



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월02일
(11) 등록번호 10-2369882
(24) 등록일자 2022년02월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2600/13 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0126604
- (22) 출원일자 2020년09월29일
심사청구일자 2020년09월29일
- (56) 선행기술조사문헌
Bing Li et al., Scientia Horticulturae, 220, p.160-167, 2017.*
(뒷면에 계속)
- (73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
- (72) 발명자
김현욱
서울특별시 중랑구 용마산로129가길 41, 102동 901호(신내동, 영풍마드레빌)
황성빈
서울특별시 송파구 송파대로28길 27, 102동 910호 (가락동, 송파성원쌍떼빌)
최유리
서울특별시 광진구 군자로15길 16(군자동)
- (74) 대리인
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 7 항

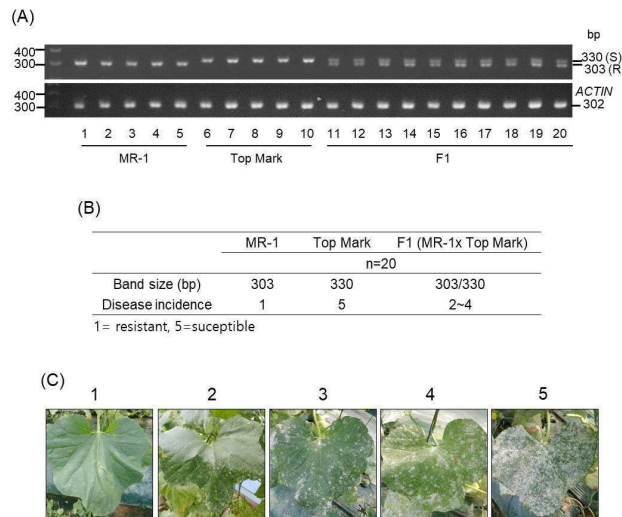
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **흰가루병 저항성 멜론 품종 식별용 분자 마커 및 이를 이용한 식별 방법**

(57) 요약

본 발명은 흰가루병 저항성 MR-1 멜론 품종 선별할 수 있는 신규한 InDel에 대한 분자 마커 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 InDel에 대한 분자 마커를 이용할 경우, 흰가루병에 대해 저항성을 가지는 멜론 품종을 조기에 선별하여 단기간 내에 우량품종을 개발할 수 있다.

대표도 - 도3



(56) 선행기술조사문헌

Fernando J Yuste-Lisbona et al., Theor. Appl. Genet., 122(4), p.747-758, 2011.*

GENBANK ACCESSION NO. LN713266 (2015.03.05)*

WO2019185945 A1

US10772273 B2

KR1020090011741 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545018769
과제번호	316087044SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농생명산업기술개발(R&D)
연구과제명	박과작물 육종지원을 위한 내병성 유전자마커 개발 및 적용 연구
기여율	50/100
과제수행기관명	세종대학교산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395063465
과제번호	PJ013185022020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명	카멜리나의 식용 적합 지방산조성 변경 연구
기여율	25/100
과제수행기관명	세종대학교산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545021802
과제번호	319107042SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농생명산업기술개발(R&D)
연구과제명	생명공학기술을 활용한 고기능성 들깨 개발
기여율	25/100
과제수행기관명	세종대학교산학협력단
연구기간	2020.02.20 ~ 2021.02.19

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열 중 116~124번째와 238~257번째 염기에 위치하는 InDel을 검출하는 제제를 포함하는, MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론 중 흰가루병 저항성 멜론 선별용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 자손 세대 멜론은 MR-1 멜론 품종과 그 이외 품종의 교배 품종 또는 이외 자손 세대 멜론인, MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론 중 흰가루병 저항성 멜론 선별용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프라이머인, MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론 중 흰가루병 저항성 멜론 선별용 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론 중 흰가루병 저항성 멜론 선별용 키트.

