(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0055190
(43) 공개일자 2024년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01) *C12Q 1/6827* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 1/6827 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0134678
(22) 출원일자 2022년10월19일
심사청구일자 2022년10월19일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
심성철
서울특별시 강남구 테헤란로16길 27, B동 101호(역삼동)
(74) 대리인
특허법인리채

전체 청구항 수 : 총 10 항

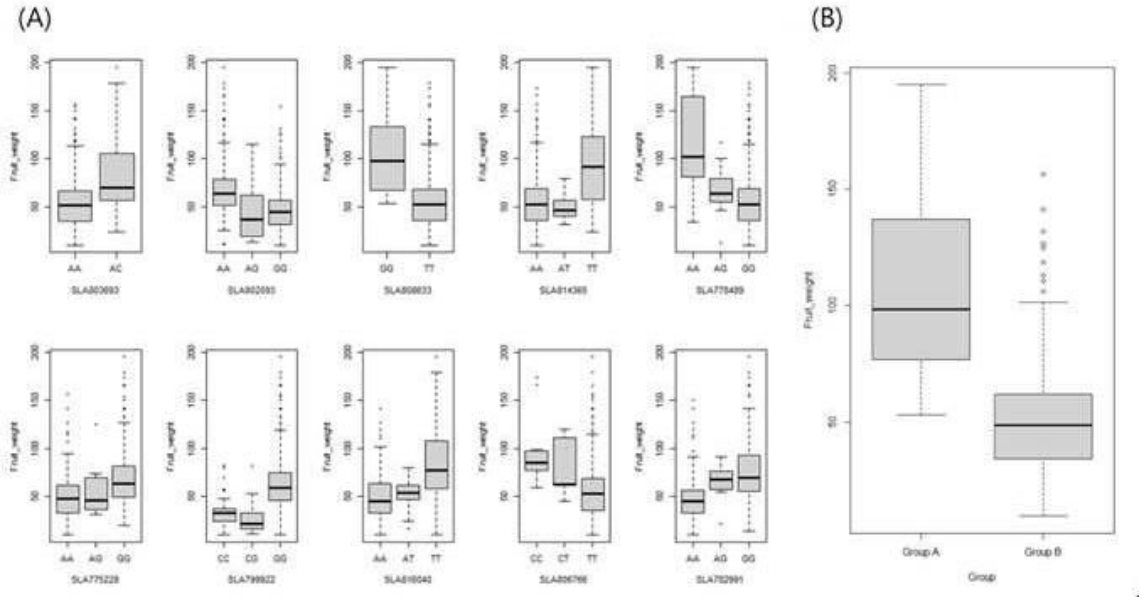
(54) 발명의 명칭 **과실류의 형질 선별용 분자 마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 토마토 과중 선별용 마커 조성물에 관한 것으로, 10개의 SNP를 포함하는 분자 마커를 제공하여 수확기 토마토의 과중을 조기에 예측 및 선별 할 수 있다.

또한, 본 발명은 토마토의 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물에 관한 것으로, 24개의 SNP를 포함하는 분자 마커를 제공하여 수확기 토마토의 과중, 과폭 및 과피두께를 조기에 예측 및 선별 할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/13 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395071843
과제번호	PJ015898012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린연계농생명혁신기술개발
연구과제명	토마토 핵심집단 및 유전분석 집단을 이용한 선발효율 증진 분자표지 기술 개발(1주관)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 서열의 137번째 위치, 서열번호 2의 서열의 137번째 위치, 서열번호 3의 서열의 145번째 위치, 서열번호 4의 서열의 138번째 위치, 서열번호 5의 서열의 140번째 위치, 서열번호 6의 서열의 141번째 위치, 서열번호 7의 서열의 137번째 위치, 서열번호 8의 서열의 142번째 위치, 서열번호 9의 서열의 136번째 위치, 및 서열번호 10의 서열의 138번째 위치에 존재하는 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 토마토 과중 선별용 마커 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 더 포함하는 것인, 토마토 과중 선별용 마커 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 제제는 상기 SNP를 검출할 수 있는 프라이머, 프로브 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 토마토 과중 선별용 마커 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 토마토 과중 선별키트.

청구항 5

선별 대상 토마토 시료에서 청구항 1의 토마토 과중 선별용 마커를 확인하는 단계를 포함하는 토마토 과중을 선별하는 방법.

청구항 6

서열번호 1의 서열의 137번째 위치, 서열번호 2의 서열의 137번째 위치, 서열번호 3의 서열의 145번째 위치, 서열번호 4의 서열의 138번째 위치, 서열번호 5의 서열의 140번째 위치, 서열번호 6의 서열의 141번째 위치, 서열번호 7의 서열의 137번째 위치, 서열번호 8의 서열의 142번째 위치, 서열번호 9의 서열의 136번째 위치, 서열번호 10의 서열의 138번째 위치, 서열번호 11의 서열의 144번째 위치, 서열번호 12의 서열의 144번째 위치, 서열번호 13의 서열의 139번째 위치, 서열번호 14의 서열의 140번째 위치, 서열번호 15의 서열의 139번째 위치, 서열번호 16의 서열의 139번째 위치, 서열번호 17의 서열의 143번째 위치, 서열번호 18의 서열의 145번째 위치, 서열번호 19의 서열의 137번째 위치 서열번호 20의 서열의 144번째 위치, 서열번호 21의 서열의 145번째 위치, 서열번호 22의 서열의 140번째 위치, 서열번호 23의 서열의 138번째 위치, 및 서열번호 24의 서열의 144번째 위치에 존재하는 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 검출 또는 증폭할 수

있는 제제를 더 포함하는 것인, 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 제제는 상기 SNP를 검출할 수 있는 프라이머, 프로브 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물.

청구항 9

청구항 6 내지 8 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별키트.

청구항 10

선별 대상 토마토 시료에서 청구항 6의 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커를 확인하는 단계를 포함하는 토마토 과중, 과폭 및 과피두께를 선별하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명의 토마토 과실 형질과 연관된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 토마토 세계 종자시장 규모가 약 1조원에 달하는 고부가가치 글로벌 채소작물로 국내에서도 소비가 증가하여 종자시장 규모가 2021년도에 352억으로 성장하여, 고추, 무, 양파 다음으로 큰 비중을 차지하고 있다. 국내 토마토 시장이 확대는 신품종 육성의 활성화를 이끌었는데 과실형질은 주요 육종목표가 되어 왔다. 우수한 품종을 육성하는데 표현형에 기반한 기존 육종방법은 시간과 비용이 많이 소요되어, DNA 분자표지 활용하여 선별효율을 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, 내병성 유전자를 선별하기 위한 분자표지 개발 연구가 활발하게 이루어졌으며 육종현장에서 MAS(Marker Assisted Selection)의 활용도가 높다.

[0004] 식물 육종은 MAS(marker-assisted selection)에 의해 크게 가속화되고 있다. QTL(Pedigree-based quantitative trait loci) 맵핑 및 GWAS(genome wide association study)는 정성적 특성 및 정량적 특성을 모두 맵핑하는 강력한 도구이다. 최근, 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing, NGS) 기반 QTL 맵핑 전략인 BSA-seq가 몇몇 곡물 및 채소에서 유전자를 신속하게 맵핑하는데 성공하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제 2388021호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 토마토 과중 선별용 마커 조성물을 제공함에 그 목적이 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 토마토 과중 선별키트를 제공함에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 토마토 과중을 선별하는 방법을 제공함에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물을 제공함에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별키트를 제공함에 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 토마토 과중, 과폭 및 과피두께를 선별하는 방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 1. 서열번호 1의 서열의 137번째 위치, 서열번호 2의 서열의 137번째 위치, 서열번호 3의 서열의 145번째 위치, 서열번호 4의 서열의 138번째 위치, 서열번호 5의 서열의 140번째 위치, 서열번호 6의 서열의 141번째 위치, 서열번호 7의 서열의 137번째 위치, 서열번호 8의 서열의 142번째 위치, 서열번호 9의 서열의 136번째 위치, 및 서열번호 10의 서열의 138번째 위치에 존재하는 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 토마토 과중 선별용 마커 조성물.

[0015] 2. 위 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 더 포함하는 것인, 토마토 과중 선별용 마커 조성물.

[0016] 3. 위 2에 있어서, 상기 제제는 상기 SNP를 검출할 수 있는 프라이머, 프로브 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 토마토 과중 선별용 마커 조성물.

[0017] 4. 위 1 내지 3 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 토마토 과중 선별키트.

[0018] 5. 선별 대상 토마토 시료에서 청구항 1의 토마토 과중 선별용 마커를 확인하는 단계를 포함하는 토마토 과중을 선별하는 방법.

