



등록특허 10-2380677



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월29일  
(11) 등록번호 10-2380677  
(24) 등록일자 2022년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6895 (2018.01)

(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6895 (2018.05)  
C12Q 2600/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0128842

(22) 출원일자 2020년10월06일  
심사청구일자 2020년10월06일

(56) 선행기술조사문헌  
KR1020080077140 A  
NCBI REFERENCE SEQUENCE: XM\_004143717.2  
KR1020100133014 A  
KR102125521 B1

(73) 특허권자

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

이상협

서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 104동 201호(대치동, 대치삼성아파트)

마디 마드르 아나잔

서울특별시 광진구 능동로 209, 광개토관 1431호(군자동)

(74) 대리인

특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 9 항

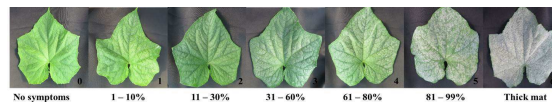
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 마커 및 이를 이용한 선별 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 마커에 관한 것으로, 본 발명 오이 흰가루병 저항성 판별용 마커 및 이를 검출할 수 있는 체제를 포함하는 조성물은 육종과정에서 오이 흰가루병에 대한 저항성을 갖는 개체를 보다 정확하게 선별할 수 있다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711115427
과제번호	2020R1A2C1008800
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	효모 이중잡종화 검사법을 활용한 오이 노균병/흰가루병 저항성
기여율	1/2
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345300115
과제번호	2017R1D1A1A02018460
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	“Effectoromics” 기반의 노균병 저항성 유전자 발굴
기여율	1/2
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.05.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 염기서열 중 2076번째 위치에 대응되는 위치의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드; 또는 서열번호 1의 염기서열 중 1456번, 1534번, 1594번, 1769번, 1770번, 1779번, 2076번 및 2220번째 위치에 대응되는 위치의 SNP를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드;를 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 마커 조성물.

#### 청구항 2

서열번호 1의 염기서열 중 2076번째 위치에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 제제를 포함하는 제제; 또는 서열번호 1의 염기서열 중 1456번, 1534번, 1594번, 1769번, 1770번, 1779번, 2076번 및 2220번째 위치에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 제제를 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 조성물.

#### 청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 제제는 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트인 것인, 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 조성물.

#### 청구항 4

청구항 2 내지 3 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 키트.

#### 청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 키트는 제한효소를 더 포함하는 것인, 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 키트.

#### 청구항 6

오이로부터 분리된 서열번호 1의 염기 서열 중 2076번째 위치에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 단계; 또는 오이로부터 분리된 서열번호 1의 염기 서열 중 1456번, 1534번, 1594번, 1769번, 1770번, 1779번, 2076번 및 2220번째 위치에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 단계;를 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별 방법.

#### 청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 검출은 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트를 이용해 증폭하는 것인, 오이 흰가루병 저항성 개체 선별 방법.

#### 청구항 8

청구항 7에 있어서, 증폭 산물을 제한효소로 절단하는 단계;를 더 포함하는, 오이 흰가루병 저항성 개체 선별

방법.

**청구항 9**

청구항 8에 있어서, 제한효소로 절단하여 얻어진 산물을 전기영동하여 크기별로 분리하는 단계;를 더 포함하는, 오이 흰가루병 저항성 개체 선별 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

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

**배경 기술**

[0003] 흰가루병(Powdery mildew, PM)은 박과식물(Cucurbit)에서 발생하는 가장 심각한 곰팡이병 중 하나이다. 흰가루병에 걸리면 식물 잎, 줄기 등의 표면에 백색 분상이 생기고, 병이 진전됨에 따라 병반이 커져 잎의 전면이 진한 백색의 포자로 덮여버린다.

[0004] 흰가루병 저항성에 대한 유전 양상은 매우 복잡하며, 구체적으로, single dominant 유전 양상부터 십 여개의 열성 유전자가 관여한다는 다양한 보고가 존재한다.

[0005] 현재까지 오이 흰가루병 저항성에 관한 연구는 QTL 분석에 관한 연구가 주류를 이루고 있다. 또한, 실제 육종 프로그램에 적용할 가치를 가진 흰가루병 저항성 유전자가 밝혀진 사례는 *CsaML08* 이라는 유전자가 유일하며, 현재 오이 육종 단계에서 *CsaML08* 유전자를 바탕으로 개발된 분자마커가 사용되고 있다. 하지만, 육종 단계에서 *CsaML08* 기반의 마커로 선별할 수 없는 흰가루병 저항성 자원이 다수 발견되고 있어 신규 마커를 연구 개발할 필요성이 있다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1733302호

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 본 발명은 오이 흰가루병 저항성 개체 판별용 마커를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 오이 흰가루병 저항성 개체 판별용 마커를 검출할 수 있는 체제를 포함하는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 오이 흰가루병 저항성 개체 판별용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 오이 흰가루병 저항성 개체 선별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

[0013] 1. 서열번호 1의 염기서열 중 1456번, 1534번, 1594번, 1769번, 1770번, 1779번, 2076번 및 2220번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 마커 조성물.

[0014] 2. 서열번호 1의 염기서열 중 1456번, 1534번, 1594번, 1769번, 1770번, 1779번, 2076번 및 2220번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 체제를 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 조성물.

- [0015] 3. 위 2에 있어서, 상기 제제는 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트인 것인, 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 조성물.
- [0016] 4. 위 2 내지 3 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 키트.
- [0017] 5. 위 4에 있어서, 상기 키트는 제한효소를 더 포함하는 것인, 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 키트.
- [0018] 6. 오이로부터 분리된 서열번호 1의 염기 서열 중 1456번, 1534번, 1594번, 1769번, 1770번, 1779번, 2076번 및 2220번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 단계;를 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별 방법.
- [0019] 7. 위 6에 있어서, 상기 검출은 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트를 이용해 증폭하는 것인, 오이 흰가루병 저항성 개체 선별 방법.
- [0020] 8. 위 7에 있어서, 증폭 산물을 제한효소로 절단하는 단계;를 더 포함하는, 오이 흰가루병 저항성 개체 선별 방법.
- [0021] 9. 위 8에 있어서, 제한효소로 절단하여 얻어진 산물을 전기영동하여 크기별로 분리하는 단계;를 더 포함하는, 오이 흰가루병 저항성 개체 선별 방법.

