

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213003-04-2-SBQ10

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 GSP 원예종자사업단

연구사업명 Golden Seed 프로젝트사업

연구과제명 백합 육종기반 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.05.03 ~ 2016.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 연속된 뉴클레오타이드는 10 내지 100개의 연속된 뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 잎마름병 저항성 백합 품종을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.

청구항 3

서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 프라이머.

청구항 4

제3항에 있어서, 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 프라이머.

청구항 5

서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 프로브.

청구항 6

서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 마이크로어레이.

청구항 7

제3항 또는 제4항의 프라이머; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종을 선별하기 위한 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 잎마름병 저항성 백합 품종을 선별하기 위한 키트.

청구항 9

백합 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제3항 또는 제4항의 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종을 구별하기 위한 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 표적 서열의 증폭은 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 잎마름병 저항성 백합 품종을 선별하기 위한 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 60s 리보솜 유전자 기반 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 SNP 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 백합(나리; 속명 *Lilium*)은 우리나라 절화 품목 중 장미, 국화에 이어 3위에 이르는 경제적으로 매우 중요한 3대 수출 품목에 해당하는 화훼 원예작물이다. 2012년에는 재배면적 192 ha에서 약 4,100만본이 생산되어 년 322억원 이상의 판매금액을 보이며, 최근 일본에서는 90% 이상의 물량을 우리나라로부터 수입하고 있어 효자 작물이기도 하다. 하지만 백합의 수출 전 가장 문제가 되는 점은 노지 재배, 시설 하우스 혹은 노지 포장에서 발생되는 백합 잎마름병이다. 이 병은 보트리티스 속(*Botrytis* sp.)인 곰팡이균이 공기를 통해 백합의 잎과 꽃잎에 감염되어 잎마름 증상을 유발시키는데, 백합의 약간의 상처를 통해 감염이 되면 일반적으로 잎에는 난형 내지 타원형의 적갈색 반점을 형성시키며, 꽃봉오리에는 갈색반점이 생기고 차츰 커지면서 부패를 일으킨다. 이는 관상형 절화로 포장되어 수출되는 백합에게는 치명적인 병이 아닐 수가 없다. 백합 계통은 크게 오리엔탈계 나리(Oriental hybrid), 아시아틱계 나리(Asiatic hybrid), 나팔 백합나리(Longiflorum)로 나뉘는데, 이 중 우리나라에서 주로 발견되는 대부분의 나리는 아시아틱계이다. 특히, 아시아틱계 나리는 다양한 화색과 병 저항성 등 우량 형질을 보유하고 있어, 중간 또는 속간 교잡을 통한 새로운 품종개발에 유용하게 활용될 수 있는 유전자원이다.

[0003] 그러나 아직까지 이러한 백합 품종 중에서 뚜렷하게 병 저항성 백합 품종을 효과적으로 구별할 수 있는 마커에 대해서는 거의 밝혀진 바가 없어, 이에 대한 개발이 시급한 실정이다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1209121호에서는 '제조제 저항성 백합의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 제조제 저항성 백합'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 '60s 리보솜 유전자 기반 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 SNP 마커 및 이의 용도'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 아시아틱계 나리를 포함한 오리엔탈계 나리 40여 종과 국내 자생 나리 13종 그리고 국립원예특작과학원 보유 63여종과 태안백합시험장 보유 50여종의 백합품종들에 대한 병해 저항성을 포함하는 특성 분석을 실시하여 잎마름병에 대한 저항성 F1 집단(Resistant line)과 이병성 F1 집단(Susceptible line)으로 구분되는 약 20여 종의 자식계통(inbred line)을 선별하였고, 선별된 F1 세대의 잎마름병의 병해에 대한 저항성 증대에 기여하는 유전자들의 발현 패턴의 분석(DEG)을 통해 백합 잎마름병에 강한 저항성을 보이는 F1(inbred line) 중 60s ribosomal Protein 137a 유전자 서열에서 유래한 EST-SNPs 마커인 mRNA_296428를 개발하였다. 상기 mRNA_296428 분자마커의 특이적 프라이머를 이용하여 백합 품종 중 잎마름병 저항성 품종을 효과적으로 구별할 수 있는 점을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종 판

별용 프라이머를 제공한다.

