(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월09일
(11) 등록번호 10-1936403
(24) 등록일자 2019년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2600/13 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0125064
(22) 출원일자 2017년09월27일
심사청구일자 2017년09월27일
(56) 선행기술조사문헌
J. Casals et al. Genet Resour Crop Evol (2012) Vol. 59 pp. 219-229.*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
심성철
서울특별시 강남구 테헤란로16길 27, B동 101호(역삼동)
(74) 대리인
두호특허법인

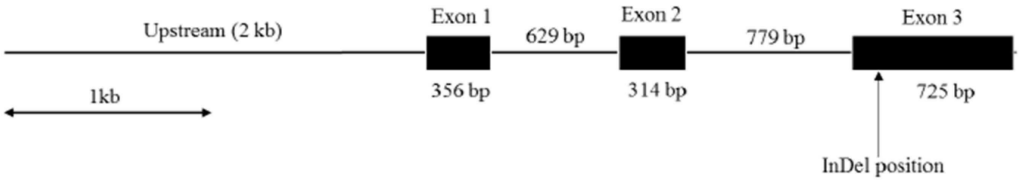
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **토마토 저장성 증진 품종 선별용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 토마토 *nor* 유전자의 엑손 3의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이를 포함하는 염기 서열을 증폭시키는 프라이머 세트를 포함하는 토마토 저장성 증진 품종 선별용 조성물에 관한 것으로, 저장성 증진을 나타내는 토마토 품종을 효율적으로 판별 및 육성할 수 있어 육종에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감하는데 매우 유용하고, 선별된 토마토 품종의 보급은 고품질의 신선한 토마토 생산 및 공급을 가능하게 한다.

대 표 도 - 도1



(56) 선행기술조사문헌
GenBank Accession No. AY573803.2
GenBank Accession No. KX598785.1
KR1020170086171 A
James J Giovannoni et al. Current Opinion in Plant Biology 2007 Vol.10 pp. 283-289
KR1020120104555 A
US20140137296 A1
Thim Thi Nguyen et al. HORTICULTURAL SCIENCE and TECHNOLOGY Vol. 35 No. 5 pp. 618-627
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01185703
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농생물게놈활용연구사업단
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 GWAS를 통한 유용유전자 대량 발굴 및 분자표지 개발
기 여 율 1/1
주관기관 세종대학교
연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 21의 유전자 내의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이를 포함하는 염기 서열을 증폭시키는 프라이머 세트를 포함하는 토마토 저장성 증진 품종 선별용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머를 포함하는, 조성물.

청구항 3

청구항 1 또는 2의 조성물을 포함하는 토마토 저장성 증진 품종 선별용 키트.

청구항 4

대상 토마토에서 서열번호 21의 유전자의 49번, 50번 위치의 2bp InDel을 확인하는 단계를 포함하는 토마토 저장성 증진 품종 선별 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 2bp의 결실이 확인된 토마토를 저장성 증진 품종으로 선별하는, 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 확인 방법은 HRM(High-Resolution Melting) 분석법을 사용하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 토마토 저장성 증진 품종 선별용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 토마토(*Solanum lycopersicum L.*)는 세계에서 가장 널리 소비되는 신선한 과채류 중 하나이다. 토마토는 풍부한 비타민, 무기질 및 항산화 물질을 가지고 있어 전 세계적으로 인체 영양에 크게 기여하고 있다. 토마토는 클라이맥터릭형(climacteric fruit)이고 부패하기 쉬우므로, 토마토는 수확 단계에서 품질에 영향을 미치는 많은 과정으로 인해 숙성 후 매우 짧은 수명을 갖는다. 숙성된 과일의 품질과 영양 가치는 수확 후 처리 및 저장 방법에 의해 크게 감소된다. 신선한 토마토는 45.32%까지 손실될 수 있다(Kasso and Bekele, 2016). 따라서 냉동, 열처리, 가스치환포장방식(modified atmosphere packaging, MAP), 1-methylcyclopropent(1-MCP) 및 $CaCl_2$(calcium chloride) 사용과 같이 과일 품질 및 저장 수명을 개선하기 위한 많은 전략이 개발되었다. 상기 방법들은 수확 후 손실을 제한하는 데 효과적이지만, 특히 소규모 농장의 경우 비용이 많이 들고 시간 소모적인 단점을 가진다. 그러나 숙성 돌연변이 유전자의 사용은 이러한 단점을 제거하고 토마토 육종 프로그램에서 효과적인 방법이다.

[0003] 품질 관련 형질 중 특히 저장성은 신선한 토마토 유통과 판매에 중요하다. 토마토에서 비정상적인 숙성 과정과 관련된 몇 가지 유전자들을 확인함으로써 토마토에서의 과일 숙성 분자 메커니즘이 연구되었다.

[0004] 숙성-저해인자(*ripening-inhibitor; rin*), 비-숙성(*non-ripening; nor*), 무색 비-숙성(*Colorless non-ripening; Cnr*), *Green-ripe*(*Gr*), *Never-ripe*(*Nr*), 및 *alcobaca*(*alc*)를 포함한 몇 가지 토마토 숙성 유전자들이 보고되었다. 이 유전자들은 과일 숙성 과정에서 독립적으로 그리고 협력적으로 관련되어 있다. 예를 들어, *rin* 돌연변이는 부분적으로 결실된 MADS-box 단백질(성숙-특이적 전사인자)을 생성하며, 과일 숙성 과정을 효과

적으로 차단하여 결과적으로 녹색 과실이 된다(Vrebalov et al., 2002). *rin* 유전자(*rin*/*Rin*)의 이형접합 돌연변이는 느린 숙성과 긴 저장 수명을 가진 토마토를 생산하는 데 종종 사용된다(Giovannoni, 2007). 유사하게, NAC 전사인자를 암호화하는 *nor* 유전자의 돌연변이는 정상적인 숙성 과정을 개시하지 못하고 과일에서 비-연화(non-softening)를 일으킨다(Giovannoni, 2004; Lincoln and Fischer, 1988). *nor* 유전자는 이형접합 형태(*nor*/*Nor*)에서도 토마토 과일의 저장 수명을 향상시키는데 사용될 수 있다. NAC 전사인자군은 스트레스 반응, 개화 및 노화를 포함하여 발달 중에 다양한 생리학적 과정에서 중요하다(Martel et al., 2011). *nor* 돌연변이는 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)에 대한 토마토의 내성과 같이 생물학적 스트레스에 대한 방어 기작과 관련된 여러 유전자의 발현을 상향 조절하여 질병 저항성을 향상시킨다(Cantu et al., 2009).