**발명의 효과**

[0023] 본 발명인 오이 흰가루병 저항성 판별용 마커 및 이를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 조성물은 육종 단계에서 오이 흰가루병에 대한 저항성을 갖는 개체를 보다 정확하게 선별할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0025] 도 1은 흰가루병 곰팡이의 영향을 받은 오이 잎의 면적에 기초하여 흰가루병 중증도를 분류한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 PM-저항성 벌크와 PM-이병성 벌크를 포함하는 F<sub>2</sub> 계통의 흰가루병 등급 분포를 나타낸다. 회색 화살표는 부모 계통의 흰가루병 스코어를 나타내며, 녹색 화살표는 흰가루병 저항성 벌크를 생성하기 위해 사용된 흰가루병 저항성 샘플을 나타낸다. 주황색 화살표는 흰가루병 이병성 벌크를 생성하기 위해 사용된 흰가루병 이병성 샘플을 나타낸다.
- 도 3은 F<sub>2</sub> 집단의 QTL-seq 분석을 기반으로 한 흰가루병 저항성 벌크 및 이병성 벌크의 단일 뉴클레오티드 다형성 인덱스(SNP-index) 그래프와, Δ(SNP-index) 그래프를 나타낸다(1번 염색체 내지 4번 염색체).
- 도 4는 F<sub>2</sub> 집단의 QTL-seq 분석을 기반으로 한 흰가루병 저항성 벌크 및 이병성 벌크의 단일 뉴클레오티드 다형성 인덱스(SNP-index) 그래프와, Δ(SNP-index) 그래프를 나타낸다(5번 염색체 내지 7번 염색체).
- 도 5는 오이 흰가루병 저항성과 이병성을 보이는 개체를 대상으로 흰가루병을 일으키는 병원체(*Podosphaera xanthii*)를 접종하고 12시간, 24시간, 48시간, 120시간, 168시간이 경과한 후 *CsGy5G015660* 유전자의 발현을 확인한 결과를 나타낸다. *Cs*-ACTIN 유전자의 발현은 양성 대조군으로 확인하였다.
- 도 6은 CAPS-*CsGy5G015660* 마커를 기반으로 실제 오이 F<sub>2</sub> 개체에 적용하여 저항성 표현형과 이병성 표현형을 나타내는 개체에 대한 유전형 분석 결과를 나타낸다. 324bp 및 224bp 밴드는 각각 흰가루병 저항성과 이병성 대립 유전자를 나타낸다. R-bulk와 S-bulk는 각각 극도의 흰가루병 저항성과 이병성의 표현형을 보여주는 15개의 개체이며, intermediate는 중간 표현형을 나타내는 개체이다.
- 도 7은 오이 흰가루병 저항성 유전자와 QTL을 분석한 결과를 나타낸다.
- 도 8은 5번 염색체에 존재하는 leucine-rich repeat (LRR) receptor-like serine/threonine-protein kinase RRK2를 코딩하는 *CsGy5G015660* 유전자 서열에서 흰가루병 저항성 개체와 이병성 개체 간 차이를 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 9는 흰가루병 저항성과 이병성의 *CsGy5G015660* 유전자로부터 번역된 단백질의 아미노산 서열을 나타낸다. 빨간색과 노란색 점은 각각 비동의(nonsynonymous) 및 동의(synonymous) 치환을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0026] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 중 1456번, 1534번, 1594번, 1769번, 1770번, 1779번, 2076번 및 2220번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 마커 조성물을 제공한다.
- [0027] 용어 “흰가루병 저항성”은 흰가루병을 일으키는 균(예컨대, *Podosphaera fuliginea*)에 감염되더라도 건강한 표현형을 나타내는 성질, 즉 PM에 내성을 갖는 것을 의미한다. 오이의 품종에 따라 흰가루병에 대한 저항성 또는 이병성의 정도가 상이할 수 있다.
- [0028] 서열번호 1의 염기서열은 *CsGy5G015660* 유전자 염기서열로, leucine-rich repeat(LRR) receptor-like serine/threonine-protein kinase RRK2를 암호화하는 염기서열 일 수 있다.
- [0029] 용어 “단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)”은 게놈에서 단일염기(A, T, C 또는 G)가 종의 멤버들 간 또는 한 개체(individual)의 쌍 염색체 간에 다른 경우에 발생하는 DNA 서열의 다양성을 의미한다. 단일염기는 폴리뉴클레오티드 서열에서 치환, 제거 또는 첨가될 수 있다. 단일염기다형성은 유전자의 코딩 서열, 유전자의 비-코딩 부위 또는 유전자 사이의 내부 지역(intergenic regions)에 포함될 수 있다. 코딩 영역 내에 존재하는 SNP는 유전암호의 중복성(degeneracy)으로 인해 반드시 타겟 단백질의 아미노산 서열 상에 변화를 일으키지는 않는다. 동일한 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 동의적(synonymous)이라 하고, 다른 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 비-동의적(non-synonymous)이라 한다. 비-동의적 SNP는 미스센스 또는 넌센스일 수 있다. 코딩 영역이 아닌 곳에 존재하는 SNP는 유전자 사일런싱, 전사인자 결합 또는 비-코딩 RNA 서열을 유발할 수 있다.
- [0030] 오이 흰가루병 저항성 개체와 이병성 개체는 서열번호 1로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 1456번째 염기가 각각 A 또는 G로 다르게 나타날 수 있다.
- [0031] 오이 흰가루병 저항성 개체와 이병성 개체는 서열번호 1로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 1534번째 염기가 각각 T 또는 C로 다르게 나타날 수 있다.
- [0032] 오이 흰가루병 저항성 개체와 이병성 개체는 서열번호 1로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 1594번째 염기가 각각 C 또는 T로 다르게 나타날 수 있다.
- [0033] 오이 흰가루병 저항성 개체와 이병성 개체는 서열번호 1로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 1769번째 염기가 각각 A 또는 G로 다르게 나타날 수 있다.
- [0034] 오이 흰가루병 저항성 개체와 이병성 개체는 서열번호 1로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 1770번째 염기가 각각 A 또는 T로 다르게 나타날 수 있다.
- [0035] 오이 흰가루병 저항성 개체와 이병성 개체는 서열번호 1로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 1779번째 염기가 각각 T 또는 A로 다르게 나타날 수 있다.
- [0036] 오이 흰가루병 저항성 개체와 이병성 개체는 서열번호 1로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 2076번째 염기가 각각 T 또는 C로 다르게 나타날 수 있다.
- [0037] 오이 흰가루병 저항성 개체와 이병성 개체는 서열번호 1로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 2220번째 염기가 각각 A 또는 G로 다르게 나타날 수 있다.
- [0038] 이에, 전술한 서열번호 1의 염기서열 중 1456번, 1534번, 1594번, 1769번, 1770번, 1779번, 2076번 및 2220번째 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP 종류를 확인함으로써 오이 흰가루병 저항성 개체를 판별할 수 있을 것이다.
- [0039] 용어 “대응되는 위치”는 서열을 배열(alignment)하였을 때의 대응되는 위치의 서열을 의미한다.
- [0040] 마커 조성물에 포함되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드의 길이는 검출 또는 증폭되어 확인될 수 있는 것이라면 제한되지 않는다.
- [0042] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 중 1456번, 1534번, 1594번, 1769번, 1770번, 1779번, 2076번 및 2220번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 체제를 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 조성물을 제공한다.
- [0043] 용어 “SNP를 검출하는 체제”는 시료에 포함된 해당 SNP를 확인하기 위해 사용되는 체제를 의미한다. 예컨대,

RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 유전자 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 표적 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 제제일 수 있다.

- [0044] 상기 제제는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.
- [0045] 상기 제제는 서열번호 4 및 서열번호 5;의 프라이머 세트일 수 있다.
- [0046] 상기 제제는 전술한 서열번호 1의 염기서열 중 1456번, 1534번, 1594번, 1769번, 1770번, 1779번, 2076번 및 2220번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP를 포함하는 제한효소 절단부위의 존부를 검출할 수 있다.
- [0047] 예를 들어, 상기 제제는 서열번호 1의 염기서열 중 1534번째 위치에 대응되는 위치의 SNP를 포함하는 *Hinf1* 절단부위의 존부를 검출할 수 있다.
- [0048] 예를 들어, 상기 제제는 서열번호 1의 염기서열 중 1534번째 위치에 대응되는 위치의 SNP를 포함하는 단편을 증폭시킬 수 있고, 그 후 제한효소인 *Hinf1*를 처리함으로써, *Hinf1* 절단부위의 존부를 검출할 수 있다.
- [0049] 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxylgroup)를 가지는 핵산서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 15 내지 30개의 염기로 구성된다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [0050] 용어 "프로브"는 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미한다. 프로브는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 보다 용이하게 검출하기 위하여 라벨링될 수 있다.
- [0051] 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 이러한 핵산서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0052] 본 발명에 이용되는 프라이머 또는 프로브로 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다.
- [0053] 용어 "상보적"은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 구체적으로는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [0054] 용어 "실질적으로 상보적인 서열"은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함하는 의미이다.
- [0056] 또한, 본 발명은 전술한 조성물을 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별용 키트를 제공한다.
- [0057] 본 발명 키트는 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트를 포함할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 본 발명의 키트는 선택적으로 PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다. dNTPs는 dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 포함하며, DNA 중합효소는 내열성 DNA 중합효소로서 Taq DNA 폴리머라아제, Tth DNA 폴리머라아제 등 시판되는 폴리머라아제일 수 있다.