[0019] 6. 서열번호 1의 서열의 137번째 위치, 서열번호 2의 서열의 137번째 위치, 서열번호 3의 서열의 145번째 위치, 서열번호 4의 서열의 138번째 위치, 서열번호 5의 서열의 140번째 위치, 서열번호 6의 서열의 141번째 위치, 서열번호 7의 서열의 137번째 위치, 서열번호 8의 서열의 142번째 위치, 서열번호 9의 서열의 136번째 위치, 서열번호 10의 서열의 138번째 위치, 서열번호 11의 서열의 144번째 위치, 서열번호 12의 서열의 144번째 위치, 서열번호 13의 서열의 139번째 위치, 서열번호 14의 서열의 140번째 위치, 서열번호 15의 서열의 139번째 위치, 서열번호 16의 서열의 139번째 위치, 서열번호 17의 서열의 143번째 위치, 서열번호 18의 서열의 145번째 위치, 서열번호 19의 서열의 137번째 위치 서열번호 20의 서열의 144번째 위치, 서열번호 21의 서열의 145번째 위치, 서열번호 22의 서열의 140번째 위치, 서열번호 23의 서열의 138번째 위치, 및 서열번호 24의 서열의 144번째 위치에 존재하는 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물.

[0020] 7. 위 6에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 더 포함하는 것인, 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물.

[0021] 8. 위 7에 있어서, 상기 제제는 상기 SNP를 검출할 수 있는 프라이머, 프로브 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물.

[0022] 9. 위 6 내지 8 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별키트.

[0023] 10. 선별 대상 토마토 시료에서 위 6의 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커를 확인하는 단계를 포함하는 토마토 과중, 과폭 및 과피두께를 선별하는 방법.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 토마토 과중 선별용 마커 조성물은 수확기 토마토의 과중을 조기에 예측 및 선별할 수 있다.

[0026] 본 발명의 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물은 수확기 토마토의 과중, 과폭 및 과피두께를 조

기에 예측 및 선별할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 과중 MAS용 분자표지 세트를 구성하고 있는 10개 SNP의 Box plot 분석한 결과이다. (A) 개별 SNP의 대립유전자 그룹간 과중 표현형 비교. (B) 10개의 SNP 중 5개 이상에서 과중 증가 대립유전자의 동형접합 그룹(Group A)과 과중 감소 관련 대립유전자의 동형접합 그룹(Group B)간의 표현형 비교.

도 2는 과중, 과폭 및 과피두께와 연관된 single nucleotide polymorphism(SNP, 단일염기다형성)을 보여주는 전장유전체연관분석(GWAS)의 Manhattan plot에 관한 그래프이다.

도 3은 과중, 과폭 및 과피두께를 선별하기 위해 개발된 24개의 분자표지 세트의 다중회귀 분석 결과이다.

도 4는 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 24개 분자표지의 토마토 염색체상 위치이다.

도 5는 과폭 MAS용 분자표지 세트를 구성하고 있는 9개 SNP의 Box plot 분석한 결과이다. (A) 개별 SNP의 대립유전자 그룹간 과폭 표현형 비교. (B) 9개의 SNP 중 5개 이상에서 과폭 증가 대립유전자의 동형접합 그룹(Group A)과 과폭 감소 관련 대립유전자의 동형접합 그룹(Group B)간의 표현형 비교.

도 6은 과피 두께 MAS용 분자표지 세트를 구성하고 있는 10개 SNP의 Box plot 분석이다. (A) 개별 SNP의 대립유전자 그룹간 과피 두께 표현형 비교. (B) 10개의 SNP 중 6개 이상에서 과피 두께 증가 대립유전자의 동형접합 그룹(Group A)과 과피 두께 감소 관련 대립유전자의 동형접합 그룹(Group B)간의 표현형 비교.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0031] 본 발명은 서열번호 1의 서열의 137번째 위치, 서열번호 2의 서열의 137번째 위치, 서열번호 3의 서열의 145번째 위치, 서열번호 4의 서열의 138번째 위치, 서열번호 5의 서열의 140번째 위치, 서열번호 6의 서열의 141번째 위치, 서열번호 7의 서열의 137번째 위치, 서열번호 8의 서열의 142번째 위치, 서열번호 9의 서열의 136번째 위치, 및 서열번호 10의 서열의 138번째 위치에 존재하는 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 토마토 과중 선별용 마커 조성물을 제공하여, 수확기 토마토의 과중을 조기에 예측 및 선별할 수 있다.

[0032] 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 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)이라 한다.

[0033] 용어 "대립 유전자(allele)"는 상동염색체의 동일한 유전자좌에 존재하는 한 종류의 유전자의 여러 타입을 의미한다.

[0034] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드 단위체가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오타이드의 중합체이다.

[0035] 용어 "뉴클레오타이드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 특별하게 다르게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다.

[0036] 용어 "선별"은 같은 계통의 유전자형이나 품종을 골라내는 것을 의미한다.

[0037] 본 발명의 "마커"는 서열번호 1 내지 10의 SNP 위치의 염기 또는 서열번호 1 내지 10에 대응되는 서열에서 SNP 위치에 대응되는 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 전체 또는 일부 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 상기 마커를 포함하는 것이고, 검출 또는 증폭되어 확인될 수 있는 것이라면 그 길이는 제한되지 않고, 예를 들면 12bp 이상, 50bp 이상, 100bp 이상, 300bp 이상, 500bp 이상, 5000bp 이하, 3000bp 이하, 1000bp 이하 등일 수 있다.

[0038] 토마토 과중 선별용 10개 SNP의 flanking sequence는 하기 표 1과 같다. 각 Flanking sequence에서 SNP 위치의 염기를 Y로 표기하였다.

표 1

[0040]

마커 이름	염색체	Flanking sequence	
		서열	서열번호
SLA803693	1	ATCAATCTGTATTTCTACATTGTTTTAATCACAAATAAATACAAGCGATACAACG ATGCTTGTACATATCAGATATATTCTATATAAGCATGTATTCCTAAATCATAAAA AAATACACGCATACAAGTGCAAATAAYTATAAATAATTTAATTTTACATGTATCG AAACATATTGTATAAAATCGTATTATTGCTACAACCTATATTTATCGAATTACAA CTTATATCTAGTATCTCTTCAATCTCAATCACCTATTTCTTTTTTATATGATCAA TAAAC	1
SLA802093	1	CTGCTCCAATTGGGGTAGCGACTGAATTAGCTGCTGGTGATGGTGATGGTGATGG TGATGGTGCTGATGTTGATCGGGATCGGAGGAAGTATGGCTGGTATCATCGTCGT CGTCGTCCCGGAAGAATCCAATATCAYAAAAAAAGGGTTCTTCTTCCTCCTCCTG TAAAATTGTCGGCTGAGATTGATCCAAGATTTGATGATGCGGGTCCAAGTGATGA TGGAACATATCTTCTTCTTCAACTTTGCTAGGATTCATAGCTTTCTGCAAAATGG GTATC	2
SLA808633	1	TCTGCAGTGTCCAGCAATGTCTTGCAATTCTGACAAAATATTAAGTCCTACATGC AAATGTTTATATCCATACACTGGGACACTACATTTCTTTTCCCTGTCCTTCTCAA ATTTAGAGAACTCAAGCTACTTTACAACCCTTGCYGGCTCTATGATGTCTGCATT TCTATCCAATGGGCTTCCAGTGGATTCAGTTTCTCTAAGTGATCCAACAGTTGAT GTTTATTCATATCTTCAAATTGAAGCACAAATCTTTCCCTCAACACAGGACAGTT TCAAT	3
SLA814365	2	AATATAATTTAATTATCATTATTTTTTAAAATAAAAATAAAAAATGTACAGTGAA ATAAAAAAAAGTATTATTTTAAATATAATTTATATTTTTGAAATTTTCATAGCAA AATAAAAAAATTAAAAATCTTGATCAAYGAGGTGTTTGTAGAGGGTAGTTGTGTC TTTTCATGAATGGAGTCAACACACTCGTTAAACAATCAGTGGCCTTTCTTTCTCC AACTGAAAAGTTAAAAAAAGTAGAACAGCTTTGTGCTCCGCCAGAGTGCTGTACA TTCAG	4
SLA778489	2	GCTAATAAAAAAACAAAGCAACATAGTAGTATTTCCTTATTTTTTTTAAAATAAA AATAAAAATTAGAGTATGTTTTGTTACTAAAAGTTTACGACCACAAAAAAAGAAA AAACATATGCTTCCATGAGAATGTTCTAAYTGCAAATCTTGAATAGTTGATGTGC AAATGATAGACAAAAATGTTAAATCCATTATATTTTGGTAAAACTAAATGTAGAG GTAATAAATAGAATCGTAAAAAAGGAGTTGAAGAGAAATGTCATTTAAGTAGAAA AAGTG	5
SLA775228	2	AGTAAATCTGAATTTGCTTTCAGATGTTTAATTCATCATTATCAGAAACTAAATG AGTAAACAAAATCTTTGGATATTACACGTTTATTGCTATTGCATGTGGATCAAAT AAAAATAATACACCCTTAGTGCATTACTACYGCGGAGGCTGAATATGCAGAAGCA AAAAGAAAGGAACCAAACACCTAATAATCAAAGCAGGGTTTAATGAAAGGGGTTA TTTCTAAATACTGGTAACCCAATAACCCCTATAGACCAATGTTTATTATGTCAAA CTGCT	6
SLA799922	5	GAATATATAATTGTTATTATTATTATTAAAGGTAAGAAAAGAGATTTGAATTAAA CTTCAAGAGATTAAAAAAAATAAGGCTAAATACATAATTAGATTCCTAAATTTGT TGGATATTTTCCCTCGTGTACCTCAGYTATGCTATTTTCCTATTGAATCATTAAA CCACCCATAATTTATTTTTTTATACACCGTTGGCTGATGTGGAACTAGATTTTGT GAATGATATTGATAGAGGACACATATGTTATTCCAGAACTCATTAGTCCAATTAA TAGTG	7
SLA816040	7	TGCTTCTCCGATCTAAATCCTCATATAACTATTTTCTCAGCTCAAATTAGCTCTG ATACTTCAAATTTTGAGTTTTTAACAATCTAATTGCTCTCTGATGATCTCTACCT TCAGAAAAATAGGGCTCCACCCGAAGAATTAYGTTCTGCATCTTGATGCATCTTC TTAGGTAATTTTATTTCATCTCAAGTAAGTAAGTCTTTAATAAATCTTATTAAAT TATTTTCTTTTCTTTATTCCTTCAAAAAAATGATATCAGAGTAAAAGAAAATGAA TAAAA	8
SLA806766	9	GGCAATAAAATTTATCACTTAAGTAAATATTTTGTAGCGACTACGATAAATTTTA GCGGTGACAAAAGTAGCCACTAACAAGGACTTAAGTTGGCTACTGATAAAAACTT TAGTGGCGACAAAAGTTGTCGTTAAYATCTTTTAGTGGCGACTGAAATACCTTTT CCGGCGATAAAAGTTGCACTAAAATCGCTTTTAGTGGCGACAAAATAGCTACAAA AGGTTATGAATGTGGTGGCTAAAAGTTACTTTAGAAACTGCCGCTAAAAGTTATA AAAGT	9
SLA782991	11	TAACATACTTATCGACATTTCTTTCAGCTCTCCAAAAGCATTTCCGAATAACTTG AACTATGTAGAAGAGTTTGGTTTTACCAAACAGTGCATGGATATAAGTTTTTTTA AGTTGCTGTTTCTTGTCAAAAAGAAAAYATTTAACTACCTCCAACTGTTTTCCAG TATTGTACCTTGAGATATTGGCCTTTCTTGTTCACTTTATTTTATGACAGGATCC TAATTCGAAGCATTTAGGCACTACTGTTTGGGATGCATCTATGGTTTTAGTAAAA TTTCT	10

