(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0058140
(43) 공개일자 2025년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2600/13 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0141025
(22) 출원일자 2023년10월20일
심사청구일자 2023년10월20일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이성우
대전광역시 유성구 죽동로 39, 209동 2401호 (죽동, 죽동칸타빌아파트)
유희진
세종특별자치시 조치원읍 오구미1길 7
양서윤
충청북도 제천시 신죽하로 165, 101동 501호 (모산동, 로즈웰모산힐)
(74) 대리인
최규환

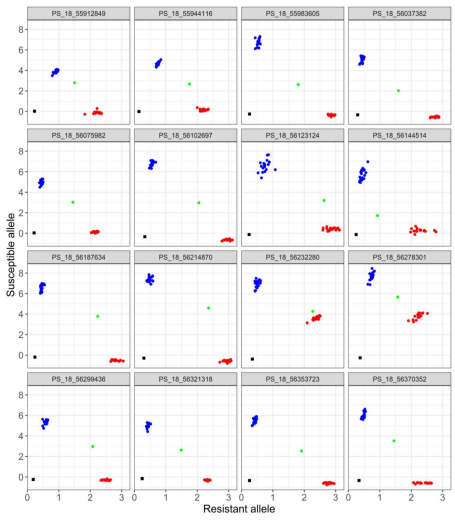
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **콩 역병 저항성을 판별하기 위한 SNP 기반 KASP 프라이머 세트 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 콩 역병 저항성을 판별하기 위한 SNP 기반 KASP 프라이머 세트 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 SNP 기반 KASP 프라이머 세트를 이용하면 역병 저항성 생물검정보다 노동력 및 시간을 절약할 수 있으므로, 역병 저항성 유전자원의 선발 요구에 빠르게 대응할 수 있어 신품종 콩 육성에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395076628
과제번호	RS-2019-RD008897
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	수요자맞춤형육종소재대량 · 신속발굴기술개발
연구과제명	콩 유전자원 병 저항성, 내재해성, 식품이용적합성 특성평가(4공동)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국립농업과학원
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 49 내지 64의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 있어서, 각각의 염기서열 중 101번째에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism) 염기를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 기재된 SNP 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 cDNA를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 마이크로어레이.

청구항 3

제1항에 기재된 SNP 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 cDNA를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 프로브.

청구항 4

서열번호 1 내지 48로 표시된 올리고뉴클레오티드에서 서열번호 1부터 시작하여 인접한 3개의 올리고뉴클레오티드가 하나의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 16개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 KASP(kompetitive allele specific PCR) 프라이머 세트 조성물.

청구항 5

제4항의 KASP 프라이머 세트 조성물; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약;을 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 완충액을 포함하는 것인 키트.

청구항 7

콩 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제4항의 KASP 프라이머 세트 조성물을 이용하여 KASP를 수행하는 단계; 및

상기 KASP의 증폭산물을 분석하는 단계;를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 증폭 단계의 산물의 검출은 겔 전기영동, DNA 칩, 형광 측정, 인광 측정 또는 방사성 측정을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 콩 역병 저항성을 판별하기 위한 SNP 기반 KASP 프라이머 세트 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 콩의 역병은 토양에 생존하는 난균류인 파이토프토라 소재(*Phytophthora sojae*)에 의해 발병되는 것으로, 미국, 브라질, 아르헨티나와 같은 대규모 콩 생산국에서 생산량을 크게 감소시키는 주요한 콩의 주요 병 중 하나이다. 콩 역병균은 콩이 유일무이한 기주식물일 정도로 기주 범위가 매우 좁다. 토양 내에서 또는 콩 식물체 파편등에서 겨울 동안 생존할 수 있고, 콩 뿌리에서 유출되는 아이소플라본에 의해 유인되는 주화성(chemotaxis)을 가진다. 감수성 콩 식물체가 콩 역병균에 감염되면 뿌리와 줄기가 썩음으로써 고사하게 되고, 이는 결과적으로 수량을 감소시킨다. 콩 역병균은 배수가 불량한 토양, 습한 토양에서 발병 확률이 높으며, 토양이나 식물체 파편에서 수년 간 생존 가능하여 방제가 어렵기 때문에 식물의 저항성을 이용하는 것이 가장 지속 가능한 방제 방법이다.

[0003] 우리나라에서는 1998년 처음 콩 역병이 발견된 이래 병 발생 보고가 꾸준히 증가하고 있으나 이후 연구가 많이 수행되지 않았고, 역병 저항성에 대한 유전 분석 연구도 초기 단계이다. 콩 역병에 대한 저항성을 확인하는 생물 검정은 균주를 직접 유묘의 하배축에 접종하는 방식으로 이루어진다. 이 생물 검정 방법은 식물을 균일한 생장 단계까지 재배하는 과정과 접종할 균주를 배지에서 배양하는 작업이 선행되어야 한다. 파종 후에도 병 반응을 확인하기까지 14일이라는 시간이 소요되고, 식물체를 유지하기 위한 생장상 공간도 필요하다. 대량의 유전자원을 검정하거나 다수의 육종 계통을 대상으로 실험하는 경우 많은 노동력, 공간 및 시간을 필요로 하게 된다. 따라서 콩 역병 저항성 자원의 탐색과 역병 저항성 관련 유전자의 확보가 우선 필요하며, 저항성 관련 유전자에 대한 분자육종 및 유전체 육종 시스템 적용을 위한 분자마커 개발과 유전자의 염기서열 분석 등 관련 기술의 선점 및 연구 파이프라인 구축이 절실히 필요하다.

[0004] 콩의 주요한 역병 저항성 기작은 *Rps*(Resistance to *Phytophthora sojae*)라는 저항성 유전자(*R* gene, *R*)에 의해 형성되는 질적 저항성(qualitative resistance)으로 나타난다. 식물체에서 *R* 유전자에 의해 생성되는 R 단백질은 병원균이 생성하는 비병원성(avirulence, Avr) 단백질을 특이적으로 인식하여 저항성을 가지게 되는데, 이러한 상호작용을 유전자-대-유전자(gene-for-gene) 저항성이라고 한다. 우리나라 콩 유전자원들은 유전적 다양성이 매우 크고, 미국이나 중국의 콩 유전자원들과는 유전적 차이가 있는 것으로 여러 연구에 보고되어 있기 때문에 미국이나 중국 토착 재배콩에 존재하지 않는 새로운 역병 저항성 유전자를 보유할 가능성이 크다. 따라서 기존에 보고되어 있지 않은 역병 저항성 유전자를 발굴하고 연구함으로써 그 가치를 선점할 필요가 있다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2022-0092112호에는 콩 염색체 3번에 위치하는 SNP에 관한 '콩 역병균에 대한 저항성 또는 감수성을 가지는 콩 품종 판별용 마커 조성물 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2018-0028410호에는 콩 염색체 7번에 위치하는 '대두에서 파이토프토라 뿌리 및 줄기 썩음 관련 유전자좌'가 개시되어 있으나, 본 발명의 콩 염색체 18번에 위치하는 '콩 역병 저항성을 판별하기 위한 SNP 기반 KASP 프라이머 세트 조성물 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 콩 역병균(*Phytophthora sojae*) 중 하나인 균주 40468에 대해 저항성을 부여하는 저항성 유전자(Resistance to *Phytophthora sojae*, *Rps*)를 탐색하였다. 콩 역병에 대해 저항성을 보이는 '천알' 품종과 감수성을 보이는 '대풍' 품종을 모·부본으로 하는 재조합자식계통(recombinant inbred line, RIL) 집단을 대상으로 유전자지도 작성 및 역병 저항성 연관 유전자좌의 위치를 분석하여, 역병 저항성과 매우 유의미하게 연관된 염색체 18번 내 55,912,198~56,412,565 bp 영역이 역병 저항성과 밀접하게 연관되어 있음을 확인하였다. 또한, 상기 영역 내에서 역병 저항성 또는 감수성을 판별할 수 있는 SNP 마커 16개를 개발하였고, 상기 SNP 마커에 기반한 KASP 프라이머 세트가 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 정확하게 판별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 49 내지 64의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 있어서, 각각의 염기서열 중 101번째에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism) 염기를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위

