

(43) 공개일자 2020년05월26일

- 1 -

(52) CPC특허분류

C12Q 2521/301 (2013.01)

C12Q 2565/125 (2013.01)

C12Q 2600/13 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395053951

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)

연구과제명 Post-GWAS 연구를 통한 토마토 유전체육종 기반 구축

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 Ty-3 유전자의 염기서열 중 34 내지 45번 위치에 대응되는 위치의 12bp 인델 변이, 286번 위치에 대응되는 위치의 SNP 변이 및 754번 위치에 대응되는 위치의 SNP 변이 중 어느 하나 이상의 변이를 포함하는 12개 이상의 연속된 뉴클레오타드로 구성된 폴리뉴클레오타드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타드를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커.

청구항 2

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

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 제제는 서열번호 2 및 3의 서열로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 4 및 5의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 조성물.

청구항 4

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

청구항 5

판별 대상 토마토에서 서열번호 1의 Ty-3 유전자의 염기서열 중 34 내지 45번 위치에 대응되는 위치의 12bp 인델, 286번 위치에 대응되는 위치의 SNP 및 754번 위치에 대응되는 위치의 SNP 중 어느 하나를 확인하는 단계를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 34 내지 45번 위치에 대응되는 위치의 12bp의 삽입, 286번 위치에 대응되는 위치의 염기가 아데닌(A) 또는 754번 위치에 대응되는 위치의 염기가 아데닌(A)으로 확인된 토마토를 황화잎말림 바이러스 저항성 품종으로 판별하는, 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 확인은 상기 마커를 증폭시키고, 증폭 산물에 MfeI, Bstz17I 및 RsaI로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 제한효소를 처리하여 수행되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

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

배경 기술

[0003] 토마토 세계 종자시장 규모가 약 1조원에 달하는 고부가가치 글로벌 채소작물로 국내에서도 소비가 증가하여 종자시장 규모가 2012년도에 186억으로 성장, 과채류 중에서 고추 다음으로 큰 비중을 차지하고 있다. 국내 토마토 시장이 확대는 신품종 육성의 활성화를 이끌었는데 토마토 황화잎말림 바이러스(TYLCV)는 토마토 재배에 큰 문제가 되는 병으로 저항성 토마토 품종육성이 주요 육종목표가 되어 왔다. 우수한 품종을 육성하는데 표현형에 기반한 기존 육종방법은 시간과 비용이 많이 소요되어, DNA 분자표지 활용하여 선발효율을 증진시키고자 하는 연구가 많이 이루어져 왔다. DNA 분자표지는 생물종의 유전체상에서 다형성 여부를 판단할 수 있는 특정 염기서열 단편으로 표현형 기반의 방법에 비해 재배환경 및 작물의 성장단계에 영향을 받지 않아 신속하고 정확도가 높다는 장점이 있다. 토마토의 경우, 다수 병에 대한 저항성 유전자를 선발하기 위한 분자표지 개발을 통한 MAS(Marker Assisted Selection) 기술의 요구도가 높아 연구가 활발히 이루어지고 있다. 하지만 기존에 개발된 TYLCV 저항성 분자표지들은 연관마커로써 재조합을 통해 마커와 해당 유전자간의 연관성이 유지되지 않아 육종 현장에서 저항성 계통을 선발하는 효과적이 않음으로써 활용도가 높지 않은 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

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

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0007] 본 발명은 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 본 발명은 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명은 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다

과제의 해결 수단

- [0011] 1. 서열번호 1의 Ty-3 유전자의 염기서열 중 34 내지 45번 위치에 대응되는 위치의 12bp 인델 변이, 286번 위치에 대응되는 위치의 SNP 변이 및 754번 위치에 대응되는 위치의 SNP 변이 중 어느 하나 이상의 변이를 포함하는 12개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커.
- [0012] 2. 위 1의 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 조성물.
- [0013] 3. 위 2에 있어서, 상기 제제는 서열번호 2 및 3의 서열로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 4 및 5의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 조성물.
- [0014] 4. 위 2 또는 3 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 키트.
- [0015] 5. 판별 대상 토마토에서 서열번호 1의 Ty-3 유전자의 염기서열 중 34 내지 45번 위치에 대응되는 위치의 12bp 인델, 286번 위치에 대응되는 위치의 SNP 및 754번 위치에 대응되는 위치의 SNP 중 어느 하나를 확인하는 단계를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별방법.

- [0016] 6. 위 5에 있어서, 상기 34 내지 45번 위치에 대응되는 위치의 12bp의 삽입, 286번 위치에 대응되는 위치의 염기가 아데닌(A) 또는 754번 위치에 대응되는 위치의 염기가 아데닌(A)으로 확인된 토마토를 황화잎말림 바이러스 저항성 품종으로 판별하는, 방법.
- [0017] 7. 위 5에 있어서, 상기 확인은 상기 마커를 증폭시키고, 증폭 산물에 MfeI, Bstz17I 및 RsaI로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 제한효소를 처리하여 수행되는, 방법.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 토마토의 황화잎말림 바이러스 판별용 마커 및 이를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 신속하고 정확한 판별이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 Ty-3 유전자에서의 서열변이 탐색을 위한 염기서열분석 전략을 나타낸 도이다. 회색과 검정색 박스는 각각 UTR과 코딩 영역을 의미하며 non-coding 영역은 실선으로 나타내었다.
- 도 2는 Ty-3 저항성 계통과 감수성 계통 간의 아미노산 서열 변이를 나타낸 도이다. SNP 또는 InDel에 의하여 아미노산 서열 치환이 일어난 경우에는 검은색으로 표시하였다. "*"는 Ty-3 CAPS 마커 발굴에 사용된 변이를 의미한다.
- 도 3은 Ty-3 저항성 계통과 감수성 계통 간의 염기 서열 변이를 나타낸 도이다. SNP 또는 InDel에 의하여 염기 서열 치환이 일어난 경우에는 노란색으로 표시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명은 서열번호 1의 Ty-3 유전자의 염기서열 중 34 내지 45번 위치에 대응되는 위치의 12bp 인델 변이, 286번 위치에 대응되는 위치의 SNP 변이 및 754번 위치에 대응되는 위치의 SNP 변이 중 어느 하나 이상의 변이를 포함하는 12개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 용어, "토마토 황화잎말림 바이러스(TYLCV) 저항성"은 TYLCV에 감염되어도 건강한 표현형을 나타내는, TYLCV에 내성을 갖는 것을 의미한다. 토마토 품종에 따라 TYLCV에 대한 저항성 또는 감수성의 정도가 다르며, 구체적인 예로, TB38, TB45는 TYLCV 저항성 품종으로 구분된다.
- [0026] 본 발명은 TYLCV 저항성 개체는 비저항성 개체의 Ty-3 유전자에서의 InDel 변이 및 SNP 변이가 있음에 기반으로 한 것이다.
- [0027] 용어 "마커"는 유전적으로 불특정 연관된 유전자좌(genetic locus)를 동정할 때 참고점으로 사용되는 염기서열을 말하며, 마커(molecular marker)의 유전자 지도상의 위치는 유전자좌 또는 좌위로 일컬어진다.
- [0028] 본 발명에서 제공되는 마커는 제한 증폭 다형성 서열 마커일 수 있다.
- [0029] 용어 "제한 증폭 다형성 서열(Cleaved amplified polymorphic sequence; CAPS) 마커"는 SNP처럼 한 개의 염기 서열이 변하거나 InDel에 의해 발생하는 제한효소에 의해 잘리는 부위의 변화를 해석할 수 있는 마커이다. CAPS 마커는 유전자좌에 특이적인 프라이머로 PCR 증폭을 한 후 제한효소로 잘라준 뒤 나타나는 다형성을 분석하는 방법이다.
- [0030] 용어 "인델(InDel)"은 DNA의 염기배열에서 일부 염기가 중간에 삽입되거나(insertion) 결실된(deletion) 변이를 총칭한다. 상기 인델(InDel) 마커는 표준유전체와 실험에 사용된 품종의 유전체 정보를 비교 분석하는 방법을 통해 표준유전체보다 삽입(insertion) 또는 결실(deletion)된 영역을 탐색하고 그 정보를 바탕으로 프라이머를 제작한다. 따라서 그 증폭 결과는 표준유전체와 비교하여 밴드 크기가 큰 경우(insertion)와 작은 경우