- [0059] 본 발명 키트는 제한효소를 더 포함할 수 있다. 상기 제한효소는 EcoRI, Bsu36I, HindIII, MboII, PstI, SpeI, BamHI, MluI, AluI, DraI, PvuI, XhoI, BclI, TaqI, KpnI, MspI 및 HinfI에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 추가로, 본 발명은 오이로부터 분리된 서열번호 1의 염기 서열 중 1456번, 1534번, 1594번, 1769번, 1770번, 1779번, 2076번 및 2220번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 단계;를 포함하는 오이 흰가루병 저항성 개체 선별 방법을 제공한다.
- [0062] 상기 검출은 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 실시하여 검출하는 것일 수 있다.
- [0063] 예를 들어, 검출은 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트를 이용해 증폭하는 것일 수 있다.
- [0064] 본 발명 오이 흰가루병 저항성 개체 선별 방법은 증폭 산물을 제한효소로 절단하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0065] 예를 들어, 특정 프라이머 세트를 기반으로 PCR을 수행하여 얻어진 증폭산물을 해당 프라이머와 조합된 제한효소를 이용하여 활성 온도 내에서 처리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0066] 용어 "제한효소"는 DNA의 특정한 염기배열을 식별하고 이중사슬을 절단하는 엔도뉴클레아제로서 특수한 효소를 의미한다. 상기 제한효소는 EcoRI, Bsu36I, HindIII, MboII, PstI, SpeI, BamHI, MluI, AluI, DraI, PvuI, XhoI, BclI, TaqI, KpnI, MspI 및 HinfI에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 본 발명 오이 흰가루병 저항성 개체 선별 방법은 상기 제한효소로 절단하여 얻어진 산물을 전기영동하여 크기별로 분리하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0068] 본 발명 일 실시예에 따르면, 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트로 증폭된 산물이 HinfI 제한효소 처리에 의해 절단되어 크기가 작은 산물이 확인되면 흰가루병 이병성 개체로 선별될 수 있고, 절단되지 않아 크기가 큰 산물이 확인되면 흰가루병 저항성 개체로 선별될 수 있다(도 6 참조).
- [0070] **실시예 1 : 식물 재료 및 각 식물의 흰가루병 스코어 평가**
- [0071] F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> 및 F<sub>2</sub> 유래 F<sub>3</sub> 집단(이하, F<sub>2:3</sub>)을 생산하기 위해, 두 개의 오이 계통(inbres line)을 부모 계통(parental line; 흰가루병 저항성 부모 계통: PM-R, 흰가루병 이병성 부모 계통: PM-S로 표현)으로 사용하였다. 두 부모 계통, F<sub>1</sub> 및 F<sub>2</sub> 세대 자손은 (주)동부(대한민국 안성)로부터 제공받았다. 2016년 여름과 2017년 봄에 각각 아시아종묘(대한민국 서울)와 세종대학교의 온실에서 부모 계통, F<sub>1</sub> 및 F<sub>2</sub> 세대 자손을 재배하였다. 2017년 여름에 세종대학교(대한민국 곤지암) 온실에서 F<sub>2:3</sub> 패밀리들(1 패밀리 당 8개 식물)을 재배하였다. 정확한 흰가루병에 대한 환경 요인의 영향을 최소화하기 위해 다양한 장소와 재배 계절에서 분석을 수행하였다.
- [0072] 두 부모 계통(PM-R 및 PM-S), 그들의 F<sub>1</sub> 자손, F<sub>2</sub> 집단 및 F<sub>2:3</sub> 패밀리에 대한 흰가루병 저항성을 스크리닝 하였다. 온실 조건 하에서 자연적으로 발생하는 흰가루병의 증상은 오이를 심은지 약 60일 후에 뚜렷하게 나타났다. 각 F<sub>2</sub> 개체의 병 발생 정도를 평가하기 위해 각 잎의 감염 면적 비율과 흰가루병 포자 범위의 밀도에 따라 병 발생 지수를 분류하였다. 시각적 병발생 지수는 아래와 같다: “스코어 0” : 증상 없음(곰팡이 없음), “스코어 1” : 감염된 잎의 표면적이 1~10%인 경우, “스코어 2” : 감염된 잎의 표면적이 11~30%인 경우, “스코어 3” : 감염된 잎의 표면적이 31~60%인 경우, “스코어 4” : 감염된 잎의 표면적이 61~80%인 경우, “스코어 5” : 감염된 잎의 표면적이 81~99%인 경우, 및 “스코어 6” : 흰가루병 곰팡이로 두껍게 뒤덮인 경우(도 1 참조). 평균 병발생 지수는 3 개의 다른 개체들의 병발생 지수의 평균으로 계산하였다. F<sub>2:3</sub> 패밀리 각각에 대하여, 2017년 여름 동안 각 F<sub>3</sub> 개체별 병발생 지수를 획득하였다. F<sub>2:3</sub> 패밀리의 평균 병발생 지수는 한 패밀리 당 8 개의 F<sub>3</sub> 식물의 평균값으로 결정하였다.
- [0073] 흰가루병 저항성 부모 계통(PM resistant parental line: PM-R)은 검사 받은 기간과 환경에 영향을 받지 않고 아무런 증상을 나타내지 않아, “스코어 0”으로 평가되었다. 반면, 흰가루병 이병성 parental line(PM susceptible parental line: PM-S)은 모든 검사 기간과 환경에서 최대 질병 증상을 나타내어, “스코어 6”으로 평가되었다. F<sub>1</sub> 자손은 중간 증상을 나타내어, “스코어 3” 또는 “스코어 4”로 평가되었다.
- [0074] F<sub>2</sub> 매핑 집단에서 132개 개체의 평균 병발생 지수 분포는 스코어 0 내지 스코어 6의 범위 전반에서 연속적인 빈



도 분포를 나타내었고, 평균 스코어는 3.2 다(도 1 및 2 참조). F<sub>2:3</sub> 패밀리에서, 평균 병발생 지수 빈도 분포는 PM-R과 PM-S 양쪽 부모 쪽으로 치우쳤다. 이러한 양방향 빈도 분포는 F<sub>2:3</sub> 패밀리가 흰가루병 저항성에 대한 극단적인 두 그룹으로부터 유래되었다는 점으로부터 예측될 수 있다.

**[0076] 실시예 2 : Whole-genome re-sequencing**

**[0077]** 한 패밀리 당 8개의 개체로 구성된 F<sub>2:3</sub> 패밀리를 사용하여 F<sub>2</sub> 병발생 지수를 확인한 후, 흰가루병에 대한 극단적인 저항성을 나타내는 15개의 F<sub>2</sub> 계통과 흰가루병에 대한 극단적인 이병성을 나타내는 15개의 F<sub>2</sub> 계통을 각각 흰가루병 저항성 벌크(PM-저항성 벌크, R-Bulk)와 흰가루병 이병성 벌크(PM-이병성 벌크, S-Bulk)로 선택하였다(도 2 참조).