[0005] 표현형 기반의 기존 육종방법은 우수한 품종을 육성하는데 시간과 비용이 많이 소요되어, 관심 형질과 관련된 분자 마커의 사용은 육종 프로그램에서 새로운 유통 품종을 개발하는 데 비용 효율적이고 정확한 선택이 되는 경우가 많다. 최근 차세대 시퀀싱 기술의 발전으로 인해 단일 염기 다형성(SNP) 및 삽입 및 결실(InDel)과 같은 게놈-차원의 분자 마커와의 연관 매핑이 용이해졌다. 그러한 노력으로 주요 유전자 및 양적 형질 유전자좌(QTL)와 관련된 여러 마커가 발견되었다. 그러나 이러한 마커는 연관비평형(linkage disequilibrium, LD) 붕괴로 인해 개체군을 육종하는 데 항상 효과적인 것은 아니다.

[0006] 토마토 내병성 육종의 경우, 다수 병에 대한 저항성 유전자를 선발하기 위한 분자마커들이 개발되어 유전자표식에 의한 선발(Marker Assisted Selection; MAS) 등을 통한 신품종 육성에 활용되고 있다. 하지만, 토마토 품질, 특히 저장성에 대한 분자 마커 개발 연구는 상대적으로 적게 수행되어져, 육종에 분자 마커의 활용이 높지 않다.

[0007] 최근에, *rin* 돌연변이에 대한 서열 특정된 증폭부위(SCAR) 마커가 개발되었다(Kim et al., 2013). 그러나 *nor* 돌연변이에 대한 분자 마커를 개발하기 위해 이전에 수행된 연구는 거의 없었으며, 이는 *rin* 유전자와 비교하여 저장성 증진에 더 효과적이다(Ng, 1976).

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1755231호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Kasso M, Bekele A (2016) Post-harvest loss and quality deterioration of horticultural crops in Dire Dawa Region, Ethiopia. J Saudi Soc Agric Sci 2016.

(비특허문헌 0002) Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J (2002) A MADS-Box gene necessary for fruit ripening at the tomato Ripening-Inhibitor (Rin) locus. Science 296: 343-346.

(비특허문헌 0003) Giovannoni JJ (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. Curr Opin Plant Biol 10: 283-289.

(비특허문헌 0004) Giovannoni JJ (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. Plant Cell 16 S170-180.

(비특허문헌 0005) Lincoln JE, Fischer RL (1988) Regulation of gene expression by ethylene in wild-type and rin tomato (Lycopersicon esculentum) fruit. Plant Physiol 88: 370-374.

(비특허문헌 0006) Martel C, Vrebalov J, Tafelmeyer P, Giovannoni JJ (2011) The tomato MADS-box transcription factor Ripening Inhibitor interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a Colorless Nonripening-dependent manner. Plant Physiol 157: 1568-1579.

(비특허문헌 0007) Cantu D, Blanco-Ulate B, Yang L, Labavitch JM, Bennett AB, Powell AL (2009) Ripening-regulated susceptibility of tomato fruit to Botrytis cinerea requires NOR but not RIN or ethylene. Plant Physiol 150: 1434-1449.

(비특허문헌 0008) Kim HJ, Lee HR, Hyun JY, Hong DO, Won DC, Harn CH (2013) A SCAR marker linked to Ripening Inhibitor in tomato. Korean J Breed Sci 45: 104-108.

(비특허문헌 0009) Ng TJ (1976) Genetic and physiological characterization of the rin and nor non-ripening mutants af tomato (Lycopersicon esculentum, Mill.). Purdue University.

(비특허문헌 0010) Giovannoni JJ, Noensie EN, Ruezinsky DM, Lu X, Tracy SL, Ganal MW, Martin GB, Pillen K, Alpert K, et al. (1995) Molecular genetic analysis of the ripening-inhibitor and non-ripening loci of tomato. Mol Gen Genet 248: 195-206.

(비특허문헌 0011) Hileman LC, Sundstrom JF, Litt A, Chen M, Shumba T, Irish VF (2006) Molecular and phylogenetic analyses of the MADS-box gene family in tomato. Mol Biol Evol 23: 2245-2258.

(비특허문헌 0012) Manning K, Tor M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB (2006) A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. Nat Genet 38: 948-952.

(비특허문헌 0013) Tigchelaar EC, Tomes ML, Kerr EA, Barman RJ (1973) A new fruit ripening mutant, non-ripening (nor). Rep Tomato Genet Coop 23: 33.

(비특허문헌 0014) Vicente AR, Saladie M, Rose JKC, Labavitch JM (2007) The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. J Sci Food Agric 87: 1435-1448.

(비특허문헌 0015) Seymour GB, Chapman NH, Chew BL, Rose JK (2013) Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. Plant Biotechnol J 11: 269-278.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 *nor* 유전자의 염기서열 분석을 통해 저장성을 연장시킬 수 있는 품종을 선별할 수 있는 토마토 저장성 증진 품종 선별용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 *nor* 유전자의 염기서열 분석을 통해 저장성을 연장시킬 수 있는 품종을 선별할 수 있는 토마토 저장성 증진 품종 선별용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 토마토 저장성 증진 품종을 선별하기 위한 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 1. 토마토 *nor* 유전자의 엑손 3의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이를 포함하는 염기 서열을 증폭시키는 프라이머 세트를 포함하는 토마토 저장성 증진 품종 선별용 조성물.