(deletion)의 두 종류 타입을 나타낼 수 있다.

- [0031] 용어 "다형성(polymorphism)"은 하나의 유전자 좌에 두 종류 이상의 대립 유전자(allele)가 존재하는 경우를 의미하며, 다형성 중에서 개체에 따라 단일 염기만이 차이가 있는 것을 SNP라 한다.
- [0032] 용어 "대립 유전자(allele)"는 상동염색체의 동일한 유전자좌에 존재하는 한 종류의 유전자의 여러 타입을 의미한다.
- [0033] 용어, "뉴클레오타이드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 특별하게 다르게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다.
- [0034] 상기 마커는 서열번호 1의 Ty-3 유전자의 염기서열 중 34 내지 45번 위치에 대응되는 위치, 286번 위치에 대응되는 위치, 754번 위치에 대응되는 위치에 존재하는 것으로, 대상 토마토의 Ty-3 유전자에서 상기 위치에 대응되는 위치의 마커 존부를 확인함으로써 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 여부를 판별할 수 있다.
- [0035] 서열번호 1의 Ty-3 유전자는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성을 갖는 토마토의 Ty-3 유전자로서, 34 내지 45번 위치에는 12bp의 인델(Indel) 변이가 존재하고, 구체적으로 서열번호 1의 서열은 상기 12bp가 삽입된 서열이다. 대상 토마토의 Ty-3 유전자에서 동일 위치에 동일 12bp 서열이 존재하면 대상 토마토는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성을 갖는 것일 수 있다.
- [0036] 또한, 서열번호 1의 Ty-3 유전자에는 286번 위치, 754번 위치에 SNP 변이가 존재하는 것으로, 대상 토마토의 Ty-3 유전자에서 상기 위치에 대응되는 위치의 SNP 존부를 확인함으로써 바이러스 저항성 존부를 확인할 수 있다. 구체적으로, 대상 토마토의 Ty-3 유전자의 34 내지 45번 위치에 상기 12bp가 존재하면, 286번 또는 754번 위치의 서열을 확인하여 알 수 있고, 그렇지 않다면 286번 위치 또는 754번 위치에 대응되는 위치의 서열을 확인하여 알 수 있다.
- [0037] 상기 "대응되는 위치"는 서열을 배열(alignment)하였을 때의 대응되는 위치의 서열을 의미하는 것으로, 대상 토마토의 Ty-3 유전자에서 34 내지 45번 위치에 상기 12bp(인델)가 존재하면 서열번호 1의 Ty-3 유전자에서 286번 위치, 754번 위치는 대상 토마토의 Ty-3 유전자에서 동일 위치일 수 있고, 상기 12bp가 존재하지 않으면 해당 길이만큼 위치가 달라질 수 있다.
- [0038] 대상 토마토의 Ty-3 유전자에서 상기 서열번호 1의 Ty-3 유전자의 286번 위치 또는 754번 위치에 대응되는 위치의 염기가 아데닌인 경우, 대상 토마토는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 품종일 수 있다.
- [0039] 상기 마커는 폴리뉴클레오타이드 상기 마커는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것으로서, 그 길이는 상기 마커를 포함하는 것이고, 검출 또는 증폭되어 확인될 수 있는 것이라면 그 길이는 제한되지 않고, 예를 들면 12bp 이상, 50bp 이상, 100bp 이상, 300bp 이상, 500bp 이상, 5000bp 이하, 3000bp 이하, 1000bp 이하 등일 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 마커를 검출 또는 증폭시킬 수 있는 체제를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 조성물을 제공한다.
- [0042] 상기 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 체제는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 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.
- [0045] 본 발명의 마커를 증폭시킬 수 있는 체제는 프라이머 세트일 수 있다.
- [0046] 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 뉴클레오타이드

드 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.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 Ty-3 유전자의 상기 마커를 증폭시킬 수 있는 것이라면 그 서열 및 길이는 제한되지 않고 적절하게 설계/선택될 수 있다. 예를 들면, 서열번호 2 및 3의 프라이머 세트를 포함할 수 있고, 서열번호 4 및 5의 프라이머 세트를 포함할 수 있다.

[0048] 상기 유전자 증폭은 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 예를 들어, 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 본 발명에서 이용되는 염기서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, "실질적인 동일성"은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0050] 따라서, 상기 서열번호 2 내지 5로 표시되는 염기서열과 높은 상동성을 갖는 염기서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90% 이상의 높은 상동성을 갖는 염기서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0052] 나아가, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별용 키트를 제공한다.