청구항 5

MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론의 gDNA에서 서열번호 1의 116~124번째 및 238~257번째 염기 서열에 대응되는 염기 서열의 존재를 확인하는 단계를 포함하는, 흰가루병 저항성 멜론 품종 선별 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 염기 서열의 존재 확인은 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머로 상기 gDNA에서 서열번호 1에 대응되는 염기 서열을 증폭시켜, 그 증폭 산물의 크기를 확인함으로써 수행되는, 흰가루병 저항성 멜론 품종 선별 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 대응되는 염기 서열이 존재하지 않으면, 해당 멜론을 흰가루병 저항성 멜론으로 선별하는 단계를 더 포함하는, 흰가루병 저항성 멜론 품종 선별 방법.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 흰가루병 저항성 멜론 품종 식별용 분자 마커 및 이를 이용한 식별 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 식물의 품종간 구분은 여러 가지 목적에 따라 필요한 연구이다. 예를 들면, 국제식물신품종보호동맹 UPOV(International Union for the Protection of New Varieties of Plant)의 설립 이후 품종보호권 설정은 종자 회사와 육종가의 큰 관심사가 되었고, UPOV의 회원국인 우리나라 또한 품종보호를 위하여 품종구분에 객관적인 기준을 설정 혹은 수치화하는 계량화의 필요성을 인식하게 되었다.
- [0004] 일반적인 품종 구분은 표현형에 근거하여 구분되어 왔다. 하지만 표현형은 환경요인에 많은 영향을 받기 때문에 통계적으로 많은 실험을 요구한다. 또한 품종간 구별에 있어 표현형은 객관적 기준이 불분명하고 체감적인 차이를 반영하지 못한다. 이런 어려움을 극복하기 위해 DNA 분자 마커를 개발하기 시작했다.
- [0005] DNA 분자 마커는 RFLP(restriction fragment length polymorphism), RAPD(random amplified polymorphic DNA), SSR(simple sequence repeat), SNP(Single-nucleotide polymorphism) 등 여러 가지 종류가 있다. 이중에 SNP 마커는 DNA 염기 변이 형태의 가장 흔한 유형이며 다형성 마커 개발에 높은 성공의 결과를 나타내는 방법 중 하나이다.
- [0006] 본 발명은 MR-1 멜론 특이적으로 흰가루병 저항성과 연관된 분자표지에 관한 것으로, 박과 작물인 멜론은 1970년대 농가에 처음 보급된 이래로 연간 총 재배면적이 98년 550ha 정도에서 현재 약 1000ha로 증가 추세에 있고, 생산량은 일반적으로 3,570kg/10ha이다. 현재 국민의 기호가 다양해지고 멜론에 대한 인지도가 높아지고 있으므로 앞으로 좀 더 대중적인 소비가 이루어질 것으로 예측된다. 멜론 재배에 있어, 가장 큰 병해의 하나가 흰가루병이다. 멜론 흰가루병(powdery mildew)의 병원균은 스파이로테카 풀리지니아(*Sphaerotheca fuliginea*)이며, 자낭각 형태로 월동하며 포자는 바람이나 곤충에 의해 전염되므로 효과적인 방제가 어렵고, 일단 발병하면 20~40% 이상의 생산량 저하를 초래한다. 흰가루병의 방제를 위한 방법으로 화학적 방제법과 자연 친화적 방제법이 사용되고 있는데, 주로 이용되고 있는 화학적 방제법 즉, 살균제를 이용한 방제방법은 방제 효과가 낮고 약제에 대한 내성을 가지는 새로운 병원균의 발생 가능성을 높이는 것으로 보고되고 있다. 또한 자연친화적인 방제법으로는 천적 미생물이나 생화학물을 이용한 생물학적 방제법이 있지만 효율이 높지 않으므로 현실점에서 효과적인 방제법을 찾기가 어려운 실정이다.
- [0007] 이러한 상황에서 멜론의 흰가루병 방제를 위한 가장 효과적인 방법은 저항성 품종을 육성하는 것으로 인식되고 있고, 그 필요성이 증대되고 있다. 멜론의 흰가루병 저항성 품종을 육성하기 위해서는 저항성 검정 방법이 확립되어야 하지만, 진정활물기생균으로 증식하는 이 병원균은 발병조건이 까다롭고, 발병시키기 위해서는 포장의 자연환경 조건하에서 발병을 유도해야 하므로 실질적으로 저항성 품종을 육성하기 위해서는 막대한 노력과 시간이 소요된다. 그러나 분자표지를 이용하여 저항성 품종을 육성할 경우, 환경 요인의 영향이나 관여하는 유전자의 유전양식에 따른 제한이 없어 정확한 표현형 선발이 가능하고, 유묘기에 선발이 가능하기 때문에 흰가루병과 같은 개화기 이후에 발병하는 형질의 경우, 그 경제적인 효과가 굉장히 높다. 또한, 멜론의 흰가루병 저항성과 같이 환경적인 요인에 영향을 많이 받고 유전자의 작용이 복잡한 양적형질의 경우, 분자마커의 개발과 이를 이용한 저항성 품종 육성이 필수요건으로 보고되고 있으므로, 멜론의 흰가루병 저항성 품종을 육성하기 위해 저항성과 연관된 분자마커의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1714764호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 흰가루병 저항성 MR-1 멜론 품종 선별용 분자 마커(BSA12-LI3ECORI)를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열(BSA12-LI3ECORI) 프라이머를 포함하는 흰가루병 저항성 MR-1 멜론 품종 선별용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열(BSA12-LI3ECORI) 프라이머를 포함하는 흰가루병 저항성 MR-1 멜론 품종 선별

용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열(BSA12-LI3ECORI) 프라이머를 이용하여 증폭한 PCR 산물에 EcoRI 제한효소를 처리하여 특정 길이로 잘린 것을 확인하는 단계를 포함하는 흰가루병 저항성 MR-1 멜론 품종 선별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 1. 서열번호 1의 염기서열 중 116~124번째와 238~257번째 염기에 위치하는 InDel을 검출하는 제제를 포함하는, MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론 중 흰가루병 저항성 멜론 선별용 조성물.
- [0016] 2. 위 1에 있어서, 상기 자손 세대 멜론은 MR-1 멜론 품종과 그 이외 품종의 교배 품종 또는 이의 자손 세대 멜론인, MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론 중 흰가루병 저항성 멜론 선별용 조성물.
- [0017] 3. 위 1에 있어서, 상기 제제는 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프라이머인, MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론 중 흰가루병 저항성 멜론 선별용 조성물.
- [0018] 4. 위 1 내지 3 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론 중 흰가루병 저항성 멜론 선별용 키트.
- [0019] 5. MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론의 gDNA에서 서열번호 1의 116~124번째와 238~257번째 염기 서열에 대응되는 염기 서열의 존재를 확인하는 단계를 포함하는, 흰가루병 저항성 멜론 품종 선별 방법.
- [0020] 6. 위 5에 있어서, 상기 염기 서열의 존재 확인은 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머로 상기 gDNA에서 서열번호 1에 대응되는 염기 서열을 증폭시켜, 그 증폭 산물의 크기를 확인함으로써 수행되는, 흰가루병 저항성 멜론 품종 선별 방법.
- [0021] 7. 위 5에 있어서, 상기 대응되는 염기 서열이 존재하지 않으면, 해당 멜론을 흰가루병 저항성 멜론으로 선별하는 단계를 더 포함하는, 흰가루병 저항성 멜론 품종 선별 방법.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따른 분자 마커를 통해 흰가루병 저항성을 가진 MR-1 멜론 품종을 효율적으로 선별할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 따른 프라이머를 포함하는 흰가루병 저항성을 가진 MR-1 멜론 품종 선별용 조성물 또는 선별용 키트를 이용함으로써 흰가루병 저항성을 가진 MR-1 멜론 품종을 효율적으로 선별할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 BSA12-LI3ECORI CAPS 마커를 이용한 PCR 전기영동과 제한 효소 EcoRI이 처리된 PCR 생성물을 나타낸 것이다. 도 1의 (A)는 흰가루병 감수성 계통 (S1, S2)과 흰가루병 저항성 계통 (R1~R13)의 gDNA를 추출한 뒤, CAPS 마커를 이용하여 PCR한 결과(838bp의 밴드)이고, 도 1의 (B)는 PCR 생성물에 제한효소 EcoRI을 3시간동안 처리 후, S2(Top Mark)와 R4(MR-1) 두 계통 사이 차이 나는 밴드를 확인한 결과이다.

