(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0090535
(43) 공개일자 2023년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2600/13 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0179391
(22) 출원일자 2021년12월15일
심사청구일자 2021년12월15일

(71) 출원인
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
김정구
전북 완주군 이서면 농생명로 166, 국립농업과학원
이근표
전북 완주군 이서면 농생명로 166, 국립농업과학원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진동

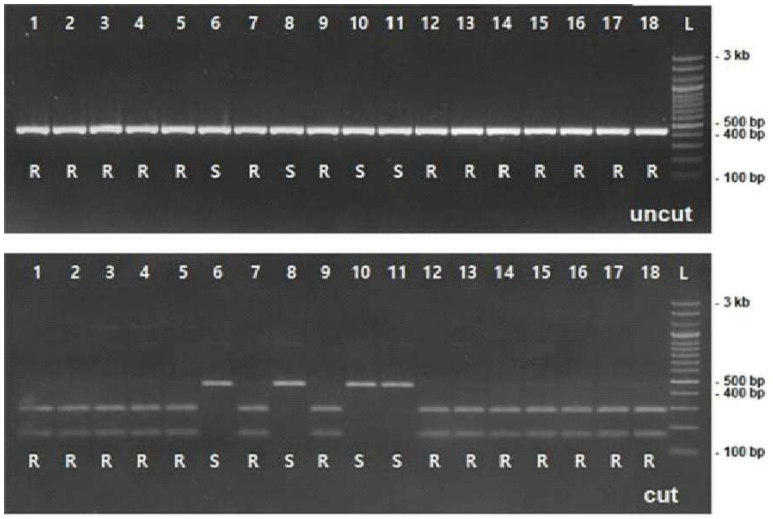
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **오이 흰가루병 저항성 판별용 분자 표지 및 이를 이용한 판별 방법**

(57) 요 약

본 발명은 오이 흰가루병 저항성 판별용 분자 표지, 이를 포함하는 조성물, 키트, 및 이를 이용하여 오이 흰가루병에 대한 저항성 여부를 판별하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

정진호

전북 완주군 이서면 농생명로 166, 국립농업과학원

오은아

전북 완주군 이서면 농생명로 166, 국립농업과학원

송기환

서울특별시 성북구 북악산로 813, 102동 1802호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067396
과제번호	PJ013432022021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(농진청)
연구과제명	국내 고유 오이 유전체해독 및 내병성 관련 유용유전형질 발굴(1주관)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국립농업과학원
연구기간	2018.01.08 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 오이 흰가루병 저항성 판별용 분자 마커.

청구항 2

제1항의 분자 마커를 포함하는 오이 흰가루병 저항성 판별용 조성물.

청구항 3

제1항의 분자 마커 또는 제2항의 조성물을 포함하는 오이 흰가루병 저항성 판별용 키트.

청구항 4

식물체 샘플에서 DNA를 분리하는 단계,

서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 서열을 분자 표지로서 이용하여 DNA 서열을 증폭시키는 단계,

증폭된 DNA 서열에 제한효소를 처리하여 DNA 서열을 절단하는 단계, 및

절단된 단편의 크기를 확인하여 오이 흰가루병에 대한 저항성 또는 감수성이 있는지 여부를 판별하는 단계

를 포함하는, 오이 흰가루병에 대한 저항성 또는 감수성을 판별하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 DNA 서열의 증폭은 PCR에 의한 것인, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 제한효소는 ClaI 제한효소인 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 절단된 단편의 크기가 159 및 280 bp이면 오이 흰가루병에 대한 저항성을 가지는 것으로 판별하고, 절단된 단편의 크기가 439 bp이면 오이 흰가루병에 대한 감수성을 가지는 것으로 판별하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 오이 흰가루병 저항성 판별용 분자 표지, 이를 포함하는 조성물, 키트, 및 이를 이용하여 오이 흰가루병에 대한 저항성 여부를 판별하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 흰가루병(powdery mildew)은 활물기생균으로 어린 식물조직 위에 곰팡이 균사류가 엉키기 때문에 밀가루를 뿌려 놓은 듯이 크고 작은 흰색 또는 회백색의 병반이 나타나게 된다. 병원균은 약 20여 종으로 아려져 있으며 에리시페(*Erysiphe*) 속, 마이크로스파이라(*Microsphaera*) 속, 포도스파이라(*Podosphaera*) 속, 필라크티니아

(*Phillactinia*) 속, 웅키눌라(*Uncinula*) 속, 스파이로테카(*Sphaerotheca*) 속 등에 속하는 곰팡이 종들의 특수한 변종에 의하여 발생한다.

[0003] 이들 병원균은 자낭각 또는 균사의 형태로 병든 식물체의 잔재에서 월동하여 1차 전염원이 되며, 시설재배에서는 분생포자가 공기전염이 되어 계속해서 발생한다. 또한, 밤과 낮의 온도차가 심한 지역이나 통풍이 잘 되지 않는 곳에서 흔히 발생하며, 매년 흰가루병에 의한 식물 생장 및 수량 감소는 다른 어떤 병보다도 심하여 농사에 막대한 피해를 일으키는 병원균이다. 이러한 흰가루병원균은 시설재배지에 항시 존재, 발생하기 때문에 화학적인 방법으로도 근절하기가 어려운 병해이다.