[0053] 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. 또한 특정 SNP 변이 및 이로 인한 특정 절편의 존부를 측정하기 위하여 MfeI, Bstz17I 또는 RsaI 등의 제한효소를 추가적으로 더 포함할 수 있다.

[0054] 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물일 수 있다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함할 수 있다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명은 판별 대상 토마토에서 서열번호 1의 Ty-3 유전자의 염기서열 중 34 내지 45번 위치에 대응되는 위치의 12bp 인델, 286번 위치에 대응되는 위치의 SNP 및 754번 위치에 대응되는 위치의 SNP 중 어느 하나를 확인하는 단계를 포함하는 토마토 황화잎말림 바이러스 저항성 판별방법을 제공한다.

[0057] 구체적으로 서열번호 1의 Ty-3 유전자의 염기서열 중 34 내지 45번 위치에 대응되는 위치에 12bp 인델이 삽입된 경우, 286번 위치에 대응되는 위치의 염기가 아데닌(A)인 경우, 754번 위치에 대응되는 위치 염기가 아데닌(A)인 경우 중 어느 하나에 해당하면 저항성을 갖는 것으로 판별할 수 있다.

[0058] 상기 확인은 상기 마커를 증폭시키고, 증폭 산물에 MfeI, Bstz17I 및 RsaI로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 제한효소를 처리하여 수행될 수 있다.

[0059] 상기 제한 효소 처리를 통해 단편화 여부를 확인함으로써 보다 간편하게 적은 비용으로 분석이 가능하다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 조성물이 서열번호 2 및 3의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 경우, 상기 제한효소는 MfeI 또는 Bstz17I일 수 있다.

- [0061] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 조성물이 서열번호 4 및 5의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 경우, 상기 제한효소는 RsaI일 수 있다.
- [0062] 구체적으로, 상기 프라이머 세트는 Ty-3의 InDel 또는 SNP 변이 부분을 증폭시키는 데에 이용된다. 증폭된 단편에 MfeI, Bstz171 및 RsaI로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 제한효소를 혼합하여 특정 절단된 단편의 관찰여부로 저항성과 감수성 개체를 판별할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 판단 대상 토마토의 Ty-3 유전자에 서열번호 2 및 3의 프라이머 세트를 처리하여 증폭시킨 단편에 Bstz171 제한효소를 혼합하는 경우(12bp 인델 검출), 특정 절단된 단편이 관찰되는 경우 저항성 품종이고, 관찰되지 않는 경우 감수성 품종인 것으로 판별할 수 있다.
- [0064] 또는 Ty-3 유전자에 서열번호 2 및 3의 프라이머 세트를 처리하여 증폭시킨 단편에 MfeI 제한효소를 혼합하여 (286번 위치에 대응되는 SNP 검출) 특정 절단된 단편이 관찰되지 않은 경우 저항성 개체이고, 관찰되는 경우 감수성 개체인 것으로 판별할 수 있다.
- [0065] 또는 Ty-3 유전자에 서열번호 4 및 5의 프라이머 세트를 처리하여 증폭시킨 단편에 RsaI 제한효소를 혼합하여 (754번 위치에 대응되는 SNP 검출) 5개의 절단된 단편이 관찰되는 경우 저항성 개체이고, 4개의 절단된 단편이 관찰되는 경우 감수성 개체인 것으로 판별할 수 있다.
- [0066] 필요에 따라, 본 발명의 방법은 대상 토마토에서 게놈 DNA를 분리하고, 전술한 프라이머를 이용하여 서열번호 1의 Ty-3 유전자의 34 내지 45번 위치에 대응되는 염기, 286번 위치에 대응되는 염기 및 754번 위치에 대응되는 염기 서열 변이 중 하나 이상을 포함하는 염기 서열을 증폭시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0067] 게놈 DNA를 분리 및 염기 서열 증폭은 당 분야에 공지된 실험방법, 조건에 따라 행해질 수 있고, 이는 특별히 제한되지 않는다.

[0069] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0071] 실험재료

[0072] 총 8 개의 토마토 근친 계통 (*S. lycopersicum*)이 Ty-2 및 Ty-3 유전자의 서열 분석을 위해 사용되었다. 이들은 Ty-2 저항성 품종 (TB47 및 TB50), Ty-2 감수성 품종 (TB48 및 TB49), Ty-3 저항성 품종 (TB38(Ty-3 유전자는 서열번호 1) 및 TB45(Ty-3 유전자는 서열번호 6) 및 Ty-3 감수성 품종 (TB61(Ty-3 유전자는 서열번호 7) 및 TB70(Ty-3 유전자는 서열번호 8))이다. 이 연구에서 개발된 마커의 검증을 위해 추가로 30 종의 저항성 및 감수성 품종 (18 개의 F1 상업용 품종(cultivars), 9개의 근친교배종(inbred lines) 및 3개의 야생종(wild species))이 사용되었다. 이 중 하나의 F1 품종과 하나의 근친교배종은 Ty-2 유전자를 포함하는 것으로 알려진 품종이며, 2개의 야생종 LA1932와 LA2779는 Ty-3 저항성의 원천이다. LA1969는 Ty-1 저항성의 원천으로 포함되었다. 또 다른 13종 (7개의 F1 품종 및 8개의 근친교배종)은 TYLCV에 저항성이 있지만, 그 저항성의 원인은 알려져 있지 않은 것이다. 다른 10개의 F1 품종은 감수성이다. 또한, 검증된 마커를 사용하여 Ty-2 및 Ty-3 저항성에 접근하기 위해 171 개의 토마토 accession (77개의 동령의 육종계통 및 94개의 생식질)의 집단(collection)을 유전자형화 하였다. 이 육종 계통은 대한민국 농촌진흥청 (RDA)의 원예 및 한방 과학 연구소 (NIHHS)에서 유래되었다. 생식질 accession은 RDA의 National Agrobiodiversity Center(NAC), 미 농무부의 Germplasm Resources Information Network (GRIN), CM Rick Tomato Genetics Resource Center (TGRC), 및 세종대학교에서 얻었다.

[0074] 실험방법

[0075] 1. Ty-3의 유전자 서열 분석

[0076] 변형된 cetyl trimethyl ammonium bromide(CTAB) 방법을 사용해서 4주된 모종의 신선하고 어린 잎에서 게놈 DNA를 추출하였다. 잎 조직을 2 개의 4 mm 직경의 스테인레스 비드를 갖는 튜브에 넣고 TissueLyser (QIAGEN, CA, USA, USA)를 사용하여 3분 동안 교반하여 분쇄하였다. 분쇄 후, 모든 추출단계는 전술한 바와 같다. Complementary DNA(cDNA) 합성을 위해, Trizol™ 방법을 사용하여 4주된 모종의 신선한 어린 잎으로부터 전체

RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 NEXscript™ cDNA synthesis kit (Geneslab, Seongnam, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하는데 사용되었다.