도 2는 인텔 분자마커를 이용하여 흰가루병 저항성과 감수성을 판별한 결과를 나타낸 것이다. 도 2의 (A)는 MR-1 인텔 분자마커는 멜론 DNA PCR 결과 흰가루병 저항성은 303bp 밴드, 감수성은 330bp, 그리고 이 둘간의 교배종 (F1)에선 두 개의 밴드를 나타낸다. 도 2의 (B)는 303bp 밴드는 흰가루병 저항성 (C의 1과 같은 무병징), 330bp 밴드는 감수성 (C의 5와 같은 병징), 303/330bp 밴드는 중도저항성을 나타낸다. (C의 2-4와 같은 병징) 도2의 (C)는 멜론 잎의 흰가루병 병징 정도를 1-5로 표시한 것이다. (1은 저항성, 5는 감수성)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0029] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 중 116~124번째와 238~257번째 염기에 위치하는 2곳의 중요 InDel을 검출하는 제제를 포함하는, MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론 중 흰가루병 저항성 멜론 선별용 조성물을 제공한다.
- [0030] 서열번호 1은 멜론 (*Cucumis melo*)의 게놈 염색체 12번의 22,804,440 ~ 22,805,117번째 염기서열에 해당한다.
- [0031] 서열번호 1의 염기서열 중 116~124번째 염기는 “AAATAATTT” 이고 238~257번째 염기는 “GTCAATATTT(C/T)AAGTCATA” 이며, MR-1 멜론 품종에서는 결실되어 있는 염기서열에 해당한다. MR-1 멜론 품종에

서는 12번 염색체 쌍 모두에서 상기 염기 서열에 대응되는 서열이 결실되어 있다.

