



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월05일
(11) 등록번호 10-2235298
(24) 등록일자 2021년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/6895 (2018.01) C12Q 1/683 (2018.01)
(52) CPC특허분류 C12Q 1/6895 (2018.05) C12Q 1/683 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0142455
(22) 출원일자 2019년11월08일
심사청구일자 2019년11월08일
(65) 공개번호 10-2020-0057632
(43) 공개일자 2020년05월26일
(30) 우선권주장 1020180141998 2018년11월16일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌 KR1020170080130 A
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 6 항

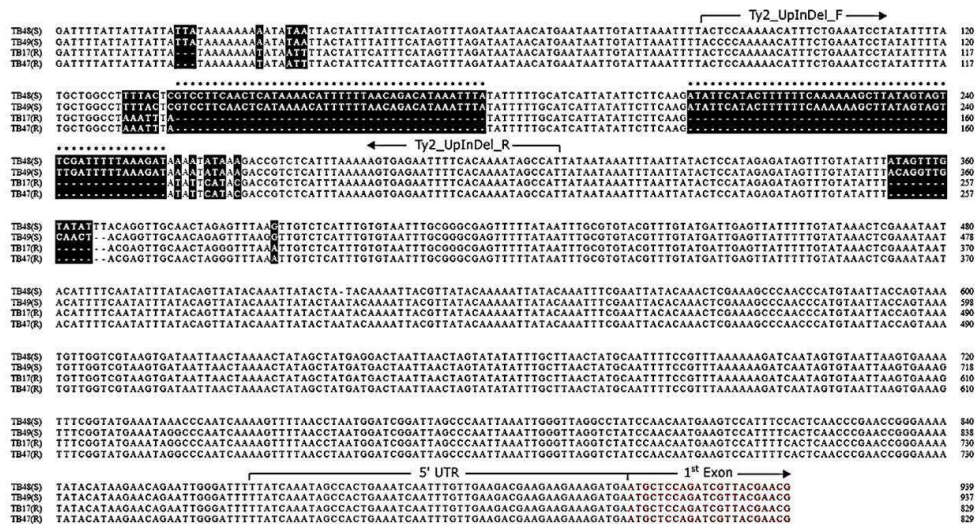
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커 및 이를 이용한 판별 방법

(57) 요약

본 발명은 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커 및 이를 이용한 판별 방법에 관한 것으로 본 발명의 마커 및 이를 검출 또는 증폭할 수 있는 체제를 이용하면 신속하고 정확한 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 2521/301 (2013.01)

C12Q 2565/125 (2013.01)

C12Q 2600/13 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

GENBANK ACCESSION NO. CP023767

KR1020180037731 A

KR1020150110120 A

KR1020160139509 A

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395053951

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)

연구과제명 Post-GWAS 연구를 통한 토마토 유전체육종 기반 구축

기 여 율 1/1

과제수행기관명 세종대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 Ty-2 유전자의 염기서열 중 866번째 염기에서 상위영역(upstream region)으로 499번째 내지 513번째 염기, 611번째 내지 660번째 염기 또는 688번째 내지 729번째 염기에 위치한 인텔 변이를 포함하는 50개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커 조성물.

청구항 2

청구항 1의 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 제제는 서열번호 2 및 3의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 조성물.

청구항 4

청구항 2 또는 3 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 키트.

청구항 5

판별 대상 토마토의 Ty-2 유전자의 염기서열에서 서열번호 1의 염기서열의 866번째 염기에서 상위영역으로 499번째 내지 513번째 염기 위치에 대응되는 위치의 15bp 인텔 변이, 서열번호 1의 염기서열의 866번째 염기에서 상위영역으로 611번째 내지 660번째 염기 위치에 대응되는 위치의 50bp 인텔 변이 또는 서열번호 1의 염기서열의 866번째 염기에서 상위영역으로 688번째 내지 729번째 염기 위치에 대응되는 위치의 42bp 인텔 변이를 확인하는 단계를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 15bp, 50bp 또는 42bp의 결실이 확인된 토마토를 황화잎말림 바이러스 저항성 품종으로 판별하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커 및 이를 이용한 판별 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 토마토 세계 종자시장 규모가 약 1조원에 달하는 고부가가치 글로벌 채소작물로 국내에서도 소비가 증가하여 종자시장 규모가 2012년도에 186억으로 성장, 과채류 중에서 고추 다음으로 큰 비중을 차지하고 있다. 국내 토마토 시장이 확대는 신품종 육성의 활성화를 이끌었는데 토마토 황화잎말림 바이러스(TYLCV)는 토마토 재배에 큰