한 SNP 마커 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 SNP 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 cDNA를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 마이크로어레이를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 SNP 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 cDNA를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 프로브를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 48로 표시된 올리고뉴클레오티드에서 서열번호 1부터 시작하여 인접한 3개의 올리고뉴클레오티드가 하나의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 16개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 KASP(kompetitive allele specific PCR) 프라이머 세트 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 KASP 프라이머 세트 조성물; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약;을 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 콩 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명에 따른 KASP 프라이머 세트 조성물을 이용하여 KASP를 수행하는 단계; 및 상기 KASP의 증폭산물을 분석하는 단계;를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 SNP 기반 KASP 프라이머 세트를 이용하면 역병 저항성 생물검정보다 노동력 및 시간을 절약할 수 있으므로, 역병 저항성 유전자원의 선발 요구에 빠르게 대응할 수 있어 신품종 콩 육성에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 콩 역병균(*Phytophthora sojae* KACC 40468)에 의해 발병된 역병에 대해 감수성을 가지는 '대풍(Daepung)' 품종과 저항성을 가지는 '천알(Cheonal)' 품종의 사진이다.

도 2는 본 발명의 SNP 마커가 포함된 콩 염색체 18번의 유전자지도이다. 염색체 18번 내 55,912,198~56,412,565 bp 영역은 상당히 높은 LOD(logarithm of odds) 값을 가지므로, 해당 영역은 균주 40468에 대해 *Rps*(Resistance to *Phytophthora sojae*)라는 저항성 유전자가 존재할 가능성이 매우 높다.

도 3은 본 발명의 SNP 기반 KASP 프라이머 세트 16개(표 3 및 4)를 모·부본으로 사용된 대풍과 천알, 이들의 재조합자식계통 집단(저항성 18계통, 감수성 18계통), 그리고 대풍과 천알 DNA를 동량으로 혼합하여 만든 합성이형접합체(Synthetic Heterozygosity)에 적용한 결과이다. 파란색은 대풍의 대립유전자를 가지는 콩 계통(유전자원)을, 빨간색은 천알 대립유전자를 가지는 콩 계통(유전자원)을, 초록색은 합성이형접합체를, 검정색은 음성대조군(증류수 처리)을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 49 내지 64의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 있어서, 각각의 염기서열 중 101번째에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism) 염기를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 연속된 뉴클레오티드는 8 내지 100개의 연속된 뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 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.

[0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 SNP 마커 조성물에 있어서, 상기 SNP 위치 염기는 서열번호 49 내지 64의 염기서열 모두 101번째로, 다형성 염기 정보는 표 1 및 2의 SNP 염기서열 정보에서 [/]로 표시하였으며, 본 발명의 서열번호 49 내지 64의 염기서열은 표 1 내지 2의 사선(/) 앞에 위치한 염기를 포함하는 서열을 의미한다.

[0019] 본 발명의 SNP 마커를 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원의 판별에 사용할 수 있는 것은, 서열번호 49로 표

시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 C 또는 T로, 서열번호 50으로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 T 또는 G로, 서열번호 51로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 T 또는 C로, 서열번호 52로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 G 또는 A로, 서열번호 53으로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 C 또는 T로, 서열번호 54로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 G 또는 A로, 서열번호 55로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 T 또는 C로, 서열번호 56로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 C 또는 A로, 서열번호 57으로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 C 또는 T로, 서열번호 58로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 C 또는 T로, 서열번호 59로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 C 또는 T로, 서열번호 60으로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 T 또는 C로, 서열번호 61로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 T 또는 C로, 서열번호 62로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 G 또는 A로, 서열번호 63으로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 A 또는 G로, 서열번호 64로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 101번째가 T 또는 C로 다르게 나타나는 것에 근거한 것이다. 상기 SNP 위치 염기에 있어서, 서열번호 49 내지 64의 염기서열 중 101번째 염기가 각각 T, G, C, A, T, A, C, A, T, T, T, C, C, A, G 및 C 염기일 경우 역병 저항성 콩 유전자원으로 판별할 수 있다(표 1, 2, 7 및 8 참고).

[0020] 본 발명은 상기 서열번호 49 내지 64의 염기서열에서 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 염기가 된다. 이러한 측면에서, 본 명세서에 제시된 모든 서열은, 특별한 언급이 없는 한, 게놈 DNA의 센스 가닥에 있는 서열을 기준으로 한 것이다.

[0021] 본 발명은 또한, 서열번호 49 내지 64의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 있어서, 각각의 염기서열 중 101번째에 위치한 SNP 염기를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 마이크로어레이를 제공한다.

[0022] 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오티드는 아미노-실란, 폴리 L-라이신 또는 알데히드의 활성기가 코팅된 기판에 고정될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 상기 기판은 실리콘 웨이퍼, 유리, 석영, 금속 또는 플라스틱일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 폴리뉴클레오티드를 기판에 고정화시키는 방법으로는 피에조일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로피펫팅(micropipetting)법, 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용할 수 있다.

[0023] 발명에 따른 마이크로어레이는 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드, 그에 의해 코딩되는 폴리펩티드 또는 그의 cDNA를 이용하여 본 분야의 당업자에게 알려져 있는 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0024] 본 발명은 또한, 서열번호 49 내지 64의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 있어서, 각각의 염기서열 중 101번째에 위치한 SNP 염기를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 프로브를 제공한다.

[0025] 본 명세서에서, 용어 '프로브'는 혼성화 프로브로서, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 디옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 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 디옥시리보뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 명세서에서, 용어 '혼성화(hybridization)'는 상보적인 단일 가닥 핵산들이 이중-가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 완전히 매칭되거나 일부 미스매치로 실질적으로 매칭되는 2개의 핵산 가닥 사이에서 일어날 수 있다. 혼성화를 위한 상보성은 혼성화 조건, 특히 온도에 따라 달라질 수 있다.