- [0032] InDel은 Insertion/Deletion 마커로, 생물의 DNA의 염기배열에서 일부 염기가 중간에 삽입되거나(insertion) 결실된(deletion) 변이를 총칭하며, 이는 예를 들어, 서로 다른 종 또는 품종간에 유전체 정보를 비교하여 염기가 삽입 또는 결실된 영역을 찾고, 그 정보를 바탕으로 프라이머를 제작한 뒤 PCR 기술을 이용하여 DNA를 증폭시키고 그 패턴을 분석함으로써 특정 품종을 식별할 수 있다.
- [0033] 흰가루병은 흰가루병의 병원균 또는 흰가루병균에 감염에 의해 나타나는 병해로, 구체적으로는 병원균 포도스파에라 크산티이(*Podospaera xanthii*), 골로비노마이세스 시초라세아룸(*Golovinomyces cichoracearum*) 등에 의한 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 흰가루병 저항성은, 예컨대 「흰가루병 내성」이라고도 하며, 상기 저항성은, 예를 들어 흰가루병균의 감염에 의한 병해의 발생 및 진행에 대한 저해능 또는 억제능을 의미하며, 구체적으로는 병해의 미발생, 발생한 병해의 진행 정지 및 발생한 병해의 진행 억제를 의미한다.
- [0035] 본 발명의 조성물은 MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론을 대상으로 하여 그 흰가루병 저항성 여부를 선별할 수 있다.
- [0036] MR-1 멜론 품종은 12번 염색체 쌍 모두에서 상기 2곳의 InDel 부분이 결실되어 있으므로 흰가루병 저항성인 것이고, 그 자손 세대 멜론의 경우 부모로부터 유전된 12번째 상동 염색체간에 상기 InDel 부분이 결실되어 있을 수도 있고, 그렇지 않을 수도 있으며, 이는 각 염색체 쌍마다 적용되는 것이므로, 그 자손 세대 멜론에서 상기 InDel을 검출하여 그 존재를 확인함으로써 흰가루병 저항성 여부를 확인할 수 있다.
- [0037] 상기 자손 세대 멜론은 MR-1 멜론 품종과 그 이외 품종을 교배하여 얻은 F₁ 집단, F₁을 자가 수정하거나 어느 멜론 품종과 교배하여 얻은 F₂ 집단, 또는 F₂ 이후의 교배를 통해 얻은 집단을 의미한다.
- [0038] 상기 제제는 상기 InDel을 검출할 수 있는 것이라면 그 종류는 제한되지 않으며, 예를 들면 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프라이머일 수 있다. 서열번호 2는 서열번호 1의 116~124번째와 238~257번째 염기에 위치하는 InDel을 검출할 수 있는 정방향 프라이머 서열을, 서열번호 3은 서열번호 1의 116~124번째와 238~257번째 염기에 위치하는 InDel을 검출할 수 있는 역방향 프라이머 서열에 해당한다.
- [0040] 또한, 본 발명은 MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론의 gDNA에서 서열번호 1의 116~124번째 및 238~257번째 염기 서열에 대응되는 염기 서열의 존재를 확인하는 단계를 포함하는, 흰가루병 저항성 멜론 품종 선별 방법을 제공한다.
- [0041] MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론의 예시는 전술한 바와 같다.
- [0042] MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론은 MR-1 품종에서와 같이 상기 InDel 부분이 결실되어 있을 수도 있고, 그렇지 않을 수도 있으며, 이는 각 염색체마다 상이할 수 있다. 따라서, MR-1 멜론 품종의 자손 세대 멜론의 gDNA에서 서열번호 1의 116~124번째 및 238~257번째 염기 서열에 대응되는 염기 서열의 존재를 확인함으로써 흰가루병 저항성 여부를 확인할 수 있다.
- [0043] 서열번호 1의 116~124번째 및 238~257번째 염기 서열에 대응되는 염기 서열은 InDel 부분의 염기 서열에 대응되는 염기 서열을 의미하는 것으로서, 상기 InDel 부분 염기가 삽입되어 있는 멜론은 상기 염기 서열에 대응되는 염기 서열이 서열번호 1의 116~124번째 및 238~257번째 염기 서열의 서열과 동일하고, 상기 InDel 부분 염기가 결실되어 있는 멜론은 서열번호 1의 서열과 얼라인(aligned)하였을 때 상기 InDel 부분이 결실되어, 해당 위치의 염기가 서열번호 1의 116~124번째 및 238~257번째 염기 서열과 상이하다.
- [0044] 염기 서열의 존재 확인은 당 분야에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 예를 들면 서열번호 1에 대응되는 염기 서열을 증폭시켜 그 증폭산물의 크기를 확인함으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머를 사용할 수 있고, 보다 구체적으로는 그 증폭 산물의 크기가 303bp 또는 330bp인 것을 확인하여, 증폭 산물의 크기가 303bp이면 서열번호 1의 116~124번째 및 238~257번째 염기 서열에 대응되는 염기 서열이 존재하지 않는다고 판단할 수 있다.
- [0045] 그리고, 상기 대응되는 염기 서열이 존재하지 않으면, 해당 멜론을 흰가루병 저항성 멜론으로 선별할 수 있다.
- [0046] 구체적으로, 서열번호 1의 116~124번째 및 238~257번째 염기 서열에 대응되는 염기 서열은 대상 멜론에서 1개의 염색체에만 존재할 수도 있고, 2개 염색체 모두에 존재할 수도 있고, 2개 염색체 모두에서 존재하지 않을 수도

있다.

[0047] 상기 대응되는 염기 서열이 존재하지 않을수록 보다 강한 흰가루병 저항성을 갖는 것으로서, 2개 염색체 모두에 상기 대응되는 염기 서열이 존재하지 않으면 그 품종은 MR-1과 대응되는 수준의 높은 흰가루병 저항성을 갖는다고 판단할 수 있고, 1개 염색체에만 상기 대응되는 염기 서열이 존재하지 않으면 그 품종은 중간 수준의 흰가루병 저항성을 갖는다고 판단할 수 있으며, 2개 염색체 모두에 상기 대응되는 염기 서열이 존재한다면 그 품종은 흰가루병 저항성을 갖지 않는다(흰가루병 감수성)고 판단할 수 있다.

[0049] **실시예**

[0050] **실시예 1. 재료 및 방법**

[0051] **(1) 식물 재료**

[0052] 흰가루병에 내성이 있는 멜론 계열- MR-1 (Ames8578), Edisto47 (NSL34600), PMR5 (Ames26809), PMR6 (Ames26810), PMR45 (NSL113039), PMR45 (Ames26811), TGR1151 (PI482420), VIR5682 (PI313970), VIR5682 (NS12002), 2563 (PI124111), 2564 (PI12412), LJ90234 (PI414723), D-2 Resistant (Ames18738) 및 내성이 없는 Top Mark 멜론은 미국 국립 식물 유전자원 센터에서 입수하였다. 흰가루병에 취약한 IranH 멜론 종자는 대한민국의 농촌진흥청 유전자원센터에서 입수했다.

[0053] **(2) 게놈 DNA 분리**

[0054] 13개의 내성 품종과 2개의 감수성 계통의 종자에서 자란 어린 식물에서 멜론 게놈 DNA를 분리하였다. 게놈 DNA는 DNA 추출 버퍼 (50mM Tris-HCl, 20mM EDTA)를 사용하여 추출하였다. 우선, 100mg의 샘플 잎을 액체 질소로 분쇄한 후, 2mL tube에 담긴 시료에 1 밀리리터의 추출 버퍼와 66 µL의 10 % SDS를 넣고 30분간 65 °C에서 혼합하였다. 300 µL의 3M 아세트산 나트륨 (pH 5.2)을 첨가한 후 혼합물이 담긴 튜브를 얼음에 50분간 방치하고 고속 원심 분리를 사용하여 9330X g에서 20분 동안 원심 분리하였다. 800 µL의 상청액을 새로운 2mL 튜브로 옮기고 동일한 부피의 이소프로판올 (IPA)을 첨가했다. 상기 튜브를 -80 °C에서 10 분 동안 동결시키고, 원심 분리 후 펠렛을 분리하고 상청액은 제거하였다. 700 µL의 70 % EtOH를 사용하여 펠렛을 2회 행구고, 최종적으로는 펠렛을 멸균 증류수에 녹여 게놈 DNA를 획득하였다.