[0004] 흰가루병에 가장 심각한 영향을 받는 식물 중에는 밀과 보리와 같은 여러 곡물이 있으며, 이외의 작물로는 박과 채소작물, 특히 멜론, 호박, 오이 등이 있다.

[0005] 이 중, 오이는 전 세계적으로 많이 재배되는 경제적으로 중요한 작물 중 하나이다. 오이 흰가루병은 시설재배와 노지재배에서 연중 발생하며 이를 방제하기 위한 농약 사용량이 가장 많은 병해로 알려져 있다. 그러나, 농약 사용에도 불구하고 발생량이 계속 증가하여 방제가 어려운 병해이다.

[0006] 오이 흰가루병은 국내 오이 재배가 시설화, 대규모화되면서 지속적으로 문제가 되고 있으며, 방제 약제 내성균까지 나타나 방제가 어려운 실정이다. 이에 따라 저항성 품종에 대한 요구가 증가하고 있다.

[0007] 이에, 오이 흰가루병 저항성과 연관된 유전적 변이영역과 유전자를 찾고자 하는 많은 노력들이 있어 왔으며, 오이의 다양한 흰가루병 저항성 육종 자원이 알려졌고, 이를 분석하여 관련된 양적 형질 유전자좌(Quantitative trait locus; QTL) 및 유전자가 탐색된 바 있다(표 1 참조).

표 1

[0008] 오이 흰가루병 저항성 관련 QTL 및 유전자 분석 동향 (Liu et al., 2021)

Resistance Donor	Mapping Population	Gene/QTL	Chromosome	Causal Gene
Puerto Rico 37	-	-	-	-
Indian accession PI197087	-	-	-	-
Yomaki	-	-	-	-
Natsufushinari	-	-	-	-
Indian accession PI 197088-1	RILs of PI 197088-1 *X* Santou	-	1, 5, 6, 7	-
S94	RILs (F6:7 family) of Inbredline S94 (R) *X* S06(S)	*pm1.1*, *pm2.1*, *pm4.1*, *pm6.1*	1, 2, 4, 6	-
WIS2757	F2 family of WIS2757 *X* 19032	-	5	-
K8	F2 and F2:3 families of K8 (R) x K18 (S)	*pm5.1*, *pm5.2*, *pm5.3*, *pm6.1*	5, 6	-
WI 2757	F2:3 families of WI2757 (R) x True lemon (S)	*pm1.1*, *pm1.2*, *pm3.1*, *pm4.1*, *pm5.1*, *pm5.2*	1, 3, 4, 5	-
CS-PMR1	RILs of CS-PMR1 (derived from PI 197088, R) x Santou (intermediate S)	9 QTLs	Allchromosomes except 7	-
S1003	BC3F1 and BC2F2 families of S1003(R) *X* S1001(S)	*pm5.1*	5	*CsaMLO8* (*CsMLO1*)
Jin5-508	F2 and CSILs families of Jin5-508(R) *X* D8(S)	*pm1.1*	1	-
NCG122	F2 families of NCG122(R) *X* NCG121(S)	*pm-s*	5	-
PI 197088	RIL families of PI 19,788 (R) *X* Coolgreen (S)	*pm1.1*, *pm2.1*, *pm5.1*, *pm 6.1*	1, 2, 5, 6	-
IL52	RIL families of IL52 (R) *X* changchunmici (S)	*pm*	5	*Csa5M622830*
PM-R	F2 families of PM-R *X* PM-S	*pm5.2*, *pm6.1*	5, 6	*CsGy5G015660*

[0009] 또한, 최근, 국내 연구팀은 264점의 육종계통과 유전자원의 GWAS 분석을 통해서 오이 흰가루병 저항성과 연관된 지역 영역을 염색체 5번에서 찾았고, 그 지역내 영역 내에 존재하는 변이 중 단쇄 데하이드로게나제/리덕타제 유전자와 세포분열 후기-촉진 복합체 서브유닛(anaphase-promoting complex subunit) 유전자내의 변이가 흰가루병 저항성과 연관성이 높을 수 있음을 보고하였다(Lee et al., 2020). 이와 같이, 현재까지 오이 흰가루병 저항성과 연관된 유전자좌 및 변이 탐색 연구는 다양하게 이루어져 왔지만, 아직까지 오이 분자 육종을 위한 흰가루병 저항성 판별용 분자 표지의 개발은 여전히 부진한 실정이다.