**[0078]** DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여, 두 부모 계통(PM-R, PM-S)과 F<sub>2</sub> 개체의 어린 잎으로부터 gDNA를 분리하였다. gDNA의 품질과 양은 제조업체의 지침에 따라 Nanodrop ND-2000 spectrophotometer를 사용해 측정하였다(Thermo Fisher Scientific, 미국). 각 개체에서 얻어진 동일한 양의 gDNA를 혼합하여 PM-저항성 벌크 및 PM-이병성 벌크를 구축하였다. Illumina HiSeq 2000 sequencer를 사용하여 두 부모 계통(PM-R 및 PM-S)과 두 벌크(R-Bulk 및 S-Bulk)의 whole-genome re-sequencing을 수행하였다.

**[0079]** 그 결과, 두 부모 계통의 게놈은 참조 게놈인 Gy14에 대하여 98.2% 및 98.61%의 게놈 커버리지를 나타내었다. 또한, PM-저항성 벌크와 PM-이병성 벌크는 참조 게놈인 Gy14에 대하여 99.05% 및 99%의 게놈 커버리지를 나타내었다. 최종적으로, F<sub>2</sub> 자손 PM-저항성 벌크와 PM-이병성 벌크 사이에서 총 224,941개의 다형성 SNP를 식별하였다.

**[0082] 실시예 3 : QTL-seq를 이용한 F<sub>2</sub> 집단의 흰가루병 저항성에 관련된 QTL의 분자 매핑**

**[0083]** 흰가루병 저항성에 관련된 QTL 영역을 확인하기 위해, 부모 PM-S 계통을 참조 게놈으로 사용하여 SNP-index 값을 계산하고 비교하였다. SNP-index 값 0은 모든 염기서열들이 완전히 PM-S 게놈에서 파생되었음을 의미하며, SNP-index 값 1은 모든 염기서열들이 완전히 PM-R 게놈에서 파생되었음을 의미한다. 각 염색체에서 10kb 증가로 2Mb 게놈 간격을 기반으로 평균 SNP-index 값을 계산하였고, 모든 염색체에 대하여 흰가루병 저항성 벌크 및 이병성 벌크를 플롯하였다(도 3A, 3B, 4A 및 4B 참조, 도 3A: 흰가루병 저항성 벌크의 1번 내지 4번 염색체 플롯 결과, 도 3B: 흰가루병 이병성 벌크의 1번 내지 4번 염색체 플롯 결과, 도 4A: 흰가루병 저항성 벌크의 5번 내지 7번 염색체 플롯 결과, 도 4B: 흰가루병 이병성 벌크의 5번 내지 7번 염색체 플롯 결과).

**[0084]** 두 벌크 사이 SNP-index의 차이를 효율적으로 감지하기 위해, 흰가루병 저항성 벌크와 흰가루병 이병성 벌크의 SNP-index 정보를 통합하여  $\Delta$  (SNP-index)를 측정하고 게놈에 따른 통계적 신뢰 구간을 플로팅하였다. 유의한 게놈 위치는 P < 0.05의 통계적 유의성에서 확인되었다.  $\Delta$  (SNP-index) 플롯을 조사하여, QTL-seq 분석에서 정의된 SNP-index 평가 기준에 따라 5번 염색체 및 6번 염색체에서 흰가루병 저항성에 대해 관련된 두 개의 중요한 게놈 영역을 확인하였다(P < 0.05)(도 3C 및 도 4C 참조). 5번 염색체 16.35 Mb 내지 24.99 Mb까지의 게놈 영역에서 평균 SNP-index 값은 흰가루병 저항성 벌크에서 0.9보다 높고 흰가루병 이병성 벌크에서 0.16보다 낮은 값을 나타내었다. 이를 통해, 흰가루병 저항성이 오이 5번 염색체의 16.35 Mb 내지 24.99 Mb 영역이 흰가루병 저항성에 관여하는 주요 QTL이라는 것을 확인할 수 있었고, 이에 따라 흰가루병 저항성에 관여하는 주요 QTL로 *pm5.2* 를 지정하였다. 유사하게, 6번 염색체 11.01 Mb 내지 12.42 Mb까지의 게놈 영역에서 평균 SNP-index 값은 PM 저항성 벌크에서 0.61보다 높고 PM-이병성 벌크에서 0.24보다 낮은 값을 나타내었다. 이를 통해 *pm6.1* 로 지정한 오이의 6번 염색체에서 11.01 Mb 내지 12.42 Mb 사이의 영역이 흰가루병 저항성에 관여하는 주요 영역이라는 것을 확인할 수 있었다.

**[0086] 실시예 4 : 흰가루병 저항성 후보 유전자 확인**

**[0087]** 2 개의 게놈 영역 *pm5.2* 및 *pm6.1*을 포함하는 PM-R 및 PM-S의 서열을 사용하여 흰가루병 저항성과 관련된 후보 유전자를 선별하였다.

**[0088]** 구체적으로, 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광도로 long-day conditions (16h/8h 명/암)의 23°C 성장상(대한 과학, 대한민국 원주)에서 두 부모 계통(PM-R 및 PM-S)을 성장시켰다. 흰가루병 분생포자(conidia)는 온실에서 자연적으로 감염된 PM-S의 잎에서 수확하였고, 포자 현탁액은 0.01% Tween-20을 사용하여 106 포자/mL<sup>-1</sup> 농도로

회색되었다. PM-R 및 PM-S 계통의 잎 표면에 흰가루병 포자 현탁액을 고르게 분사하여 인위적으로 접종하였다. 샘플을 수집할 때까지 높은 수준의 습도를 유지하기 위해, 포자가 접종된 오이를 폴리에틸렌으로 덮었다. 포자 접종 후 0, 0.5, 1, 2, 5, 및 7일(dpi)이 경과한 후 전술한 두 흰가루병 저항성 QTL 영역(*pm5.2* 및 *pm6.1*)에 위치한 선택된 후보 유전자의 발현을 확인하였다. *P. xanthii* 백색 포자가 나타나는 흰가루병의 시각적인 증상이 7dpi에서 관찰되었다. 포자 접종 후 각 시점에서, 각 식물 당 5 개의 잎을 수집하였다. 수집된 샘플을 즉시 액체질소에서 동결하였고, RNA 분리에 사용할 때까지 80°C의 온도 조건을 유지하였다. Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen, MA, USA)를 사용하여 잎 샘플로부터 Total RNA를 분리하고, Nanodrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Fisher, MA, USA)를 사용하여 분리된 RNA의 품질을 확인하였다. ReverTra Ace qPCR RT Master Mix kit (Toyobo, Osaka, Japan)의 지침에 따라 5 µg의 total RNA로부터 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. 유전자 발현 분석에 사용된 프라이머는 Geneious Pro 9.1.8 (Biomatters, Auckland, New Zealand)을 사용하여 설계하였다. 후보 유전자 *CsGy5G015660*를 검출하기 위해 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머를 사용하였다(표 1 참조).

표 1

[0089]

QTL	Genes ID	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>pm5.2</i>	<i>CsGy5G015660</i>	TGCTACAACATGTCGGGTCT (서열번호 2)	TCTCCACGACTTGCTTCATTG (서열번호 3)	296
-	<i>Cs-Actin</i>	CCTCATTGGAATGGAAGCTGC (서열번호 6)	GAAGCACTTCTGTGGACGATG (서열번호 7)	350

[0090]

EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa, Seoul, Korea)를 이용해 RT-PCR 반응 혼합물(20 µL)을 준비하였고, Bio-Rad T100™ Thermocycler (BioRad, CA, USA)에서 증폭을 수행하였다. 사용된 증폭 프로그램은 아래와 같다: 94° C 에서 5분, 이어서 30~36 사이클(94°C에서 20초, 56 ~ 63°C에서 10초, 72°C에서 20초), 최종 사이클 72°C에서 5분. PCR 증폭물은 2% 아가로오스 겔(0.5 x TBE 버퍼)에서 시각화되었고, RedSafe를 사용하여 염색하였다. 참조 대조군으로 ACTIN 유전자를 사용하였다.