[0055] **(3) CAPS 마커에 대한 PCR 분석, 제한효소 처리 및 DNA 서열 분석**

[0056] 멜론 라인의 PCR 분석을 위해 2개의 CAPS 마커 (BSA12_LI3ECORI 및 BSA12-LI4HINFI; MR-1에 대한 PM 내성 유전자좌인 BpM12.1과 연결됨)가 사용되었다. BSA12_LI3ECORI에 대한 정방향 프라이머 (5'-TGCCTTTAGTGGGAGTAGTTCAT-3', 서열번호 4) 및 역방향 프라이머 (5'-TGTAGTGCTCCAACATTTAG-3', 서열번호 5), BSA12-LI4HINFI에 대한 정방향 프라이머 (5'-GGATACAACAGATTAAGCAGGT-3', 서열번호 6) 및 역방향 프라이머 (5'-TCAAGCGAAGATATTGAGCAA-3', 서열번호 7)를 사용하였다 (Li et al.에 보고된 뉴클레오티드 서열 정보를 사용하여 합성). 게놈 DNA-PCR은 CAPS 마커 쌍 0.75 µM, dNTP 250 µM 및 5유닛의 NEXpro™ e Taq DNA 중합 효소 (Focus Bioscience)와 1X 반응 버퍼를 혼합물을 사용하여 100ng의 멜론 DNA에서 수행되었다. PCR은 95°C에서 5분, 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분의 조건으로 수행되었다. 5 µL의 PCR 산물을 EcoRI 또는 HinfI 제한 효소로 3시간 처리한 후 아가로스 젤 전기 영동을 통해 흰가루병 내성 또는 감수성 멜론 라인 사이에 차이가 있는지 확인하였고, PCR 밴드는 젤에서 분리하여 Sanger DNA 서열 분석을 수행하였다.

[0057] **(4) InDel 마커 디자인 및 PCR 분석**

[0058] InDel 마커 프라이머는 BSA12_LI3ECORI CAPS 마커에 의한 PCR 산물의 염기 서열을 기반으로 구성하였다 (정방향 프라이머 (서열번호 2): 5'-AATCTATCCCAAATCAAAGTC-3', 역방향 프라이머 (서열번호 3): 5'-AAGTTATATTGGTCTAGAAGTTT-3'). (도 2B). PCR 반응은 프라이머 0.5M, dNTP 250M, 1x 반응 버퍼, 5유닛 NEXpro™ e Taq DNA (Focus Bioscience) 및 100ng의 멜론 DNA를 혼합하여 수행하였다. PCR 반응은 95°C에서 5분, 95°C에서 30초, 49°C에서 30초, 72°C에서 30초, 72°C에서 5분으로 수행되었고, 총 20 µL PCR 산물 중 5 µL은 전기 영동을 실시하여 밴드를 확인하였다.

[0059] **(5) MR-1과 Top Mark의 교배 및 흰가루병 테스트**

[0060] 부모 세대로 MR-1과 Top Mark를 수분하여 수확한 F1 세대는 MR-1 및 Top Mark와 동일한 조건에서 발아 및 재배되었다. 부모 세대 (MR-1 및 Top Mark)와 F1 세대는 자발적인 흰가루병을 유발하기 위해 온도는 25-30°C상대 습도는 60~70%의 조건을 갖춘 플라스틱 온실에서 재배하였다. 이 후 흰가루병 증상을 확인하여, 감염 수준을 기준

의 보고된 기준에 따라 1~5 등급으로 분류하였다. 클래스 1에는 증상이 없고(0%), 등급 2, 3, 4는 각각 낮음(10%), 중간(10~25%) 및 중증 감염(25~50%) 정도를 나타내며, 클래스 5는 전체 잎(50~100%)이 감염된 정도를 나타낸다(도 3C).

[0061] 실시예 2. 실험 결과

[0062] (1) 멜론 품종별 CAPS 마커의 PCR 다형성 분석

[0063] MR-1의 PM 저항성의 주요 QTL인 BpM12.1은 CAPS 마커 BSA12-LI3ECORI 및 BSA12-LI4HINF1 사이에 각각 0.02 cM 및 0.28 cM 간격으로 위치한다고 보고되었다(도 1A). CAPS 마커 BSA12-LI3ECORI 및 BSA12-LI4HINF1(도 1B)의 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여, 두 개의 PM 민감성 멜론 품종(IranH 및 Top Mark) 및 13개의 흰가루병 내성 품종(Edisto47, PMR5, PMR6, MR-1), TGR1551, VIR5682, 2563, 2564, VIR5682, PMR45 [NSL113039], PMR45 [Ames26811], LJ9-234 및 D2 Resistant)의 PCR 산물 사이즈를 확인하였다(도 1C). BSA12-LI4HINF1 및 BSA12-LI3ECORI 및 의 PCR 산물에 각각 Hinf1 및 EcoR1 제한효소를 처리하여 길이 다형성을 확인했다(도 1D, E).