[0041] 토마토 과중 선별용 10개의 SNP에 대한 각 SNP의 대립유전자는 하기 표 2와 같다.

[0042] 각 SNP에서 과중 증가와 관련된 대립유전자는 A, 감소와 관련된 대립유전자는 B로 표기하였다.

표 2

[0043]

마커 이름	A	B	마커 포함된 Flanking sequence 서열번호
SLA803693	C	A	1
SLA802093	A	G	2
SLA808633	G	T	3
SLA814365	T	A	4
SLA778489	A	G	5
SLA775228	G	A	6
SLA799922	G	C	7
SLA816040	T	A	8
SLA806766	C	T	9
SLA782991	G	A	10

[0044] 구체적으로, 선별대상 토마토 시료의 게놈에서 서열번호 1의 137번째 위치의 염기가 C이고, 서열번호 2의 서열의 137번째 위치의 염기가 A이고, 서열번호 3의 서열의 145번째 위치의 G이고, 서열번호 4의 서열의 138번째 위치의 염기가 T이고, 서열번호 5의 서열의 140번째 위치의 염기가 A이고, 서열번호 6의 서열의 141번째 위치의 염기가 G이고, 서열번호 7의 서열의 137번째 위치의 염기가 G이고, 서열번호 8의 서열의 142번째 위치의 염기가 T이고, 서열번호 9의 서열의 136번째 위치의 염기가 C이고, 및 서열번호 10의 서열의 138번째 위치의 염기가 G에 해당될수록, 그렇지 않은 경우에 비해 수확기 토마토의 과중이 증가한다.

[0045] 선별하고자 하는 토마토 시료에서 토마토를 선별하기 위하여 목적에 따라 통상의 기술자는 상기 SNP의 대립 유전자를 적절히 고려할 수 있다. 예를 들어, 10개의 SNP 모두 과중의 증가와 관련된 대립유전자를 포함하는 토마토 시료를 선별할 수 있고, 각 SNP의 과중 형질에 대한 기여도를 고려하여 일부만 과중의 증가와 관련된 대립유전자를 포함하는 토마토 시료를 선별할 수 있고, 10개의 SNP 모두 과중의 감소와 관련된 대립유전자를 포함하는 토마토 시료를 선별할 수 있다.

[0046] 예를 들어, 상기 각 SNP의 과중 형질에 대한 기여도를 고려하기 위하여, 당업계 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 당업계 공지된 방법은 전장 유전체 분석, 다중 회귀 분석일 수 있다.

[0047] 본 발명의 과중 선별용 마커 조성물은 상기 Flanking sequence에 상보적으로 결합할 수 있는 염기 서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 상기 마커 조성물이 상기 Flanking sequence에 상보적으로 결합할 수 있는 염기 서열의 일부를 포함하는 경우에는 SNP와 상보적으로 결합할 수 있는 염기를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 토마토 과중 선별용 마커 조성물은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 더 포함할 수 있다.

[0049] 용어 "폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 검출 또는 증폭시킬 수 있는 제제"는 검출 또는 증폭을 통해 다형성 부위(polymorphic site)를 확인하여 토마토 과중을 선별할 수 있는 조성물을 의미한다.

[0050] 용어 "다형성 부위(polymorphic site)"는 다형성이 나타난 염기의 위치를 의미하며, 본 명세서에서는 다형성이 나타난 위치에 대응하는 염기와 혼용하여 사용될 수 있다.

[0051] 토마토의 생육 단계는 시기에 따라 파종기, 육묘기, 개화기 및 수확기로 나눌 수 있다. 본 발명의 마커를 이용하면 수확기 이전 생육 단계에서 채취한 토마토의 시료로 수확기의 토마토 과중을 조기에 예측 및 선별 할 수 있다. 바람직하게는 파종기 및 육묘기, 더욱 바람직하게는 육묘기에서 선별 대상이 되는 토마토의 시료를 채취할 수 있으나, 이에 제한 되지 않는다.

[0052] 본 발명의 마커 조성물의 선별 대상이 되는 토마토의 시료는 토마토의 줄기, 잎, 뿌리, 꽃, 종자 또는 과실에서 채취할 수 있고, 바람직하게는 줄기 또는 잎이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 증폭시킬 수 있는 것이라면 그 서열 및 길이는 제한되지 않고 적절하게 설계/선택될 수 있다.

[0054] 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 Qβ 복제효소(replicase)를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 본 발명에서 이용되는 염기서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다.

[0056] 상기 용어, "실질적인 동일성"은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 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.

[0057] 본 발명의 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제는 상기 SNP를 검출할 수 있는 프라이머, 프로브 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 제제일 수 있다.

[0058] 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.

[0059] 상기 프라이머는 상기 SNP를 포함하는 Flainking sequence의 전부 또는 적어도 일부와 상보적으로 결합할 수 있는 염기 서열을 포함할 수 있다. 상기 프라이머는 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용할 수 있는 것이면 당업계의 공지의 방법을 이용하여 제조될 수 있다.

[0060] 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.

[0062] 또한, 본 발명은 상기 토마토 과중 선별용 마커 조성물을 포함하는 토마토 과중 선별키트를 제공한다.

[0063] 본 발명의 키트는 전술한 마커를 검출 또는 증폭시킬 수 있는 제제를 포함하는 조성물; 상기 검출 또는 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.

[0064] 상기 폴리뉴클레오타이드, 상기 프로브 및 상기 프라이머는 상기 설명한 바와 같다.

[0065] 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 표면상에 설명을 포함할 수 있다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함할 수 있다.

[0066] 상기 토마토 과중 선별키트의 선별 대상이 되는 토마토의 시료는 상기 설명한 바와 같다.

[0067] 선별대상 토마토 시료에서 수확기 토마토의 과중이 증가하는 토마토의 대립유전자는 상기 설명한 바와 같다.

[0068] 선별 목적에 따라 토마토를 선별하는 방법은 상기 설명한 바와 같다.