[0091]

Gy14 게놈 서열 및 주석 파일 (버전 2.0; <http://cucurbitgenomics.org/>)을 다운로드하여 *pm5.2* 및 *pm6.1*의 유전자 간 서열을 식별하는 데 사용하였다. 다형성의 보존을 확인하기 위해, PM-R 및 PM-S 서열 사이에 다형성을 나타내는 모든 유전자 서열을 추가 저항성 계통(Gy14 및 PI288995) 및 이병성 계통(WMEJ, PI173892 및 PI267942)에 재-정렬 하였고, 이들 계통 중에서 보존된 다형성을 나타내는 유전자를 선별하였다. 그 후, 아래 두 조건 중 하나가 충족되면 후보 흰가루병 저항성 유전자로 선택하였다: 1) NCBI 데이터베이스의 서열 유사성 검색을 수행하여 결정된 추정되는 기능을 기반으로 하여 식물 스트레스 방어 반응에 관여했다는 강한 증거가 있는 경우 2) 다형성 서열이 넌센스 돌연변이를 유도하는 경우. 마지막으로, RT-PCR을 이용하여 선택된 유전자들의 PM-R 및 PM-S 사이에서 발현 차이를 확인하였다.

[0092]

Gy14 참조 게놈 (version 2.0)에 대한 주석에 기초하면, 5번 염색체의 *pm5.2* 영역에는 552개의 추정 유전자 (putative gene)가 포함되어 있다. 이들 중 48개의 유전자가 두 부모 계통 사이에서 다형성을 나타내는 것으로 확인되었고, 그 중 37개 유전자는 비동의적 돌연변이(nonsynonymous mutation)였고, 나머지 11 개는 넌센스 돌연변이(nonsense mutation)였다. 총 17 개의 후보 유전자를 선택하고 RT-PCR 분석을 통해 전사체의 발현 수준을 조사하였다. 그 결과, 1, 2, 5 및 7 dpi(days post inoculation)에서 PM-R 계통에서 LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RPK2를 암호화하는 *CsGy5G015660* 유전자가 뚜렷한 전사체 발현을 나타낸 것을 확인하였다(도 5 참조).

[0093]

6번 염색체의 *pm6.1* 영역에는 122개의 추정 유전자가 포함되어 있는 것으로 알려져 있으며, 이들 중 32개의 유전자가 두 부모 계통인 PM-R과 PM-S 사이에서 다형성을 나타내었다. 5번 염색체의 *pm5.2* 영역에서 검출된 유전자와 달리, 6번 염색체에서 분석된 유전자는 어느 것도 PM-R과 PM-S 계통 사이에서 유의한 전사 수준 차이가 나타나지 않았다.

[0094]

위 결과를 통해, *CsGy5G015660* 유전자를 흰가루병 저항성 개체를 선별할 수 있는 마커로 선택하였다.

[0096]

**실시예 5 : 실제 오이 개체에 흰가루병 저항성 개체 선별 마커의 적용**

[0097]

흰가루병 저항성에 대한 *CsGy5G015660* 유전자의 관여를 확인하기 위해 CAPS 마커 CAPS\_ CsGy5G015660을 개발하였

다. CAPS\_CsGy5G015660 마커 서열은 하기 표 2에 기재하였다.

표 2

[0098]

Name of Markers	Marker types	Restriction enzyme	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
CAPS_CsGy5G015660	CAPS	<i>Hinf1</i>	GCAACAAGTTCAATGGACCAC (서열번호 4)	GAATCTCTCCAGTCAAATTGTTCC (서열번호 5)

[0099]

CAPS\_CsGy5G015660 마커를 사용하여 40개의 F<sub>2</sub> 계통[저항성 15개, 이병성 15개, 중간 저항성 계통 10개(질병 등급 3 또는 4)]과 동오 씨드(대한민국 이천)에서 제공하는 근교계 계통 35개에 적용하였다. 구체적으로, Maxime PCR PreMix (Intron Bio, Seoul, Korea)를 사용하여 PCR 반응 혼합물(20 μL)을 준비하고 Bio-Rad T100™ Thermocycler (BioRad, CA, USA)에서 증폭을 수행하였다. 샘플은 다음 반응 프로그램을 이용하여 증폭하였다: 5분 동안 94℃, 이어서 20초 동안 94℃, 10초 동안 60℃, 20초 동안 72℃의 35 사이클, 5분 동안 72℃ 최종 사이클 수행. *Hinf1*을 PCR 증폭물에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 최종 반응 생성물을 2% 아가로스 겔(0.5×TBE 버퍼)에서 RedSafe로 시각화하였다.

[0100]

CAPS\_CsGy5G015660을 사용하여 F<sub>2</sub> 계통의 유전형질을 분석한 결과, 중간 저항성 표현형 또는 이병성 표현형을 가진 25개의 F<sub>2</sub> 개체는 이병성 동형접합 밴드 (224bp) 또는 이병성/저항성 이형접합 밴드 (224bp 및 324bp) 나타내었다(도 6 참조).

[0101]

흰가루병 저항성 표현형을 가진 15개의 F<sub>2</sub> 개체는 대부분 저항성 동형접합 밴드(324bp)를 나타내었다. 저항성 표현형을 가진 15 개의 개체 중 3개는 저항성 밴드(324bp)와 이병성 밴드(224bp)를 모두 나타내는 이형접합 밴드를 나타내었다. 즉, CAPS\_CsGy5G015660 마커의 사용에 따른 유전자형 분석결과가 표현형과 7.5% 정도의 불일치를 나타내었다. 이에, PM-R과 PM-S 사이에 다형성을 나타내고 *CsGy5G015660* 유전자의 양쪽에서 각각 최대 1628 및 280 kb 정도 떨어진 곳에 위치하는 4개의 유전자(*CsGy5G014630*, *CsGy5G015650*, *CsGy5G015780* 및 *CsGy5G015880*)를 이용해 표현형과 유전자형 사이 일치 여부를 추가적으로 확인하였다. 그러나, *P. xanthii* 접종 후 이들 유전자의 발현 패턴은 PM-R과 PM-S 간에 차이를 보이지 않았다. 이를 통해, 유전자형과 표현형이 100% 일치하는 것은 아니지만, *CsGy5G015660* 유전자가 흰가루병 저항성 개체를 선별할 수 있는 강력한 후보 유전자라는 것을 확인할 수 있었다.