[0014] 2. 위 1에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머를 포함하는, 조성물.

[0015] 3. 위 1 또는 2의 조성물을 포함하는 토마토 저장성 증진 품종 선별용 키트.

[0016] 4. 대상 토마토에서 *nor* 유전자의 엑손 3의 염기 서열에서 49번, 50번 위치의 2bp InDel을 확인하는 단계를 포함하는 토마토 저장성 증진 품종 선별 방법.

[0017] 5. 위 4에 있어서, 상기 2bp의 결실이 확인된 토마토를 저장성 증진 품종으로 선별하는, 방법.

[0018] 6. 위 4에 있어서, 상기 확인 방법은 HRM(High-Resolution Melting) 분석법을 사용하는, 방법.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 조성물은 저장성 증진을 나타내는 토마토 품종을 효율적으로 판별 및 육성할 수 있어 육종에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감하는데 매우 유용하다.

[0020] 본 발명의 조성물로 선별된 토마토 품종의 보급은 고품질의 신선한 토마토 생산 및 공급을 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 3개의 엑손과 2개의 인트론이 있는 *nor* 유전자의 서열을 나타낸 것이다.

도 2는 야생형(Heinz 1706, San Marzano) 및 돌연변이체(LA1793, LA3013)간 *nor* 유전자 내 엑손 3의 염기서열 변이를 나타낸 것이다.

도 3은 야생형(Heinz 1706, San Marzano) 및 돌연변이체(LA1793, LA3013)간 *nor* 유전자 내 엑손 3의 아미노산 서열 변화를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명은 토마토 *nor* 유전자의 엑손 3의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이를 포함하는 염기 서열을 증폭시키는 프라이머 세트를 포함하는 토마토 저장성 증진 품종 선별용 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명은 토마토 품종별로 *nor* 유전자의 엑손 3에 유전자 차이(SNP 또는 2bp InDel, 엑손 3의 49번, 50번 위치)가 존재하고, 다른 품종에 비해 *nor* 유전자의 엑손 3에 2bp 결실이 있는 종이 저장성이 증진된 품종임을 발견한 것에 착안한 것으로서, *nor* 유전자의 엑손 3의 유전적 변이가 토마토 저장성 증진에 영향을 미치는 인자인바, 본 발명의 토마토 저장성 증진 품종 선별용 조성물은 토마토 *nor* 유전자의 엑손 3의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이를 포함하는 염기 서열을 증폭시키는 프라이머 세트를 포함한다.

[0026] 상기 엑손 3의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이를 포함하는 염기 서열은 엑손 3의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이(도 2의 경우를 예시하면, aa)를 포함하는 염기 서열로서, 엑손 3의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이만을 포함할 수도 있고, 엑손 3에서 해당 서열 외에 해당 서열에서 앞 및/또는 뒤의 서열을 더 포함하는 서열일 수도 있고, 엑손 3 외에 그 앞 및/또는 뒤의 인트론 서열을 더 포함할 수도 있고, 다른 엑손 서열을 더 포함할 수도 있다. 그 길이는 예를 들면, 2bp 내지 2kbp 내에서 적절하게 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 상기 프라이머 세트는 *nor* 유전자의 엑손 3의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이를 포함하는 서열을 증폭시킬 수 있는 것이라면 그 서열 및 길이는 제한되지 않고 적절하게 설계/선택될 수 있다. 예를 들면 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머를 포함할 수 있다. 상기 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머를 포함하는 프라이머 세트는 엑손 3의 전체 길이 725bp 중 2bp InDel(엑손 3의 49번, 50번 위치)을 포함하는 269bp 영역만을 증폭시킨다. 또는 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머를 포함할 수도 있다. 상기 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머는 엑손 3의 전체길이 725bp와 일부 인트론을 포함하는 993bp를 증폭시킨다.

[0028] 본 발명에 따른 프라이머 세트를 이용하여 토마토 *nor* 유전자의 엑손 3의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이를 포함하는 염기 서열을 증폭시킬 수 있고, 2bp 유전적 변이를 확인함으로써 그 품종이 저장성이 우수한 품종인지 그렇지 않은지를 확인할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는, 토마토 저장성 증진 품종을 선별하기 위한 키트를 제공한다.

[0031] 본 발명의 키트는 전술한 프라이머 세트를 포함하고, 그 외에도 당 분야에 공지된 역전사효소, 중합효소, 중합효소연쇄반응을 위한 cDNA 템플릿 (template), 및 버퍼 등의 반응 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 대상 토마토에서 *nor* 유전자의 엑손 3의 염기 서열에서 49번, 50번 위치의 2bp InDel을 확인하는 단계를 포함하는 토마토 저장성 증진 품종 선별 방법을 제공한다.

[0034] 전술한 바와 같이, 토마토에서 *nor* 유전자 엑손 3의 2bp 유전적 변이가 토마토 저장성에 영향을 미치는 것인바, 본 발명의 토마토 저장성 증진 품종 선별 방법은 대상 토마토에서 *nor* 유전자의 엑손 3의 유전적 변이를 확인함으로써, 대상 토마토가 저장성이 우수한 품종인지를 선별할 수 있다.

[0035] *nor* 유전자의 엑손 3의 염기 서열에서 49번 및 50번 자리의 2bp InDel을 확인하는 방법으로는 당 분야에 공지된 방법이 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면 엑손 3의 염기 서열을 정렬하여 확인할 수도 있고, 엑손 3의 염기 서열 길이를 봄으로써 확인할 수도 있고, 엑손 3의 염기 서열에서 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이를 포함하는 서열을 증폭시켜 해당 서열을 정렬하거나, 길이를 비교함으로써 확인할 수도 있고, 엑손 3 유전자의 번역

물인 아미노산의 서열을 정렬하여 확인할 수도 있고, HRM(High Resolution Melting) 분석법으로 확인할 수도 있다.