[0010] 따라서, 오이 흰가루병 저항성을 가지는 식물체를 종자 및 생육 초기 단계에서 판별하고, 이를 통해 오이 분자 육종에 기여할 수 있는 분자 표지의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-2125521호(공고일: 2020년 7월 7일)

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제 10-1793042(공고일: 2017년 11월 3일)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 오이 흰가루병 저항성을 가지는 식물체를 판별할 수 있는 분자 표지 및 이를 포함하는 조성물 또는 키트, 및 상기 분자 표지를 이용하여 흰가루병 저항성을 가지는 식물체를 판별할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 오이 흰가루병 저항성 판별용 분자 마커를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 분자 마커를 포함하는 오이 흰가루병 저항성 판별용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 분자 마커, 또는 이를 포함하는 조성물을 포함하는 오이 흰가루병 저항성 판별용 키트를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 분자 마커를 이용하여 오이 흰가루병에 대한 저항성을 가지는지 여부를 판별하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 오이 흰가루병 저항성 판별용 분자 표지를 이용함으로써 오이 흰가루병에 대한 저항성을 가지는 오이 식물체를 종자 또는 생육 초기에 판별하는 것이 가능하며, 이를 통해 흰가루병 저항성을 가지는 새로운 오이 품종을 개발하는 것이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0018] **도 1**은 흰가루병 저항성 계통들(PI 438678(1), PI 196477(2), Ames 23537(3))과 감수성 계통들(JEF(6), MGLMC(10))의 SNP 주변 서열을 나타낸다.

도 2는 3가지 저항성 계통과 2가지 감수성 계통에서 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머를 이용하여 SNP 주변 서열을 PCR 증폭 시킨 결과를 나타낸다(L: 100 bp ladder, R1 내지 R3: 흰가루병 저항성 계통의 게놈 DNA(R1: PI 438678, R2: PI 196477, R3: Ames 23537), S1 내지 S2: 흰가루병 감수성 계통의 게놈 DNA(S1: JEF, S2: MGLMC).

도 3은 흰가루병 저항성과 감수성 계통간 SNP 주변 서열의 비교 결과를 나타낸다(R1 내지 R3: 흰가루병 저항성 계통(R1: PI 438678, R2: PI 196477, R3: Ames 23537), S1 내지 S2: 흰가루병 감수성 계통(S1: JEF, S2:

MGLMC)).

도 4는 흰가루병 저항성 검증이 진행된 오이 18가지 계통의 게놈 DNA에 대하여 CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence) 분자 표지(MK1)(서열번호 1 및 서열번호 2)를 이용하여 PCR 증폭 시킨 결과(uncut), 및 PCR 산물에 ClaI 제한효소를 처리한 후의 DNA 단편(cut)을 나타낸다(L: 100 bp ladder, 1 내지 18: 18가지의 오이 계통, R: 흰가루병 저항성 표현형, G: 흰가루병 감수성 표현형).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 오이 흰가루병 저항성 판별용 분자 마커를 제공한다.

[0020] 본 발명에서 흰가루병은 흰가루병균에 의해 유발되는 질병을 지칭하며, 박과작물의 흰가루병균은 포도스파에라 잔티이(*Podosphaera xanthii*; *Podosphaera fuliginea*로도 알려져 있음)로 알려져 있다.

[0021] 본 발명에서 "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 복잡도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0022] 본 발명에서 분자 표지 내지 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드 서열은 또한 이의 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.

[0023] 본 발명자들은 오이 흰가루병 저항성과 감수성이 있는 계통을 확보하여 이로부터 게놈 DNA를 추출한 다음, 오이 흰가루병 저항성과 감수성 계통간에 차이가 있는 변이를 탐색하고, 이를 기초로 오이 흰가루병 저항성과 감수성 계통을 판별할 수 있는 분자 표지를 설계하였으며, 상기 분자 표지가 오이 흰가루병 저항성과 감수성 계통을 성공적으로 판별할 수 있는지 여부를 확인하였다.

[0024] 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 오이 흰가루병 저항성 판별용 분자 마커를 제공한다. 바람직하게는 상기 분자 마커는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 올리고뉴클레오티드 서열을 프라이머로서 둘 다 포함하는 프라이머 세트이다.

[0025] 또한, 본 발명은 오이 흰가루병 저항성 판별용 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명의 오이 흰가루병 저항성 판별용 조성물은 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 분자 마커를 포함한다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 분자 마커, 또는 이를 포함하는 조성물을 포함하는 오이 흰가루병 저항성 판별용 키트를 제공한다.

[0028] 본 발명의 키트에서, 상기 분자 마커 이외에 PCR 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있으며, 구체적으로 DNA 폴리머라제, dNTP, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 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 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.

[0029] 또한, 본 발명은 식물체 샘플에서 분리한 DNA 서열을 증폭시켜 오이 흰가루병에 대한 저항성을 판별하는 방법을 제공한다.

[0030] 구체적으로, 본 발명의 방법은 식물체 샘플에서 DNA를 분리하는 단계, 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 서열을 분자 표지로서 이용하여 DNA 서열을 증폭시키는 단계, 증폭된 DNA 서열에 제한효소를 처리하여 DNA 서열을 절단하는 단계, 및 절단된 단편의 크기를 확인하여 오이 흰가루병에 대한 저항성 또는 감수성이 있는지 여부를 판별하는 단계를 포함하는, 오이 흰가루병에 대한 저항성 또는 감수성을 판별하는 방법을 제공한다.

[0031] 상기 DNA의 분리는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 의해 수행할 수 있다. 예컨대, CTAB(Cetyltrimethylammonium bromide) DNA 추출 방법, 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법 등을 이용하거나

상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명에서 표적 서열인 DNA 서열을 증폭하는 방법으로는 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사기재 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. 바람직하게는, 본 발명에서 표적 서열을 증폭하는 방법은 PCR 방법이다.