[0102]

CAPS\_CsGy5G015660 마커를 사용하여 35개의 근교계 계통(inbred line)을 스크리닝한 결과를 아래 표 4에 나타내었다(31개 계통: 흰가루병 저항성 표현형, 4개의 계통: 흰가루병 이병성 표현형). 구체적으로, 이병성 표현형을 나타내는 4개의 계통은 모두 이형접합 밴드(표 4에 H로 표현)를 나타내어 유전자형과 표현형이 일치하였다. 한편, 저항성 표현형을 나타내는 31개의 계통 중 4개의 계통(12.9%)에서 이형접합 밴드가 나타났다. 즉, 스크리닝을 통해 CAPS\_CsGy5G015660 마커가 근교계 계통의 흰가루병 저항성을 87.1%의 정확도로 선별할 수 있다는 것을 확인하였다. 추가로, 동일한 35개의 근교계 계통을 공지된 *CsaML08* 기반 Indel 마커를 사용하여 스크리닝하였다. 사용한 PCR 시약은 전술한 바와 동일하다. 샘플은 다음 반응 프로그램을 사용하여 증폭하였다: 5분 동안 94℃, 이어서 20초 동안 94℃, 20초 동안 65℃, 2분 동안 72℃의 30 사이클, 5분 동안 72℃ 최종 사이클 수행. *CsaML08* 기반 Indel 마커 서열은 하기 표 3에 기재하였다. *CsGy5G015660*과 *CsaML08* 두 유전자는 8.8Mb 떨어져서 위치하는 바, 흰가루병 저항성에 독립적으로 관여하는 것으로 볼 수 있다(도 7 참조).

표 3

[0103]

Name of Markers	Marker types	Forward primer(5' to 3')	Reverse primer(5' to 3')
<i>CsaML08</i> *	INDEL	TATGGCTGCCTTCATCTCCT (서열번호 8)	ATATCTCAACTCGCTGATGGAACAA (서열번호 9)

표 4

[0104]

Inbred line No.	PM phenotype	Generation*	CAPS_CsGy5G015660	<i>CsaML08</i> ^
1	R	6	R	R

2	R	6	R	R
3	R	6	R	R
4	R	6	R	R
5	R	6	R	R
6	R	6	R	R
7	R	6	R	R
8	R	6	R	R
9	R	6	R	-
10	R	6	R	R
11	R	6	R	R
12	R	6	R	R
13	R	6	R	R
14	R	6	R	R
15	R	6	R	R
16	R	6	R	R
17	R	6	R	R
18	R	5	R	R
19	R	5	R	R
20	R	5	R	R
21	R	5	R	-
22	R	5	R	R
23	R	5	R	R
24	R	5	R	R
25	R	5	R	R
26	R	5	R	-
27	R	4	R	R
28	R	4	H	R
29	S	4	H	S
30	S	4	H	S
31	S	4	H	S
32	S	4	H	S
33	R	4	H	S
34	R	4	H	R
35	R	4	H	-

[0105] 표 4에서 “-” 는 *CsaML08* 기반 마커를 사용하여 PCR 증폭이 검출되지 않음을 나타낸다. “Inbred line No.” 는 육종회사의 육종계통 번호를 나타낸다. “Generation\*” 은 육종 계통의 교배세대를 나타낸다. “R(Resistance)” 은 표현형과 유전자형이 흰가루병 저항성을 따른다는 것을 나타내며, “S(Susceptible)” 는 표현형과 유전자형이 흰가루병 이병성을 따른다는 것을 나타내고, “H(Hetero)” 는 근교계 계통이 R과 S 대립유전자를 모두 갖는 것을 나타낸다.

[0106] 위 표 4와 같이, CAPS\_CsGy5G015660 마커를 이용한 경우 대부분의 근교계 계통의 흰가루병 저항성에 대한 검출이 가능하였으나, 공지된 *CsaML08* 마커를 이용한 경우 일부 계통의 유전자형을 판별할 수 없었다. 이를 통해 CAPS\_CsGy5G015660 마커는 100% 정확도를 나타내지는 않으나, 공지된 *CsaML08* 마커로 선별될 수 없는 계통의 흰가루병 저항성 개체를 선별할 수 있었다(표 4의 Inbred line No. 9, 21, 26).

[0107] 즉, 본 발명 마커는 흰가루병 저항성 개체를 높은 확률로 정확하게 선별할 수 있으며, 특히 공지된 다른 종류의 마커로 선별하기 어려운 개체도 정확하게 선별해낼 수 있다. 따라서, 본 발명 마커는 육종과정에서 흰가루병 저항성 개체를 선별하기 위한 마커로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

[0109] **실시예 6 : SNP 마커 선별**

[0110] 115개(48개 accessions: PM-R, 67개 accessions: PM-S) 오이 핵심집단의 서열을 사용하여 *CsGy5G015660* 유전자의 자연적 변이를 평가하였다. 재-시퀀싱 된 115개의 accessions(SRA0506480)의 모든 서열은 NCBI short read archive에서 다운로드하여 Geneious Pro 9.1.8(뉴질랜드 오클랜드 소재의 Biomatters)로 분석하였다. 서열 정렬은 참조 서열로 사용 된 *CsGy5G015660*과 함께 " Map to reference" 기능을 사용하여 수행하였다. *CsGy5G015660*과 115개의 오이 accessions의 짧은 읽기 서열 사이의 정렬을 기반으로, *CsGy5G015660* 대립 유전

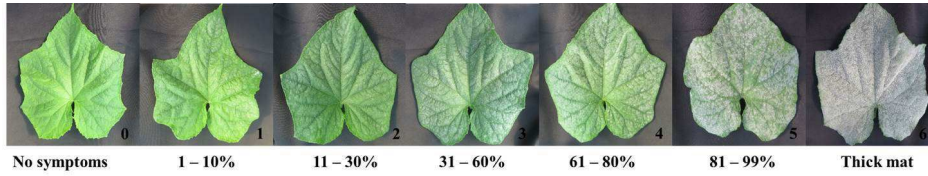
자에서 8개의 SNP의 자연적 변이를 확인하였다.

[0111]

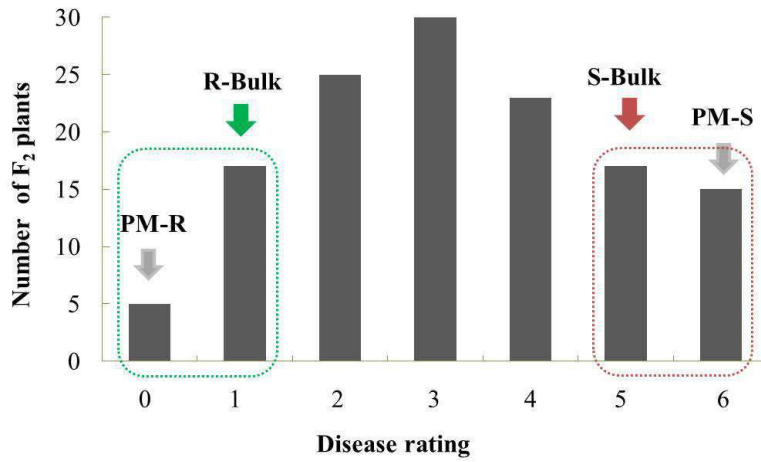
즉, *CsGy5G015660* 유전자의 코딩 서열에서 8개의 SNP 유전자좌(1456, 1534, 1594, 1769, 1770, 1779, 2076 및 2220)는 PM-R과 PM-S 사이에서 차이를 나타내었다(도 8 참조). 8개 중 4개의 SNP는 *CsGy5G015660* 단백질의 비동시적 돌연변이를 유발하는 것으로 확인되었다(도 9 참조).