[0036] HRM 분석법을 사용하는 경우를 구체적으로 예시하자면, 대상 토마토의 *nor* 유전자의 엑손 3의 융해 곡선(melting curve)를 얻고, 2bp InDel에 따라 융해 곡선이 달라지므로 이를 확인함으로써 2bp InDel을 확인할 수 있다.

[0037] HRM 분석은 HRM curve 분석이라고도 하며, 1개의 염기서열 차이도 판별할 수 있도록 0.1 ~ 0.5℃ 단위로 정밀하게 융해 곡선을 분석하는 방식으로, 상기 InDel의 정확한 확인이 가능하며, 간편하고 빠른 시간 내에 확인이 가능하다.

[0038] 본 발명의 방법에 따라 대상 토마토의 *nor* 유전자의 엑손 3의 2bp InDel을 확인하여, 2bp 결실이 확인된 경우에 대상 토마토를 저장성 증진 품종으로 선별할 수 있다.

[0039] 필요에 따라, 본 발명의 방법은 대상 토마토에서 게놈 DNA를 분리하고, 전술한 프라이머를 이용하여 *nor* 유전자의 엑손 3의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이를 포함하는 염기 서열을 증폭시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0040] 게놈 DNA의 분리 및 상기 엑손 3의 49번, 50번 위치의 염기 서열 변이를 포함하는 염기 서열 증폭은 당 분야에 공지된 실험 방법, 조건에 따라 행해질 수 있고, 이는 특별히 제한되지 않는다.

[0042] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0044] <u>실시예</u>

[0046] **재료 및 방법**

[0047] **식물 재료**

[0048] 'San Marzano'(야생형 대립유전자, *Nor/Nor*), 'LA1793'과 'LA3013'(돌연변이 대립유전자, *nor/nor*)의 3가지 토마토 유전자원을 미국 캘리포니아 주립대학교의 토마토 유전 자원 센터(http://tgrc.ucdavis.edu)에서 분양 받아 사용하였다. 또한, 유전자 염기서열 변이를 검증하기 위해 81개의 품종(고정종 30개, F_1 잡종 51개)을 사용하였다. 상기 고정종은 국립농업유전자원센터(품종 20개), 농촌진흥청 국립원예특작과학원(품종 10개)에서 분양받았다. 상기 F_1 잡종은 부농종묘(품종 10개), 몬산토코리아(품종 8개), 농우바이오(품종 6개), 신젠타코리아(품종 5개), 한국다끼이, PPS(품종 3개), 진흥종묘, NH-농협, 코레곤, 아시아종묘, 고농(각각 품종 2개); 스카이종묘, 사카타코리아, 팜한농, 흥농원, 동원농산종묘, 현대종묘, 가나종묘에서 나머지를 분양 받았다.

[0050] **DNA 추출**

[0051] CTAB(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)를 사용하여 유묘기의 어린 잎에서 게놈 DNA를 분리하였다. 어린 잎 조직을 350μL DNA 추출-용해 버퍼를 포함하는 2.0mL 마이크로원심분리튜브에 넣고 TissueLyser Ⅱ(QIAGEN, Valencia, CA, USA)로 분당 300회 5분 동안 분쇄하였다. 65℃, 20분 동안 배양한 후, 상기 튜브에 클로로포름: 이소아밀(24:1) 350μL를 첨가하고 5,000g에서 10분 동안 원심분리하였다. 상등액을 분리하고 200μL 차가운 이소프로판올과 혼합한 후 4℃, 1시간 동안 안정화시키고 5,000g에서 15분 동안 원심분리하였다. DNA 펠렛은 70% 에탄올을 사용하여 2번 헹구고 실온에서 건조한 후 100mL TE 버퍼(10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA)에서 재현탁시켰다. DNA의 양과 질은 아가로스 겔 전기영동법을 사용하여 측정되었고 PCR 증폭과 고해상도 융해(HRM) 분석을 위해 50ng/μL로 희석되었다.

[0053] ***nor* 유전자 염기서열 분석 및 다형성 검출**

[0054] *nor* 유전자(SGN Gene ID: Solyc10g006880)의 전체 염기서열은 토마토 표준유전체 v2.50(Tomato Genome Consortium, 2012); https://www.solgenomics.net/)에서 검색하였다. 프라이머 세트는 Primer3Plus version 2.4.0(Untergasser et al., Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 40: e115, 2012)를 사용하여 상류 영역(개시코돈으로부터 2kb 부근) 뿐만 아니라 모든 엑손과 인트론을 증폭하도록 고안되었다. PCR 증폭은 50-100ng 게놈 DNA, 0.25μM 각 프라이머, 0.2mM dNTPs, 1X PCR 버퍼, 0.5U DNA Taq 폴리머라제(Geneslabs, Seongnam, Korea)를 포함하여 총 반응부피 50μL로 수행하였다. pre-denaturation은 94℃에서 3분, denaturation은 94℃에서 30초, annealing 온도에서 30초(annealing 온도는 프라이머의 융해 온도에 따라 50℃ 내지 60℃였다), extension은 72℃에서 45초간 수행하였다. 총 cycle 수는 40회였다. Final extension은 72℃에서 7분간 1회 수행하였다.

[0055] 각 프라이머의 PCR 증폭 산물은 1X TBE에서 200V 1시간 동안 1X RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution(20,000 X) (JH Science, Lynnwood, WA, USA)을 포함하는 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동을 하여 확인하였고 MinElute® Gel Extraction Kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 정제하였다. 생어 시퀀싱(Sanger sequencing) (Cosmogenetech, Seoul, Korea)을 통해 염기서열을 확인하였다. DNA 서열은 Staden Package software(Bonfield et al., A new DNA sequence assembly program. Nucleic Acids Res 23: 4992-4999., 1995) 및 Clustal Omega tool (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)를 사용하여 정렬하였다. 돌연변이체(LA1793 and LA3013)와 야생형(San Marzano) 사이의 염기서열 변이는 육안 검사를 통해 확인하였다.