[0033] PCR을 수행하여 DNA 서열을 증폭시키는 것은 상기 분자 표지, 또는 이를 포함하는 조성물을 이용하여 샘플에서 분리된 DNA를 주형으로 하여 표적 서열인 DNA 서열을 증폭시키는 것이다.

[0034] 본 발명에서 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 모세관 전기영동을 수행할 수 있다. 모세관 전기영동은, 예를 들면, ABi Sequencer를 이용할 수 있다. 또한, 겔 전기영동을 수행할 수 있으며, 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 가장 바람직하게는, 6% 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5, Cy-3 또는 6-FAM을 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행 시 ^{32}P 또는 ^{35}S 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.

[0035] 본 발명에서 증폭된 DNA 서열의 절단에 사용되는 제한효소는 바람직하게는 ClaI 제한효소이다.

[0036] 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 서열을 분자 표지로 사용하여 오이 식물체로부터 추출한 게놈 DNA를 증폭시키면 크기가 439 bp인 산물이 생성된다. 그 다음, 수득한 증폭된 DNA 산물을 ClaI 제한효소로 처리하면, 오이 흰가루병에 대하여 저항성이 있는 경우에는 크기가 159 및 280 bp인 단편을 수득할 수 있고, 오이 흰가루병에 대하여 감수성이 있는 경우에는 크기가 439 bp인 단편을 수득할 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드 서열을 분자 표지로 사용한 경우, 오이 흰가루병에 대하여 감수성이 있으면 증폭된 DNA 산물이 ClaI 제한효소에 의해 특이적으로 절단되지 아니한다.

[0039] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0041] [실시예 1] 오이 흰가루병 저항성과 감수성을 가지는 계통 확보

[0042] 흰가루병 저항성 검증이 진행된 오이 계통 18가지를 확보하였다(표 2).

표 2

[0043]

No.	식물체 명칭	기원	1차 흰가루병 저항성 검증 결과	2차 흰가루병 저항성 검증 결과	3차 흰가루병 저항성 검증 결과	4차 흰가루병 저항성 검증 결과	5차 흰가루병 저항성 검증 결과	1~5차 평균 흰가루병 저항성 지수 값	저항성(R) 및 감수성(S) 여부		게놈 DNA 농도 (ng/㎕)	게놈 DNA 총양 (㎍)
1	PI 438678	Mexico, Oaxaca	9	9	-	-	6.3	8.1	R		39.0	3.9
2	PI 196477	Brazil, Mato Grosso	9	9	-	7.0	6.4	7.9	R		41.0	4.1
3	Ames 23537	South Africa, Transvaal	9	9	-	-	6.5	8.2	R		63.3	6.3
4	PI 264217	Australia, Victoria	9	7	-	-	6.7	7.6	R		45.6	4.6

5	PI 525075	Mauritius	8	7	-	-	6.3	7.1	R		63.2	3.2
6	JEF	Breeding line	3	2	5	3.5	1.3	3.0	S		116.6	5.8
7	K4/KJ2	Breeding line	5	4	7	7.3	6.8	6.0	R		116.0	5.8
8	MEJ	Breeding line	4	2	3	5.0	2.3	3.3	S		82.9	4.2
9	WNE	Breeding line	7	8	4	7.5	5.8	6.5	R		63.0	3.2
10	MGLMC	Breeding line	2	2	3	3.4	1.8	2.4	S		39.3	3.9
11	KWSA	Breeding line	3	3	3	4.0	1.7	2.9	S		107.6	5.4
12	PS122	Breeding line	6	5	8	7.3	6.0	6.5	R		79.7	4.0
13	PS137	Breeding line	7	7	6	7.0	5.8	6.6	R		77.9	3.9
14	PI 511817	Taiwan	7	8	7	8.0	5.3	7.1	R		96.1	4.8
15	Marketmore88	USA	6	7	5	7.6	5.8	6.3	R		50.8	5.1
16	EU42	Breeding line	7	4	7	7.0	6.0	6.2	R		41.9	4.2
17	BF085	Breeding line	6	6	8	-	6.0	6.5	R		34.5	3.5
18	PI 426170	Philippines	7	7	5	6.0	6.3	6.3	R		57.6	5.8

[0044] [실시예 2] 오이 흰가루병 저항성과 감수성 계통간에 차이가 있는 변이의 탐색 및 PCR 증폭용 프라이머의 설계

[0045] 최근 국내 연구팀(Lee et al., 2020)이 GWAS 분석을 통해서 찾은 오이 흰가루병 저항성과 연관 변이 중 단쇄 데하이드로게나제/리덕타제 유전자(Csa5G453160) 내에 존재하는 변이(SNP Name: S5_16047445, 위치: Chr5 16,047,445bp)의 주변 서열을 오이 참조유전체 서열(Chinese Long ver2.0, http://cucurbitgenomics.org/organism/2)에서 추출하고 이를 이용하여, 시행착오 끝에 게놈 DNA PCR용 프라이머를 설계하였다(표 3).