- [0008] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 프로브 및 마이크로어레이를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종을 구별하기 위한 키트를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은
- [0011] 백합 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0012] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0013] 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종을 구별하기 위한 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따른 SNP 마커를 백합에 적용하면, 백합 품종 중 잎마름병 저항성 품종을 효율적으로 판별 및 육성할 수 있어 육종에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감하는데 매우 유용할 것으로 기대된다. 또한, 본 발명의 방법으로 육성한 잎마름병 저항성 백합 품종의 보급은 재배 농가 및 소비자에게도 고품질의 백합 생산 및 공급을 가능하게 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 잎마름병 저항성 백합 품종을 판별하기 위해 RNA-Seq 데이터를 이용하여 병 저항성 유전자의 검색 및 SNP 마커 개발 방법을 나타낸다.
- 도 2의 (A)는 백합의 EST 전사체 정보를 바탕으로 수집된 60s ribosomal protein 137a 유전자 서열정보(붉은 네모는 SNP 부위이며, 화살표는 각 방향의 프라이머 위치임)를 나타내고, (B)는 유전자형에 따라 다르게 분포된 melting curve 확인과 동일한 유전자 부위에 대한 HRM 분석 결과를 통해 S20(저항성)과 S21(민감성)에 해당하는 두 개의 다른 곡선을 확인함. 이때, 기준서열(reference)은 S20(저항성). (C)는 S20을 기준으로 (B)의 그래프를 정량화한 결과로 S20과 S21의 유전자 다형성(C; 병저항성, T; 민감성)에 따른 두 개의 서로 다른 유형의 melting curve를 확인함. (D)는 HRM 분석시에 증폭되었던 PCR 산물을 3% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인한 결과(M은 DNA 레더, S20은 저항성 F1, S21은 민감성 F1).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 연속된 뉴클레오티드는 10 내지 100개의 연속된 뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명에서 용어, "뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드이며, 특별하게 다르게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오티드의 유사체를 포함한다.
- [0019] 본 발명의 SNP는 표현형에 직접적인 영향을 미치는 매우 안정적인 유전자 마커이다. 본 발명의 SNP 마커를 잎마름병 저항성 백합 품종의 판별에 사용할 수 있는 것은 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자인 서열번호 1로 표시되는 유전자의 염기서열 중 SNP 변이 위치인 78번째 염기가 C로 다르게 나타나는 것에 근거한 것이다.
- [0020] 본 발명은 상기 서열번호 1의 서열에서 각 SNP 위치의 염기 변이체에 관한 것이나, 이러한 SNP 염기 변이가 이중 가닥의 gDNA (게놈 DNA)에서 발견되는 경우, 상기 뉴클레오티드 서열에 대해 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 따라서 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열에서 SNP 위치의 염기도 상보적인 염기

가 된다. 이러한 측면에서, 본 명세서에 제시된 모든 서열은, 특별한 언급이 없는 한, 게놈 DNA의 센스 가닥에 있는 서열을 기준으로 한 것이다.

- [0021] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 프라이머를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 프라이머는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 4로 표시된 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 역방향 프라이머이며, 각 프라이머의 서열 길이에 따라 각 서열 내의 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상, 26개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0023] 따라서, 본 발명의 프라이머 세트는 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용할 수 있다. 이들 모든 프라이머 조합은 SNP 위치의 주변 서열로부터 제작하였으며, PCR로 증폭하고 전기영동을 통해 산물을 확인함으로써 품종을 식별하는 방법에 적용될 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도 (complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체 (analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트 (phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산 (peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질 (intercalating agent)을 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 본 발명의 프라이머 핵산 서열은 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소 (예를 들어, HRP (horse radish peroxidase), 알칼리 포스파타아제), 방사성 동위원소 (예를 들어, ³²P), 형광성 분자, 화학그룹 (예를 들어, 비오틴 (biotin)) 등이 있다. 프라이머의 적합한 길이는 사용하고자하는 프라이머의 특성에 의해 결정하지만, 통상적으로 15 내지 30bp의 길이로 사용한다. 프라이머는 주형의 서열과 정확하게 상보적일 필요는 없지만 주형과 혼성복합체 (hybrid-complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적이어야만 한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 프로브를 제공한다.
- [0027] 본 발명에서 용어 "프로브"는 혼성화 프로브로서, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연적인 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 본 발명의 프로브는 대립형질 특이적 프로브로서, 같은 종의 두 구성원으로부터 유래한 핵산 단편 중에 다형성 부위가 존재하여, 한 구성원으로부터 유래한 DNA 단편에는 혼성화하나, 다른 구성원으로부터 유래한 단편에는 혼성화하지 않는다. 바람직하게는 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일 가닥, 더 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게 (perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로 (substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 프로브는 SNP 뉴클레오타이드인 서열번호 1의 78번째 뉴클레오타이드를 포함하는 10 내지 100 개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 더 바람직하게는, 상기 프로브의 3'-말단 또는 5'-말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스 (duplex)의 안정성은 말단 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3'-말단 또는 5'-말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다. 혼성화에 적합한 조건은 당업계에 통상적으로 알려진 내용을 참조하여