[0057] **유전자원 수집(germplasm collection)의 HRM 분석**

[0058] HRM 분석용 프라이머는 Primer3Plus 버전 2.4.0을 사용하여 100bp ~ 300bp 사이의 예상 산물 크기를 생성하도록 설계되었다. 프라이머 서열은 SOL 게놈 네트워크(https://solgenomics.net/tools/in_silico_pcr)에서 In Silico PCR을 사용하여 가능한 모든 비특이적인 산물을 검출하여 PCR 증폭 효율 및 HRM 정확도를 보장함으로써 분석되었다. HRM 분석은 LightCyler96 Real-Time PCR System(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)을 사용하여 총부피 20μL에서 수행되었다. 반응 혼합물은 50ng 게놈 DNA, 0.25μM 정방향 및 역방향 프라이머 및 LightCycler® 480 HRM Master Mix 1X(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)를 포함했다.

[0059] pre-denaturation은 95℃에서 10분, denaturation은 95℃에서 10초, annealing은 55℃에서 15초, 72℃에서 15초간 수행하였다. 총 cycle 수는 45회였다. denaturation은 95℃에서 15초, 50℃ 10초, 50℃에서 50초, 97℃에서 1초, HRM은 2.2℃/s 단위로 50℃에서 97℃까지 상승시키면서 변성시켰다.

[0061] *nor* 유전자를 증폭시키기 위해 사용된 8개의 프라이머 세트

표 1

[0062]

Region	Primer name	Primer sequence (5' -3')[z] (서열번호)	Tm[y] (℃)	PCR product size (bp)
2.0kb upstream sequence	*nor*-1	F: ACGTATCGCGAGGATTCATC (서열번호 5) R: CGTTATTAGGCTTTGAGAAGGAC (서열번호 6)	57 57	741
	nor-2	F: GCTAATGACGACCTCCACTTC (서열번호 7) R: TTGTGTGGACATACTTTGATCG (서열번호 8)	59 59	810
	nor-3	F: ACCACAAGAATCTCAAGACATG (서열번호 9) R: CGTAGTACGAGGTTGATAAATTCG (서열번호 10)	56 57	780
2.8 kb open reading frame sequence	*nor*-4	F: GTTTATCATTTTCTCTCTTCCC (서열번호 11) R: AATTAGCAACGAAATTCGTC (서열번호 12)	54 55	482
	nor-5	F: CAGCGATGAACAATTATTGTGTC (서열번호 13) R: AGGATATTTTCTATCTCTTGGAC (서열번호 14)	55 53	621
	nor-6	F: CTTCTTATCATGTGTTTAACGC (서열번호 15) R: CCTCATATTAACCACGCGTA (서열번호 16)	55 56	666
	nor-7	F: TACGAAATAGCCGAAAGAGGT (서열번호 17) R: TCGATCCCAACATATCATGCA (서열번호 18)	58 62	718
	nor-8	F: TTTGCAGCTAGATGATTGGG (서열번호 19) R: ATCGATTGATTTTACAGGGCTA (서열번호 20)	59 58	620

[0063] [z]F: 정방향 프라이머, [z]R: 역방향 프라이머

[0064] [y]Tm : 융해 온도

[0066] 고해상도 융해(HRM) 분석을 통해 *nor* 유전자에 대한 83개 토마토 품종의 유전자형 분석

표 2

[0067]

No.	Variety	Class	Source[z]	*nor* genotype[y]
1	LA1793	Inbred	TGRC	*nor*/*nor*

2	San Marzano	Inbred	TGRC	*Nor/Nor*
3	Cast mart	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
4	L385Dwart	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
5	KA608-79L10743-1	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
6	Serersanum	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
7	Coloumbia	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
8	Lucky Tm	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
9	Leningradski	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
10	Rougede Marmade	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
11	Jubi	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
12	L251	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
13	C125F2	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
14	Daehyungboksu	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
15	Heungjin 101	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
16	Heungjin 10	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
17	84-4-428-2-1-1	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
18	82-4-124-1-1-1-1	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
19	82-4-65-1-1-1-1	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
20	79-4-1-1-3-1-1	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
21	77-4-25-1-2-1-1	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
22	75-4-22-1-1-1-1	Inbred	NAC	*Nor/Nor*
23	14KT-6-5	Inbred	NIHHS	*Nor/Nor*
24	14KT-7-6	Inbred	NIHHS	*Nor/Nor*
25	14KT-8-1	Inbred	NIHHS	*Nor/Nor*
26	14KT-II-7	Inbred	NIHHS	*Nor/Nor*
27	AVT01458	Inbred	NIHHS	*Nor/Nor*
28	14KT-5-24	Inbred	NIHHS	*nor/nor*
29	14KT-6-10	Inbred	NIHHS	*nor/nor*
30	14KT-9-4	Inbred	NIHHS	*Nor/Nor*
31	14KT-9-20	Inbred	NIHHS	*Nor/Nor*
32	15TGl12	Inbred	NIHHS	*Nor/Nor*
33	Seowang	F_1 hybrid	Monsanto-Korea	*Nor/Nor*
34	SV0244TG	F_1 hybrid	Monsanto-Korea	*Nor/Nor*
35	Bacchus	F_1 hybrid	Monsanto-Korea	*Nor/Nor*
36	Styx TY	F_1 hybrid	Monsanto-Korea	*Nor/Nor*
37	Rafito	F_1 hybrid	Monsanto-Korea	*Nor/Nor*
38	Olleh TY	F_1 hybrid	Monsanto-Korea	*Nor/Nor*
39	Poseidon	F_1 hybrid	Monsanto-Korea	*Nor/Nor*
40	Shincheonggang	F_1 hybrid	Monsanto-Korea	*Nor/Nor*
41	Unicorn	F_1 hybrid	Monsanto-Korea	*Nor/Nor*
42	Masecala	F_1 hybrid	Bunong Seed	*Nor/Nor*
43	TY Escot	F_1 hybrid	Bunong Seed	*Nor/Nor*
44	Black Eagle	F_1 hybrid	Bunong Seed	*Nor/Nor*
45	All Keeper	F_1 hybrid	Bunong Seed	*Nor/Nor*
46	Kstar	F_1 hybrid	Bunong Seed	*Nor/Nor*
47	Gold Sugar	F_1 hybrid	Bunong Seed	*Nor/Nor*
48	Vitamini	F_1 hybrid	Bunong Seed	*Nor/Nor*
49	TY Candy	F_1 hybrid	Bunong Seed	*Nor/Nor*
50	Nice Gold	F_1 hybrid	Bunong Seed	*Nor/Nor*
51	TY Endorphin	F_1 hybrid	Bunong Seed	*Nor/Nor*