[0077] The tomato reference genome assembly version SL3.0을 사용하여 Sol Genomic Network (SGN, <https://solgenomics.net>)에서 Ty-3 유전자의 전체 길이의 게놈 DNA 서열을 검색 하였다. Ty-3 유전자의 경우, 4,242 bp 게놈 DNA 서열 (SGN 유전자 ID : Solyc06g051190.2.1)을 사용하여 5' UTR 및 처음 6개의 엑손의 일부를 증폭하도록 3개의 프라이머 세트를 설계하였다. 구체적으로, 이들 프라이머는 5' UTR / 첫번째 엑손 (669 bp), 두 번째/세 번째 엑손 (514 bp) 및 네 번째/다섯 번째 엑손 (813bp)을 증폭시켰다 (도 1).

[0078] 총 50 μ l 부피에 포함된 50-100ng의 게놈 DNA 또는 cDNA, 0.2mM dNTP, 0.1 μ M의 각 F(forward) 와 R(reverse) 프라이머, 1X PCR buffer, 및 0.5U의 Taq polymerase를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 증폭 과정은 94℃에서 3분 동안 initial denaturation 하는 것을 포함하고, 그 후, 94℃에서 3초, annealing 온도(프라이머의 녹는점에 따라 50℃에서 60℃)에서 30초, 72℃에서 45초 동안 40회 cycle을 반복하고, 72℃에서 7분 동안 1회 cycle로 extension 하는 것을 포함한다.

[0079] PCR 증폭산물(amplicon)은 제조자의 지시에 따라 NEXprep™ Purification Mini Kit (Geneslab, Seongnam, Korea)를 사용해서 정제되었다. 정제된 증폭산물은 Sanger sequencing (CosmoGenetech, Seoul, Korea)을 위해 사용되었다. 그 DNA 서열은 Staden Package software 및 Clustal Omega tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>)을 사용하여 트리밍되고 정렬되었다. TYLCV 저항성과 감수성 품종 사이의 서열 변이는 서열 정렬의 육안 검사에 의해 확인되었다. 핵산 서열은 ExPASy-translate tool을 사용하여 non-synonymous 변이를 확인하기 위해 아미노산 서열로 번역되었다.

[0081] 2. 세포질 집단에서 마커 발굴 및 유전자 분석

[0082] 게놈 DNA, cDNA, 및 아미노산 서열의 다중 정렬로부터 확인된 Non-synonymous SNPs와 작은 insertion/deletions (InDels)는 cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) 마커를 개발하기 위해 사용되었다. CAPS를 식별하기 위해 SGN (https://solgenomics.net/tools/caps_designer/caps_input.pl) and SnapGene Viewer software (<https://www.snapgene.com>)에서 수행되는 CAPS Designer tool이 모두 사용되었다. 큰 InDel은 아가로오스 겔에서 다형성을 찾기위해 직접 마커로 사용되었다. CAPS 마커로 유전형을 분석하는 것은 1g의 PCR 증폭산물을 1.2 유닛의 제한효소들 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)로 처리하고, 적절한 온도에서 overnight 인큐베이션하여 수행되었다. 저항성 및 감수성 대립 유전자는 1x RedSafe™ nucleic acid staining solution (iNTRON Biotechnology, Seongnam, Korea)과 2% 아가로오스 겔에서 처리된 증폭산물의 겔 전기영동에 의해 결정되었다. InDel 마커의 대립 유전자는 PCR 증폭 후 3% 아가로오스 겔로 분리되었다.

[0084] 실험결과

[0085] 1. Ty-3 저항성과 관련된 서열 변이

[0086] Ty-3 유전자(서열번호 1)의 경우, 5' UTR, 5개의 엑손, 및 인트론의 일부를 포함하여 1,996 bp 서열을 생성하였다. 다중 서열 정렬은 저항성과 감수성 품종 사이에 총 30개의 SNP를 검출하였다. 이들 중 12개의 SNP는 코딩 서열에서 발견되고, 10개의 SNP는 non-synonymous였다. 또한, 첫 번째 엑손에서 12 bp InDel과 non-coding 서열에서 4개의 InDel(5' UTR에서 3개, 인트론 서열에서 1개)이 발견되었다 (표 1).

표 1

위치	Ty-3	
	SNP	InDel
Upstream region	na	na
5' UTR	8	3
Exon	12 (9)	1
Intron	10	1
3' UTR	na	na

[0089]

¹
non-synonymous SNP의 수는 괄호안에 표시되었다.

[0091]

2. Ty-3 선별을 위한 분자 마커

[0092]

실험에 사용된 후보 Ty-3의 경우, 코딩 서열에 있는 non-synonymous SNP와 InDel은 CAPS 마커를 개발하기 위해 고려되었다. 10개의 non-synonymous SNP 중 5개의 SNP는 CAPS로 변환되었다. 비용 효율적인 제한효소 MfeI 및 RsaI을 기반으로 2개의 CAPS 마커(Ty3-SNP9 및 Ty3-SNP17)를 각각 선택하였다. Ty3-SNP9 프라이머 세트에 수행한 PCR은 678 bp(저항성)과 669 bp(감수성) 증폭산물을 생성하였다. 증폭산물의 이러한 크기 차이는 프라이머 세트가 증폭시킨 5' UTR와 첫 번째 엑손 서열에 InDel이 존재하기 때문이다. MfeI로 처리 후에 감수성 증폭산물은 두 조각(555 bp 및 114 bp)으로 전달되는 반면, 저항성 대립 유전자는 단편이 절단되지 않았다. 대조적으로, Ty3-SNP17 마커는 저항성 및 감수성 대립 유전자 모두에서 813 bp PCR 증폭산물의 절단된 조각이 확인되었다. 또한, 12 bp InDel은 CAPS 마커(ty3-InDel14)를 개발하기 위해 사용되었다. 그것은 BstZ17I 처리 후, 저항성 대립 유전자에 대해 2개의 절단된 조각(325 bp 및 353 bp)을 생성하였고, 감수성 대립 유전자에 대해 절단되지 않은 조각을 생성하였다. Ty3-SNP9 및 Ty3-InDel14 마커는 하나의 프라이머 세트가 사용되었고, Ty3-InDel14 마커에서 저항성과 감수성 대립 유전자 사이에서 9 bp 상이한 PCR 증폭산물이 관찰되었다.