표 3

[0046] SNP Name S5_16047445(Chr5, 16,047,445bp)의 주변 서열 PCR 증폭용 프라이머

프라이머 ID	정방향 프라이머	역방향 프라이머	PCR 산물 크기(bp)
M1-PCR&Seq	TTCAACTGTAAGTTCCACTCCCT (서열번호 1)	TGACATAATGGTGAACAATGCT (서열번호 2)	439

[0047] [실시예 3] DNA 분리 및 PCR 수행

[0048] 상기 표 2에 기재된 계통 중 흰가루병 저항성 계통들(PI 438678(서열번호 3), PI 196477(서열번호 4), Ames 23537(서열번호 5))과 감수성 계통들(JEF(서열번호 6), MGLMC(서열번호 7))의 게놈 DNA를 DNA 주형으로 하고, 상기 표 3의 프라이머를 이용하여 SNP 주변 서열을 증폭하였다. 이 때 사용된 흰가루병 저항성 계통들과 감수성 계통들의 SNP 주변 서열은 도 1, 및 서열번호 3 내지 7에 나타내었다(PI 438678: 서열번호 3; PI 196477: 서열번호 4; Ames 23537: 서열번호 5; JEF: 서열번호 6; MGLMC: 서열번호 7).

[0049] 구체적인 PCR 조건은 다음과 같았다:

[0050] - 사용한 게놈 DNA 양: 50 ng

[0051] - PCR 조성: 1x PCR 버퍼, 0.2 mM dNTP, 1.25유닛 Taq DNA 폴리머라제, 2 pmole 정방향 프라이머, 2 pmole 역방향 프라이머

[0052] - PCR 온도조건:

[0053] 1. 초기 변성: 94℃에서 5분 (1 사이클)

[0054] 2. 변성: 94℃에서 30초c

[0055] 어닐링: 60℃에서 30초

[0056] 연장: 72℃에서 30초

[0057] (변성, 어닐링 및 연장을 35 사이클 반복)

[0058] 3. 최종 연장: 72℃에서 7분 (1 사이클)

[0059] 증폭된 PCR 산물을 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동 및 EtBr 염색한 후 UV 일루미네이터 하에서 관찰하였으며, 이의 결과는 도 2에 나타내었다.

[0060] 도 2에 나타낸 바와 같이, 흰가루병 저항성 계통과 감수성 계통 모두에서 특이적인 단일 크기의 PCR 증폭 산물이 생성됨을 확인하였다.

[0061] 그 다음, 증폭된 PCR 산물의 염기 서열을 ABI Sanger sequencing으로 확인하였다. 그 결과, PCR 산물의 439 bp 염기서열을 확인할 수 있었고, 이후 흰가루병 저항성 계통과 감수성 계통의 서열을 비교하여 저항성과 감수성 계통간에 차이가 있는 25개 SNP 변이 지역을 확인할 수 있었다(도 3).

[0063] [실시예 4] 오이 흰가루병 저항성 판별용 분자 표지 설계

[0064] 흰가루병 저항성과 감수성 계통간에 차이가 있는 변이들 중, ClaI 제한효소 자리에 변화가 초래되었음을 확인하였고(도 3 참조), 이를 기초로 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머를 저항성과 감수성 계통을 판별할 수 있는 CAPS 분자 표지(MK1)로서 설계하였다(표 4).

표 4

[0065] 오이 흰가루병 저항성 판별용 CAPS 분자 표지 1종의 프라이머 서열

마커 ID	정방향 프라이머	역방향 프라이머	적용 제한효소	제한효소 처리후 DNA 단편 크기(bp) (저항성 vs. 감수성)
MK1	TTCAACTGTAAGTTCCACTCCCT (서열번호 1)	TGACATAATGGTGAACAATGCT (서열번호 2)	ClaI	159, 280 vs. 439

[0066] [실시예 5] 오이 흰가루병 저항성 판별용 분자 표지 검증 및 적용

[0067] 흰가루병 저항성 검증이 진행된 오이 18가지 계통의 게놈 DNA(표 2)를 PCR DNA 주형으로 이용하여 오이 흰가루병 저항성 판별용 CAPS 분자 표지의 검증 및 적용 실험을 실시하였다.

[0068] 구체적인 PCR 조건은 다음과 같았다:

[0069] - 사용한 게놈 DNA 양: 50 ng

[0070] - PCR 조성: 1x PCR 버퍼, 0.2 mM dNTP, 1.25유닛 Taq DNA 폴리머라제, 2 pmole 정방향 프라이머, 2 pmole 역방향 프라이머

[0071] - PCR 온도조건:

[0072] 1. 초기 변성: 94℃에서 5분 (1 사이클)

[0073] 2. 변성: 94℃에서 30초c

[0074] 어닐링: 60℃에서 30초

[0075] 연장: 72℃에서 30초

[0076] (변성, 어닐링 및 연장을 35 사이클 반복)

[0077] 3. 최종 연장: 72℃에서 7분 (1 사이클)

[0078] 증폭된 PCR 산물을 정제한 후, ClaI 제한효소(7 유닛)로 12시간 정도 처리하고, 2% 아가로스 겔에서 전기영동 및 EtBr 염색한 후 UV 일루미네이터 하에서 관찰함으로써 절단된 밴드의 크기 차이를 확인하였으며, 이의 결과는 도 4에 나타내었다.