결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격한 조건 (stringent condition)은 대립형질 중 하나에만 혼성화하도록 충분히 엄격해야 하며, 온도, 이온 세기 (완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 마이크로어레이를 제공한다.

[0030] 본 발명에서 잎마름병 저항성 백합 품종 판별용 마이크로어레이는 본 발명의 SNP 마커가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이를 의미한다. "마이크로어레이"란 기판 상에 폴리뉴클레오타이드의 그룹이 높은 밀도로 고정화되어 있는 것으로서, 상기 폴리뉴클레오타이드 그룹은 각각 일정한 영역에 고정화되어 있다. 이러한 마이크로어레이는 당업계에 잘 알려져 있다. 마이크로어레이는 예를 들면, 미국특허 제5,445,934호 및 제5,744,305호에 개시되어 있으며, 이들 특허의 내용은 참조에 의하여 본 명세서에 포함된다.

[0031] 용어 "기판"은 혼성화 특성을 보유하고, 혼성화의 배경 수준이 낮게 유지되는 조건 하에 마커가 부착될 수 있는 임의의 기판을 말한다. 통상적으로, 상기 기판은 미세역가 (microtiter) 플레이트, 막 (예를 들면, 나일론 또는 니트로셀룰로오스), 미세구 (비드) 또는 칩일 수 있다. 막에 적용하거나 고정하기 전에, 핵산 프로브를 변형시켜 고정화를 촉진시키거나 혼성화 효율을 개선시킬 수 있다. 상기 변형은 단독중합체 테일링 (homopolymer tailing), 지방족기, NH₂기, SH기 및 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와와의 커플링, 또는 비오틴, 합텐 (hapten) 또는 단백질과의 커플링을 포함할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 상기 프라이머; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종을 선별하기 위한 키트를 제공한다. 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 dNTPs는 dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 포함하며, DNA 폴리머라제는 내열성 DNA 중합효소로서 Taq DNA 폴리머라제, Tth DNA 폴리머라제 등 시판되는 폴리머라제를 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 있어서, 잎마름병 저항성 백합 품종을 선별하기 위한 키트는 상기 프로브 또는 상기 마이크로어레이가 포함된 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 또한, 본 발명은 백합 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

[0034] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

[0035] 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 잎마름병 저항성 백합 품종을 구별하기 위한 방법을 제공한다.

[0036] 본 발명의 방법은 백합 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 게놈 DNA의 추출은 당업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법, CTAB 분리법 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에 있어서, 상기 표적 서열의 증폭은 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 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 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에 있어서, 상기 증폭 산물은 서열번호 1의 백합 60s 리보솜 단백질 137a(60s ribosomal protein 137a) 유전자의 염기서열 중 78번째 염기에 해당하는 SNP(single nucleotide polymorphism) 위치에 C 염기를 가질 수 있다. 해당 SNP 위치에 C 염기를 갖는 경우에는 잎마름병 저항성 백합 품종을 나타내며, 해당 SNP 위치에 T 염기를 갖는 경우에는 잎마름병 민감성 백합 품종을 나타낸다.

[0039] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출 가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ³²P 또는 ³⁵S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.

[0040] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 서열분석, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있다. 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 서열분석 방법은 Sanger 방법, 마이크로 전기영동 서열분석, 파이프 서열분석, 나노 포어 단일 DNA 서열분석 등을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ³²P 또는 ³⁵S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기 (Geiger counter) 또는 액체섬광계수기 (liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 실시예 1. 본 발명의 분석에 사용된 백합 품종

[0043] 본 실험에서는 아시아틱계 나라를 포함한 오리엔탈계 나라 40여 종과 국내 자생 나라 13종 그리고 국립원예특작과학원 보유 63여종과 태안백합시험장 보유 50여종의 백합품종들에 대한 병해저항성을 포함하는 특성 분석을 실시하여 잎마름병에 대한 저항성 F1 집단(Resistant line)과 이병성 F1 집단(Susceptible line)으로 구분되는 약 20여 종의 자식계통(inbred line)을 선별하였다(표 1).