[0093]

저항성과 감수성 품종 사이의 Ty-3 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열 분석결과와 도 2에 나타내었으며, 제작된 프라이머 및 발굴 마커는 표 2에 나타내었다.

표 2

[0095]

유전자	마커 이름	마커 종류	프라이머 서열 (5'-3')	제한 효소 ¹	단편 크기 (bp)	
					저항성	감수성
Ty-3	Ty3-InDel14	CAPS	F: CCTATCCTCAGTGTTCGGTCA	BstZ17I	353/325 (678) ¹	669 (669)
			R: GGCGAAAGACTTTGTGTACACA			
	Ty3-SNP9	CAPS	F: CCTATCCTCAGTGTTCGGTCA R: GGCGAAAGACTTTGTGTACACA	MfeI	678 (678)	555/114 (669)
	Ty3-SNP17	CAPS	F: TCTCAGGTGATGCTGAGCAC R: AGAGAACGAAAACGAAATTTCAAAC	RsaI	497/148/65/52/51 (813)	562/148/52/51 (813)

[0096]

¹
제한 효소 분해 후의 단편 크기가 먼저 표시되고, 괄호 안에 분해 전 PCR 증폭산물의 크기가 표시된다. 저항성 및 감수성 대립 유전자 사이의 2개의 CAPS 마커에 대한 상이한 증폭산물 크기는 5'UTR 상의 다른 인델 뿐만 아니라 첫 번째 엑손 상의 12bp 인델의 존재 때문이다.

[0098]

검증을 위해, 이들 새로운 마커들은 TYLCV에 대해 알려진 표현형을 갖는 30개의 토마토 품종의 유전형 분석에 사용되었다. 그 결과는 표 3에 나타내었다. 이들 중 2개의 저항성 품종(1개의 F1 품종 및 1개의 근친교배종)은 Ty-2 유전자를 포함하는 것으로 알려져 있다. F1 품종과 근친교배종은 각각 Ty2-UpInDel 마커에 대해 저항성 대립 유전자가 heterozygous 및 homozygous 형태로 확인되었다. Ty-2 유전자는 TYLCV 저항성에 대해 완전 우성임을 알 수 있기 때문에, 저항성 F1 품종에서 Ty-2 마커로 heterozygous 형태를 찾을 것으로 예상되었다. Ty-2 유전자를 갖는 F1 품종은 모든 3개의 Ty-3마커에 대해 감수성 대립유전자의 homozygous 형태로 확인되었다. 유사하게, 근친교배종은 Ty-3 마커의 감수성 대립 유전자에 대해 homozygous 형태라고 확인되었다. Ty-1 (LA1969) 또는 Ty-3 (LA1932 and LA2779)를 포함하는 것으로 알려져 있는 3개의 야생종은 Ty2-UpInDel 마커에 대해 감수성 대립 유전자의 homozygous 형태로 확인되었다. 그러나, 3개의 Ty-3 마커의 저항성 대립 유전자에 대해 homozygous로 확인되었다.

[0099]

다른 15개의 TYLCV에 대한 저항성 품종 중 Ty2-UpInDel 마커에 대한 감수성 대립 유전자의 homozygous 형태가 5

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

표 3

[0101]

연번	품종	세대 (class)	표현형	저항성 유전자	마커 유전자형 ¹			
					Ty2-UpInDel	Ty3-InDel ₄	Ty3-SNP9	Ty3-SNP17
1	Bogopanorang	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
2	Kkottomato	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
3	Kkomaheuksu	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
4	Cadilak	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
5	Miniheuksu	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
6	Tangtang60	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
7	Beryking	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
8	Shinlovely256	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
9	Dongyu250	F ₁	S	unknown	S	S	S	S
10	RAFITO F1	F1	S	unknown	S	S	S	S
11	Hulk	F ₁	R	Ty-2	H	S	S	S
12	Tyshinheuksu	F ₁	R	unknown	S	H	H	H
13	Songari	F ₁	R	unknown	S	S	S	S
14	Aroma300	F ₁	R	unknown	S	H	H	H
15	Tyunique	F ₁	R	unknown	R	S	S	S
16	Shinsugarred	F ₁	R	unknown	H	H	H	H
17	Shinsugaryellow	F ₁	R	unknown	S	H	H	H
18	TOP 1199	F1	R	unknown	S	H	R	H
19	Hero80	Inbred	R	unknown	H	S	S	S
20	Hero90	Inbred	R	unknown	H	S	S	S
21	Hero100	Inbred	R	unknown	H	S	S	H
22	Hero110	Inbred	R	unknown	H	S	S	H
23	Hero120	Inbred	R	Ty-2	R	S	S	S
24	Hera110	Inbred	R	unknown	H	S	S	H
25	Tomas	Inbred	R	unknown	S	H	H	H
26	Tars	Inbred	R	unknown	H	S	S	S
27	TC 32347	Inbred	R	unknown	S	R	R	R
28	LA1932	wild	R	Ty-3	S	R	R	R
29	LA1969	wild	R	Ty-1	S	R	R	R
30	LA2779	wild	R	Ty-3	S	R	R	R

¹

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

3. 세포질 집단에서 Ty-2와 Ty-3 의 저항성 평가

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

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

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

표 4

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

표 5

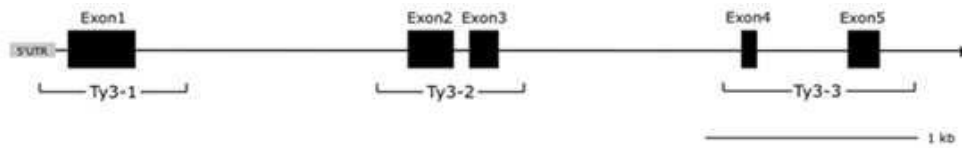
품종	마커 유전자형			
	Ty2-UpInDel	Ty3-InDel4	Ty3-SNP9	Ty3-SNP17
16TB3	R	R	S	S
16TB14	R	R	R	S
16TB19	R	S	S	R
16TB36	R	R	R	R
16TB65	R	S	S	R
16TB72	R	R	S	S
16TB74	R	R	S	R