문제가 되는 병으로 저항성 토마토 품종육성이 주요 육종목표가 되어 왔다. 우수한 품종을 육성하는데 표현형에 기반한 기존 육종방법은 시간과 비용이 많이 소요되어, DNA 분자표지 활용하여 선발효율을 증진시키고자 하는 연구가 많이 이루어져 왔다. DNA 분자표지는 생물종의 유전체상에서 다형성 여부를 판단할 수 있는 특정 염기서열 단편으로 표현형 기반의 방법에 비해 재배환경 및 작물의 생장단계에 영향을 받지 않아 신속하고 정확도가 높다는 장점이 있다. 토마토의 경우, 다수 병에 대한 저항성 유전자를 선발하기 위한 분자표지 개발을 통한 MAS(Marker Assisted Selection) 기술의 요구도가 높아 연구가 활발히 이루어지고 있다. 하지만 기존에 개발된 TYLCV 저항성 분자표지들은 연관 마커로써 재조합을 통해 마커와 해당 유전자간의 연관이 유지되지 않아 육종 현장에서 저항성 계통을 선발하는 효과적이 않음으로써 활용도가 높지 않은 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허 2013-0043406호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. 서열번호 1의 Ty-2 유전자의 염기서열 중 5' UTR에서 상위영역(upstream region)으로 499번째 내지 513번째 염기, 611번째 내지 660번째 염기 또는 688번째 내지 729번째 염기에 위치한 인델(InDel) 변이를 포함하는 50개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커.

[0012] 2. 위 1의 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 조성물.

[0013] 3. 위 2에 있어서, 상기 제제는 서열번호 2 및 3의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 조성물.

[0014] 4. 위 2 또는 3의 조성물을 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 키트.

[0015] 5. 판별 대상 토마토의 Ty-2 유전자의 염기서열 중 서열번호 1의 Ty-2 유전자의 5' UTR에서 상위영역으로 499번째 내지 513번째 염기 위치의 15bp 인델, 611번째 내지 660번째 염기 위치의 50bp 인델 또는 688번째 내지 729번째 염기 위치의 42bp 인델을 확인하는 단계를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별방법.

[0016] 6. 위 5에 있어서, 상기 15bp, 50bp 또는 42bp의 결실이 확인된 토마토를 황화잎말림 바이러스 저항성 품종으로 판별하는, 방법.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 토마토의 황화잎말림 바이러스 판별용 마커 및 이를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 신속하고 정확한 판별이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 Ty-2 유전자에서의 서열변이 탐색을 위한 염기서열분석 전략을 나타낸 도이다. 회색과 검정색 박스는 각각 UTR과 코딩 영역을 의미하며 non-coding 영역은 실선으로 나타내었다.