표 1

[0044] 잎마름병에 대한 저항성, 민감성을 보유한 백합 F1 자식 개체(inbred line)

	교배조합	잎마름병저항성	종류
S1	IS-5 x 12-1-3	Susceptible	Trumphet
S2	IS-5 x 12-1-3	Intermediate	Trumphet
S3	(12-1-2 x Hu-6) x (SQ x L)	Susceptible	Trumphet
S4	(12-1-2 x Hu-6) x (SQ x L)	Resistance	Trumphet
S5	IS-5 x WT-7 x ISS-5	Susceptible	Trumphet
S6	IS-5 x WT-7 x ISS-5	Resistance	Trumphet
S7	Sulf (#96)	Susceptible	Asiatic
S8	brownii	Susceptible	Trumphet
S9	(12-1-2 x WT-7) x 12-1-2	Susceptible	Trumphet
S10	(Aug x Hu) x (WT x AugE)	Susceptible	Trumphet
S11	(Aug x Hu) x (WT x AugE)	Resistance	Trumphet
S12	IS-5 x WT-7 x 12-1-2	Susceptible	Trumphet
S13	IS-5 x WT-7 x 12-1-2	Resistance	Trumphet
S14	(WT x 12-1) x Hu-6	Susceptible	Trumphet
S15	(WT x 12-1) x Hu-6	Resistance	Trumphet
S16	(진 x W) x AF1 x AugE x AugE	Resistance	Trumphet
S17	(진 x W) x AF1 x AugE x AugE	Susceptible	Trumphet
S18	(12-1-2 x Hu-6) x ISS1-5	Resistance	Trumphet
S19	(12-1-2 x Hu-6) x ISS1-5	Susceptible	Trumphet

S20	(진산 x AS1) x AugE x AugE	Resistance	Trumpet
S21	(진산 x AS1) x AugE x AugE	Susceptible	Trumpet
S22	Bodygourd	Susceptible	Oriental
S23	Saltarella	Resistance	Oriental Trumpet
S24	Tarrange	Resistance	Oriental

[0045] 실시예 2. 60s ribosomal protein 137a 유전자의 다형성 확인

[0046] 노지에서 잎마름병에 대한 병징의 정도를 통해 선발된 F1 세대의 저항성(RS) 집단 중, 잎마름병의 병해에 대한 저항성 증대에 기여하는 유전자들의 발현 패턴을 분석하고자, S20(sample number 20; 잎마름병 저항성)과 S21(sample number 21; 잎마름병 민감성)에 해당하는 나리들에 대하여, 총 RNA를 추출한 후, Illumina Hiseq™ 2000 sequencing technology을 이용한 전체 전사체 분석(Transcriptome analysis) 및 유전자 발현 패턴 분석(DEG; Differentially Expressed Gene)을 실시하였다. DEG 결과로부터 얻은 각 전사체 유전자서열은 NCBI BLASTX tool를 통해 어노테이션(annotation)과 설명(description)에 관한 정보를 확인하였다.

[0047] DEG 분석 결과, 특정 유전자 즉, 60s ribosomal protein 137a를 코딩하는 유전자의 경우, 저항성 F1 나리 S20에서 이병성 F1 나리 S21보다 약 100배 이상 발현이 상향 조절됨(up-regulation)을 확인하였다(표 2).

[0048] 따라서, S20과 S21 각각의 60s ribosomal protein 137a 유전자 부위에 해당하는 EST(Expressed sequence tags) 서열 정보를 BioEdit 소프트웨어를 이용하여 SNP(single nucleotide polymorphisms) 비교 분석을 실시하였다. 결과, mRNA_296428 tag에서 총 길이 55bp에 해당하는 부위에서 SNPs 마커를 디자인하였고, 이때 Primer3Plus 소프트웨어를 사용하였다. 표 2 및 표 3에서 60s ribosomal protein 137a 부위의 EST 전사체 서열정보로부터 확인된 타겟 SNP 부위와 이 부위에 대해 HRM(High Resolution Melting) 분석시 필요한 프라이머 서열정보와 DEG 값을 확인할 수 있다.