52	TY Altorang	F_1 hybrid	Nongwoo Bio	*Nor/Nor*
53	Sun globe	F_1 hybrid	Nongwoo Bio	*Nor/Nor*
54	TY Sense Q	F_1 hybrid	Nongwoo Bio	*Nor/Nor*
55	Mini maru	F_1 hybrid	Nongwoo Bio	*Nor/Nor*
56	Red Pang	F_1 hybrid	Nongwoo Bio	*Nor/Nor*
57	13T510	F_1 hybrid	Nongwoo Bio	*Nor/Nor*
58	Madison	F_1 hybrid	Syngenta-Korea	*Nor/Nor*
59	Dafnis	F_1 hybrid	Syngenta-Korea	*Nor/Nor*
60	Gayachal Plus	F_1 hybrid	Syngenta-Korea	*nor/Nor*
61	TP-7 Plus	F_1 hybrid	Syngenta-Korea	*Nor/Nor*
62	Landolino	F_1 hybrid	Syngenta-Korea	*Nor/Nor*
63	Dotaerang Dia	F_1 hybrid	Takki-Korea	*Nor/Nor*
64	Dotaerang Master	F_1 hybrid	Takki-Korea	*Nor/Nor*
65	TY Smartsama	F_1 hybrid	Takki-Korea	*Nor/Nor*
66	Prime Alexander	F_1 hybrid	PPS	*Nor/Nor*
67	Beta Tiny	F_1 hybrid	PPS	*Nor/Nor*
68	Tiara	F_1 hybrid	PPS	*Nor/Nor*
69	Sweety Redggoma	F_1 hybrid	Jinheung Seed	*Nor/Nor*
70	Blackrich	F_1 hybrid	Jinheung Seed	*Nor/Nor*
71	Super Ace	F_1 hybrid	NH-Nonghyup	*Nor/Nor*
72	Ruby Ball	F_1 hybrid	NH-Nonghyup	*Nor/Nor*
73	Super Dotaerang	F_1 hybrid	Koregon	*Nor/Nor*
74	B blocking	F_1 hybrid	Koregon	*Nor/Nor*
75	Sugar Red	F_1 hybrid	Asian Seed	*Nor/Nor*
76	Sugar Yellow	F_1 hybrid	Asian Seed	*Nor/Nor*
77	Yoyo captain	F_1 hybrid	Konong	*Nor/Nor*
78	Yoyo	F_1 hybrid	Konong	*Nor/Nor*
79	TY Miracle	F_1 hybrid	Sky Seed	*Nor/Nor*
80	Rokusanmaru	F_1 hybrid	Sakata-Korea	*Nor/Nor*
81	Venus	F_1 hybrid	Dongwon Nongsan	*Nor/Nor*
82	Honggwang	F_1 hybrid	Hyeondae seed	*Nor/Nor*
83	Jicored	F_1 hybrid	Gana Seed	*Nor/Nor*

[0069] 고정종과 F_1 잡종은 토마토 유전 자원 센터(TGRC), 국립농업유전자원센터(NAC), 국립원예특작과학원(NIHHS) 및 종묘 회사에서 분양 받았다.

[0070] *Nor*은 *non-ripening(nor)* 유전자에 대한 야생형 대립유전자이고, *nor*은 돌연변이 대립유전자이다.

[0072] **결과**

[0073] ***nor* 유전자의 서열 변화 발견**

[0074] 토마토에서 자발적 돌연변이에 기인한 *nor* 유전자는 10번 염색체의 짧은 팔에 국한되어 있다(Giovannoni et al., 1995). 이 유전자는 3개의 엑손(356, 314 및 725bp)과 2개의 인트론(629 및 779 bp)으로 구성된 번역개시 위치(ORF)를 가지고 있다(도 1). 8개의 프라이머 세트는 2개의 돌연변이체(LA1793 및 LA3013) 및 야생형(San Marzano)에서 *Nor* 유전자의 상류 영역 및 ORF 영역에 대해 482 내지 810bp 범위의 PCR 증폭물을 생성하였다. 이들 증폭 산물로부터 4.8kb의 염기 서열(2.0kb 상류 영역 및 2.8kb ORF)이 생성되어 단일 염기 다형성(SNP) 및/또는 삽입 및 결실(InDel)을 동정하였다. *nor* 유전자 중 가장 긴 엑손인 엑손 3 내 2bp의 InDel(AA/--)를 검출했다(도 2). 이 InDel은 183번째 아미노산인 글루타민(Q) 이후의 폴리펩티드 서열의 변화를 가져오는 틀이동(frameshift)를 일으킨다(도 3). 그것은 *nor* 유전자에서 과일 숙성과 관련된 서열 변이일 뿐이다. 또한, *rin* 돌

연변이는 SEPELATTA clade의 MADS-box 유전자에서 틀이동(frameshift)으로부터 유래된다(Hileman et al., 2006). 그러나 *Cnr* 유전자의 경우 돌연변이 표현형은 SBP-box(SQUAMODA promoter binding protein-like) 프로모터의 자발적인 후성적 변화 때문이다(Manning et al., 2006). 틀이동돌연변이(frameshift mutation)는 식물 종의 후성적 돌연변이에 비해 보다 일반적으로 발견되었다(Manning et al., 2006). 과일 숙성을 조절하는 *nor* 유전자의 분자 메커니즘은 토마토의 *rin* 및 *Cnr* 유전자와 비교하여 이전에 수행된 연구는 거의 없었다. 본 발명에서 확인된 InDel은 숙성 과정에서의 *nor* 유전자 기능을 밝히고 MAS(Marker Assisted Selection)을 통한 토마토 육종을 용이하게 하는데 유용할 수 있다.