도면

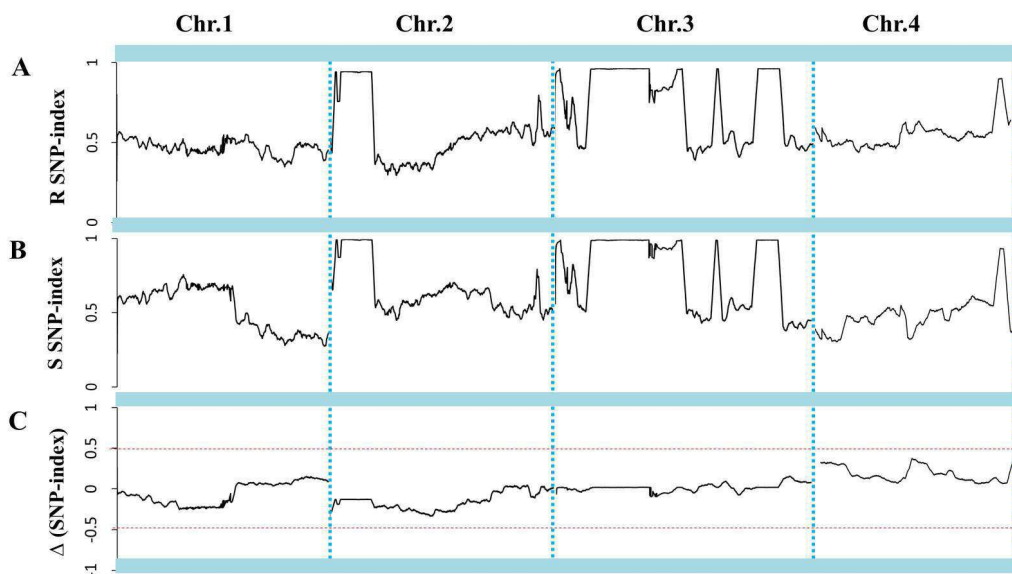
도면1



도면2

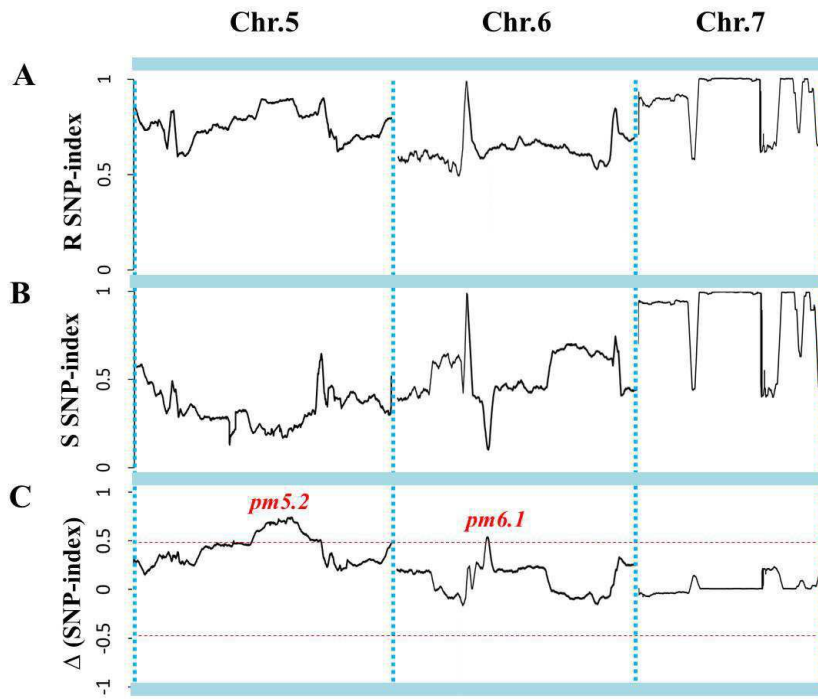


도면3

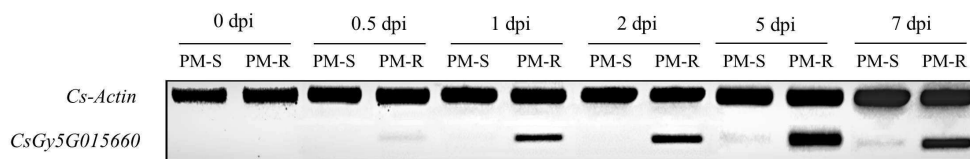




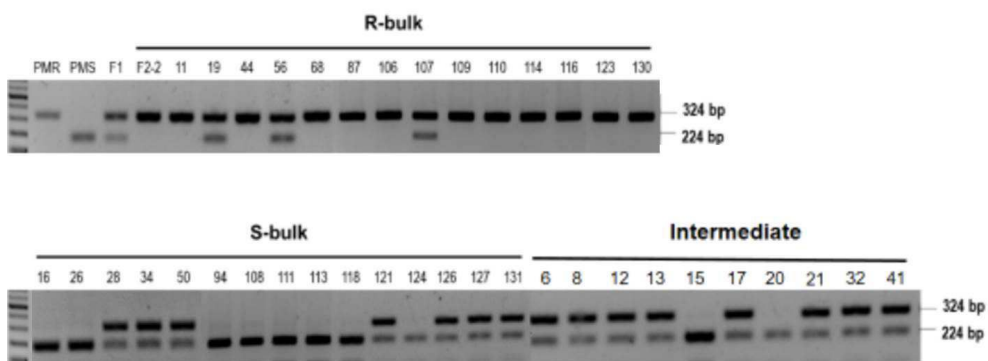
도면4



도면5



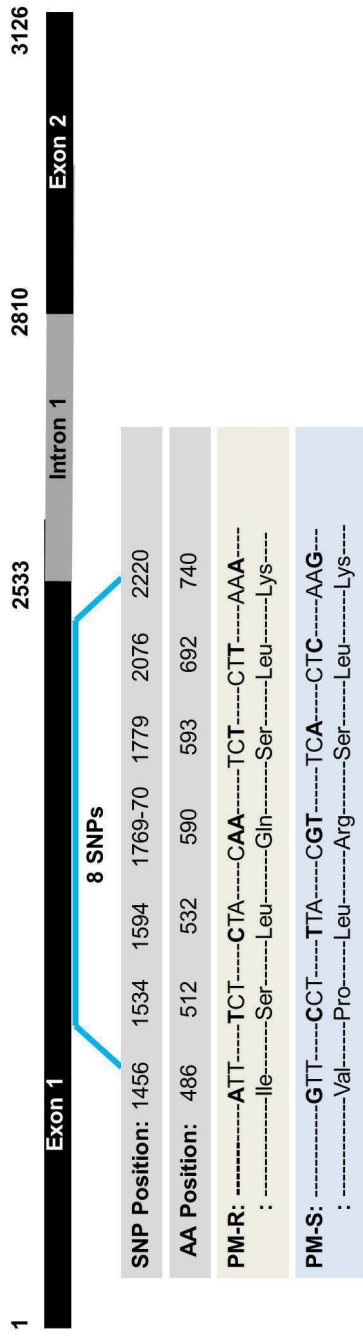
도면6



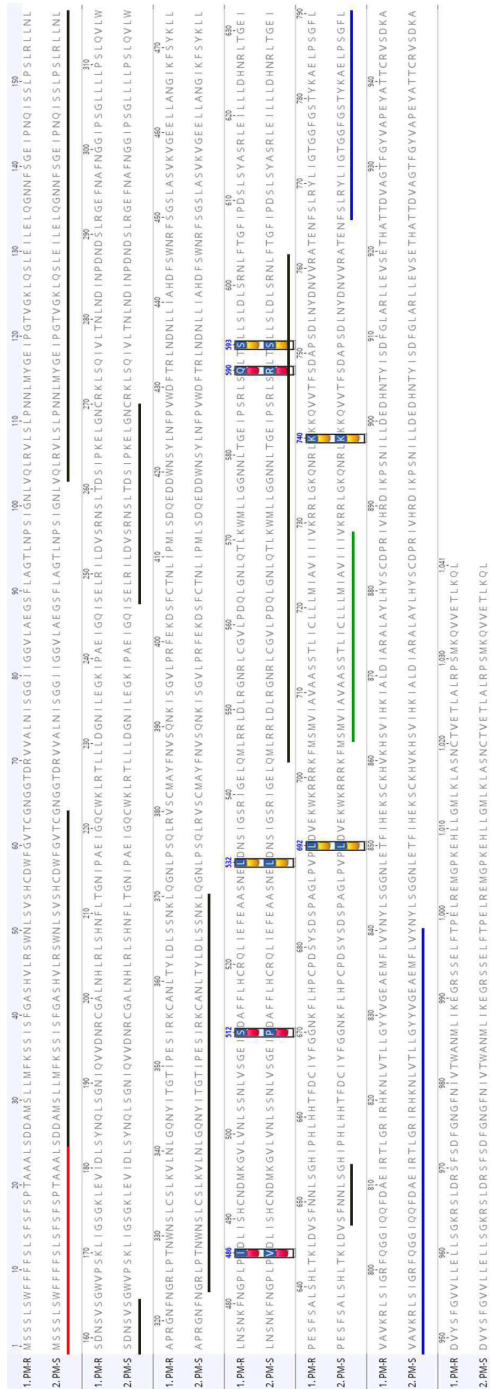




도면8



도면9



서열목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> Marker for selection of powdery mildew resistance cucumber and selection method using the same marker
- <130> 20P08037
- <160> 9
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 2850

<212> DNA

<213> Cucumis sativus

<400> 1

atgtcttctt ctctttcatg gttcttcttc ttctctctct cttctcttt ttcccctacc	60
gccgcgcgcc ttccgacga tgcaatgtcg ctactcatgt ttaaaagctc ctttctttc	120
ggtgcttctc atgttcttcg tagttggaat ttgtcggttt ctactgcga ttggtttggt	180
gttacttgcg gtaatggtgg tacggataga gtagtggcgc tgaatattag tggaggtatt	240
attggtgggt ttctggcggg gggttctttt ctggctggga cgttgaatcc gtcgattgga	300
aatcttgttc agcttcgtgt ttgtcgtt cccaataatt tgatgtacgg ggagattccc	360
gggactgttg gtaagcttca gtcgttagag attcttgagc ttcaggggaa caacttctct	420
ggtgagattc cgaatcagat aagctcactt ccactctcc gcttgcttaa tttgtctgat	480
aactcggttt cgggttgggt tccgagtaa ttgattggtt cgggaaaatt agaagtaatt	540
gatttgcgt acaatcaatt atctggtaat attcaagttg ttgataatag atgtgtgct	600
ttgaatcatt tgaggctttc gcataatfff ctgactggta acattccagc ggagattgga	660
caatgttggg aactcaggac tctgttactc gatgggaata tattagaggg gaaaattccg	720
gctgagatcg gccaaatac agaactcaga attcttgatg tttctaggaa tagccttact	780
gattcgattc caaaagagct tggtaattgc cggaaattgt cacagatcgt gttaacgaat	840
ttgaacgata tcaatcccga taacgatagt ttaagaggag aattcaacgc cttcaatgga	900
ggtattcctt ctgggttgtt attgcttcca agtctacaag ttttgtgggc acccagaggg	960
aattttaatg gaagattgcc gactaattgg aattctttat gctcgttaa agttcttaat	1020
ttagggcaaa attatatac tggtaaccata cccgaatcga ttcggaaatg tgcgaatcta	1080
acttacttgg attatcttc aaacaagctt caaggtaac ttccttcca gcttcgagtt	1140
tcatgtatgg cgtatttcaa tgttagccag acaaaaattt ctggtgttct tcccagattt	1200
gagaaagaca gttttgtac gaacttgatt cccatgttat ctgatcagga agacgattgg	1260
aattcttact taaattttcc tgtttgggat ttcacgagac taaatgataa tctcctaatt	1320
gctcatgatt ttagctggaa taggtttagt ggtcattag cttcagtcaa agtgggagaa	1380
gagcttttgg ctaatggcat taagttctcg tacaactgc ttctaatag caacaagttc	1440
aatggaccac ttcccattga tctgatctcg cattgtaacg atatgaaagg tgttttggtt	1500
aacttgagtt caaacttagt atcaggtgag atttctgatg cttttttct ccattgtcga	1560
caattaattg agtttgaggc agcaagcaat gaactagata actcgattgg atctcgaatt	1620