[0064] BSA12-LI4HINF1 CAPS 마커를 사용한 경우, 15개 모든 품종에서 약 525bp의 PCR 밴드를 보이는 것을 확인했다(도 1D 위). Hinf1를 처리한 경우, S1 (IranH), R1 (Edisto47), R2 (PMR5), R3 (PMR6) 및 R5 (TGR1551)는 절단되지 않은 것을 확인했고, 이를 제외한 나머지 10개 품종 모두에서 동일한 351bp 및 174bp 밴드를 확인하였다(도 1D 아래). 이러한 결과는 BSA12-LI4HINF1 CAPS 마커가 PM 내성과 감수성 라인 사이 및 MR-1에 대한 특정 다형성을 나타내지 않음을 나타낸다.

[0065] 다른 CAPS 마커인 BSA12-LI3ECORI의 경우, 15개 라인 모두에서 약 840bp에 해당하는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다(도 1E 위). EcoR1 제한 효소로 PCR 산물을 처리한 결과, IranH를 제외한 나머지 14개 품종에서 절단된 388bp 밴드와 450bp 밴드를 보이는 것을 확인하였다. 13개의 내성 품종 중 R4 (MR-1) 및 R7 (2563) 품종은 450bp 보다 작은 크기의 다형성 밴드를 나타내었고, R7은 R4의 부모(MR-1 라인)에 해당하므로 동일한 패턴을 보였다(도 1E 아래). 이러한 결과는 BSA12-LI3ECORI CAPS 마커가 MR-1 특이적임을 의미한다.

[0066] 또한 BSA12-LI3ECORI CAPS 마커가 0.2cM에 위치한 BpM12.1 흰가루병 저항성 QTL에 가깝기 때문에 이 마커 자체가 BpM12.1 저항성 마커로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

[0067] (2) PCR 생산물의 염기서열 분석

[0068] 2개 PM 감수성 및 13개 내성 멜론 품종에서 분리된 DNA를 BSA12-LI3ECORI CAPS 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 증폭시킨 후, 680bp에 해당하는 PCR 산물의 염기서열을 분석하였다(도 2A). 뉴클레오티드 서열은 멜론 DNA에 고도로 보존된 AT-풍부 영역이며 오픈 리딩 프레임(ORF) 영역이 없는 비 코딩 서열이다. R4 (MR-1)와 R7 (MR-1의 부모)에서는 3개 영역에서 총 36~37bp가 제거되어 있다. 116~124bp 위치의 "AAATAATTT" 9개 뉴클레오티드, 238~257bp 위치의 "GT(C/T)AATATTT(C/T)AAGTCCATA" 20개 뉴클레오티드 및 504~512bp 위치의 "CTTGATTA" 8개 또는 9개 뉴클레오티드가 제거되어 있다.

[0069] EcoRI 인식 서열 "GAATTC"는 S1 (IranH) 품종을 제외한 모든 품종의 PCR 산물 384~390bp에 존재한다(도 2A). 즉, IranH 품종을 제외하고 BSA12-LI3ECORI CAPS 프라이머를 이용한 PCR 산물은 EcoRI 위치에서 두 개의 밴드로 나타났다(도 1E 아래). EcoRI 기준으로 MR-1에서 28bp 결실로 업스트림 부분에 해당하는 밴드는 362bp로, IranH를 제외한 나머지 품종에는 28bp가 존재하는 390bp 밴드로 표시되었다. 결론적으로, 우리는 MR-1 품종에서 BSA12-LI3ECORI CAPS 마커 영역에는 다른 PM 감수성 및 내성 품종에는 없는 특정 결실이 있음을 발견했다. BSA12-LI3ECORI CAPS 마커 영역의 뉴클레오티드 서열로 구성된 계통 발생 트리는 15개의 멜론 품종을 3개의 계통군으로 나누었다. 계통군 I에는 PM 민감성 품종(S1 (IranH) 및 S2 (Top Mark)) 및 PM 내성 품종(R10 (PMR45_NSL113039), R11 (PMR45_Ames26811), (R13) D-2 Resistant 및 (R12) LJ90234)이 포함되었다. Top Mark(PM 민감성 품종)와 PMR45(저항성 품종)는 매우 높은 유전적 유사성을 나타낸다. 계통군 II에는 PM 내성 라인 R2 (PMR5), R3 (PMR6), R6 (VIR5682), R5 (TGR1151) 및 R8 (2564_PI12412)이 포함되었고, 계통군 III에는 MR-1의 부모 세대인 R4 (MR-1) 및 R7 (2563)이 포함되었다. 계통 발생학적 분석은 MR1의 PM 저항성 QTL 인 BpM12.1 유전자좌가 진화 초기에 다른 PM 저항성 멜론 품종의 유전자와 분리되었음을 시사한다. 계통 발생 트리에 있는 13개의 PM 내성 멜론 품종 중 PMR45, Edisto47, PMR5, PI12412, MR-1은 흰가루병 중독 식별에 사용된다. 이 멜론은 8개의 *Podosphaera xanthii* 종족(1, N1, N2, 5 A, S, O, 및 N5)에 대한 저항성과 감수성의 차이를 보여준다. PMR45는 종족 N2, 5, S, O 및 N5에, Edisto47은 종족 5, O 및 N5에 취약하고, PMR5 및 PI122412는 종족 O에만 취약하다. MR-1은 이 종족 8개 모두에 대해 내성이 있지만 S와 O 종족에 대해서는 약간만

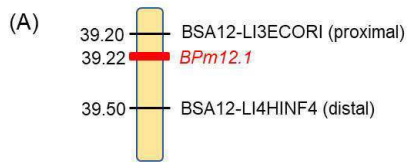
내성이 있다. 종합하면, BSA12-LI3ECOR1 CAPS 마커 영역의 뉴클레오타이드 서열에 의한 계통 분화는 PM 품종에 대한 특이적 내성에 유사한 경향을 보여준다.