[0027] 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 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 뉴클레오티드인 서열번호 49 내지 64의 101

번째 위치의 뉴클레오티드를 포함하는 8 내지 100개의 연속 뉴클레오티드를 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 존재등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다.

[0028] 본 발명은 또한, 서열번호 1 내지 48로 표시된 올리고뉴클레오티드에서 서열번호 1부터 시작하여 인접한 3개의 올리고뉴클레오티드가 하나의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 16개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 KASP(kompetitive allele specific PCR) 프라이머 세트 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명에서, 용어 "KASP"는 PCR(polymerase chain reaction) 기반의 분석 방법 중 하나로, 상동의(homogenous) 그리고 형광(fluorescence) 기반의 유전형 분석 기술이다. KASP는 대립형질(allele)-특이적 올리고 연장(extension) 및 신호생성을 위한 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer)를 기반으로 하는 기술이다.

[0030] 본 발명의 KASP 프라이머 세트 조성물은 콩 역병균인 파이토프토라 소재(*Phytophthora sojae*) KACC 40468 균주에 의해 발생된 역병에 대해 저항성 또는 감수성을 보이는 콩의 염색체 18번 내 55,912,198~56,412,565 bp 영역에서 특이적으로 차별화되는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)의 염기 타입을 검출하는 프라이머 세트이다. 본 발명의 프라이머 세트 조성물은 콩 역병에 대해 저항성을 보이는 '천알' 품종과 감수성을 보이는 '대풍' 품종을 모·부본으로 하는 재조합자식계통(recombinant inbred line, RIL) 집단의 게놈 서열을 이용하여 제작되었으며, 소수의 콩 품종에 국한되지 않고, 다양한 콩 유전자원에 대해서도 역병의 저항성 또는 감수성 판별이 가능하다.

[0031] 본 발명의 KASP 프라이머 세트 조성물은 연속되는 서열번호 3개의 올리고뉴클레오티드가 하나의 프라이머 세트를 이루며, 2개의 정방향 프라이머와 1개의 역방향 프라이머로 구성되어 있다. 본 발명의 프라이머 세트 조성물에 있어서 인접한 3개의 올리고뉴클레오티드는 순서대로 FAM이 결합된 정방향 프라이머, HEX가 결합된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 구성되어 있으며, 구체적으로 정방향 프라이머의 5' 말단에는 FAM 또는 HEX 형광물질이 부착되어 있고 3' 말단에는 SNP를 나타내는 염기가 결합되어 있으며, 공통의 역방향 프라이머 1개로 구성되어 있다.

[0032] 본 발명의 KASP 프라이머 세트 조성물은 바람직하게는 상기 16개의 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 프라이머 세트를 포함할 수 있으며, 상기 16개의 프라이머 세트를 동시에 이용하면 역병에 대한 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 효과적으로 판별할 수 있다.

[0033] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1 내지 48의 서열 내의 29개 이상, 30개 이상, 31개 이상, 32개 이상, 33개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머(34개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 1의 서열 내의 31개 이상, 32개 이상, 33개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 증폭 부위에 결합할 수 있는 서열번호 1 내지 48의 염기서열에서 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다. 서열번호 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 및 46의 올리고뉴클레오티드 프라이머는 형광물질 FAM이 부착된 정방향 프라이머이고, 서열번호 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44 및 47의 올리고뉴클레오티드 프라이머는 형광물질 HEX가 부착된 정방향 프라이머이며, 서열번호 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 및 48의 올리고뉴클레오티드 프라이머는 역방향 프라이머이다.

[0034] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 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 복합도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0035] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들

면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 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, ^{32}P), 형광성 분자, 화학그룹(예를 들어, 비오틴) 등이 있다.

[0036] 프라이머의 적합한 길이는 사용하고자 하는 프라이머의 특성에 의해 결정된다. 프라이머는 주형의 서열과 정확하게 상보적일 필요는 없지만 주형과 혼성복합체(hybrid-complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적이어야만 한다.

[0037] 본 발명은 또한, 상기 KASP 프라이머 세트 조성물; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약;을 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 키트를 제공한다.

[0038] 본 발명의 키트에 있어서, 상기 KASP 프라이머 세트 조성물은 전술한 바와 같다.

[0039] 본 발명의 키트에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 본 발명의 키트는 또한 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 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면상에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0041] 본 발명은 또한,

[0042] 콩 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

[0043] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 KASP 프라이머 세트 조성물을 이용하여 KASP를 수행하는 단계; 및

[0044] 상기 KASP의 증폭산물을 분석하는 단계;를 포함하는, 역병 저항성 또는 감수성 콩 유전자원을 판별하기 위한 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 KASP 프라이머 세트 조성물은 전술한 바와 같다.

[0046] 본 발명의 방법은 콩 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 콩 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, Wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트 조성물을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적핵산을 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 Qβ 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 이용 가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[0047] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 콩 시료는 식물체의 잎, 줄기, 뿌리, 열매 또는 종자 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 상기 표지 물질은 FAM, HEX, VIC, JOE, ROX, TAMRA, Cy3 또는 Cy5 등일 수 있다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5' 말단에 상기 표지 물질을 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 하기 표 3 및 4에 기재된 바와 같다.

[0049] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 KASP의 증폭산물을 분석하는 단계는 유전형 분석을 통해 수행될 수 있다. 구체적으로는, 정방향 프라이머의 5' 말단에 부착되어 있는 형광물질 FAM 또는 HEX와, 3'

말단에 결합된 SNP를 통해 유전형을 구별할 수 있다.

[0051] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0053] **재료 및 방법**

[0054] **1. 식물재료**

[0055] 본 발명은 콩 역병균(*Phytophthora sojae* KACC 40468)에 대해 감수성을 보이는 '대풍' 품종과 저항성을 보이는 '천알' 품종을 각각 모·부본으로 교배하여 만든 36개의 재조합자식계통(recombinant inbred lines, RIL)으로 이루어진 분리집단을 이용하였다.

[0057] **2. DNA 추출 및 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커 분석**

[0058] 대풍(모본), 천알(부본) 및 RIL 집단 36계통의 유묘에서 어린 잎을 채취하고, CTAB(Cetyl Trimethyl Ammounium Bromide) 방법으로 게놈 DNA를 추출하였다. 각 DNA 시료에 대해 Axiom® 180K SoyaSNP array(Affymetrix, 미국)를 이용하여 SNP 유전자형 분석을 수행하였다.

[0060] **3. 역병에 대한 표현형 검정**

[0061] 콩 역병균 40468을 V8 배지에 치상하고 10일 동안 배양한 후 배지와 함께 주사기로 마쇄하여 접종원을 준비하였다. 접종에 이용될 콩 계통(유전자원)들은 종자를 15개씩 원형 포트에 파종하여 생장상 안에서 발아시켰다. 접종은 7일차 유묘의 하배축 상단의 가운데 부분을 의료용 칼날로 1cm 세로 길이로 절개하고, 유묘의 절개 부위에 마쇄한 V8 배지를 충전하는 방법으로 이루어졌다. 배지의 마쇄는 50 ㎖ 주사기에 2회 통과시키는 방법으로, 마쇄 후 10 ㎖ 주사기와 18 게이지(G) 굵기의 바늘을 이용하여 하배축 절개 부위의 내부 관다발계에 충분한 양의 배지가 닿을 수 있도록 약 0.4 ㎖씩 배지를 접종하였다.