[0070] 또한, 본 발명은 선별 대상 토마토 시료에서 상기 토마토 과중 선별용 마커를 확인하는 단계를 포함하는 토마토 과중을 선별하는 방법을 제공하여, 수확기 토마토의 과중을 조기에 예측 및 선별할 수 있다.

[0071] 선별 대상 토마토 시료는 전술한 범위 내의 것을 사용할 수 있다.

[0072] 토마토 과중 선별용 마커의 확인은 선별대상 토마토의 서열번호 1의 서열의 137번째 위치, 서열번호 2의 서열의 137번째 위치, 서열번호 3의 서열의 145번째 위치, 서열번호 4의 서열의 138번째 위치, 서열번호 5의 서열의 140번째 위치, 서열번호 6의 서열의 141번째 위치, 서열번호 7의 서열의 137번째 위치, 서열번호 8의 서열의 142번째 위치, 서열번호 9의 서열의 136번째 위치, 및 서열번호 10의 서열의 138번째 위치에 존재하는 SNP의 대립 유전자를 확인하는 것이다.

[0073] 마커의 확인은 당 분야에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있으며, 예를 들면 상기 마커에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 등을 사용하여 해당 부위를 증폭하고, 그 증폭 산물을 확인하는 등에 의해 수행될 수 있다. 프라이머, 프로브 등은 앞서 설명한 바와 같다.

[0074] 본 발명의 방법은 상기 선별 대상 토마토 시료에서 상기 토마토 과중 선별용 마커를 확인하는 단계 전에, 대상 토마토에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0075] 선별대상 토마토 시료에서 수확기 토마토의 과중이 증가하는 토마토의 대립유전자는 상기 설명한 바와 같다.

[0076] 선별 목적에 따라 토마토를 선별하는 방법은 상기 설명한 바와 같다.

[0078] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 서열의 137번째 위치, 서열번호 2의 서열의 137번째 위치, 서열번호 3의 서열의 145번째 위치, 서열번호 4의 서열의 138번째 위치, 서열번호 5의 서열의 140번째 위치, 서열번호 6의 서열의 141번째 위치, 서열번호 7의 서열의 137번째 위치, 서열번호 8의 서열의 142번째 위치, 서열번호 9의 서열의 136번째 위치, 서열번호 10의 서열의 138번째 위치, 서열번호 11의 서열의 144번째 위치, 서열번호 12의 서열의 144번째 위치, 서열번호 13의 서열의 139번째 위치, 서열번호 14의 서열의 140번째 위치, 서열번호 15의 서열의 139번째 위치, 서열번호 16의 서열의 139번째 위치, 서열번호 17의 서열의 143번째 위치, 서열번호 18의 서열의 145번째 위치, 서열번호 19의 서열의 137번째 위치 서열번호 20의 서열의 144번째 위치, 서열번호 21의 서열의 145번째 위치, 서열번호 22의 서열의 140번째 위치, 서열번호 23의 서열의 138번째 위치, 및 서열번호 24의 서열의 144번째 위치에 존재하는 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물을 제공하여, 수확기 토마토의 과중, 과폭 및 과피두께를 조기에 예측 및 선별할 수 있다.

[0079] 용어 "SNP", "폴리뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드" 및 "선별"은 상기 설명한 바와 같다.

[0080] 용어 "마커"는 서열번호 1 내지 24의 SNP 위치의 염기 또는 서열번호 1 내지 24에 대응되는 서열에서 SNP 위치에 대응되는 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 전체 또는 일부 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 상기 마커를 포함하는 것이고, 검출 또는 증폭되어 확인될 수 있는 것이라면 그 길이는 제한되지 않고, 예를 들면 12bp 이상, 50bp 이상, 100bp 이상, 300bp 이상, 500bp 이상, 5000bp 이하, 3000bp 이하, 1000bp 이하 등일 수 있다.

[0081] 토마토의 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 24개 SNP의 flanking sequence는 하기 표 3과 같다. 각 Flanking sequence에서 SNP 위치의 염기를 Y로 표기하였다.

표 3

[0083]

마커 이름	염색체	Flanking sequence	서열번호
SLA803693	1	ATCAATCTGTATTTCTACATTGTTTTAATCACAAATAAATACAAGCGATACAACG ATGCTTGTACATATCAGATATATTCTATATAAGCATGTATTCCTAAATCATAAAA AAATACACGCATACAAGTGCAAATAAYTATAAATAATTTAATTTTACATGTATCG AAACATATTGTATAAAATCGTATTATTGCTACAACCTATATTTATCGAATTACAA CTTATATCTAGTATCTCTTCAATCTCAATCACCTATTTCTTTTTTATATGATCAA TAAAC	1
SLA802093	1	CTGCTCCAATTGGGGTAGCGACTGAATTAGCTGCTGGTGATGGTGATGGTGATGG TGATGGTGCTGATGTTGATCGGGATCGGAGGAAGTATGGCTGGTATCATCGTCGT CGTCGTCCCGGAAGAATCCAATATCAYAAAAAAAGGGTTCTTCTTCCTCCTCCTG TAAAATTGTCGGCTGAGATTGATCCAAGATTTGATGATGCGGGTCCAAGTGATGA TGGAACATATCTTCTTCTTCAACTTTGCTAGGATTCATAGCTTTCTGCAAAATGG GTATC	2
SLA808633	1	TCTGCAGTGTCCAGCAATGTCTTGCAATTCTGACAAAATATTAAGTCCTACATGC AAATGTTTATATCCATACACTGGGACACTACATTTCTTTTCCCTGTCCTTCTCAA ATTTAGAGAACTCAAGCTACTTTACAACCCTTGCYGGCTCTATGATGTCTGCATT TCTATCCAATGGGCTTCCAGTGGATTCAGTTTCTCTAAGTGATCCAACAGTTGAT GTTTATTCATATCTTCAAATTGAAGCACAAATCTTTCCCTCAACACAGGACAGTT TCAAT	3
SLA814365	2	AATATAATTTAATTATCATTATTTTTTAAAATAAAAATAAAAAATGTACAGTGAA ATAAAAAAAAGTATTATTTTAAATATAATTTATATTTTTGAAATTTTCATAGCAA AATAAAAAAATTAAAAATCTTGATCAAYGAGGTGTTTGTAGAGGGTAGTTGTGTC TTTTCATGAATGGAGTCAACACACTCGTTAAACAATCAGTGGCCTTTCTTTCTCC AACTGAAAAGTTAAAAAAAGTAGAACAGCTTTGTGCTCCGCCAGAGTGCTGTACA TTCAG	4
SLA778489	2	GCTAATAAAAAAACAAAGCAACATAGTAGTATTTCCTTATTTTTTTTAAAATAAA AATAAAAATTAGAGTATGTTTTGTTACTAAAAGTTTACGACCACAAAAAAAGAAA AAACATATGCTTCCATGAGAATGTTCTAAYTGCAAATCTTGAATAGTTGATGTGC AAATGATAGACAAAAATGTTAAATCCATTATATTTTGGTAAAACTAAATGTAGAG GTAATAAATAGAATCGTAAAAAAGGAGTTGAAGAGAAATGTCATTTAAGTAGAAA AAGTG	5
SLA775228	2	AGTAAATCTGAATTTGCTTTCAGATGTTTAATTCATCATTATCAGAAACTAAATG AGTAAACAAAATCTTTGGATATTACACGTTTATTGCTATTGCATGTGGATCAAAT AAAAATAATACACCCTTAGTGCATTACTACYGCGGAGGCTGAATATGCAGAAGCA AAAAGAAAGGAACCAAACACCTAATAATCAAAGCAGGGTTTAATGAAAGGGGTTA TTTCTAAATACTGGTAACCCAATAACCCCTATAGACCAATGTTTATTATGTCAAA CTGCT	6
SLA799922	5	GAATATATAATTGTTATTATTATTATTAAAGGTAAGAAAAGAGATTTGAATTAAA CTTCAAGAGATTAAAAAAAATAAGGCTAAATACATAATTAGATTCCTAAATTTGT TGGATATTTTCCCTCGTGTACCTCAGYTATGCTATTTTCCTATTGAATCATTAAA CCACCCATAATTTATTTTTTTATACACCGTTGGCTGATGTGGAACTAGATTTTGT GAATGATATTGATAGAGGACACATATGTTATTCCAGAACTCATTAGTCCAATTAA TAGTG	7
SLA816040	7	TGCTTCTCCGATCTAAATCCTCATATAACTATTTTCTCAGCTCAAATTAGCTCTG ATACTTCAAATTTTGAGTTTTTAACAATCTAATTGCTCTCTGATGATCTCTACCT TCAGAAAAATAGGGCTCCACCCGAAGAATTAYGTTCTGCATCTTGATGCATCTTC TTAGGTAATTTTATTTCATCTCAAGTAAGTAAGTCTTTAATAAATCTTATTAAAT TATTTTCTTTTCTTTATTCCTTCAAAAAAATGATATCAGAGTAAAAGAAAATGAA TAAAA	8
SLA806766	9	GGCAATAAAATTTATCACTTAAGTAAATATTTTGTAGCGACTACGATAAATTTTA GCGGTGACAAAAGTAGCCACTAACAAGGACTTAAGTTGGCTACTGATAAAAACTT TAGTGGCGACAAAAGTTGTCGTTAAYATCTTTTAGTGGCGACTGAAATACCTTTT CCGGCGATAAAAGTTGCACTAAAATCGCTTTTAGTGGCGACAAAATAGCTACAAA AGGTTATGAATGTGGTGGCTAAAAGTTACTTTAGAAACTGCCGCTAAAAGTTATA AAAGT	9
SLA782991	11	TAACATACTTATCGACATTTCTTTCAGCTCTCCAAAAGCATTTCCGAATAACTTG AACTATGTAGAAGAGTTTGGTTTTACCAAACAGTGCATGGATATAAGTTTTTTTA AGTTGCTGTTTCTTGTCAAAAAGAAAAYATTTAACTACCTCCAACTGTTTTCCAG TATTGTACCTTGAGATATTGGCCTTTCTTGTTCACTTTATTTTATGACAGGATCC TAATTCGAAGCATTTAGGCACTACTGTTTGGGATGCATCTATGGTTTTAGTAAAA TTTCT	10