표 2

[0049]

Inbred Line	Phenotype	DEG expression values	EST Sequences(서열번호)	EST name
S20	Resistance	4.7	GGTGCTTATACCTTGAACACTGCAAGCGCTGTCTACTGTGAGGAGCACCATTCGGCGTTTGAGGGAGCAGACCGAAAGCTAAATCTTACAAACCGATGGGTGTCTCGGTTATGTCATTTGGTCTGGGAAGATTTTGAATTTAGTTTCTAAGAA(1)	mRNA_296428
S21	Susceptible	-2.92	GGTGCTTATACCTTGAACACTGCAAGCGCTGTCTACTGTGAGGAGCACCATTCGGCGTTTGAGGGAGCAGACCGAAAGTTAAATCTTACAAACCGTGGGTGTCTCGGTTATGTCATTTGGTCTGGGAAGATTTTGAATTTAGTTTCTAAGAA(2)	

[0050] 본 실험에서 디자인된 EST-SNP 프라이머를 이용해 잎마름병 저항성 나리를 민감성 나리와 구별이 가능한지 확인하기 위해, HRM 분석을 실시하였다. 이때 필요한 게놈 DNA는 0.2g의 잎조직으로부터 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide) 방법(Murray and Thompson, 1980, Nucleic Acids Research, Volume 8, Issue 19, 4321-4326)을 이용하여 추출되었고, NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific)를 이용하여 순도를 측정하였다. HRM 분석시, 60s ribosomal protein 137a 유전자 부분을 증폭을 위한 PCR 반응 조건은 총 10uL의 혼합반응에 50ng의 gDNA와 2xHRM 마스터믹스 (2.5mM MgCl₂, Eva green dye; PhileKorea), EST-SNP 프라이머는 5'-TCACTGTGAGGAGCACCATT-3'(서열번호 5)의 mRNA_296428_F와 5'-AAGATTTAGCTTTTCGGTCTGC-3'(서열번호 6)의 mRNA_296428_R을 사용하였다. PCR 온도 조건으로는 초기 단계인 95℃에서 3분을 지난 뒤, 40회의 95℃에서 5초, 60℃에서 30초간 연장단계를 거친 후, Eco Real-Time instrument의 설정된 파라미터 값을 통해 PCR 반응 산물의 녹는점의 차이를 구분하여 수치화한 후, 수치들을 정량화하였다(도 2B 및 도 2C). 이 후 PCR 반응 산물은 3% 아가로스 겔상에서 확인하였다(도 2D).

[0051] 따라서, 결론적으로 도 2의 결과들을 통해 백합 잎마름병에 강한 저항성을 보이는 F1(inbred line) 중 S20[(진산 x AS1) x AugE x AugE]에서 60s ribosomal Protein 137a 유전자 서열에서 유래한 EST-SNPs 마커인 mRNA_296428를 개발하였고, 이를 이용하여 백합 품종 중 잎마름병 저항성 품종의 구별이 가능하다.

표 3

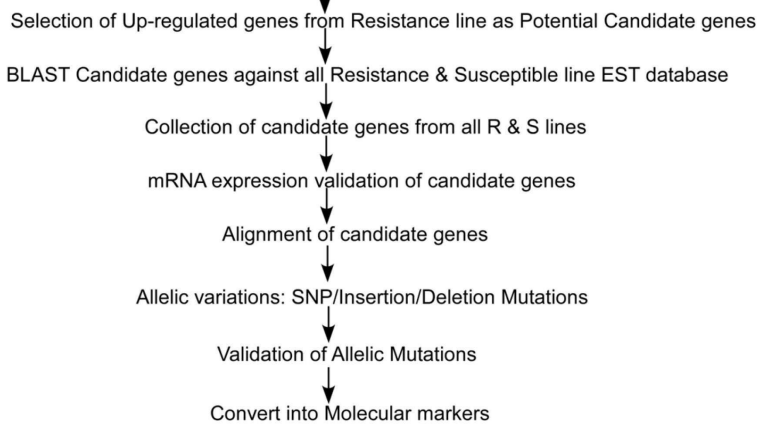
EST-SNP marker	NCBI annotation of EST			SNP mutation	HRM Primer pairs	Product size (bp)
	Gene name	Accession	Putative function			
mRNA_296428	60s ribosomal protein 137a	xp_008786203.1	nucleic acid binding transcription factor activity	C>T	F: TCACTGTGAGGAGCACCATT (서열번호 3) R: AAGATTTAGCTTTCGGTCTGC (서열번호 4)	55