[0079] 도 4에 나타낸 바와 같이, 분자 표지 MK1은 PCR 분석에서 특이적인 단일 크기의 증폭 산물(PCR 산물)을 생성하였다(도 4의 상단, uncut). 이후 PCR 산물에 ClaI 제한효소로 처리하고 전기영동한 결과, 오이 18가지 계통 식물체에서 흰가루병 저항성(159, 280 bp)과 감수성(439 bp)간에 서로 다른 크기의 DNA 단편을 생성하였다(도 4의 하단, cut).

[0080] 따라서, 분자 표지 MK1을 오이 육종 계통에 적용하여 오이 흰가루병 저항성과 감수성을 성공적으로 구분할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0082] <참조문헌>

[0083] 1. Liu et al (2021). Identification of Novel Loci and Candidate Genes for Resistance to Powdery Mildew in a Resequenced Cucumber Germplasm. Genes. 2021; 12(4):584.

[0084] 2. Lee et al (2020). Assessment of the Genetic Diversity of the Breeding Lines and a Genome Wide Association Study of Three Horticultural Traits Using Worldwide Cucumber (Cucumis spp.) Germplasm Collection. Agronomy 2020, 10, 1736.

[0085] 상기 참조문헌은 그 내용이 전체로 본 명세서에 참조로 통합된다.

도면

도면1

>1-1309_M1

GCAAATTCGCATTCCTTTTGGCAAACTCACGAAAACCTGTAAATACATCCTCAGTTCTCTCATCTTCAGGCAAGTGAGCTACAGCCAAACTCGTTGGAACCGCGTAAGGAGAGACACAATTTACACGAATTCC
ATATTGGCCGAGCTCGGCTGCAACGCTTCTTGTAAGCCCCAATACGGCGTGCTTCGAGCCTATGTAATGATGTGGCCCTATTCCTCCTATGACGCTACCAACGCTGCCAAGTGATATGATCGATCCTTGCTTG
CGTGGAATCATTACACTGGCAGAATACTTCATTCCCATGAAAACAGCCTTCACATTTATATCAAACACCTTCTCGAACTCCGATACATCGACGTTGCGAATATCGGATGAGGGTGTGCCTGAGATTCC

>2-1312_M1

GCAAATTCGCATTCCTTTTGGCAAACTCACGAAAACCTGTAAATACATCCTCAGTTCTCTCATCTTCAGGCAAGTGAGCTACAGCCAAACTCGTTGGAACCGCGTAAGGAGAGACACAATTTACACGAATTCC
ATATTGGCCGAGCTCGGCTGCAACGCTTCTTGTAAGCCCCAATACGGCGTGCTTCGAGCCTATGTAATGATGTGGCCCTATTCCTCCTATGACGCTACCAACGCTGCCAAGTGATATGATCGATCCTTGCTTG
CGTGGAATCATTACACTGGCAGAATACTTCATTCCCATGAAAACAGCCTTCACATTTATATCAAACACCTTCTCGAACTCCGATACATCGACGTTGCGAATATCGGATGAGGGTGTGCCTGAGATTCC

>3-1318_M1

GCAAATTCGCATTCCTTTTGGCAAACTCACGAAAACCTGTAAATACATCCTCAGTTCTCTCATCTTCAGGCAAGTGAGCTACAGCCAAACTCGTTGGAACCGCGTAAGGAGAGACACAATTTACACGAATTCC
ATATTGGCCGAGCTCGGCTGCAACGCTTCTTGTAAGCCCCAATACGGCGTGCTTCGAGCCTATGTAATGATGTGGCCCTATTCCTCCTATGACGCTACCAACGCTGCCAAGTGATATGATCGATCCTTGCTTG
CGTGGAATCATTACACTGGCAGAATACTTCATTCCCATGAAAACAGCCTTCACATTTATATCAAACACCTTCTCGAACTCCGATATATCGACGTTGCGAATATCGGATGAGGGCGTGCCTGAGATTCC

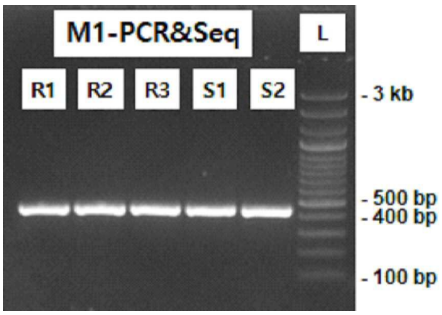
>6-10863_M1

GCAAATTTGCATTCTTTTTGGCAAACTCACGAAAACCTGTAAACATATCCTCAGTTCTCTCATCTTCAGGCAAGTGAGCTACAGCCAAGTTCGTTGGAACCGCGTAAGGAGAGACACAATTTACACGAATTCC
ATGTTGCCCAAGCTCCGCTGCAATGCTTCTTGTAAGCCCCACTACAGCGTGCTTCGAGCTTATGTAATGATGTGGCCCTATTCCTCCTATGACGCTACCAACACTGCCTAGCGATATGATTGATCCTTGCTTG
CGCGGAATCATTACACTGGCAGCATACTTCATTCCCATGAAAACACCCTTCACATTTATATCAAACACCTTCTCGAACTCCGATACATCGACGTTGCGAATATCAGATGAGGGCGTGCCTGAGATCCC