SLA773218	1	GATTTTGTATCATTATTTTTTTTCCTTGCCCAATAGAAATAAATGGAATATATAG CTTACAATTTGCAAGAAATGTACCAATGATTTTTATGTCATTATTTTGTGATGTG ATGGGTAGCTCCTTAAAGACTAGGAAATCAAGTYTATTCTTTTTTTGTTCTCAAG AGTAATTCTTTTAATTAGTATTTATTTTGGGAGGGAAACATAATTAAATAAAAAG GTAGCCTTCATGGACCCAAAAAAATAACAATGCAACAAATATAATTAATTAGCAA CCACA	11
SLA781717	1	ATATATAGCACGACATCTTGTCATACGATTTGAATTGACACTTCAATAAATGTTC GGAAAAGTTTTGTCATTTTTGTTGGTCCTTGTTCTTTAGGAAGTCAAATAATAAT AATTTAAATATTAATCCAATTAAGATGCATTGAYACCCATAGCTCCGCCCCTGCT AGTAGGCACTTTTAGCTAACTGCACAGAAGAATAATACAGAACAGAACAGAGAAT GACTATGTTTATGTCTTCATCCAGTCCAATGTCCTCATCTTGTTAAAGATACCAA CAACA	12
SLA783419	1	GTTGGGGCAAAATGGGCCGAACGATGGTTCATAATAGCCTAACCGGCCAACTCCT ACCATATTTTAATTTCCTAGTTTTCTTATAATTTGTTTAGTTTCTTAATAAGACA TTTTTGTTTATTATGGCTATATACAACAYATCAAATGATAAAACAGGCAGATACA ACTCCTTGCCACACTTCTAAAGCTAGATCTCTTTTTATGGTTATTTAGTTGGCAG AATTTTGCCCCTGTAGATTGCCCTATTAACTTGTTGGATTTTGGATTTCTCCTTC CCGTT	13
SLA768673	1	AAATACGATATCTTTCTTTAAAAATACATAAATTTTCAATTTTTTTCAATTGAAA ATCTATCAAAAATTATAATCCATTTAATCTGGTAATAAGATAATTTCTATATATT CAAACAGATTTCACATTGTAAAATTATACYAATTATGTTACATTGTTGTTTGTGC TGTAATTTGTTGGCAGTCCAAATCAAAGCCCCAAAATTGGGGGTATTTTTTATGA TATATGACAAGATAATAAAGTTGGCATCAAGACTTAGAAAATCTGTAGCAATATA GTAAT	14
SLA789940	2	TCCACCAAAAGTCCTTAATCAAAGATTTTAAATTTAACTCGGTAGAAAGTATTGA CAACTCCTTATAATGTGACTTTACGCGACATAAATTAAAAATACACATACTCTAA ATATAAATATCAAACCTCAAATAAAAAAYAAATTGCAAGTGATCAACCTTTAAAG TTCGACTTAGATGATAGCGAGTCAGTGTATTATCACCAAAATTTGAGCCCAAATT GGAAGGATAAGGGTTGGGCTTTATGTATGCATTGGGCATAATTTGATGGATCTCA AGAGT	15
SLA778779	2	CCAAATCATCCTCAAATTTATCATACACATCATAAACAACAGCATGCTCCTAAAG AAGGCTCTATAAAGTTTATCCAGTGAAGGGTGCAGAACGACTTGCAACCGTAAAC TTCTACGTTATAATTTATGAACTTCTTAYATCAAACTTTTCAAGATTTGATCCTC CTTAATTGGCGTTTGTAAACTATTTGGTTGAAGTTGGAAAGGAAGTATTTGGAAG TTGAAGTAATGTTTGGATATACCTGAAATCATTACACATCACTTGAAATAAGTGT TAAGA	16
SLA811603	4	ATCCATAACGTGAAACATGTCTAATCACATATATTAGTAGTCACATCAATTATAT TCAAAACACATAAATATATGATCATTGCTTCTCAGAATTTAGCTAAGACATGAAT AAAATTTGTATCTCAATAAAATTTAAATAATTYTTGCTTCATGTAATTTTGGCTA TCCAATTTGATGTGATATATCAATCTCAATGAACTTTATATTTTGATTAATGATT AAGTCTTTCAATATAGTTTTTGCTTTCTTTTATTCATTTTTCTTATCTTCGGTTG TTATG	17
SLA812345	6	TTAGTCGGACCGTATCTGATGTCCAAGGTCAATGATGACATTTTACACCCTACAT CTTTCGACAGTGTGCGCTGCCTAAGGGCGATGATAGCATTGTTATGCCCAACATC GTCGACCATGTGTGCAGTCCAAGAGTGATGATGCYATGCAACGCCCTACGTAGTG CGACCCTGTGTATGTTGTCCAATGGCGATGAAGGCCTTCCAAGCACGATGTTGTT CGACTGCGTGTTCTGGCTAAAGTCCATGATGGCATGCCATGCCCGACGTAGTCTG ATCGT	18
SLA772216	8	TTTTCAATCTTCATTGTTCACTTTTTTGATAGTGAATAATGAATGTTAATCATTG GAGTTGTATTTGGTTGTTAATATAAATTGGATTTAATTATTTTTGAGTTTTTGTG GATGATTTGGAATGAAAAAAGTGGGGYAAAAATTAATTTTATGGCCAATCGTGTT TTTTTTGGAGTCTTTCCTCAAATCAGTGGAAGAGGAAGAAAAGAAGTTAATTATT CAAGAATTTGGAAATGAAGTTATTATATGAAAATAGATATAAATTTCTTCTCTTG TAAAA	19
SLA786548	8	AAAGATTGTTGCTGATTTGGAGCAGAAATCGGCTTCTCTTAGCAGTTTAATTGAC AAGAATGCCCGAGCGTTGGAAGACCTTAGGGATATCCATTCACCCTTTGTCCACA AATATAGCGAAAATGTAAAGATGGTAAGCCTTCYAGGTATACGGGATACAATAAT AGATTTGAAACCCACAGAGTTGCTTAACAGAGTTCCAGAGAATTCAACACCTTTT TATGAACAAAATCTGATGTCTCTGATCTCTGTTCATCCTTCATTCGTGGCAAATA AAAAG	20
SLA782893	9	GTCACCTTTGATTACTTTATCCATGTTTGATTGATTAACTTCTCATACAAGTTGT GATTGTAGAACTGAAATTCTTTATCTAAAATATTCAGCTCCACATGGCACATAGA AATGGAAGAATAGGAATACTAATCCCTGTTTAGCYGGCAATCTTAGTAGCTCAGT TGATTGTCCAACTATCGTAGATCAGTTTTTTAATGTTTTAGAAAAGACTCCTTGT TTGGCATTATTACTATTCGGGAATCATATTTGTCTGTTACTACAGTTCTAAAACA GAACT	21