[0070] (3) BSA12-LI3ECOR1에 기초한 InDel 마커 디자인 및 평가

[0071] MR-1의 PM 내성과 관련된 BSA12-LI3ECOR1 CAPS 마커 대신 PCR 제품 크기의 차이를 통해 다형성을 보다 쉽게 식별할 수 있는 InDel PCR 마커가 개발되었다. MR-1 품종의 경우, EcoR1 사이트의 특정 상위 영역에 총 28bp 결실이 존재한다. 그래서 이 부분의 크기를 구별할 수 있는 PCR 프라이머 (도 2B)를 사용하여 총 14개의 멜론 품종에서 PCR을 수행했을 때, MR-1 만이 303bp의 작은 크기를 가진 밴드를 특이적으로 나타내고, 나머지 흰가루병 감수성 및 내성 품종은 더 큰 사이즈인 330bp의 PCR 밴드를 나타낸다 (도 2C). 이러한 결과는 새로 설계된 InDel PCR 프라이머가 BSA12-LI3ECOR1 CAPS 마커를 대체할 수 있음을 의미한다. 실제로 InDel PCR 마커는 PM 내성 MR-1에서는 303bp 밴드를, PM-민감성 Top Mark에서 330bp 밴드를 나타낸다. 두 품종을 교차하여 얻은 F1은 330 및 303 bp의 두 밴드를 나타낸다 (도 3A). 자연 발생 PM을 사용한 테스트 결과 MR-1은 Class 1 (PM 내성), Top Mark는 Class 5 (PM 민감성) 이었다. 그러나 F1은 PM, Classes 2-4 (도 3B)에 대해 중간 정도의 저항을 나타내었다. F1의 중간 저항은 종족 S 또는 O가 자연발생적으로 다른 종족과 동시에 발생했을 가능성을 시사한다. 이러한 결과는 InDel PCR 마커가 MR-1 PM 내성과 관련이 있고 BPm12.1 PM 내성 유전자가 마커 근처에 존재함을 시사한다. 본 연구에서 개발된 InDel PCR 마커는 PM 내성 QTL 유전자좌 인 BPm12.1 위치에서 왼쪽으로 0.2 cM에 위치한다. BSA12-LI3ECOR1과 BSA12-LI4HINFI CAPS 마커 영역 사이에는 78kb가 있으며 Cucumis melo L. cv. 멜론 참조 계통인 DHL92에 12개의 유전자가 있다. 앞으로는 MR-1 멜론에서 12개의 후보 유전자 중 BPm12.1 유전자좌를 찾는 것이 남아있다.

도면

도면1

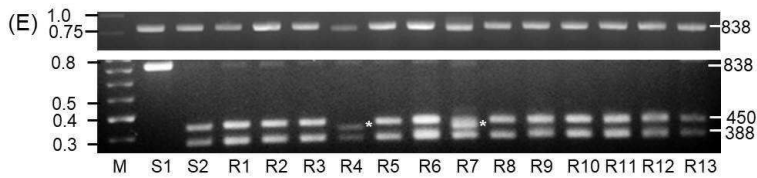
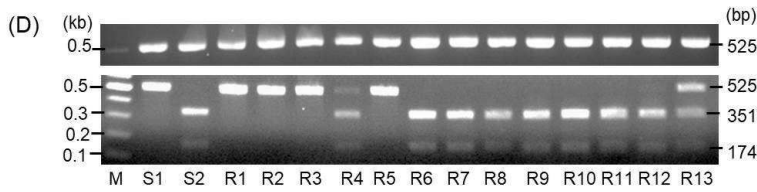


(B)

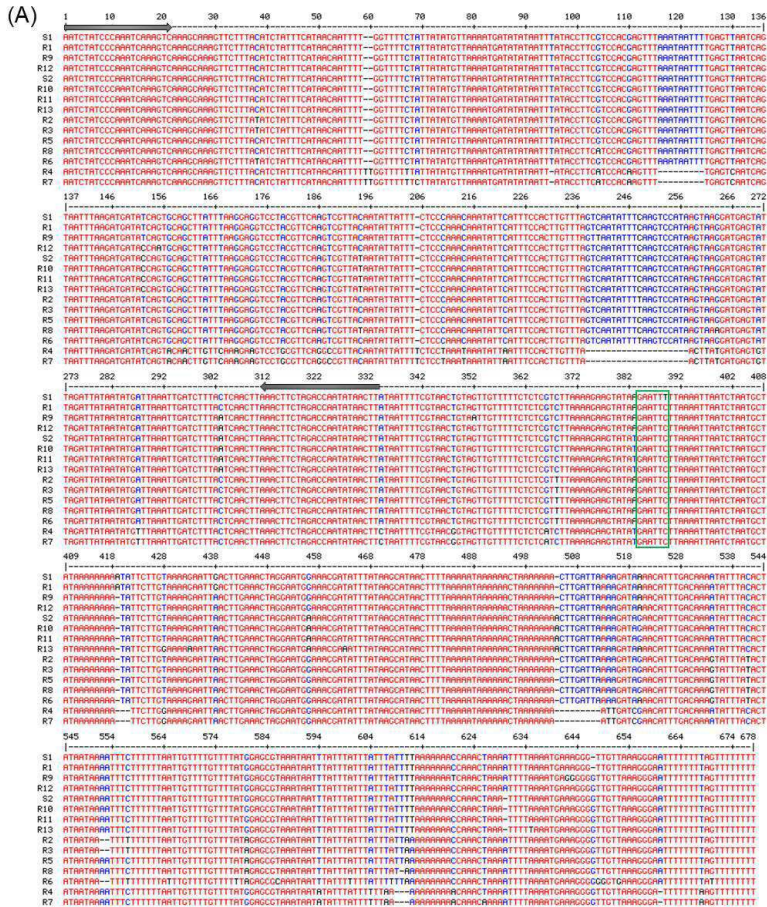
Marker	Primers	Restriction enzyme	Digested length polymorphism (bp)
<i>BSA12-LI4HINF1</i>	F:GGATACAACACGATTAAGCAGGT R:TCAAGGCGAAGATATTGAGCAA	<i>HinfI</i>	174/351
<i>BSA12-LI3ECORI</i>	F:TGCCTTTAGTGGGAGTTCAT R:TGTAGTGCTCTCCAACACATTAG	<i>EcoRI</i>	450/388