ggtgaattgc agatgcttcg tcgtcttgac ttgagagga atagattgtg tggagtttta 1680  
 cctgatcagt tggggaattt gcaaaccttg aatgggatgc ttttgggggg aaacaatttg 1740  
 actggagaga ttccatctcg acttagtcaa ttgacttctc tcttgagttt agatctttct 1800  
 cgaaacttgt ttactggctt tatcccggac agcttgcac atgcttcgag acttgagatt 1860  
  
 ctgttgcttg atcataacag gttaactggg gaaataccag aatctttctc tgcactctca 1920  
 catctcacta aattagatgt gtcttttaac aacctttctg gccacattcc tcactttcac 1980  
 cacacgtttg actgcattta ctttggtagg aataagtttc ttcacatg cccagattca 2040  
 tactctgatt cccctgctgg acttccagt cctcttgatg ttgagaagt gaagagacga 2100  
 agaaagtta tgcacatgt aatcctgta gctgcttct caacactaat ttgcttactc 2160  
 ttaatgatag ctgtcatcat cattgttaag agaaggcttg gtaacaaaa taggttaaaa 2220  
 aagaaacaag tggttacttt ctcatagct ccttccgac tgaattatga taatgtagtc 2280  
  
 cgagctaccg aaaatttcag ccttcgttac ctaatcggta caggtaggctt cggatcaaca 2340  
 taaaaagctg aactgcctc aggtttctg gttgctgtaa agagattgtc cattggtagg 2400  
 tttcaaggag ggattcaaca attcgacgca gagattcgaa cattaggaag aatacgacac 2460  
 aaaaactc taactctct cgggtactac gtcggagagg ctgaaatgtt cttagtttac 2520  
 aactatctt ctgaatatgc tacaacatgt cgggtctcgg ataaagccga tgtttatagc 2580  
 tttggagttg tgctactaga gttgctttct ggaaaaagat cccttgatcg atccttttcc 2640  
 gactttggga atggatttaa cattgttaca tgggcaata tgctgatcaa ggaaggtcgt 2700  
  
 tcttctgagc ttttcactcc tgaacttca gaaatgggac ctaaggaaca ctacttggga 2760  
 atgttaaac ttgctctaa ttgcacagt gaaactctgg cacttcgacc gtcaatgaag 2820  
 caagtcgtgg agacactgaa acagttgtaa 2850  
  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CsGy5G015660\_forward primer  
 <400> 2  
 tgctacaaca tgcgggtct 20  
 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CsGy5G015660\_reverse primer

<400> 3

tctccacgac ttgcttcatt g 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAPS\_CsGy5G015660\_forward primer

<400> 4

gcaacaagtt caatggacca c 21

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAPS\_CsGy5G015660\_reverse primer

<400> 5

gaatctctcc agtcaaattg tttcc 25

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cs-Actin\_forward primer

<400> 6

cctcattgga atggaagctg c 21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cs-Actin\_reverse primer

<400> 7

gaagcacttc ctgtggacga tg 22

<210> 8



<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Indel\_CsaML08\_forward primer

<400> 8

tatggctgcc tttcatctcc t

21

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Indel\_CsaML08\_reverse primer

<400> 9

atatcttcaa ctcgctgatg gaaacaa

27