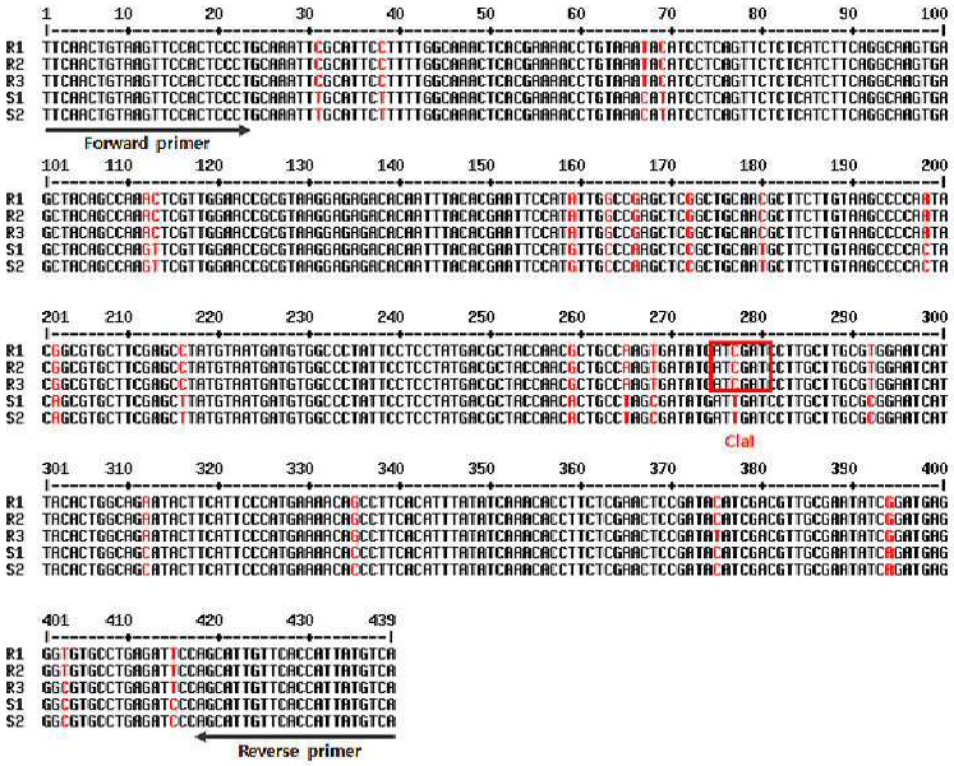
>10-10886_M1

GCAAATTTGCATTCTTTTTGGCAAACTCACGAAAACCTGTAAACATATCCTCAGTTCTCTCATCTTCAGGCAAGTGAGCTACAGCCAAGTTCGTTGGAACCGCGTAAGGAGAGACACAATTTACACGAATTCC
ATGTTGCCCAAGCTCCGCTGCAATGCTTCTTGTAAGCCCCACTACAGCGTGCTTCGAGCTTATGTAATGATGTGGCCCTATTCCTCCTATGACGCTACCAACACTGCCTAGCGATATGATTGATCCTTGCTTG
CGCGGAATCATTACACTGGCAGCATACTTCATTCCCATGAAAACACCCTTCACATTTATATCAAACACCTTCTCGAACTCCGATACATCGACGTTGCGAATATCAGATGAGGGCGTGCCTGAGATCCC

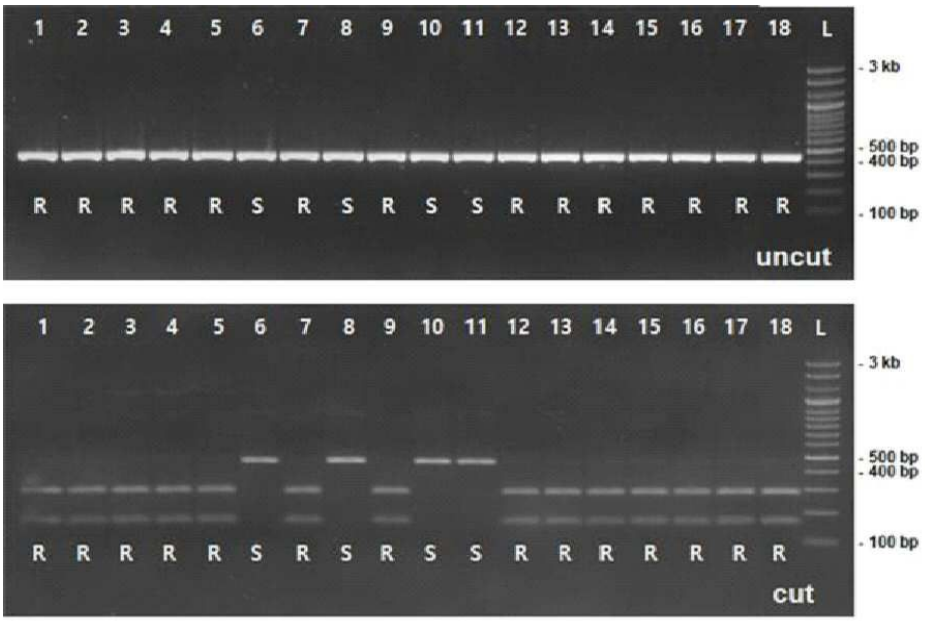
도면2


M1-PCR&Seq
L
R1
R2
R3
S1
S2
- 3 kb
- 500 bp
- 400 bp
- 100 bp

도면3


Forward primer
ClaI
Reverse primer

도면4



서 열 목 록

<110> REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)