도 2는 cluster omega tool을 이용한 Ty-2 유전자 상위영역의 저항성 계통과 감수성 계통의 염기서열을 비교한 것이다. 발견된 InDel과 SNP는 검은색으로 표시되었고, 마커 발굴 시 사용된 3개의 InDel은 "*"로 표시하였다. 회색박스는 마커의 프라이머 위치를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명은 서열번호 1의 Ty-2 유전자의 염기서열 중 5' UTR에서 상위영역(upstream region)으로 499번째 내지 513번째 염기, 611번째 내지 660번째 염기 또는 688번째 내지 729번째 염기에 위치한 인텔 변이를 포함하는 50 개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 용어, "토마토 황화잎말림 바이러스(TYLCV) 저항성"은 TYLCV에 감염되어도 건강한 표현형을 나타내는, TYLCV에 내성을 갖는 것을 의미한다. 토마토 품종에 따라 TYLCV에 대한 저항성 또는 감수성의 정도가 다르며, 구체적인 예로, TB17, TB47은 TYLCV 저항성 품종으로 구분된다.
- [0025] 용어 "마커"는 유전적으로 불특정 연관된 유전자좌(genetic locus)를 동정할 때 참고점으로 사용되는 염기서열을 말하며, 마커(molecular marker)의 유전자 지도상의 위치는 유전자좌 또는 좌위로 일컬어진다.
- [0026] 본 발명에서 제공되는 마커는 제한 증폭 다형성 서열 마커일 수 있다.
- [0027] 용어 "제한 증폭 다형성 서열(Cleaved amplified polymorphic sequence; CAPS) 마커"는 SNP처럼 한 개의 염기서열이 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.
- [0028] 용어 "인텔(InDel)"은 DNA의 염기배열에서 일부 염기가 중간에 삽입되거나(insertion) 결실된(deletion) 변이를 총칭한다. 상기 인텔(InDel) 마커는 표준유전체와 실험에 사용된 품종의 유전체 정보를 비교 분석하는 방법을 통해 표준유전체보다 삽입(insertion) 또는 결실(deletion)된 영역을 탐색하고 그 정보를 바탕으로 프라이머를 제작한다. 따라서 그 증폭 결과는 표준유전체와 비교하여 밴드 크기가 큰 경우(insertion)와 작은 경우(deletion)의 두 종류 타입을 나타낼 수 있다.
- [0029] 용어, "뉴클레오타이드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 특별하게 다르게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다.
- [0030] 본 발명의 마커는 상기 15bp, 50bp 및 42bp 인텔과 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성과의 관련성을 나타내는 마커로서, Ty-2 유전자에서 상기 인텔 중 어느 하나 이상이 결실된 토마토는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 품종에 해당한다.
- [0031] 상기 마커는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것으로서, 그 길이는 상기 마커를 포함하는 것이고, 검출 또는 증폭되어 확인될 수 있는 것이라면 그 길이는 제한되지 않고, 예를 들면 50bp 이상, 100bp 이상, 300bp 이상, 500bp 이상, 5000bp 이하, 3000bp 이하, 1000bp 이하 등일 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 마커를 검출 또는 증폭시킬 수 있는 체제를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 조성물을 제공한다.
- [0033] 상기 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 체제는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 용어 "프로브(probe)"는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는, 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 라벨링(labeling)되어 있어 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단일 사슬 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중 사슬 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 마커를 증폭시킬 수 있는 체제는 프라이머 세트일 수 있다.
- [0036] 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 뉴클레오사이드 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.

[0037] 본 발명에 있어서 상기 제제는 Ty-2 유전자의 상기 마커를 증폭시킬 수 있는 것이라면 그 서열 및 길이는 제한되지 않고 적절하게 설계/선택될 수 있다. 예를 들면, 서열번호 2 및 3의 프라이머 세트를 포함할 수 있다.

[0038] 상기 유전자 증폭은 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 예를 들어, 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 본 발명에서 이용되는 염기서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, "실질적인 동일성"은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0040] 따라서, 상기 서열번호 2 및 3으로 표시되는 염기서열과 높은 상동성을 갖는 염기서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90% 이상의 높은 상동성을 갖는 염기서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0042] 나아가, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 키트를 제공한다.

[0043] 본 발명의 키트는 전술한 마커를 검출 또는 증폭시킬 수 있는 제제를 포함하는 조성물; 및 상기 검출 또는 증폭을 위한 시약;을 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.

[0044] 또한 특정 SNP 변이 및 이로 인한 특정 절편의 존재를 확인하기 위하여 MfeI, Bstz17I 또는 RsaI 등의 제한효소를 추가적으로 더 포함할 수 있다.

[0045] 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.

[0047] 본 발명은 판별 대상 토마토의 Ty-2 유전자의 염기서열 중 5' UTR에서 상위영역으로 499번째 내지 513번째 염기 위치의 15bp 인델, 611번째 내지 660번째 염기 위치의 50bp 인델 또는 688번째 내지 729번째 염기 위치의 42bp 인델을 확인하는 단계를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별방법을 제공한다.

[0048] 구체적으로, 본 발명에 따라 대상 토마토의 상기 15bp, 50bp 및 42bp 인델을 확인하여 그 중 어느 하나 이상의 결실이 확인된 경우, 대상 토마토를 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 품종으로 판별할 수 있다.

[0050] 필요에 따라, 본 발명의 방법은 대상 토마토에서 게놈 DNA를 분리하고, 전술한 프라이머를 이용하여 Ty-2 유전자의 유전자의 5' UTR에서 상위영역으로 499번째 내지 513번째 염기 위치, 611번째 내지 660번째 염기 위치 또는 688번째 내지 729번째 염기 위치의 염기서열 변이를 포함하는 염기 서열을 증폭시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0051] 게놈 DNA를 분리 및 염기 서열 증폭은 당 분야에 공지된 실험방법, 조건에 따라 행해질 수 있고, 이는 특별히 제한되지 않는다.