(C)

Symbol	Common name	ID
S1	IranH	
S2	TopMark	NSL30032
R1	Edisto47	NSL34600
R2	PMR5	Ames26809
R3	PMR6	Ames26810
R4	MR1	Ames8578
R5	TGR1551	PI482420
R6	VIR5682	PI313970
R7	2563	PI124111
R8	2564	PI124112
R9	VIR5682	PI315410
R10	PMR45	NSL113039
R11	PMR45	Ames26811
R12	LJ90234	PI414723
R13	D-2 Resistant	Ames18738

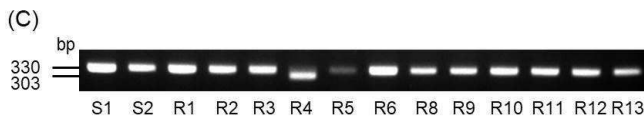


도면2

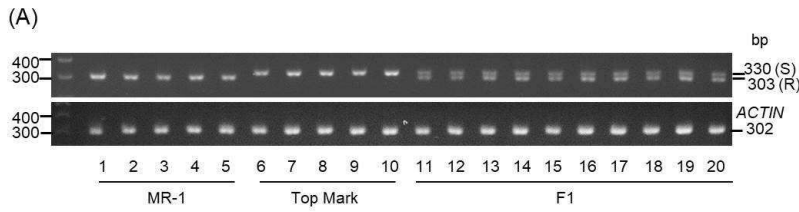


(B)

Name	Forward	Reverse	Susceptible	Resistance
MR-1 PCR	AATCTATCCAAATCAAAGTC	AAGTTATATTGGCTAGAAGTTT	330bp	303bp



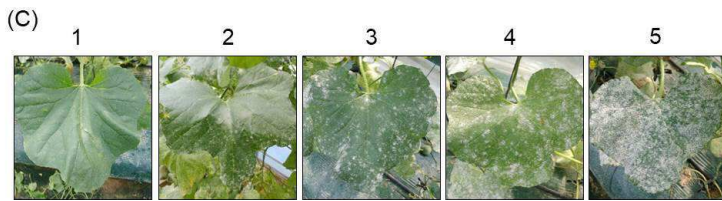
도면3



(B)

	MR-1	Top Mark	F1 (MR-1x Top Mark)
	n=20		
Band size (bp)	303	330	303/330
Disease incidence	1	5	2~4

1= resistant, 5=suceptible



서열 목록

<110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION

<120> Molecular marker for identification of melon resistant to powdery mildew and identification method using the same marker

<130> 20P08013

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 678

<212> DNA

<213> Cucumis melo

<220><221> allele

<222> (1)..(678)

<223> n is a blank

<400> 1

aatctatccc aatcaaaagt caaagcaaag ttctttacat ctatttcata acaanntttt 60

ggttttctat tatatgttaa aatgatatat aatttatacc ttctgccagc agtttaata 120

atthtgagtt aatcagtaat ttaagatgat atcagtgacg cttatttaag gaggtcctac 180

gttcaagtcg ttacaatatt atttntctcc aaacaaatat tcatttcac ttgtttagtc 240

aatatttcaa gtccataagt aaggatgagt attagattat aatagatta aattgatctt 300
 tactcaactt aaacttctag accaatataa cttataatct tcgtaactgt agttgttttt 360
 ctctcgtctt aaaagaagta taagaatctt taaaattaat ctaatgctat aaaaaaaaaat 420
 attcttgtaa aagaattgac ttgaaactag gaatggaaac gatatttata agcataactt 480
 ttaaaaaata aaaactaaaa aaancttgat taaaagataa aacatttgac aaaatattta 540

cactataata aaatttcttt tttaattggt ttgttttatg gagcgtaaat aatttattta 600
 tttatttatt ttaaaaaaac caaactaaaa ttttaaatg aaaggnttg ttaaagggaa 660
 ttttttttag tttttttt 678

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence
 <400> 2

aatctatccc aaatcaaagt c 21

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><
 223> primer sequence
 <400> 3

aagttatatt ggtctagaag ttt 23

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence
 <400> 4

tgcccttagt gggagtagtt cat 23

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence
 <400> 5
 tgtagtgctc caacatttag 20
 <
 210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence
 <400> 6
 ggatacaaca cgattaagca ggt 23
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence
 <400> 7
 tcaaggcgaa gatattgagc aa 22