¹

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

도면

도면1



도면2

```

****
TB38(R) MGDPLIEEIDVPSCLDAPLPYSVETMLDRICKEQQQKPPCTGIRRLSSIGEGKSLEMLKIIISRRPIKKSLSAFLVYMI 80
TB45(R) MODPLIEEIDVPSCLDAPLPYSVETMLDRICKEQQQKPPCTGIRRLSSIGEGKSLEMLKIIISRRPIKKSLSAFLVYMI 80
TB61(S) MODPLIEEIDVPSCLDAPLPYSVETMLDRICKEQQQKPPCTGIRRLSSIGEGKSLEMLKIIISRRPIKKSLSAFLVYMI 77
TB70(S) MODPLIEEIDVPSCLDAPLPYSVETMLDRICKEQQQKPPCTGIRRLSSIGEGKSLEMLKIIISRRPIKKSLSAFLVYMI 77

*
TB38(R) DRYPDCLSSSSSPFNLLKRSSSPLEFPSPGKRLIGESSKSKLEMGLLACASPQKVARQLSFCEEPESNCRRTSPYVS 160
TB45(R) DRYPDCLSSSSSPFNLLKRSSSPLEFPSPGKRLIGESSKSKLEMGLLACASPQKVARQLSFCEEPESNCRRTSPYVS 160
TB61(S) DRYPDCLSSSSSPFNLLKRSSSPLEFPSPGKRLIGESSKSKLEMGLLACASPQKVARQLSFCEEPESNCRRTSPYVS 157
TB70(S) DRYPDCLSSSSSPFNLLKRSSSPLEFPSPGKRLIGESSKSKLEMGLLACASPQKVARQLSFCEEPESNCRRTSPYVS 157

TB38(R) QQLMILNELEFRKLLVLVSYIGCNKLEDVISPQIADDIVRKEDLSMTDFESEIWNAFQKACYAVSDRSKYLDWNCRKTHI 240
TB45(R) QQLMILNELEFRKLLVLVSYIGCNKLEDVISPQIADDIVRKEDLSMTDFESEIWNAFQKACYAVSDRSKYLDWNCRKTHI 240
TB61(S) QQLMILNELEFRKLLVLVSYIGCNKLEDVISPQIADDIVRKEDLSMTDFESEIWNAFQKACYAVSDRSKYLDWNCRKTHI 237
TB70(S) QQLMILNELEFRKLLVLVSYIGCNKLEDVISPQIADDIVRKEDLSMTDFESEIWNAFQKACYAVSDRSKYLDWNCRKTHI 237

*
TB38(R) YYCHIKQNGCCCTFKGPYLNTRTHLQRALODDNVLIKRFVEDTSCANIILEEGILVGLRRYRFF 293
TB45(R) YYCHIKQNGCCCTFKGPYLNTRTHLQRALODDNVLIKRFVEDTSCANIILEEGILVGLRRYRFF 293
TB61(S) YYCHIKQNGCCCTFKGPYLNTRTHLQRALODDNVLIKRFVEDTSCANIILEEGILVGLRRYRFF 290
TB70(S) YYCHIKQNGCCCTFKGPYLNTRTHLQRALODDNVLIKRFVEDTSCANIILEEGILVGLRRYRFF 290