[0053] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0055] 실험재료

[0056] 총 8 개의 토마토 근친 계통 (*S. lycopersicum*)이 Ty-2 및 Ty-3 유전자의 서열 분석을 위해 사용 되었다. 이들은 Ty-2 저항성 품종 (TB47(Ty-2 유전자는 서열번호 5) 및 TB50(Ty-2 유전자는 서열번호 6)), Ty-2 감수성 품종 (TB48(Ty-2 유전자는 서열번호 1) 및 TB49(Ty-2 유전자는 서열번호 4)), Ty-3 저항성 품종 (TB38 및 TB45) 및 Ty-3 감수성 품종 (TB61 및 TB70)이다. 이 연구에서 개발된 마커의 검증을 위해 추가로 30 종의 저항성 및 감수성 품종 (18 개의 F1 상업용 품종(cultivars), 9개의 근친교배종(inbred lines) 및 3개의 야생종(wild species))이 사용되었다. 이 중 하나의 F1 품종과 하나의 근친교배종은 Ty-2 유전자를 포함하는 것으로 알려진 품종이며, 2개의 야생종 LA1932와 LA2779는 Ty-3 저항성의 원천이다. LA1969은 Ty-1 저항성의 원천으로 포함되었다. 또 다른 13종 (7개의 F1 품종 및 8개의 근친교배종)은 TYLCV에 저항성이 있지만, 그 저항성의 원인은 알려져 있지 않은 것이다. 다른 10개의 F1 품종은 감수성이다. 또한, 검증된 마커를 사용하여 Ty-2 및 Ty-3 저항성에 접근하기 위해 171 개의 토마토 accession (77개의 동령의 육종계통 및 94개의 생식질)의 집단(collection)을 유전자형화 하였다. 이 육종 계통은 대한민국 농촌진흥청 (RDA)의 원예 및 한방 과학 연구소 (NIHHS)에서 유래되었다. 생식질 accession은 RDA의 National Agrobiodiversity Center(NAC), 미 농무부의 Germplasm Resources Information Network (GRIN), CM Rick Tomato Genetics Resource Center (TGRC), 및 세종대학교에서 얻었다.

[0058] 실험방법

[0059] 1. Ty-2의 유전자 서열 분석

[0060] 변형된 cetyl trimethyl ammonium bromide(CTAB) 방법을 사용해서 4주된 모종의 신선하고 어린 잎에서 게놈 DNA를 추출하였다. 잎 조직을 2 개의 4 mm 직경의 스테인레스 비드를 갖는 튜브에 넣고 TissueLyser (QIAGEN, CA, USA, USA)를 사용하여 3분 동안 교반하여 분쇄하였다. 분쇄 후, 모든 추출단계는 전술한 바와 같다. Complementary DNA(cDNA) 합성을 위해, TrizolTM 방법을 사용하여 4주된 모종의 신선한 어린 잎으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 NEXscriptTM cDNA synthesis kit (Geneslab, Seongnam, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하는데 사용되었다.

[0061] The tomato reference genome assembly version SL3.0을 사용하여 Sol Genomic Network (SGN, <https://solgenomics.net>)에서 Ty-2 및 Ty-3 유전자의 전체 길이의 게놈 DNA 서열을 검색 하였다. 3개의 프라이머 세트는 3 '프라이머 세트는 5' UTR, 5개의 엑손(exons), 4개의 인트론(introns), 및 3' UTR을 포함하는 Ty-2 유전자의 2,890 bp 서열 (SGN 유전자 ID : Solyc11g069910.2.1)에 기초하여 처음 설계되었다. 이들 프라이머는 gDNA를 사용하여 5' UTR / 처음 3개의 엑손 (607 bp), 4번째 엑손 (582 bp) 및 5번째 엑손 / 3' UTR (337 bp)을 증폭시켰다 (도 1). 또한 cDNA를 사용하여 5' UTR에서 3' UTR까지의 영역을 증폭시키기 위한 프라이머 세트를 설계하였다. 추가 3개의 프라이머 세트는 5' UTR의 첫 번째 염기에서 2,135 bp upstream 서열을 포함하도록 설계되었다 (도 1).

[0062] 총 50 μ l 부피에 포함된 50-100ng의 게놈 DNA 또는 cDNA, 0.2mM dNTP, 0.1 μ Mdml 각 F(forward) 와 R(reverse) 프라이머, 1X PCR buffer, 및 0.5U의 Taq polymerase를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 증폭 과정은 94 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 initial denaturation 하는 것을 포함하고, 그 후, 94 $^{\circ}$ C에서 3초, annealing 온도(프라이머의 녹는점에 따라 50 $^{\circ}$ C에서 60 $^{\circ}$ C)에서 30초, 7 $^{\circ}$ C에서 45초 동안 40회 cycle을 반복하고, 7 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 1회 cycle로 extension 하는 것을 포함한다.