[0062] 접종 후 식물은 약 16시간 고습처리 후, 25℃에서 낮/밤 길이 16:8(L:D)h로 설정한 생장상 안에 놓고 배양하였다. 접종 7일 후 각 유묘의 저항성 또는 감수성 반응을 카운트하여 전체 유묘 수 대비 고사한 유묘 수의 비율(%)을 다음과 같이 계산하였다; (고사한 유묘 수/전체 유묘 수)×100(%).

[0063] 고사한 유묘의 비율이 20% 이하이면 저항성(resistant), 80% 이상이면 감수성(susceptible), 20% 초과 80% 미만이면 중간형(intermediate)으로 표현형을 결정하였다. 상기 방법으로 계통당 3회 반복 검정하였다.

[0065] **4. 단일염기변이 기반 유전자지도 작성 및 역병 저항성 연관 유전자좌 분석**

[0066] 유전자지도는 IciMapping(version 4.2) 소프트웨어를 이용하여 작성하였다. 전체 유전체에 분포하는 169,028개의 고품질 SNP 데이터를 얻은 후, 모·부본간 다형성을 보이는 22,637개의 SNP를 필터링하였다. Binning을 통해 결과값에 중복성이 큰 SNP를 제거하여 최종적으로 2,322개의 SNP를 이용하여 유전자지도를 작성하였다. 그 다음, 일원분산분석(single-factor analysis of variance)과 구간분석(interval mapping)을 통해 역병 저항성 연관 유전자좌의 위치를 특정하였다.

[0068] **5. KASP(Kompetitive Allele Specific PCR) 프라이머 세트 제작**

[0069] 유전분석 결과에 따라, 콩 염색체 18번의 55,912,198~56,412,565 bp에 존재하는 52개의 SNP 중에서 유전자 영역에 위치하면서 각 대립유전자에 특이적으로 반응할 수 있는 SNP 16개(표 1 및 2)를 선정하여 KASP 프라이머 세트(표 3 및 4)를 개발하였다. 각 프라이머 세트는 2개의 대립유전자-특이적 정방향 프라이머와 공통의 역방향 프라이머를 포함한다. KASP 프라이머 세트는 대립유전자 특이적인 2개의 정방향 프라이머의 5'-말단에 마스터 믹스(master mix) 내 FRET cassettes에 상응하는 두 종류의 oligo tail이 붙어있어 대립유전자형에 따라 달라

지는 형광물질의 차이를 통해 유전형을 분석할 수 있다. 본 발명에 있어서, 하기 표 1 및 2의 괄호 안에서 '/'를 기준으로 왼쪽 SNP 염기는 역병 감수성 관련 SNP, 오른쪽 SNP 염기는 역병 저항성 관련 SNP를 의미한다.

표 1

[0070] 본 발명의 SNP 마커 정보(1)

염색체	물리적 위치(bp)	SNP ID	서열정보	서열번호
18	55,912,849	AX-90485402	AGACGAAATAAACAACTAGTACCTAACCATACTAAAATAACAGAA GTGGTTGATGATCAAATATTTGGCTTCTAGTTAAATATATTATTG TATTTGGAGG[C/T]CCCAGAACGAGTGGCTCTTGAGTCATCAAA TTCATCAACCCTTCTTTCTTCTTGCTCTTTGAGATGAAACTGCCT TTCCAAATCTCCTTTTTCCTCCAAA	49
	55,944,116	AX-90490662	ATGCCTATGAATTGCTCTTGCAAAGATGATCCTTCCCATAATAAA CGCCAATGCACTTGTAATGTTGTGTGTAACACATGAGACAATTTT GCCTCTAGAG[T/G]GCACTTCAGTCCAAATTATTCATAAAATAA AAAAACGTGTACTGATCTTGTAATTTCTCTACATATGTTGAGAAT TTTAAAAGCCCATCACCTAATGTTC	50
	55,983,605	AX-90402411	GCTCATATATGCTTACAGGTACTGGAGGCTTCTTAGGTGACCAAG AGAGGGAGGAATCCCCCCACTGAAGAAGTTGTTAGAGAGATCAAG CGTTTGAAGC[T/C]TTGAAAGTTTGCCTAACTCTGAAGGGATTG GTCCACTTATGTTGTTATTCTGTAGCAGCCTGAAAAGTAGTCCAA AAAACCCTTCTTAGTGAACAAAGAA	51
	56,037,382	AX-90400765	ACATTTTTATTTTAAATATTATTTTCCATGTTCCTCTTCCTTATT AATTTTGTTGCAAATTCATTTCTGTGCATGTTCACTACGCTAAGT TCAAAAATGG[G/A]AGATCGATGCAATTGCACATGTTAAGGTTT GAAACAAATTGTGATTGCACCCAAGTTTCCAATTTGAATATTGAA CACAAAACTGAAACAAAGTTCCGAT	52
	56,075,982	AX-90487878	CTCTTCTTTTTTTTGTTCTTATCTCTTTTTTATTGAACAAATTTT TATCAAGGAAAAATATAAATACATGTGCCTTGTCATTTTACTTGT AGCTGGTTAG[C/T]TCACCTAAGTCCATTATGATATTCAACTAA TTCAAGGATTAGGTAAATGATCAAATGGAAGTAACATGCATGAAA GCATCAAGCATGCATGCCGAGGAAA	53
	56,102,697	AX-90476841	TCCCACAATTCAGGTATTTCATCGTGTTATGTACTACCAACTACT ACATTAGGAATGTATTATCTTGTTGGTTCTTCAATGTTGTTTGTT GTTAACCTTG[G/A]AAATTTGTTACTGAGATAAATATCAAAAGA ATTTCCCAGTAGTGCTTAAACTTGAATTAGATACTCTCAGATATA ATGGATTCTGTTTCCTGGATACTTC	54
	56,123,124	AX-90413289	AGCACATGTGGATCGAATAAAAGGAAAAGGTGTTCGTATATGCTC CTCCATTGATCATGATCATGTTCAGAACAATATCATATACGGTTC AAATCATTCG[T/C]AAGAAGCTATAAATGCTATGACTCCATTAC AAGGTACAACTACTTTGTCACTCTCACTGGAAGAAGAAAAAAAAA AACTAATCTTACATAACTTTACCCT	55
	56,144,514	AX-90344000	ACGTTAGAAGAGACTTAAGTGCTGAAATTGTACTAAATGAAACTA TTATAATTTAATATAGTACACAAGGCTAGGCATAAAGCACCCATT TCCATTTAAT[C/A]ATTTAAATATGGAAAGTGTTGCAACTGAAT ACAATAAATGACCTCTCATGCTGAATTTTTTGGCACCTTTTCACT CTAGGCTGTATTAAACACTGTTTAA	56