[0052]

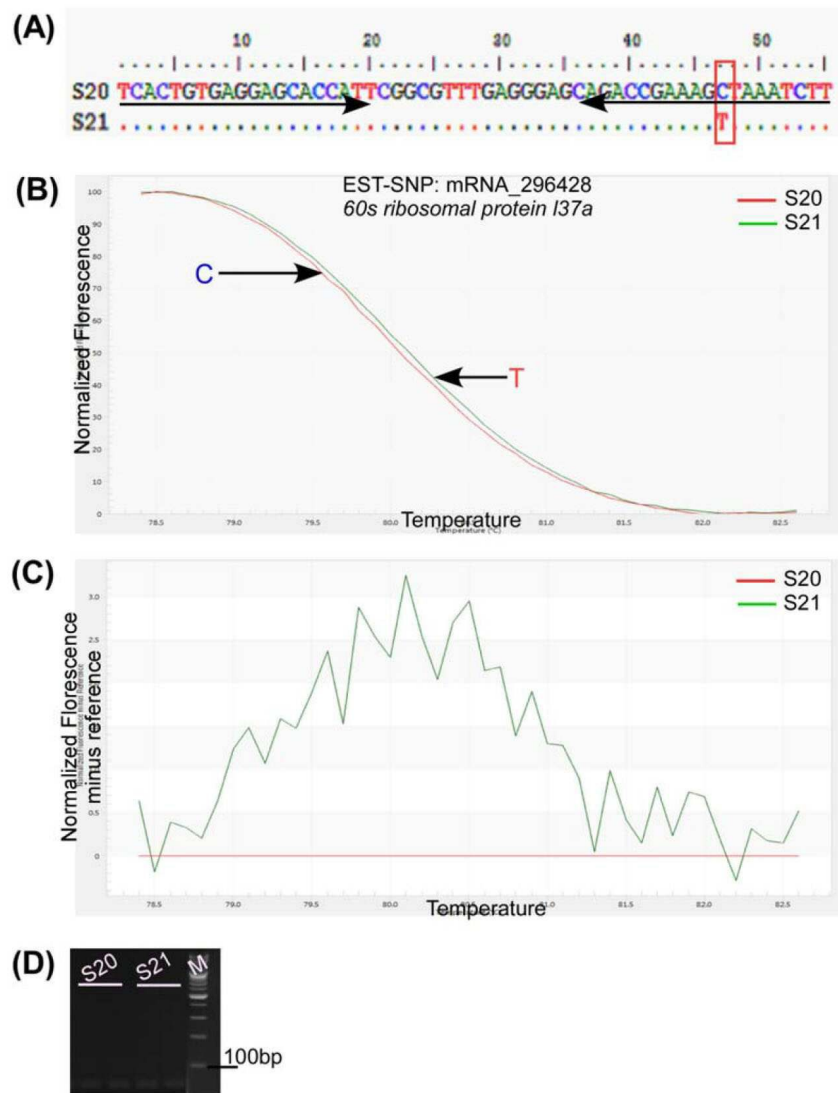
도면

도면1

Comparison of DEG values between particular Resistance (S20) and Susceptible lines (S21)



도면2



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Single nucleotide polymorphism marker for discerning leaf blight-resistant lily cultivar based on 60s ribosomal gene and uses thereof
- <130> PN15441
- <160> 6
- <170> KoPatent In
- <210> 1
- <211> 151
- <212> DNA

<213> Liliun longiflorum

<400> 1

ggtgcttata ccttgaacac tgcaagcgct gtcactgtga ggagcaccat tcggcgtttg 60

agggagcaga ccgaaagcta aatcttacia accgatggtg tctcggttat gtcatttggt 120

ctgggaagat tttgaattta gtttctaaga a 151

<210> 2

<211> 151

<212> DNA

<213> Liliun longiflorum

<400> 2

ggtgcttata ccttgaacac tgcaagcgct gtcactgtga ggagcaccat tcggcgtttg 60

agggagcaga ccgaaagtta aatcttacia accggtgggtg tctcggttat gtcatttggt 120

ctgggaagat tttgaattta gtttctaaga a 151

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

tcactgtgag gagcaccatt 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

aagatttagc tttcggctctg c 21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tcactgtgag gagcaccatt	20
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
aagatttagc tttcggtctg c	21