[0063] PCR 증폭산물(amplicon)은 제조자의 지시에 따라 NEXprepTM Purification Mini Kit (Geneslab, Seongnam, Korea)를 사용해서 정제되었다. 정제된 증폭산물은 Sanger sequencing (Cosmogenetech, Seoul, Korea)을 위해 사용되었다. 그 DNA 서열은 Staden Package software 및 Clustal Omega tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>)을 사용하여 트리밍되고 정렬되었다. TYLCV 저항성과 감수성 품종 사이의 서열 변이는 서열 정렬의 육안 검사에 의해 확인되었다. 핵산 서열은 ExPASy-translate tool을 사용하여 non-synonymous 변이를 확인하기 위해 아미노산 서열로 번역되었다.

[0065] 2. 세포질 집단에서 마커 발굴 및 유전자 분석

[0066] 게놈 DNA, cDNA, 및 아미노산 서열의 다중 정렬로부터 확인된 Non-synonymous SNPs와 작은 insertion/deletions (InDels)는 cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) 마커를 개발하기 위해 사용되었다. CAPS를 식별하기 위해 SGN (https://solgenomics.net/tools/caps_designer/caps_input.pl) and SnapGene Viewer software (<https://www.snapgene.com>)에서 수행되는 CAPS Designer tool이 모두 사용되었다. 큰 InDel은 아가로오스 겔에서 다형성을 찾기위해 직접 마커로 사용되었다. CAPS 마커로 유전형을 분석하는 것

은 1g의 PCR 증폭산물을 1.2 유닛의 제한효소들 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)로 처리하고, 적절한 온도에서 overnight 인큐베이션하여 수행되었다. 저항성 및 감수성 대립 유전자는 1x RedSafe™ nucleic acid staining solution (iNTRON Biotechnology, Seongnam, Korea)과 2% 아가로오스 겔에서 처리된 증폭산물의 겔 전기영동에 의해 결정되었다. InDel 마커의 대립 유전자는 PCR 증폭 후 3% 아가로오스 겔로 분리되었다.

실험결과

1. Ty-2의 저항성과 관련된 서열 변이

후보 Ty-2 유전자(서열번호 1)의 서열 분석은 저항성과 감수성 품종 사이에 39개의 SNP와 7개의 InDel을 검출하였다. 이들 중 3개의 synonymous SNP는 첫 번째 엑손(1개의 SNP)과 4번째 엑손(2개의 SNP)에서 발견되었다. 모든 다른 36개의 SNP와 7개의 InDel은 인트론 서열로부터 유래되었다. 이들 SNP와 InDel 중 어느 것도 아미노산 서열 변이가 없기 때문에 그들의 cDNA 서열을 사용해서 저항성 및 감수성 대립 유전자 사이에 alternative splicing을 조사하였다. 저항성 및 감수성 대립 유전자 모두 450 bp의 cDNA 서열을 생성하였는데, 이것은 이 대립 유전자 사이에 alternative splicing이 발생하지 않는다는 것을 시사한다. 또한, 2.5 kb의 upstream 영역의 추가 서열 분석은 50 bp, 42 bp, 및 15 bp InDel을 식별하였으며, 그것은 각각 5' UTR의 첫 번째 염기로부터 688 bp, 611 bp, 및 499 bp 떨어져서 위치하였다 (도 2). 게다가 이 InDel 근처에서 13개의 SNP가 발견되었다 (표 1).

표 1

위치	Ty-2	
	SNP	InDel
Upstream region	35	7
5' UTR	1	0
Exon	3 (0) ¹	0
Intron	35	6
3' UTR	0	1

¹
non-synonymous SNP의 수는 괄호안에 표시되었다.

2. Ty-2 선별을 위한 분자 마커

실험에 사용된 후보 Ty-2 유전자는 코딩 서열에서 non-synonymous SNP와 InDel이 결핍된 것이 확인되었다. 대안으로 PCR 기반 마커를 upstream 영역에 있는 3개의 InDel을 사용해서 제작하였는데, 이것은 이 유전자에서 유전자 발현을 변화시킬 수 있다. InDel 마커(Ty2-UpInDel)는 저항성 대립 유전자에 대해 130 bp 증폭산물을 생성하고, 감수성 대립 유전자에 대해 200 bp 증폭산물을 생성하였다. 이 증폭산물들은 3% 아가로오스 겔로 완전히 분리되었다.