SLA799872	9	AATAAGCTACCCGAAGCAAGAAAAACAACAAGTAATACAAAAGCGAAAGAAACAT AAAAATACTAAAGAAGCTTGCATTTAGTAACGAACGTCGTTGCGAGTCTATTGTT ATTTTGTTCATTGCTAACAAAAATCAATCYTCTATTTACCGTCGCTAAGTGAATT TAGTTACAAAATTTGTTTTTTAGCTACAAAAATATTTCATTGCTAAATTCAATTT TTTAATATCTACAAACCTTCTATCATAATGCTCGATATCTATTAAGAGACACTTA TGTTA	22
SLA768317	12	TACAAAGCCAAGGTTAAAACCAGGGGCGAACTCACGTGACTCGGTAAGGGTACAC ATACACTCGCTAACTTCGAAAAAATGATATATATTATATATATATAAAACTAGCA AAACAAAGAATATAATTAACAGTGCAAYCATAAATAACATAAATGTGTCCTTGTG CAATTGGTACAAGCTAGTGAGACACAAGTTCAAACCCAGCTAGTTACCTATTTTT ATTTTAAATTTGCCTTAGAGCTTATATTAGTGCACCCAAAGTCTTCAAAACCTGG GTTCG	23
SLA811651	12	TATTACACGTAGAATGTCATATGAACGGGTTGAATATATATAATAATTTTTTGTA TATGTCTACCTACATAGCTTAAATTAAAGTTAACAGATTCAGATGAACCTAGATA CATGCTCTAGATTCAGCTCTAAACTTATTAGTCYAAAGTGAAAAGCGATTGAGCA AATGAAAAATAATATTTATATTTGATTGAAAAAAAATTATAAAATTTAAATTTTT CGAGTTTACTAATTATTGCGGTTTGATTCAACTTCAGGCTCTGGTGCTCAATCGA AAAAT	24

[0084] 구체적으로, 선별대상 토마토 시료의 게놈에서 서열번호 1의 137번째 위치의 염기가 C이고, 서열번호 2의 서열의 137번째 위치의 염기가 A이고, 서열번호 3의 서열의 145번째 위치의 G이고, 서열번호 4의 서열의 138번째 위치의 염기가 T이고, 서열번호 5의 서열의 140번째 위치의 염기가 A이고, 서열번호 6의 서열의 141번째 위치의 염기가 G이고, 서열번호 7의 서열의 137번째 위치의 염기가 G이고, 서열번호 8의 서열의 142번째 위치의 염기가 T이고, 서열번호 9의 서열의 136번째 위치의 염기가 C이고, 및 서열번호 10의 서열의 138번째 위치의 염기가 G에 해당될수록, 그렇지 않은 경우에 비해 수확기 토마토의 과중이 증가한다.

[0085] 선별대상 토마토 시료의 게놈에서 서열번호 11의 144번째 위치의 염기가 A이고, 서열번호 2의 서열의 137번째 위치의 염기가 A이고, 서열번호 14의 서열의 140번째 위치의 A이고, 서열번호 15의 서열의 139번째 위치의 염기가 T이고, 서열번호 16의 서열의 139번째 위치의 염기가 G이고, 서열번호 17의 서열의 143번째 위치의 염기가 G이고, 서열번호 8의 서열의 142번째 위치의 염기가 A이고, 서열번호 9의 서열의 136번째 위치의 염기가 T이고, 및 서열번호 23의 서열의 138번째 위치의 염기가 T에 해당될수록, 그렇지 않은 경우에 비해 수확기 토마토의 과폭이 증가한다.

[0086] 선별대상 토마토 시료의 게놈에서 서열번호 12의 144번째 위치의 염기가 A이고, 서열번호 13의 서열의 139번째 위치의 염기가 A이고, 서열번호 15의 서열의 139번째 위치의 T이고, 서열번호 7의 서열의 137번째 위치의 염기가 G이고, 서열번호 18의 서열의 145번째 위치의 염기가 C이고, 서열번호 19의 서열의 137번째 위치의 염기가 G이고, 서열번호 20의 서열의 144번째 위치의 염기가 A이고, 서열번호 21의 서열의 145번째 위치의 염기가 A이고, 서열번호 22의 서열의 140번째 위치의 염기가 G이고, 및 서열번호 24의 서열의 144번째 위치의 염기가 T에 해당될수록, 그렇지 않은 경우에 비해 수확기 토마토의 과피두께가 증가한다.

[0087] 선별하고자 하는 토마토 시료에서 토마토를 선별하기 위하여 목적에 따라 통상의 기술자는 상기 SNP의 대립 유전자를 적절히 고려할 수 있다. 예를 들어, 24개의 SNP 모두 형질의 증가와 관련된 대립유전자를 포함하는 토마토 시료를 선별할 수 있고, 각 SNP의 형질에 대한 기여도를 고려하여 일부만 형질의 증가와 관련된 대립 유전자를 포함하는 토마토 시료를 선별할 수 있고, 24개의 SNP 모두 형질의 감소와 관련된 대립유전자를 포함하는 토마토 시료를 선별할 수 있다.

[0088] 본 발명의 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물은 상기 Flanking sequence에 상보적으로 결합할 수 있는 염기 서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 상기 마커 조성물이 상기 Flanking sequence에 상보적으로 결합할 수 있는 염기 서열의 일부를 포함하는 경우에는 SNP와 상보적으로 결합할 수 있는 염기를 포함한다.

[0089] 본 발명의 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 더 포함할 수 있다.

[0090] 용어 "폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 검출 또는 증폭시킬 수 있는 제제" 및 "다형성 부위"는 상기 설명한 바와 같다.

[0091] 토마토 선별 대상이 되는 토마토 시료는 상기 설명한 바와 같다.

[0092] 상기 유전자 증폭 방법은 상기 설명한 바와 같다.

[0093] 상기 제제에 포함되는 염기서열은 상기 설명한 바와 같다.

[0094] 본 발명의 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제는 상기 SNP를 검출할 수 있는 프라이머, 프로브 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 제제일 수 있다.

[0095] 용어 "프라이머" 및 "프로브"는 상기 설명한 바와 같다.

[0096] 상기 프라이머는 상기 SNP를 포함하는 Flainking sequence의 전부 또는 일부와 상보적으로 결합할 수 있는 염기서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다.

[0098] 또한, 본 발명은 상기 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커 조성물을 포함하는 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별키트를 제공한다.

[0099] 본 발명의 선별키트는 상기 설명한 바와 같다.

[0100] 선별대상 토마토 시료에서 수확기 토마토의 과중, 과폭 및 과피두께가 증가하는 토마토의 대립유전자는 상기 설명한 바와 같다.

[0101] 선별 목적에 따라 토마토를 선별하는 방법은 상기 설명한 바와 같다.

[0103] 또한, 본 발명은 선별 대상 토마토 시료에서 상기 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커를 확인하는 단계를 포함하는 토마토 과중, 과폭 및 과피두께를 선별하는 방법을 제공하여, 토마토의 과중, 과폭 및 과피두께를 조기에 선별할 수 있다.

[0104] 선별 대상 토마토 시료는 전술한 범위 내의 것을 사용할 수 있다.

[0105] 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커의 확인은 선별대상 토마토의 서열번호 1의 서열의 137번째 위치, 서열번호 2의 서열의 137번째 위치, 서열번호 3의 서열의 145번째 위치, 서열번호 4의 서열의 138번째 위치, 서열번호 5의 서열의 140번째 위치, 서열번호 6의 서열의 141번째 위치, 서열번호 7의 서열의 137번째 위치, 서열번호 8의 서열의 142번째 위치, 서열번호 9의 서열의 136번째 위치, 서열번호 10의 서열의 138번째 위치, 서열번호 11의 서열의 144번째 위치, 서열번호 12의 서열의 144번째 위치, 서열번호 13의 서열의 139번째 위치, 서열번호 14의 서열의 140번째 위치, 서열번호 15의 서열의 139번째 위치, 서열번호 16의 서열의 139번째 위치, 서열번호 17의 서열의 143번째 위치, 서열번호 18의 서열의 145번째 위치, 서열번호 19의 서열의 137번째 위치 서열번호 20의 서열의 144번째 위치, 서열번호 21의 서열의 145번째 위치, 서열번호 22의 서열의 140번째 위치, 서열번호 23의 서열의 138번째 위치, 및 서열번호 24의 서열의 144번째 위치에 존재하는 SNP의 대립 유전자를 확인하는 것이다.

[0106] 마커의 확인은 당 분야에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있으며, 예를 들면 상기 마커에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 등을 사용하여 해당 부위를 증폭하고, 그 증폭 산물을 확인하는 등에 의해 수행될 수 있다. 프라이머, 프로브 등은 앞서 설명한 바와 같다.

[0107] 본 발명의 방법은 상기 선별 대상 토마토 시료에서 상기 토마토 과중, 과폭 및 과피두께 선별용 마커를 확인하는 단계 전에, 대상 토마토에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0108] 선별대상 토마토 시료에서 수확기 토마토의 과중, 과폭 및 과피두께가 증가하는 토마토의 대립유전자는 상기 설명한 바와 같다.

[0109] 선별 목적에 따라 토마토를 선별하는 방법은 상기 설명한 바와 같다.