표 2

[0071] 본 발명의 SNP 마커 정보(2)

염색체	물리적 위치(bp)	SNP ID	서열정보	서열번호
18	56,187,634	AX-90413871	CTCACCATGTGATTCACACCTCTCTTCCACCGTCCACTCGTTAAC CCAGTAATCTCCATTTGTCTTTCCCATATGATATATATATCACCT TTGCCTTCAA[C/T]ACATCCCACATAACATAACCTCTTGTTTTG TCATCTAAGAAAACCTAGTGAGAGTAAGCACACATTGATCAGCAA CAATGGCAGCCTACTCAAGCCATGC	57
	56,214,870	AX-90448445	TTGATTCCCTCATCATTACTCCTATGATTCTCCAATTTTCTCCTC CCAATTTCCTTTTGCCAGCTGTGTTTTCTGTTGAGCATTTCCCTC TTCCAACCGA[C/T]TTCTCCACTCCTTCTCTTCCTTCTTTCATC AAATTCCATCCTGGCCCCCTTTTTCTCATCTTCTTTGGCACACCT AAAGGCCCATTTTTTCATTTCTTCC	58
	56,232,280	AX-90374236	AGATCGGCTTAGCTCAACCTTTAGCCTCTTCCTGATAGTATCATC TCTACCTTAAAGAATGGAGAGCTGCCTCTGCAGCTCAAACATCAT AATATTCAAT[C/T]AACTTGTGATGTTGATCATGTGGGTTTTTA CGTTCCAACTTTGCATGTTGTAATGTCATAAGTTATTAGTTTAAG GTATTGATAACAAATTAACCTAAAA	59
	56,278,301	AX-90453819	GGCGGCGGAGACTCCGGTGGCGGTGGCGGAGGCGGCGTCGGCGGG GGATGAGGAGGTGCACCTCTATGATAGTAATCGGAGGGTTGGGAG TGAGGATGGG[T/C]TGTTCTCGGATTCTGAGAAGGACGAGGTTT TGCTTTTAGCCGCTGCCAAGGATGTTCCTGCACCTGTTCCTCTCT CAGGTTCAATTTTGGACATTGTGTG	60
	56,299,436	AX-90516634	GATTGGTGAGTGAGACCACAACTAAATTATAATAATAATTGACAA AGGTTTTTTTTCCTAATTTAACTTGGAATACTTCTAGTTTTTCAG TGGTGTATAT[T/C]TGGATGCATCAATATCAATAGCAATAAGTA ATAACAATAAAAGATTGCTTGATTGATGGCATTGCATATATGGGT ATGGTATTGCCAATAAGATGTTTAT	61
	56,321,318	AX-90428430	CTCACAATCCAATAACGATCCAAAAATCATAGAAAGCAGAGCCAG CCAACCAACAAACGAAACAAACCGAGAATCGAATCGAGATCTAAA ATAATGGGAA[G/A]AGTTTTAAGGCGAAGTGATTAAATTAGGGT TCCAATTTCGTTCCTTCGAAAATCTCAGATTTAGGGCGCAACAAC AGTGTTAAAAACCAAAATCGGAAGT	62
	56,353,723	AX-90370966	CACTGAAGTTCAAGTTCTTGTGTGTAAAATGGCCAACATTTTCCT ACACAATGGGGGCAACACTTGCAAGGCTACCCTCTATCTCTTATT CATAACCACA[A/G]CCTTTTTTATCGCAAACTCTGCAAGGATTC TAGATGAAGTGGAATCCCAACCCCAAGCCATAGGCAATCTACCAG CACCTGGAGCTACCAATCCTTCACT	63
	56,370,352	AX-90510781	ATGCCTTAAGAATTACCCTCAGCAACTAAAGCACACATAAGATAT AGTGCATTTGAATGAATCTAAGATCACAGGTCAACAAAAAACTGA AAAATCACAT[T/C]ATTAGCCAAACTACTTAAATATTAGACAAC TTGAAAAATAAATACATTGACCCGTTGTAGGTGATAAGAAAAAGG AAAAGAAGATTATCAAACTTGCTTC	64

표 3

[0072] 본 발명의 KASP용 프라이머 세트 정보(1)

No.	SNP ID	프라이머 명칭	방향	프라이머 서열정보 (5' → 3')	서열번호
1	AX-90485402	PS_18_55912849	정방향	GCTTCTAGTTAAATATATTATTGTATTTGGAGGC	1
			정방향	CTTCTAGTTAAATATATTATTGTATTTGGAGGT	2
			역방향	AATTTGATGACTCAAGAGCCACTCGTT	3
2	AX-90490662	PS_18_55944116	정방향	TTTTATTTTATGAATAATTTGGACTGAAGTGCA	4
			정방향	TTATTTTATGAATAATTTGGACTGAAGTGCC	5
			역방향	GTGTAACACATGAGACAATTTTGCCTCTA	6
3	AX-90402411	PS_18_55983605	정방향	TGTTAGAGAGATCAAGCGTTTGAAGCT	7
			정방향	TTAGAGAGATCAAGCGTTTGAAGCC	8
			역방향	AATCCCTTCAGAGTTAGGCAAACTTTCAA	9
4	AX-90400765	PS_18_56037382	정방향	CTTAACATGTGCAATTGCATCGATCTC	10
			정방향	CTTAACATGTGCAATTGCATCGATCTT	11
			역방향	TGTGCATGTTCACTACGCTAAGTTCAAA	12

5	AX-90487878	PS_18_56075982	정방향	GTTGAATATCATAATGGACTTAGGTGAG	13
			정방향	ATTAGTTGAATATCATAATGGACTTAGGTGAA	14
			역방향	TGCCTTGTCATTTTACTTGTAGCTGGTTA	15
6	AX-90476841	PS_18_56102697	정방향	CTTCAATGTTGTTTGTTGTTAACCTTGG	16
			정방향	TTCTTCAATGTTGTTTGTTGTTAACCTTGA	17
			역방향	GTTTAAGCACTACTGGGAAATTCTTTTGAT	18
7	AX-90413289	PS_18_56123124	정방향	ACAATATCATATACGGTTCAAATCATTCGT	19
			정방향	CAATATCATATACGGTTCAAATCATTCGC	20
			역방향	GTAATGGAGTCATAGCATTTATAGCTTCTT	21
8	AX-90344000	PS_18_56144514	정방향	TTCAGTTGCAACACTTTCCATATTTAAATG	22
			정방향	TATTCAGTTGCAACACTTTCCATATTTAAATT	23
			역방향	CTAGGCATAAAGCACCCATTTCCATTTAA	24

표 4

[0073] 본 발명의 KASP용 프라이머 세트 정보(2)