저항성과 감수성 품종 사이의 Ty-2 유전자의 염기서열 분석결과는 도 2에 나타내었으며, 제작된 프라이머 및 발굴 마커는 표 2에 나타내었다.

표 2

유전자	마커 이름	마커 종류	프라이머 서열(5'-3')	제한 효소	단편 크기(bp)	
					저항성	감수성
Ty-2	Ty2-UpInDel	InDel	F: ACCCCAAAAACATTTCTGAAATCCT(서열번호 2)	na	130	220
			R: TGGCTATTTGTGAAAATTCTCACT(서열번호 3)			

검증을 위해, 이들 새로운 마커들은 TYLCV에 대해 알려진 표현형을 갖는 30개의 토마토 품종의 유전형 분석에 사용되었다. 그 결과는 표 3에 나타내었다. 이들 중 2개의 저항성 품종(1개의 F1 품종 및 1개의 근친교배종)은 Ty-2 유전자를 포함하는 것으로 알려져 있다. F1 품종과 근친교배종은 각각 Ty2-UpInDel 마커에 대해 저항성 대립 유전자가 heterozygous 및 homozygous 형태로 확인되었다. Ty-2 유전자는 TYLCV 저항성에 대해 완전 우성임

을 알 수 있기 때문에, 저항성 F1 품종에서 Ty-2 마커로 heterozygous 형태를 찾을 것으로 예상되었다. Ty-2 유전자를 갖는 F1 품종은 모든 3개의 Ty-3마커에 대해 감수성 대립유전자의 homozygous 형태로 확인되었다. 유사하게, 근친교배종은 Ty-3 마커의 감수성 대립 유전자에 대해 homozygous 형태라고 확인되었다. Ty-1 (LA1969) 또는 Ty-3 (LA1932 and LA2779)를 포함하는 것으로 알려져 있는 3개의 야생종은 Ty2-UpInDel 마커에 대해 감수성 대립 유전자의 homozygous 형태로 확인되었다. 그러나, 3개의 Ty-3 마커의 저항성 대립 유전자에 대해 homozygous로 확인되었다.

[0080]

다른 15개의 TYLCV에 대한 저항성 품종 중 Ty2-UpInDel 마커에 대한 감수성 대립 유전자의 homozygous 형태가 5개의 F1 품종과 2개의 근친교배종에서 확인되었다. 그러나, 이들 6개의 품종은 Ty-3 마커에 대해 저항성 대립 유전자의 homozygous 형태 또는 heterozygous 형태로 확인되었다. TYLCV 저항성을 가진 F1 품종 'Songari'는 Ty-2와 Ty-3마커 둘 다에 대해 homozygous 형태를 나타내고, 다른 Ty 유전자를 보유할 것 추측되었다. 또한, 모두 10개의 감수성 F1 품종은 Ty-2 마커의 감수성 대립 유전자에 대해 homozygous로 결정되었다. 모든 3개의 Ty-3 마커들에 대해 TYLCV 저항성을 가진 6개의 품종(2개의 F1 품종 및 4개의 근친교배종)은 감수성 대립 유전자에 대해 homozygous 형태로 확인되었고, Ty-3 마커에 대해 감수성 유전형을 가진 품종에서 TYLCV 저항성을 Ty-2 또는 다른 Ty 유전자 때문이라는 것을 시사한다. 예를 들어, F1 품종 'Tyunique'와 근친교배종 'Hero120'은 Ty-2 마커에 대해 저항성 대립 유전자가 homozygous 형태를 보여주는 반면, 다른 4개의 품종은 heterozygous로 확인되었다. 게다가 모든 10개의 감수성 품종은 Ty-3 마커에 대해 감수성 대립 유전자의 homozygous 형태를 보여주었다.

표 3

[0082]