```

도면3

```

TB38(R) ATGGGTGATCCGTTGATGAAGAAATGATGTTCTCTTGTATCTGATGACCTTTA TB38(R) CAACAGTTGATGATCCTCAATGAACCTGAATTAAGAAATGTTTTTGGTACTGAGCTAC
TB45(R) ATGGGTGATCCGTTGATGAAGAAATGATGTTCTCTTGTATCTGATGACCTTTA TB45(R) CAACAGTTGATGATCCTCAATGAACCTGAATTAAGAAATGTTTTTGGTACTGAGCTAC
TB61(S) ATGGGTGATCCGTTGATGAAGAAATGATGTTCTCTTGTATCTGATGACCTTTA TB61(S) CAACAGTTGATGATCCTCAATGAACCTGAATTAAGAAATGTTTTTGGTACTGAGCTAC
TB70(S) ATGGGTGATCCGTTGATGAAGAAATGATGTTCTCTTGTATCTGATGACCTTTA TB70(S) CAACAGTTGATGATCCTCAATGAACCTGAATTAAGAAATGTTTTTGGTACTGAGCTAC
*****
TB38(R) CCATATCTGTAGAGACGATGCTTGATAGAATCTGCAAGGACGAGGGCAAAACACCG TB38(R) ATTGGATGCAACAAGTTGGAAGATGTTATATCCCTCAAAATGCTGATGATATTGTAAGA
TB45(R) CCATATCTGTAGAGACGATGCTTGATAGAATCTGCAAGGACGAGGGCAAAACACCG TB45(R) ATTGGATGCAACAAGTTGGAAGATGTTATATCCCTCAAAATGCTGATGATATTGTAAGA
TB61(S) CCATATCTGTAGAGACGATGCTTGATAGAATCTGCAAGGACGAGGGCAAAACACCG TB61(S) ATTGGATGCAACAAGTTGGAAGATGTTATATCCCTCAAAATGCTGATGATATTGTAAGA
TB70(S) CCATATCTGTAGAGACGATGCTTGATAGAATCTGCAAGGACGAGGGCAAAACACCG TB70(S) ATTGGATGCAACAAGTTGGAAGATGTTATATCCCTCAAAATGCTGATGATATTGTAAGA
*****
TB38(R) TGTACTGGCATTAGAAGGAGGCTGAGCTCTATTGGTGAAGGAGGCTATTAGAATGCTC TB38(R) AAGAAAGATCTTCCATGACTGATTTTGAATCAGAAATTTGGAATGCTTTGGAAGAGCA
TB45(R) TGTACTGGCATTAGAAGGAGGCTGAGCTCTATTGGTGAAGGAGGCTATTAGAATGCTC TB45(R) AAGAAAGATCTTCCATGACTGATTTTGAATCAGAAATTTGGAATGCTTTGGAAGAGCA
TB61(S) TGTACTGGCATTAGAAGGAGGCTGAGCTCTATTGGTGAAGGAGGCTATTAGAATGCTC TB61(S) AAGAAAGATCTTCCATGACTGATTTTGAATCAGAAATTTGGAATGCTTTGGAAGAGCA
TB70(S) TGTACTGGCATTAGAAGGAGGCTGAGCTCTATTGGTGAAGGAGGCTATTAGAATGCTC TB70(S) AAGAAAGATCTTCCATGACTGATTTTGAATCAGAAATTTGGAATGCTTTGGAAGAGCA
*****
TB38(R) AAAATAATATCACGTCGCTCTATCAAGAGAGTCTCTGCTTTCTTGTACATGATT TB38(R) TGTATGCTGTGTGATGATGATCAAGTACTTGAAGTGAATGCAAGAGACATATC
TB45(R) AAAATAATATCACGTCGCTCTATCAAGAGAGTCTCTGCTTTCTTGTACATGATT TB45(R) TGTATGCTGTGTGATGATGATCAAGTACTTGAAGTGAATGCAAGAGACATATC
TB61(S) AAAATAATATCACGTCGCTCTATCAAGAGAGTCTCTGCTTTCTTGTACATGATT TB61(S) TGTATGCTGTGTGATGATGATCAAGTACTTGAAGTGAATGCAAGAGACATATC
TB70(S) AAAATAATATCACGTCGCTCTATCAAGAGAGTCTCTGCTTTCTTGTACATGATT TB70(S) TGTATGCTGTGTGATGATGATCAAGTACTTGAAGTGAATGCAAGAGACATATC
*****
TB38(R) GATGCTACCCGATTTGCTCTCTCTCTGCTGATGCTTCAATGCTACTCAAAAGC TB38(R) TACTATTGCCACATTAAAGCAGAGGATGCTGTCTTCAAGGGTCCATCTTGAACACA
TB45(R) GATGCTACCCGATTTGCTCTCTCTCTGCTGATGCTTCAATGCTACTCAAAAGC TB45(R) TACTATTGCCACATTAAAGCAGAGGATGCTGTCTTCAAGGGTCCATCTTGAACACA
TB61(S) GATGCTACCCGATTTGCTCTCTCTCTGCTGATGCTTCAATGCTACTCAAAAGC TB61(S) TACTATTGCCACATTAAAGCAGAGGATGCTGTCTTCAAGGGTCCATCTTGAACACA
TB70(S) GATGCTACCCGATTTGCTCTCTCTCTGCTGATGCTTCAATGCTACTCAAAAGC TB70(S) TACTATTGCCACATTAAAGCAGAGGATGCTGTCTTCAAGGGTCCATCTTGAACACA
*****
TB38(R) TCTCTCTCCCTCTCTTATTCCATCTCCAGAGGGTAAACBTTTACTTGGTGAAGTTCT TB38(R) GCAAGBACTCACTTACAGAGAGCCCTGGGAGATGACAATGCTGATTTGCAATTTGTT
TB45(R) TCTCTCTCCCTCTCTTATTCCATCTCCAGAGGGTAAACBTTTACTTGGTGAAGTTCT TB45(R) GCAAGBACTCACTTACAGAGAGCCCTGGGAGATGACAATGCTGATTTGCAATTTGTT
TB61(S) TCTCTCTCCCTCTCTTATTCCATCTCCAGAGGGTAAACBTTTACTTGGTGAAGTTCT TB61(S) TTAAGBACTCACTTACAGAGAGCCCTGGGAGATGACAATGCTGATTTGCAATTTGTT
TB70(S) TCTCTCTCCCTCTCTTATTCCATCTCCAGAGGGTAAACBTTTACTTGGTGAAGTTCT TB70(S) TTAAGBACTCACTTACAGAGAGCCCTGGGAGATGACAATGCTGATTTGCAATTTGTT
*****
TB38(R) TCTAAATCAAGCTTGAGATGAGGCTTATTGGCTGTGCAAGGCCCTCAGAAAGTTGCTGCG TB38(R) GAAGATACAAGTTGTGCCAATAATAATCTCAGAGAGGCTCTTGTGTGGCTTGAGACGT
TB45(R) TCTAAATCAAGCTTGAGATGAGGCTTATTGGCTGTGCAAGGCCCTCAGAAAGTTGCTGCG TB45(R) GAAGATACAAGTTGTGCCAATAATAATCTCAGAGAGGCTCTTGTGTGGCTTGAGACGT
TB61(S) TCTAAATCAAGCTTGAGATGAGGCTTATTGGCTGTGCAAGGCCCTCAGAAAGTTGCTGCG TB61(S) GAAGATACAAGTTGTGCCAATAATAATCTCAGAGAGGCTCTTGTGTGGCTTGAGACGT
TB70(S) TCTAAATCAAGCTTGAGATGAGGCTTATTGGCTGTGCAAGGCCCTCAGAAAGTTGCTGCG TB70(S) GAAGATACAAGTTGTGCCAATAATAATCTCAGAGAGGCTCTTGTGTGGCTTGAGACGT
*****
TB38(R) CAGTTATCATTTTGGAGAGGCTGAATCTAAGTGTAGAAGAACCTCCCTTATGTCAGC TB38(R) TACCCTTTCTTTG
TB45(R) CAGTTATCATTTTGGAGAGGCTGAATCTAAGTGTAGAAGAACCTCCCTTATGTCAGC TB45(R) TACCCTTTCTTTG
TB61(S) CAGTTATCATTTTGGAGAGGCTGAATCTAAGTGTAGAAGAACCTCCCTTATGTCAGC TB61(S) TACCCTTTCTTTG
TB70(S) CAGTTATCATTTTGGAGAGGCTGAATCTAAGTGTAGAAGAACCTCCCTTATGTCAGC TB70(S) TACCCTTTCTTTG
*****

```

서 열 목 록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> Marker for discrimination of resistance to tomato yellow leaf
curl virus and discrimination method using the same marker
- <130> 19P09046-우
- <150> KR 10-2018-0141998
- <151> 2018-11-16
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 913
- <212> DNA
- <213> Lycopersicon esculentum
- <400> 1

atgggtgac cggttgatga agaaatgat gtctcttctt gtatactgga tgcaccttta 60
ccatattctg tagagacgat gcttgataga atctgcaagg agcaggggca aaaaccaccg 120

tgtactggca ttagaaggag gctgagctct attggtgaaa aagggtcatt agaaatgctc 180
aaaataatat cacgtcgcc tatcaagaag agtctctctg ctttcttctt ttacatgatt 240
gategctacc cggattgtct ctctcttctc tctagccct tcaatagtct actcaaacgc 300
tcttcttccc ctctcttatt tccatctcca gagggtaaac gtttacttgg tgaaagtctt 360
tctaaatcaa agcttgagat gggcttattg gcctgtgcaa gccctcagaa agttgctcgc 420
cagttatcat ttgcgagga gcctgaatct aactgtagaa gaacctcccc ttatgtcagc 480
caacagtga tgatctcaa tgaacttgaa ttagaaaaat tgtttttggt actgagctac 540

attggatgca acaagttgga agatgttata tccctcaaa ttgctgatga tattgtaaga 600
aagaaagatc ttccatgac tgattttgaa tcagaaattt ggaatgcttt tggaaaagca 660
tgttatgctg tgcagatag atcaaagtac ttagactgga attgcagaaa gacacatatt 720
tactattgcc acattaagca gaacggatgc tgtacctca agggctcata cttgaacaca 780
gcaaggactc acttacagag agccctggga gatgacaatg tactgattgt caaatttgtt 840
gaagatacaa gttgtgcaa tataattctc gaggaaggca ttcttgttgg cttgagacgt 900
taccgtttct ttg 913