No.	SNP ID	프라이머 명칭	방향	프라이머 서열정보 (5' → 3')	서열번호
9	AX-90413871	PS_18_56187634	정방향	CAAGAGGTTATGTTATGTGGGATGTG	25
			정방향	ACAAGAGGTTATGTTATGTGGGATGTA	26
			역방향	CCAGTAATCTCCATTTGTCTTTCCCATAT	27
10	AX-90448445	PS_18_56214870	정방향	GCATTTCCCTCTTCCAACCGAC	28
			정방향	AGCATTTCCCTCTTCCAACCGAT	29
			역방향	GAAAGAAGGAAGAGAAGGAGTGGAGAA	30
11	AX-90374236	PS_18_56232280	정방향	CCCACATGATCAACATCACAAGTTG	31
			정방향	AACCCACATGATCAACATCACAAGTTA	32
			역방향	TGCCTCTGCAGCTCAAACATCATAATATT	33
12	AX-90453819	PS_18_56278301	정방향	GTCCTTCTCAGAATCCGAGAACAA	34
			정방향	TCCTTCTCAGAATCCGAGAACAG	35
			역방향	TCGGAGGGTTGGGAGTGAGGAT	36
13	AX-90516634	PS_18_56299436	정방향	TACTTATTGCTATTGATATTGATGCATCCAA	37
			정방향	CTTATTGCTATTGATATTGATGCATCCAG	38
			역방향	GGAATACTTCTAGTTTTTCAGTGGTGTATA	39
14	AX-90428430	PS_18_56321318	정방향	TCGAATCGAGATCTAAAATAATGGGAAG	40
			정방향	AATCGAATCGAGATCTAAAATAATGGGAAA	41
			역방향	GGAACCCTAATTTAATCACTTCGCCTTAA	42
15	AX-90370966	PS_18_56353723	정방향	CCCTCTATCTCTTATTCATAACCACAA	43
			정방향	CCTCTATCTCTTATTCATAACCACAG	44
			역방향	TCTAGAATCCTTGCAGAGTTTGCGATAAA	45
16	AX-90510781	PS_18_56370352	정방향	AAGTTGTCTAATATTTAAGTAGTTTGGCTAATA	46
			정방향	GTTGTCTAATATTTAAGTAGTTTGGCTAATG	47
			역방향	TGAATGAATCTAAGATCACAGGTCAACAAA	48

[0076] **6. KASP(kompetitive allele specific PCR) 분석**

[0077] KASP 프라이머 세트의 특이적인 증폭을 확인하기 위해 RIL 집단 36계통(저항성 18계통, 감수성 18계통), 모·부본으로 사용된 대풍과 천알, 그리고 대풍과 천알 DNA를 혼합한 합성이형접합체(Synthetic heterozygosity) 샘플과 음성대조군(물)에 대해 본 발명의 KASP 프라이머 세트 16개를 각각 적용하여 테스트하였다. KASP 반응은 QuantStudio3 Real-Time PCR(Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, 미국)을 사용하였으며, KASP 시약 반응조성과 수행조건은 LGC genomics(Laboratory of the Government Chemist genomics)의 사용자 매뉴얼에 따라 실시하였다(표 5 및 표 6).

표 5

[0078] KASP 반응물 시약 조성

조성	사용량(㎕)
DNA(2ng/㎕)	5.00
2x KASP Master mix	5.00
KASP Assay mix	0.14
총량	10.14

표 6

[0079] KASP 조건

스텝	온도	시간	사이클(횟수)
Hot-start activation	94℃	15분	1
Denature	94℃	20초	10
Annealing/Elongation	61-55℃	1분 (사이클 마다 0.6℃ 감소)	
Denature	94℃	20초	29
Annealing/Elongation	55℃	1분	
Denature	94℃	20초	3
Annealing/Elongation*	57℃	1분	

[0080] *PCR 증폭량이 적은 경우 추가수행.

[0082] **실시예 1. 역병 저항성 표현형 검정 및 분산분석 결과**

[0083] 균주 40468에 대한 RIL 집단 내 표현형 검정 결과, 역병 저항성 18계통과 감수성 18계통으로 분리되어, RIL 집단 내 표현형 분리비가 1:1임을 확인하였다. 이를 통해, 관찰된 역병 반응이 단일 유전자에 의한 표현형 분리임을 알 수 있었다.

[0084] 또한, 총 22,637개의 SNP가 분산분석에 이용되었고, 분석 결과 염색체 18번 55,912,198~56,370,352 bp에서 고도로 유의미한 SNP 52개를 발견하였다. 마커들이 설명하는 표현형 분산이 ~98%로, 이는 해당 SNP가 위치한 유전체 영역에 역병 저항성 유전자가 존재할 확률이 매우 높음을 의미한다(표 7 및 8).

표 7

일원분산분석에서 도출된 유의미한 역병 저항성 연관 SNP와 통계치(1)

Chr[a]	Position (bp)[b]	SNP	대풍 (감수성)		천알 (저항성)		Adjusted *p*-value[c]	R^{2d}
			유전자형	빈도	유전자형	빈도		
18	55,912,198	AX-90455222	GG	0.49	CC	0.51	1.0E-21	0.96
18	55,912,849	AX-90485402	CC	0.49	TT	0.51	1.0E-21	0.96
18	55,924,093	AX-90482670	TT	0.49	CC	0.51	1.0E-21	0.96
18	55,944,116	AX-90490662	TT	0.50	GG	0.50	3.5E-26	0.98
18	55,950,341	AX-90506324	TT	0.50	AA	0.50	3.5E-26	0.98
18	55,952,375	AX-90466113	CC	0.49	AA	0.51	1.0E-21	0.96
18	55,954,722	AX-90456267	CC	0.49	AA	0.51	1.0E-21	0.96
18	55,957,365	AX-90493801	AA	0.49	CC	0.51	1.0E-21	0.96
18	55,965,452	AX-90456611	CC	0.49	AA	0.51	1.0E-21	0.96
18	55,975,366	AX-90334976	GG	0.49	AA	0.51	1.0E-21	0.96
18	55,983,605	AX-90402411	TT	0.50	CC	0.50	3.5E-26	0.98
18	55,983,683	AX-90409231	AA	0.50	CC	0.50	3.5E-26	0.98
18	55,984,097	AX-90363270	GG	0.50	AA	0.50	3.5E-26	0.98
18	55,994,749	AX-90435459	TT	0.50	CC	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,012,340	AX-90305752	AA	0.49	GG	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,023,959	AX-90419372	AA	0.49	GG	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,033,039	AX-90388943	CC	0.49	AA	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,037,382	AX-90400765	GG	0.49	AA	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,037,748	AX-90454243	CC	0.50	AA	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,038,945	AX-90473794	GG	0.49	AA	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,040,302	AX-90317341	TT	0.50	GG	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,040,608	AX-90444242	TT	0.50	CC	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,040,898	AX-90512470	TT	0.50	CC	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,056,526	AX-90445535	TT	0.49	CC	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,058,777	AX-90361126	CC	0.50	TT	0.50	7.9E-21	0.96
18	56,065,802	AX-90511648	TT	0.49	CC	0.51	1.0E-21	0.96

[a]염색체

[b]콩 참조 유전체 기반 물리적 위치(Glyma2, http://soybase.org).