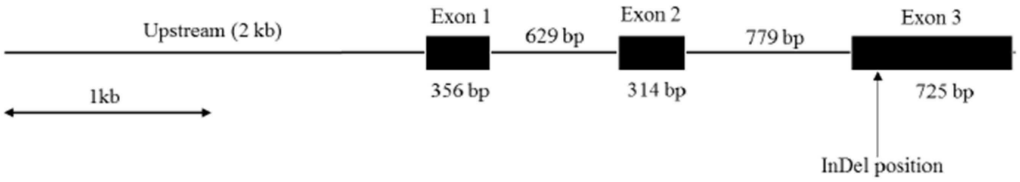
[0076] **유전자원 수집(germplasm collection)에서의 유전자-기반 마커 개발 및 유전형질분석(genotyping)**

[0077] 엑손 3의 InDel에 기초하여, *nor*-InDel 마커에 대한 프라이머 세트(정방향: 5'TGCAGCTAGATGATTGGGTTT3', 역방향: 5'ACCTCCATGCATCGTTCTCT3')가 HRM 분석을 위해 설계되었다. 이 프라이머 세트는 어닐링 온도 55℃에서 269bp의 증폭산물을 생산했으며 'LA1793'과 'San Marzano'를 포함한 83개의 토마토 품종을 유전자형으로 분류하는데 사용되었다. InDel 마커는 돌연변이 대립유전자(*nor*)를 야생형 대립유전자(*Nor*)와 명확히 구분했다(표 2). 이 품종 중 농촌진흥청(RDA)의 국립원예특작과학원(National Institute of Horticultural & Herbal Science, NIHHS)에서 입수한 '14KT-5-24'와 '14KT-6-10'의 두 가지 고정종에서 *nor*의 동형접합체가 발견되었다. F_1 잡종 51종 중에서, 신젠타코리아의 'Gayachal Plus'는 이형접합 돌연변이(*nor*/*Nor*)를 보였다(표 2). '14KT-5-24'품종은 황색 토마토를 생산하는 반면, '14KT-6-10'품종과 'Gayachal Plus'품종은 분홍색 토마토를 생산한다. 동형접합 *nor* 돌연변이체에서 녹색 또는 황색을 띄는 비정상적인 성숙 과일이 일반적이기 때문에(Tigchelaar et al., 1973), '14KT-6-10'품종이 *nor*/*nor* 유전자형을 갖는 것은 예상하지 못했다. '14KT-6-10'품종은 분홍색 토마토를 생산하지만, 정상 숙성 토마토를 생산한 야생 품종에 비해 근교배한 '14KT-5-24'와 같이 훨씬 더 견고성을 보여준다. 과일의 견고성은 저장 기간 및 수확 후 과일 품질에 영향을 미치는 주요 인자이다. 이것은 주로 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 펙틴 및 리그닌에 의해 강화된다(Vicente et al., 2007). 두 가지 셀룰로오스 합성효소는 야생형에 비하여 *nor* 돌연변이체가 더 많으며 *nor* 돌연변이가 과일의 견고성을 향상시키는 데 긍정적인 영향을 미친다는 것을 나타낸다(Seymour et al., 2013). *nor*의 이형접합 형태를 가진 토마토 품종은 정상적인 과일 색을 회복하지만 열매 견고성은 향상시킨다. 따라서 이형접합 유전자형은 선정된 재배종의 과일 품질과 저장 수명을 향상시키는데 유리하다. 본 발명은 과일 견고성에 대한 *nor* 돌연변이의 효과를 지지하며 *nor*-InDel 마커가 *nor* 돌연변이를 검출하는데 효과적임을 입증한다. 토마토 업계의 주요 과제 중 하나는 고품질의 신선한 과일(예: 바람직한 맛, 질감 및 색상)을 제공하는 것이다. 과일 숙성은 색상, 카로티노이드 생합성, 당 함량, 견고성 및 병원체 내성에서 다양한 생리학적 및 생화학적 변화를 포함한 복잡한 과정이다. 따라서 숙성 공정의 조절은 토마토의 과일 품질 향상을 위한 핵심 요소이다. 숙성 공정의 유전자 분석을 위한 많은 노력이 있어 왔으며 수많은 숙성 유전자가 확인되었다. 이 유전자들 중 *rin*과 *nor* 유전자에는 자발적인 틀이동돌연변이(frameshift mutation)가 일어나 과일 숙성 과정에서 유사한 표현형을 나타낸다. 그들의 돌연변이 대립유전자의 이형접합 형태는 정상적인 색을 회복하고 야생형 대립유전자의 동형접합 형태에 비해 과일에서 더 높은 견고성을 제공한다. 이러한 이점을 이용하여 육종 프로그램에서 선정된 토마토 재배종을 개발하기 위해 이러한 돌연변이를 사용했다. 본 발명에서 사용된 81개의 품종 중 오직 2종의 고정종과 1종의 F_1 잡종만이 동형접합체 또는 이형접합체 형태의 *nor* 돌연변이를 가져 이 돌연변이가 토마토 육종 프로그램에서 널리 사용되지 않는다는 것을 암시한다. 그것은 유통 품종(elite breeding lines)으로의 이 돌연변이의 유전자 이입을 촉진시키는 효율적인 분자 도구가 없기 때문일 수 있다.