연번	품종	세대 (class)	표현형	저항성 유전자	마커 유전자형 ¹			
					Ty2-UpInDel	Ty3-InDel ₄	Ty3-SNP9	Ty3-SNP17
1	Bogopanorang	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
2	Kkottomato	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
3	Kkomaheuksu	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
4	Cadilak	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
5	Miniheuksu	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
6	Tangtang60	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
7	Beryking	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
8	Shinlovely256	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
9	Dongyu250	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
10	RAFITO F1	F1	S	unknown	S	S	S	S
11	Hulk	F ₁	R	Ty-2	H	S	S	S
12	Tyshinheuksu	F ₁	R	unknown	S	H	H	H
13	Songari	F ₁	R	unknown	S	S	S	S
14	Aroma300	F ₁	R	unknown	S	H	H	H
15	Tyunique	F ₁	R	unknown	R	S	S	S
16	Shinsugarred	F ₁	R	unknown	H	H	H	H
17	Shinsugaryellow	F ₁	R	unknown	S	H	H	H
18	TOP 1199	F1	R	unknown	S	H	R	H
19	Hero80	Inbred	R	unknown	H	S	S	S
20	Hero90	Inbred	R	unknown	H	S	S	S
21	Hero100	Inbred	R	unknown	H	S	S	H
22	Hero110	Inbred	R	unknown	H	S	S	H
23	Hero120	Inbred	R	Ty-2	R	S	S	S
24	Hera110	Inbred	R	unknown	H	S	S	H

25	Tomas	Inbred	R	unknown	S	H	H	H
26	Tars	Inbred	R	unknown	H	S	S	S
27	TC 32347	Inbred	R	unknown	S	R	R	R
28	LA1932	wild	R	Ty-3	S	R	R	R
29	LA1969	wild	R	Ty-1	S	R	R	R
30	LA2779	wild	R	Ty-3	S	R	R	R

¹

R = 저항성 대립 유전자의 homozygous 형태, H = 저항성 대립 유전자의 heterozygous 형태, 및 S = 감수성 대립유전자의 homozygous 형태

3. 세포질 집단에서 Ty-2와 Ty-3 저항성 평가

Ty-2 및 Ty-3 마커는 77개의 동령의 육종 계통과 94개의 세포질로 구성된 171개의 토마토 accession의 집단을 유전자 분석하기 위해 사용되었다. 그 결과는 표 4 및 표 5에 나타내었다.

Ty-2 마커의 경우, 8개(4.67%)와 6개(3.50%)의 accession이 각각 homozygous 저항성 대립 유전자 및 heterozygous 형태를 갖는 것으로 확인되었다(표 4). 대조적으로 91% 이상이 homozygous 감수성 대립 유전자로 확인되었다.

3개의 Ty-3 마커는 22-32개의 accession이 적어도 하나의 homozygous 저항성 대립 유전자를 갖는 것으로 확인되었다. 이들 중 13개의 accession은 Ty-3 마커에 대해 homozygous 저항성 대립 유전자를 보여주었다. 모든 Ty-3 마커에 대한 감수성 대립 유전자의 homozygous 형태를 가진 accession의 수는 132(77.19%)에서 149(87.13%) 범위였다. 게다가, 육종 계통인 7개의 accession은 3개의 Ty-3 마커 중 적어도 하나뿐만 아니라 Ty-2 마커에 대해 homozygous 저항성 대립 유전자를 갖는 것을 알 수 있었다. 모든 4개의 마커에 대해 저항성 대립 유전자의 homozygous 형태는 육종 계통 '16TB36'에서 확인되었다. 다른 2개의 육종 계통 '16TB14' 및 '16TB74'는 Ty-2 마커 및 2개의 Ty-3 마커에 대해 homozygous 저항성 대립 유전자로 확인되었다. Ty-2 및 Ty-3 마커를 사용해서 선택된 육종 계통은 TYLCV 저항성의 광범위한 스펙트럼을 가진 우수한 품종을 개발을 가속화할 수 있음을 의미한다.

표 4

마커 유전자형	품종의 수			
	Ty2-UpInDel	Ty3-InDel4	Ty3-SNP9	Ty3-SNP17
저항성 homozygote	8 (4.67%)	30 (17.54%)	22 (12.86%)	32 (18.71%)
Heterozygote	6 (3.5%)	1 (0.58%)	0 (0%)	7 (4.09%)
감수성 homozygote	157 (91.81%)	140 (81.87%)	149 (87.13%)	132 (77.19%)

표 5

품종	마커 유전자형			
	Ty2-UpInDel	Ty3-InDel4	Ty3-SNP9	Ty3-SNP17
16TB3	R	R	S	S
16TB14	R	R	R	S
16TB19	R	S	S	R
16TB36	R	R	R	R
16TB65	R	S	S	R
16TB72	R	R	S	S
16TB74	R	R	S	R