[c]Bonferroni correction을 통해 얻어진 Adjusted *p*-value ($p < 4.4E-07$, $\alpha=0.01$).

[0085] [d]마커의 표현형 분산

표 8

일원분산분석에서 도출된 유의미한 역병 저항성 연관 SNP와 통계치(2)

Chr[a]	Position (bp)[b]	SNP	대풍 (감수성)		천알 (저항성)		Adjusted *p*-value[c]	R^{2d}
			유전자형	빈도	유전자형	빈도		
18	56,075,982	AX-90487878	CC	0.50	TT	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,077,545	AX-90391396	TT	0.49	GG	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,078,131	AX-90339253	CC	0.50	GG	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,102,697	AX-90476841	GG	0.49	AA	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,123,124	AX-90413289	TT	0.50	CC	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,127,446	AX-90456433	GG	0.49	TT	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,127,800	AX-90386532	CC	0.49	AA	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,130,758	AX-90360889	AA	0.49	GG	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,144,514	AX-90344000	CC	0.49	AA	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,144,997	AX-90462358	GG	0.49	AA	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,145,524	AX-90457110	CC	0.49	TT	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,187,634	AX-90413871	CC	0.50	TT	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,187,903	AX-90461873	AA	0.50	GG	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,201,329	AX-90378479	TT	0.47	AA	0.53	1.0E-15	0.91
18	56,214,870	AX-90448445	CC	0.50	TT	0.50	7.9E-21	0.96
18	56,230,603	AX-90512807	CC	0.50	TT	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,232,280	AX-90374236	CC	0.50	TT	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,278,301	AX-90453819	TT	0.49	CC	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,279,910	AX-90370238	TT	0.50	GG	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,280,800	AX-90417313	CC	0.50	TT	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,281,354	AX-90483014	GG	0.50	CC	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,299,436	AX-90516634	TT	0.50	CC	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,321,318	AX-90428430	GG	0.50	AA	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,346,353	AX-90475392	AA	0.49	CC	0.51	1.0E-21	0.96
18	56,353,723	AX-90370966	AA	0.50	GG	0.50	3.5E-26	0.98
18	56,370,352	AX-90510781	TT	0.39	CC	0.61	8.6E-13	0.90

[a]염색체

[b]콩 참조 유전체 기반 물리적 위치(Glyma2, http://soybase.org).

[c]Bonferroni correction을 통해 얻어진 Adjusted *p*-value ($p < 4.4E-07$, $\alpha=0.01$).

[0086] [d]마커의 표현형 분산

[0088] **실시예 2. 유전자지도 작성 및 표현형에 대한 연관분석**

[0089] 총 2,322개의 SNPs로 작성된 유전자지도의 전체 길이는 2,407 cM이고, 지도상에 존재하는 SNP의 위치와 배열은 이미 알려져 있는 20개의 콩 염색체 정보와 대체로 일치하였다. 유전자 지도상에 존재하는 마커 간 구간(bin)의 개수는 785개이고, 전체 길이를 bin의 개수로 나누어서 계산한 마커 간 평균 거리는 3.1 cM이다(표 9).

[0090] 예외적으로, 염색체 7번 및 19번의 경우 SNP 칩 데이터로부터 8,126개와 8,166개 SNPs에 대한 결과를 얻었으나, 전처리 과정에서 다형성을 보인 SNP 수는 각각 26개, 86개뿐이었다. 결과적으로 유전자 지도가 포함하는 염색체의 영역이 특정 지역으로 한정되고 SNP 간 평균 간격도 8.2 cM, 9.0 cM으로 타 염색체에 비해 2~4배 멀었다. 염색체 7번과 19번을 제외하고 나머지 18개 염색체에서의 SNP는 각 염색체에 고르게 분포하고 있고, 염색체 당 평균 마커 수는 127개이며, 평균 거리는 2.9 cM이다.

표 9

유전자지도 작성 정보

염색체 번호	염색체 길이 (cM) (a)	다형성을 보이는 SNP의 개수	지도에 위치한 SNP 개수[a]	SNP 간 구간(bin)의 개수 (b)[b]	SNP간 평균 거리 (cM) (a/b)
1	171	836	99	39	4.4
2	191	1,699	132	44	4.3
3	112	1,110	113	45	2.5
4	114	1,337	122	41	2.8
5	114	1,072	107	44	2.6
6	132	1,577	152	48	2.8
7[c]	41	26	10	5	8.2
8	160	1,249	124	62	2.6
9	116	2,097	173	54	2.1
10	102	1,250	118	34	3.0
11	124	832	108	43	2.9
12	109	1,000	102	25	4.4
13	102	837	56	18	5.7
14	76	1,277	123	30	2.5
15	151	959	102	34	4.5
16	103	983	107	33	3.1
17	124	954	140	55	2.2
18	139	2,557	289	70	2.0
19[c]	108	86	20	12	9.0
20	119	899	125	49	2.4
전체	2,407	22,637	2,322	785	3.1

[a]유전자 지도상에 위치하는 SNP의 개수
[b]유전자 지도상에 위치하는 SNP 간 구간(bin)의 개수
[c]염색체 7번과 19번에서 다형성을 보이는 SNP의 부족으로, 적은 수의 SNP로 지도가 작성됨.

[0091]

[0093] 또한, 작성된 유전자 지도와 저항성 검정 결과를 이용하여 균주 40468의 저항성에 대한 연관 분석 결과, 염색체 18번의 55,912,198~56,412,565 bp 영역에서 표현형 변이의 93.9%(LOD=23.1)를 설명하는 유전자좌를 발견하였고, 해당 지역은 일원분산분석 결과로 나온 지역을 포함하고 있음을 확인하였다(표 10 및 도 2).

[0094] 콩 표준유전체(Glyma.Wm82.a2.v1)에 기반한 예측된 유전자 모델(gene model)에 따르면, 해당 지역 내에는 총 63개의 유전자가 존재하고, 이들 중 9개가 식물 면역 반응과 관련된 것으로 잘 알려진 LRR(leucine rich repeat) 도메인 또는 STK(serine/threonine kinase)을 합성하는 유전자이다.