[0110] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0112] <u>실시예</u>

[0113] <u>1. GWAS(genome-wide association study) 분석용 토마토 유전자원 확정</u>

[0114] 한국, 러시아, 미국, 중국 등 18개 이상의 국가에서 수집하여 구축된 192점의 토마토 1차 핵심집단과 인도, 중

국, 터키 등 7개 국가에서 수집된 162점으로 구성된 2차 핵심집단을 공시재료로 사용하였다.

[0116] 2. 토마토 형질 선별용 분자표지 세트 개발

[0117] 공시재료의 과중, 과폭, 과피두께에 대한 표현형은 5년간 조사되었으며 1차 핵심집단의 경우 2016년과 2017년, 2차 핵심집단의 경우 2018에서 2020년까지 조사되었다. 공시재료의 DNA는 유묘기의 어린잎을 채취하여 CTAB 방법을 이용하여 분리하였으며, 농도를 μL당 50 ng으로 맞추어 51k Axiom tomato array를 사용한 유전형 분석에 사용되었다. 두 집단에서 missing data rate < 10 %, minor allele frequency > 5 % 기준으로 필터링하여 신뢰성 높은 31,330개의 SNP를 발굴하여 사용하였다.

[0119] 3. 토마토 유전자원을 대상으로 토마토 유용 형질에 대한 GWAS 분석

[0120] (1) 1차 선별

[0121] 전장유전체연관분석(GWAS)은 유전형 정보, 표현형 정보, 집단구조 행렬을 사용하여 각 집단과 형질, 연차별로 multilocus mixed model(MLMM)을 통해 독립적으로 수행되었으며, 각 분석에 대하여 $p < 0.0005$ 수준에서 유의성 있는 것으로 나타난 SNP들 중 304개를 1차로 선별하였다.

[0122] (2) 2차 선별

[0123] 선별된 SNP들로 mixed linear model(MLM) 분석을 수행하였고, $p < 0.05$의 유의수준에서 과중, 과폭, 과피두께와 연관성을 보이는 24개의 SNP들을 최종 선별하였다(도 2).

[0124] 과중 형질의 경우, Mixed linear model(MLM) 분석을 통해 $p<0.05$의 유의수준에서 과중과 연관성을 보이는 SNP을 발굴하였고 이들의 유전체상의 위치와 분산팽창지수(variance inflation factor)를 고려하여 최종적으로 10개의 SNP을 선별하였으며 Box plot 분석을 통해 각 SNP에서 과중 증감에 관여하는 대립유전자를 확인하였다.

[0125] 과폭 형질의 경우, Mixed linear model(MLM) 분석을 통해 $p<0.05$의 유의수준에서 과폭과 연관성을 보이는 SNP을 발굴하였고 이들의 유전체상의 위치와 분산팽창지수(variance inflation factor)를 고려하여 최종적으로 9개의 SNP을 선발하였으며 Box plot 분석을 통해 각 SNP에서 과폭 증감에 관여하는 대립유전자를 확인하였다.

[0126] 과피 두께 형질의 경우, Mixed linear model(MLM) 분석을 통해 $p<0.05$의 유의수준에서 과피 두께와 연관성을 보이는 SNP을 발굴하였고 이들의 유전체상의 위치와 분산팽창지수(variance inflation factor)를 고려하여 최종적으로 10개의 SNP을 선발하였으며 Box plot 분석을 통해 각 SNP에서 과피 두께 증감에 관여하는 대립유전자를 확인하였다.

[0128] 4. 선별된 SNP에 대한 다중회귀분석

[0129] (1) 과중 형질에 대한 10개의 SNP 분자표지 세트

[0130] 다중회귀분석을 통해 토마토 과중에 관여하는 10개의 SNP에 대한 하기 수학식 1과 같은 회귀식(R^2 = 0.574)을 얻었다.

[0132] [수학식 1]

[0133] Y = 102.61+(SLA803693 * 14.33)+(SLA802093 * 4.17)+(SLA808633 * 10.53)+(SLA814365 * 13.14)+(SLA778489 * 5.72)+(SLA775228 * 4.20)+(SLA799922 * 7.05)+(SLA816040 * 7.02)+(SLA806766 * 6.50)+(SLA782991 * 8.93).

[0135] 다중회귀분석을 위해 각 SNP의 대립유전자는 동형접합체의 경우 1과 -1로, 이형 접합체의 경우 0으로 변환되어 사용되었다. 개발된 과중 MAS용 분자표지 세트의 선별효율을 검증하기 위해 5개 이상의 SNP의 대립유전자를 기반하여 토마토 공시재료를 두 개의 그룹, Group A(A 대립유전자를 동형접합으로 가지고 있는 공시재료)와 Group B(B 대립유전자를 동형접합으로 가지고 있는 공시재료)으로 구분하였다. 그룹간 과중 평균값을 Box plot으로 비

교한 결과 유의미한 과중의 차이를 볼 수 있었다(도 1).

[0136] 또한, 다중회귀분석을 통해 이러한 분자표지 세트가 설명하는 분산의 비율을 계산한 결과 전체변이의 57.4%(과중), 50.3%(과폭) 및 45.0%(과피두께)를 설명하고 있음을 알 수 있었다(도 3).

[0137] 선별된 과중 형질에 관여하는 SNP는 하기 표 4에 나타내었다. 표 4에서 과중 증가와 관련된 대립유전자는 A, 감소와 관련된 대립유전자는 B로 표기하였으며, 전체 표현형 변이 중 MAS용 분자표지 세트가 설명하는 비율을 다중회귀분석의 R^2 값으로 나타내었다.

표 4

[0139]

마커 이름	염색체	Allele		R^2
		A	B	
SLA803693	1	C	A	0.574
SLA802093	1	A	G	
SLA808633	1	G	T	
SLA814365	2	T	A	
SLA778489	2	A	G	
SLA775228	2	G	A	
SLA799922	5	G	C	
SLA816040	7	T	A	
SLA806766	9	C	T	
SLA782991	11	G	A	

[0141] (2) 과폭 형질에 대한 9개의 SNP 분자표지 세트

[0142] 다중회귀분석을 통해 토마토 과폭에 관여하는 9개의 SNP에 대한 하기 수학식 2와 같은 회귀식(R^2 = 0.503)을 얻었다.

[0144] [수학식 2]

[0145] Y = 98.63+(SLA773218 * 16.31)+(SLA802093 * 17.04)+(SLA768673 * 9.94)+(SLA789940 * 10.21)+(SLA778779 * 12.98)+(SLA811603 * 15.02)+(SLA816040 * 2.24)+(SLA806766 * 5.64)+(SLA768317 * 17.43).

[0147] 다중회귀분석을 위해 각 SNP의 대립유전자는 동형접합체의 경우 1과 -1로, 이형 접합체의 경우 0으로 변환되어 사용되었다. 개발된 과폭 MAS용 분자표지 세트의 선별효율을 검증하기 위해 5개 이상의 SNP의 대립유전자를 기반하여 토마토 공시재료를 두 개의 그룹, Group A(A 대립유전자를 동형접합으로 가지고 있는 공시재료)와 Group B(B 대립유전자를 동형접합으로 가지고 있는 공시재료)으로 구분하였다. 그룹간 과폭 평균값을 Box plot으로 비교한 결과 유의미한 과폭의 차이를 볼 수 있었다(도 5).

[0148] 또한, 다중회귀분석을 통해 이러한 분자표지 세트가 설명하는 분산의 비율을 계산한 결과 전체변이의 57.4%(과중), 50.3%(과폭) 및 45.0%(과피두께)를 설명하고 있음을 알 수 있었다(도 3).

[0149] 선별된 과폭 형질에 관여하는 SNP는 하기 표 5에 나타내었다. 표 5에서 과폭 증가와 관련된 대립유전자는 A, 감소와 관련된 대립유전자는 B로 표기하였으며, 전체 표현형 변이 중 MAS용 분자표지 세트가 설명하는 비율을 다중회귀분석의 R^2 값으로 나타내었다.

표 5

[0151]

마커 이름	염색체	Allele		R^2
		A	B	
SLA773218	1	A	G	0.503
SLA802093	1	A	G	
SLA768673	1	A	T	
SLA789940	2	T	A	
SLA778779	2	G	A	
SLA811603	4	G	A	
SLA816040	7	A	T	
SLA806766	9	T	C	
SLA768317	12	T	C	

[0153] (3) 과피두께 형질에 대한 10개의 SNP 분자표지 세트

[0154] 다중회귀분석을 통해 토마토 과피두께에 관여하는 10개의 SNP에 대한 하기 수학식 3과 같은 회귀식(R^2 = 0.451)을 얻었다.

[0156] [수학식 3]

[0157] Y = 5.63+(SLA781717 * 0.362)+(SLA783419 * 0.425)+(SLA789940 * 0.229)+(SLA799922 * 0.569)+(SLA812345 * 0.214)+(SLA772216 * 0.108)+(SLA786548 * 0.273)+(SLA782893 * 0.600)+(SLA799872 * 0.440)+(SLA811651 * (-0.282)).