- <210> 2
- <211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ty3 primer1_F
 <400> 2
 cctatcctca gtgtttcggg ca 22
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ty3 primer1_R
 <400> 3
 ggcgaaagac tttgtgtaca ca 22
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ty3 primer2_F
 <400> 4
 tctcaggtga tgctgagcac 20

 <210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ty3 primer2_R
 <400> 5
 agagaacgaa aacgaaattt caaaca 26
 <210> 6
 <211> 913
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum
 <400> 6
 atgggtgatc cggtgattga agaaattgat gttccttctt gtatactgga tgcaccttta 60
 ccatattctg tagagacgat gcttgataga atctgcaagg agcaggggca aaaaccaccg 120

tgtactggca ttagaaggag gctgagctct attggtgaaa aagggtcatt agaaatgctc	180
aaaataatat cacgtcgicc tatcaagaag agtctctctg cttttcttgt ttacatgatt	240
gatecgtacc cggattgtct ctctctctcc tctagccctt tcaatagtct actcaaacgc	300
tcttcttccc ctcttctatt tccatctcca gagggtaaac gtttacttgg tgaaagtctt	360
tctaaatcaa agcttgagat gggcttattg gcctgtgcaa gccctcagaa agttgctcgc	420
cagttatcat ttgcgagga gcctgaatct aactgtagaa gaacctcccc ttatgtcagc	480
caacagttga tgatcctcaa tgaacttgaa tttagaaaat tgtttttggt actgagctac	540
attggatgca acaagttgga agatgttata tccctcaaa ttgctgatga tattgtaaga	600
aagaaagatc tticcatgac tgattttgaa tcagaaattt ggaatgcttt tggaaaagca	660
tgttatgctg tgtcagatag atcaaagtac ttagactgga attgcagaaa gacacatc	720
tactattgcc acattaagca gaacggatgc tgtacctca aggggtccata ctgaaacaca	780
gcaaggactc acttacagag agccctggga gatgacaatg tactgattgt caaatttgtt	840
gaagatacaa gttgtgcaa tataattctc gaggaaggca ttcttgttgg cttagacgt	900
taccgtttct ttg	913
<210> 7	
<211> 901	
<212> DNA	
<213> Lycopersicon esculentum	
<400> 7	
atgggtgac cggtgattga agaaattgat gtcttgatg cacctttacc atattctgta	60
gagacgatgc ttgatagaat ctgcaaggag caggggcaaa aaccaccgtg tactggcatt	120
agaaggaggc tgagctctat tggtagaaaa gggtcattag aaatgctcaa aataatatca	180
cgctgctcta tcaagaagag tctctctgct tttcttgttt acatgattga tcgtaccgc	240
gattgtctct ctcttctctc tagcccttc aattgtctac tcaaacgctc ttcttccct	300
cgctctcttc catctccaga gggtaaactt ttacaagggt aaagtcttc taaatcaaag	360
cttgagatgg gcttattggc ctgtgcaagc cctcagaaag ttgctcgcca gttatcattt	420
tgcgaggagc ctgaatctaa ctgtagaaga acctccctt atgtcagcca acagttgatg	480
atcctcaatg aacttgaatt tagaaaattg tttctgttac tgagctacat tggatgcaac	540
aagttggaag atgttatatc cctcaaatt gctgatgata ttgtaagaaa gaaaaatctt	600
tccatgactg attttgaatc agaaatttgg aatgcttttg gaaaagcatg ttatgtctgt	660
tcagatagat caaagtactt agactggaat tgcagaaaga cacatatcta ctattgccac	720

attaagcaga acggatactg ttccttcaag ggtccatact tgaacacatt aaggactcac	780
ttacagagag ccctgggaga tgacaatgta ctgattgtaa aatttgttga agatacaagt	840
tgtgccaata taattctcga ggaaggcatt cttgttggct tgagacgtta ccgtttcttt	900
g	901
<210> 8	
<211> 901	
<212> DNA	
<213> Lycopersicon esculentum	
<400> 8	
atgggtgatc cgittgattga agaaattgat gttctggatg cacctttacc atattctgta	60
gagacgatgc ttgatagaat ctgcaaggag caggggcaaa aaccaccgtg tactggcatt	120
agaaggaggc tgagctctat tggtgaaaaa gggtcattag aaatgctcaa aataatatca	180
cgctgctcta tcaagaagag tctctctgct tttcttgttt acatgattga tcgctaccgc	240
gattgtctct cctcttcctc tagcccttc aattgtctac tcaaacgctc tttctccct	300
cgctcttttc catctccaga gggtaaacgt ttacaagggtg aaagtcttc taaatcaaag	360
cttgagatgg gcttattggc ctgtgcaagc cctcagaaag ttgctcgcca gttatcattt	420
tgcgaggagc ctgaatctaa ctgtagaaga acctccctt atgtcagcca acagttgatg	480
atcctcaatg aacttgaatt tagaaaattg tttctgggtac tgagctacat tggatgcaac	540
aagttggaag atgttatatc cctcaaatt gctgatgata ttgtaagaaa gaaaaatctt	600
tccatgactg attttgaatc agaaatttgg aatgcttttg gaaaagcatg ttatgctgtg	660
tcagatagat caaagtactt agactggaat tgcagaaaga cacatatcta ctattgccac	720
attaagcaga acggatactg ttccttcaag ggtccatact tgaacacatt aaggactcac	780
ttacagagag ccctgggaga tgacaatgta ctgattgtaa aatttgttga agatacaagt	840
tgtgccaata taattctcga ggaaggcatt cttgttggct tgagacgtta ccgtttcttt	900
g	901