¹

R = 저항성 대립 유전자의 homozygous 형태, H = 저항성 대립 유전자의 heterozygous 형태, 및 S = 감수성 대립유전자의 homozygous 형태

gattttatta ttattattat aaaaaaaaaat ataattacta tttatttcat agtttagata 60
ataacatgaa taattgtatt aaattttact ccaaaaacat ttctgaaatc ctatatTTTA 120

tgctggcctt ttactcgtcc ttcaactcat aaaacatttt ttaacagaca taaatttata 180
TTTTTgcac attatattct tcaagatatt catacttttt tcaaaaaagc ttatagtagt 240
tcgattttta aagataaaat ataaagaccg tctcatttaa aaagtgagaa ttttcacaaa 300
atagccatta taataaattt aattatactc catagagata gtttgtatat ttatagtttg 360
tatatttaca gggtgcaact agagttaaag ttgtctcatt tgtgtaattt gcgggcgagt 420
ttttataatt tgcgtgtacg ttgtgatgat tgagttattt ttgtataaac tcgaaataat 480
acattttcaa tatttataca gttatacaaa ttatactata caaaattacg ttatacaaaa 540

attatacaaa tttcgaatta tacaactcg aaagcccaac ccatgtaatt accagtaaatt 600
gttggtcgta agtgataatt aactaaaact atagctatga ggactaatta actagtatat 660
atttgcttaa ctatgcaatt ttccgtttta aaaagatcaa tagtgtaatt aagtgaaaat 720
ttcggtatga aataaaccca atcaaaagt ttaacctaat ggatcggatt agcccaatta 780
aattgggtta ggcttatcca acaatgaagt ccatttccac tcaaccgaa cggggaaaat 840
atacataaga acagaattgg gatttttatc aaatagccac tgaaatcaat ttgttgaaga 900
cgaagaagaa agatgaatgc tccagatcgt tacgaacg 938

<210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Ty2-UpIndel primer_F
<400> 2
accccaaaaa catttctgaa atcct 25

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Ty2-UpIndel primer_R
<400> 3
tggtatTTTT gtgaaaattc tcaact 25

<210> 4
<211> 537

<212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum
 <400> 4
 gattttatta ttattattat aaaaaaaaaat ataattacta tttatttcat agtttagata 60

 ataacatgaa taattgtatt aaattttacc ccaaaaacat ttctgaaatc ctatatttta 120
 tgctggcctt ttactegtc ttcaactcat aaaacatttt ttaacagaca taaatttata 180
 tttttgcatc attatattct tcaagataatt catacttttt tcaaaaaagc ttatagtagt 240
 ttgattttta aagataaaat ataaagaccg tctcatttaa aaagtgagaa ttttcacaaa 300
 atagccatta taataaattt aattatactc catagagata gtttgatat ttacaggttg 360
 caactacagg ttgcaactag agtttaagtt gtctcatttg tgtaatttgc gggcgagttt 420
 ttataatttg cgtgtacgtt tgtatgattg agttattttt gtataaactc gaaataatac 480

 attttcaata tttatacagt tatacaaat atactatata aaattacgtt atacaaa 537
 <210> 5
 <211> 430
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum
 <400> 5
 gattttatta ttattataaa aaaatataat ttactattc atttcatagt ttagataata 60
 acatgaataa ttgtattaaa ttttactcca aaaacatttc tgaaatccta tattttatgc 120
 tggcctaagt ttatattttt gcatcattat attcttcaag atattcatac gaccgtctca 180
 tttaaaaagt gagaattttc acaaaaatagc cattataata aatttaatta tactccatag 240
 agatagtttg tatatttacg agttgcaact agggtttaaa ttgtctcatt tgtgtaattt 300

 gcgggagagt ttttataatt tgcgtgtacg tttgtatgat tgagttattt ttgtataaac 360
 tcgaaataat acattttcaa tatttataca gttatacaaa ttatactaata acaaaattac 420
 gttatacaaa 430
 <210> 6
 <211> 430
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum
 <400> 6
 gattttatta ttattataaa aaaatataat ttactattc atttcatagt ttagataata 60
 acatgaataa ttgtattaaa ttttactcca aaaacatttc tgaaatccta tattttatgc 120

tgccctaaat ttatatTTTT gcatcattat attcttcaag atattcatac gaccgtctca	180
tttaaaaagt gagaattttc acaaaatagc cattataata aatttaatta tactccatag	240
agatagtttg tatatttacg agttgcaact agggtttaaa ttgtctcatt tgtgtaattt	300
gcgggcgagt tttataatt tgcgtgtacg ttgtatgat tgagttattt ttgtataaac	360
tcgaaataat acattttcaa ttttataca gttatacaaa ttatactaata acaaaattac	420
gttatacaaa	430