[0159] 다중회귀분석을 위해 각 SNP의 대립유전자는 동형접합체의 경우 1과 -1로, 이형 접합체의 경우 0으로 변환되어 사용되었다. 개발된 과피두께 MAS용 분자표지 세트의 선별효율을 검증하기 위해 5개 이상의 SNP의 대립유전자를 기반하여 토마토 공시재료를 두 개의 그룹, Group A(A 대립유전자를 동형접합으로 가지고 있는 공시재료)와 Group B(B 대립유전자를 동형접합으로 가지고 있는 공시재료)으로 구분하였다. 그룹간 과피두께 평균값을 Box plot으로 비교한 결과 유의미한 과피두께 의 차이를 볼 수 있었다(도 6).

[0160] 또한, 다중회귀분석을 통해 이러한 분자표지 세트가 설명하는 분산의 비율을 계산한 결과 전체변이의 57.4%(과중), 50.3%(과폭) 및 45.0%(과피두께)를 설명하고 있음을 알 수 있었다(도 3).

[0161] 선별된 과피두께 형질에 관여하는 SNP는 하기 표 6에 나타내었다. 표 6에서 과피두께 증가와 관련된 대립유전자는 A, 감소와 관련된 대립유전자는 B로 표기하였으며, 전체 표현형 변이 중 MAS용 분자표지 세트가 설명하는 비율을 다중회귀분석의 R^2 값으로 나타내었다.

표 6

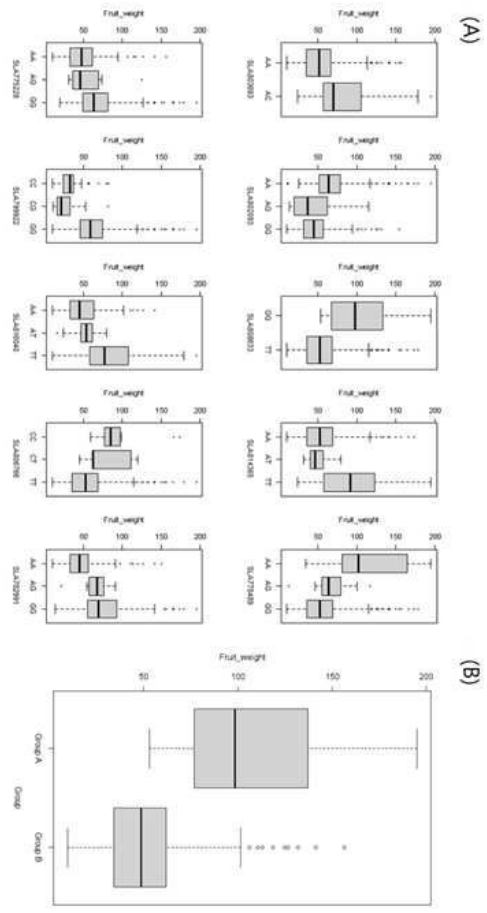
[0163]

마커 이름	염색체	Allele		R^2
		A	B	

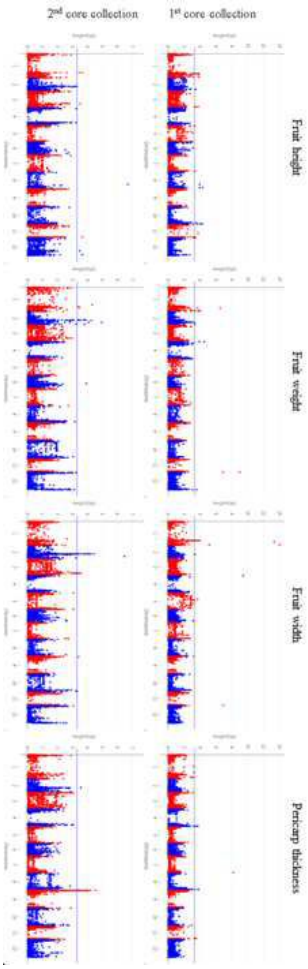
SLA781717	1	A	C	0.451
SLA783419	1	A	T	
SLA789940	2	T	A	
SLA799922	5	G	C	
SLA812345	6	C	G	
SLA772216	8	G	A	
SLA786548	8	A	C	
SLA782893	9	A	G	
SLA799872	9	G	A	
SLA811651	12	T	C	

도면

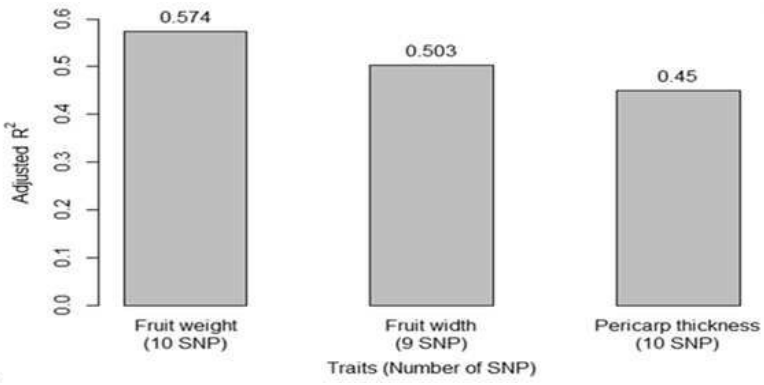
도면1



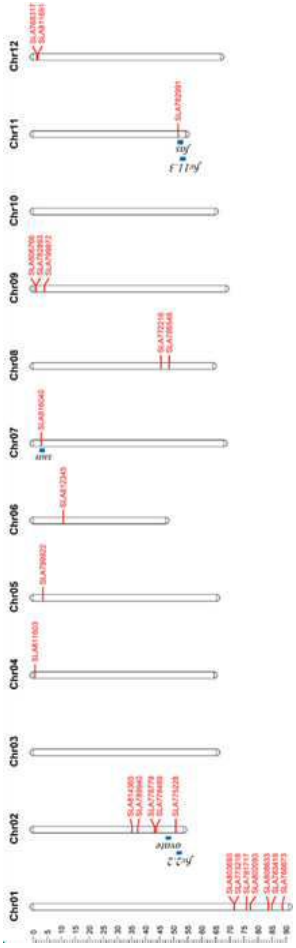
도면2


Pericarp thickness
Fruit width
Fruit weight
Fruit height
1st core collection
2nd core collection

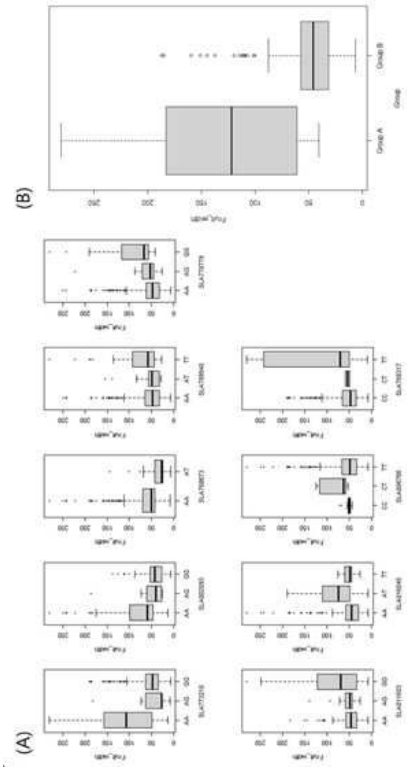
도면3


Adjusted R2
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.574
0.503
0.45
Fruit weight (10 SNP)
Fruit width (9 SNP)
Pericarp thickness (10 SNP)
Traits (Number of SNP)

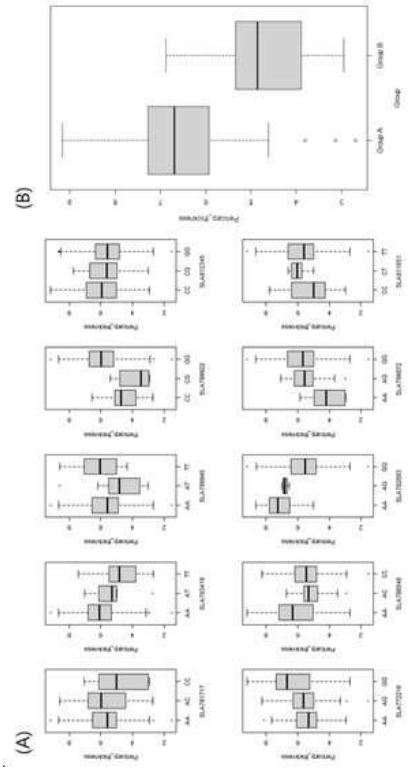
도면4


Chr01
Chr02
Chr03
Chr04
Chr05
Chr06
Chr07
Chr08
Chr09
Chr10
Chr11
Chr12

도면5


(A)
(B)
Group A
Group B
Group

도면6



서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.