<120> Molecular marker for identifying resistance against powdery mildew of cucumber and the method for identification using the same

<130> DP20210295

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MK1 Forward primer

<400> 1

ttcaactgta agttccactc cct 23

<210> 2

<211

> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MK1 reverse primer

<400> 2

tgacataatg gtgaacaatg ct 22

<210> 3

<211> 394

<212> DNA

<213> Cucumis sativus

<400> 3

gcaaattcgc attccttttg gcaaactcac gaaaacctgt aaatacatcc tcagttctct 60

catcttcagg caagtgagct acagccaaac tcgttggaac cgcgtaagga gagacacaat 120

ttacacgaat tccatattgg ccgagctcgg ctgcaacgct tcttgtaagc cccaatacgg 180

cgtgcttcga gcctatgtaa tgatgtggcc ctattcctcc tatgacgcta ccaacgctgc 240

caagtgatat gatcgatcct tgcttgcgtg gaatcattac actggcagaa tacttcattc 300

ccatgaaaac agccttcaca tttatatcaa acaccttctc gaactccgat acatcgacgt 360

tgcgaatatc ggatgagggt gtgcctgaga ttcc 394

<210> 4

<211> 394

<212> DNA

<213> Cucumis sativus

<400> 4

gcaaattcgc attccttttg gcaaactcac gaaaacctgt aaatacatcc tcagttctct 60

catcttcagg caagtgagct acagccaaac tcgttggaac cgcgtaagga gagacacaat 120

ttacacgaat tccatattgg ccgagctcgg ctgcaacgct tcttgtaagc cccaatacgg 180

cgtgcttcga gcctatgtaa tgatgtggcc ctattcctcc tatgacgcta ccaacgctgc 240

caagtgatat gatcgatcct tgcttgcgtg gaatcattac actggcagaa tacttcattc 300

ccatgaaaac agccttcaca tttatatcaa acaccttctc gaactccgat acatcgacgt 360

tgcgaatatc ggatgagggt gtgcctgaga ttcc 394

<210> 5

<211> 394

<212> DNA

<213> Cucumis sativus

<400> 5

gcaaattcgc attccttttg gcaaactcac gaaaacctgt aaatacatcc tcagttctct 60

catcttcagg caagtgagct acagccaaac tcgttggaac cgcgtaagga gagacacaat 120

ttacacgaat tccatattgg ccgagctcgg ctgcaacgct tcttgtaagc cccaatacgg 180

cgtgcttcga gcctatgtaa tgatgtggcc ctattcctcc tatgacgcta ccaacgctgc 240

caagtgatat gatcgatcct tgcttgcgtg gaatcattac actggcagaa tacttcattc 300

ccatgaaaac agccttcaca tttatatcaa acaccttctc gaactccgat atatcgacgt 360

tgcgaatatc ggatgagggc gtgcctgaga ttcc 394

<210> 6

<211> 394

<212> DNA

<213> Cucumis sativus

<400> 6

gcaaatttgc attctttttg gcaaactcac gaaaacctgt aaacatatcc tcagttctct 60

catcttcagg caagtgagct acagccaagt tcgttggaac cgcgtaagga gagacacaat 120

ttacacgaat tccatgttgc ccaagctccg ctgcaatgct tcttgtaagc cccactacag 180

cgtgcttcga gcttatgtaa tgatgtggcc ctattcctcc tatgacgcta ccaacactgc 240

ctagcgatat gattgatcct tgcttgcgcg gaatcattac actggcagca tacttcattc 300

ccatgaaaac acccttcaca tttatatcaa acaccttctc gaactccgat acatcgacgt 360

tgcgaatatc agatgagggc gtgcctgaga tccc 394

<210> 7

<211> 394

<212> DNA

<213> Cucumis sativus

<400> 7

gcaaatttgc attctttttg gcaaactcac gaaaacctgt aaacatatcc tcagttctct 60

catcttcagg caagtgagct acagccaagt tcgttggaac cgcgtaagga gagacacaat 120

ttacacgaat tccatgttgc ccaagctccg ctgcaatgct tcttgtaagc cccactacag 180

cgtgcttcga gcttatgtaa tgatgtggcc ctattcctcc tatgacgcta ccaacactgc 240

ctagcgatat gattgatcct tgcttgcgcg gaatcattac actggcagca tacttcattc 300

ccatgaaaac acccttcaca tttatatcaa acaccttctc gaactccgat acatcgacgt 360

tgcgaatatc agatgagggc gtgcctgaga tccc 394