표 10

유전자지도를 이용한 저항성 유전자좌 맵핑(genetic mapping)

염색체	위치(bp)[a]	구간	LOD[b]	PVE(%)[c]	Add[d]
18	55,912,198 to 56,412,565	AX-90455222 to AX-90366982	23.1	93.9	47.4

[a]콩 참조 유전체 기반 물리적 위치
[b]Logarithm of odds (LOD), Permutation test에 의해 LOD threshold=18.2로 결정.
[c]QTL의 표현형 변이 설명력
[d]상가적 효과

[0095]

[0097] **실시예 3. 본 발명의 KASP 프라이머 세트의 검정**

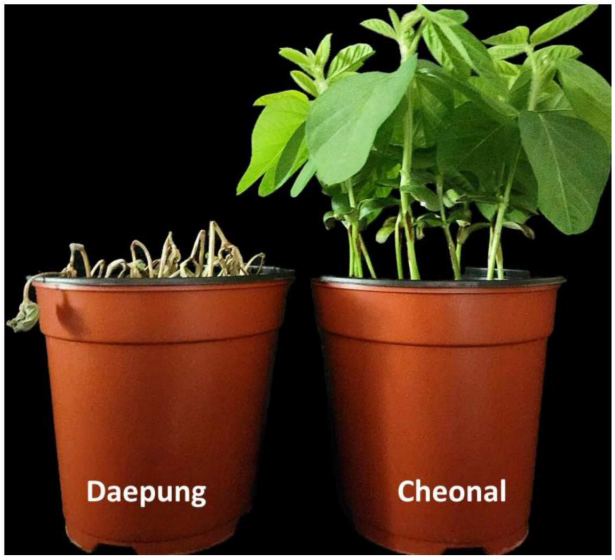
[0098] 본 발명의 KASP 프라이머 세트(상기 표 3 및 4 참고)를 RIL 집단 36계통(저항성 18계통, 감수성 18계통), 모 ·

부본으로 사용된 대풍과 천알, 그리고 대풍과 천알의 대립유전자를 모두 가지고 있는 합성이형접합체에 적용하여 KASP 분석을 수행하였다.

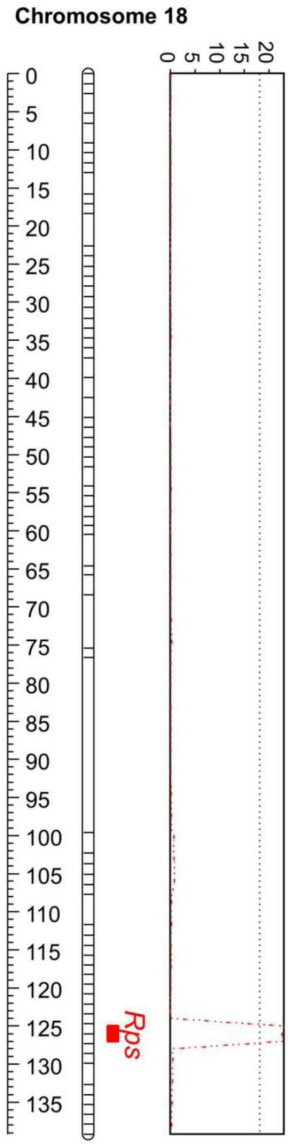
[0099] 그 결과, 역병 저항성 또는 감수성에 대한 표현형 결과와 KASP 프라이머 세트의 유전자형의 분리가 일치함을 확인하였다. 부본으로 사용된 천알과 천알의 대립유전자를 가지고 있는 RIL 집단의 저항성 18계통은 HEX 형광물질로 인해 x축에 나타났으며, 모본으로 사용된 대풍과 대풍의 대립유전자를 가지고 있는 RIL 집단의 감수성 18계통은 FAM 형광물질로 인해 y축에 가깝게 나타났다. 또한, 합성이형접합체는 두 그룹의 중간에 위치하였다(도 3).

도면

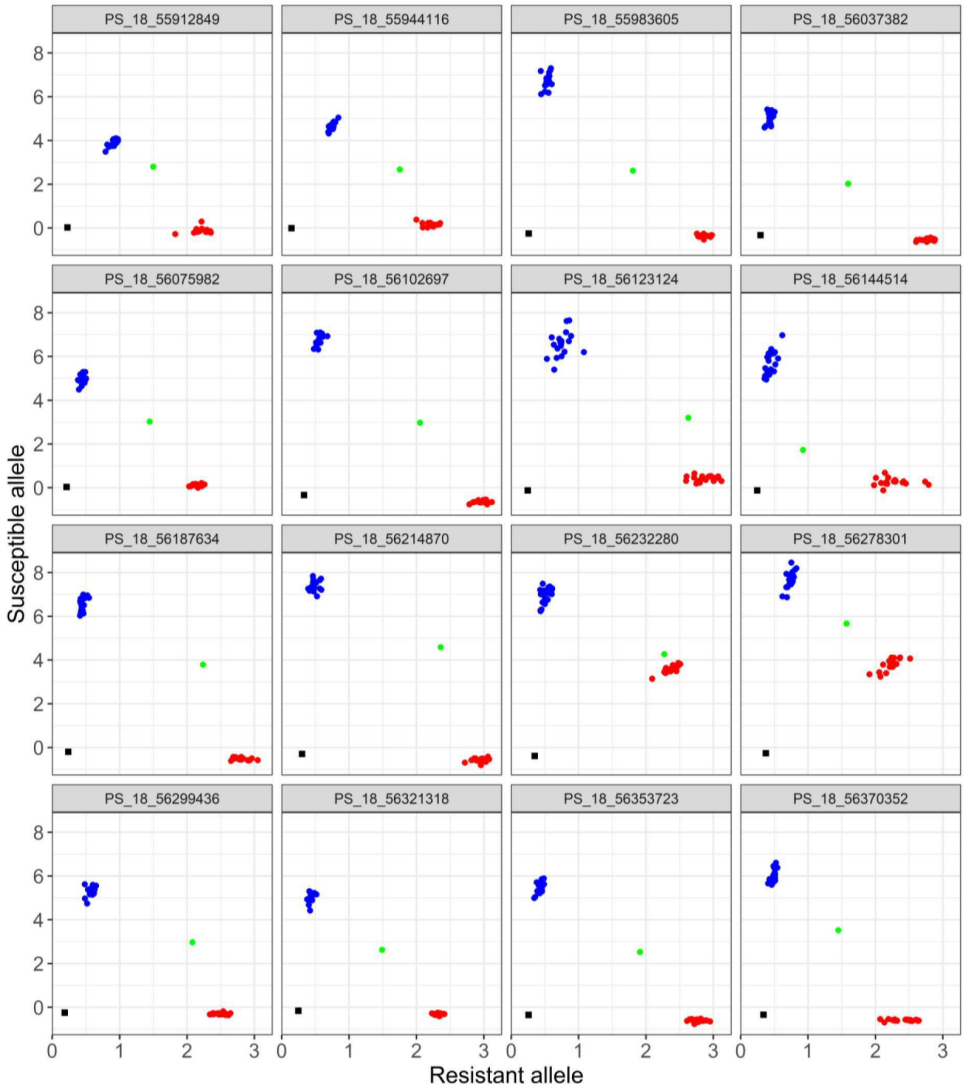
도면1



도면2


Chromosome 18
0
5
10
15
20
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
Rps

도면3


PS_18_55912849
PS_18_55944116
PS_18_55983605
PS_18_56037382
PS_18_56075982
PS_18_56102697
PS_18_56123124
PS_18_56144514
PS_18_56187634
PS_18_56214870
PS_18_56232280
PS_18_56278301
PS_18_56299436
PS_18_56321318
PS_18_56353723
PS_18_56370352
Susceptible allele
Resistant allele

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.