[0078] 표현형에 근거한 선택은 종종 환경 변화를 제거하기 위해 집중적인 현장 평가가 필요하다. 유리한 대립유전자를 가진 육종 계통이 환경 변수에 중립적인 유전자형에 따라 선택되기 때문에 MAS(Marker Assisted Selection)은 식물 육종을 가속화시키는 효과적인 접근 방법이다. 숙성 과정에서 *rin*의 분자 메커니즘은 *nor*에 비해 더 많은 연구가 수행되었다. *rin* 돌연변이와 관련된 SCAR 마커도 MAS를 위해 개발되었다. 현재 연구에서, 틀이동돌연변이(frameshift mutation)를 일으키는 InDel이 *nor* 유전자에서 검출되어 MAS에 적용할 수 있는 유전자-기반 마커를 개발하는 데 사용되었다. 이 마커를 사용하여 우리는 30개의 고정종과 51개의 F_1 잡종을 포함하는 81개 품종에서 *nor* 유전자형을 결정했다. 우리의 결과는 토마토 연구 공동체, 특히 토마토의 수명과 품질을 개선하기 위해 MAS를 활용함으로써 육종가에게 도움이 된다.

도면

도면1



도면2

```
Heinz1706     tcttactccacactattttattttatttttttgcagctagatgattgggttttatgtcga
San Marzano   tcttactccacactattttattttatttttttgcagctagatgattgggttttatgtcga
LA1793        tcttactccacactattttattttatttttttgcagctagatgattgggttttatgtcga
LA3013        tcttactccacactattttattttatttttttgcagctagatgattgggttttatgtcga
              ************************************************************

Heinz1706     atttacaagaagaataacacacaaaggtccatagatgatttgcatgatatgttgggatcg
San Marzano   atttacaagaagaataacacacaaaggtccatagatgatttgcatgatatgttgggatcg
LA1793        atttacaagaagaataacacaca--ggtccatagatgatttgcatgatatgttgggatcg
LA3013        atttacaagaagaataacacaca--ggtccatagatgatttgcatgatatgttgggatcg
              ***********************  **********************************

Heinz1706     ataccacaaaatgtaccaaattcaatattacaaggaataaagccttcaaactatggtaca
San Marzano   ataccacaaaatgtaccaaattcaatattacaaggaataaagccttcaaactatggtaca
LA1793        ataccacaaaatgtaccaaattcaatattacaaggaataaagccttcaaactatggtaca
LA3013        ataccacaaaatgtaccaaattcaatattacaaggaataaagccttcaaactatggtaca
              ************************************************************

Heinz1706     atattgctcgaaaatgaatcgaatatgtacgatggaattatgaataacacgaacgatatt
San Marzano   atattgctcgaaaatgaatcgaatatgtacgatggaattatgaataacacgaacgatatt
LA1793        atattgctcgaaaatgaatcgaatatgtacgatggaattatgaataacacgaacgatatt
LA3013        atattgctcgaaaatgaatcgaatatgtacgatggaattatgaataacacgaacgatatt
              ************************************************************

Heinz1706     atcaacaataataatagatccattccacaaatatcgtcaaagagaacgatgcatggaggt
San Marzano   atcaacaataataatagatccattccacaaatatcgtcaaagagaacgatgcatggaggt
LA1793        atcaacaataataatagatccattccacaaatatcgtcaaagagaacgatgcatggaggt
LA3013        atcaacaataataatagatccattccacaaatatcgtcaaagagaacgatgcatggaggt
              ************************************************************
```

도면3

```
Heinz1706     MESTDSSTGTRHQPQLPPGFRFHPTDEELIVHYLKKRVAGAPIPVDIIGEIDLYKFDPWE
San Marzano   MESTDSSTGTRHQPQLPPGFRFHPTDEELIVHYLKKRVAGAPIPVDIIGEIDLYKFDPWE
LA1793        MESTDSSTGTRHQPQLPPGFRFHPTDEELIVHYLKKRVAGAPIPVDIIGEIDLYKFDPWE
LA3013        MESTDSSTGTRHQPQLPPGFRFHPTDEELIVHYLKKRVAGAPIPVDIIGEIDLYKFDPWE
              ************************************************************

Heinz1706     LPAKAIFGEQEWFFFSPRDRKYPNGARPNRAATSGYWKATGTDKPVFTSGGTQKVGVKKA
San Marzano   LPAKAIFGEQEWFFFSPRDRKYPNGARPNRAATSGYWKATGTDKPVFTSGGTQKVGVKKA
LA1793        LPAKAIFGEQEWFFFSPRDRKYPNGARPNRAATSGYWKATGTDKPVFTSGGTQKVGVKKA
LA3013        LPAKAIFGEQEWFFFSPRDRKYPNGARPNRAATSGYWKATGTDKPVFTSGGTQKVGVKKA
              ************************************************************

Heinz1706     LVFYGGKPPKGVKTNWIMHEYRVVENKTNNKPLGCDNIVANKKGSLRLDDWVLCRIYKKN
San Marzano   LVFYGGKPPKGVKTNWIMHEYRVVENKTNNKPLGCDNIVANKKGSLRLDDWVLCRIYKKN
LA1793        LVFYGGKPPKGVKTNWIMHEYRVVENKTNNKPLGCDNIVANKKGSLRLDDWVLCRIYKKN
LA3013        LVFYGGKPPKGVKTNWIMHEYRVVENKTNNKPLGCDNIVANKKGSLRLDDWVLCRIYKKN
              ************************************************************

Heinz1706     NTQRSIDDLHDMLGS------IPQNVPNSILQGIK-PSNYGTILLENESNMYDGIMNNTN
San Marzano   NTQRSIDDLHDMLGS------IPQNVPNSILQGIK-PSNYGTILLENESNMYDGIMNNTN
LA1793        NTQVHRFAYVGIDTTKCTKFNITRNKAFKLWYNIARKIEYVRW--NYEHERY--------
LA3013        NTQVHRFAYVGIDTTKCTKFNITRNKAFKLWYNIARKIEYVRW--NYEHERY--------
              ***       .:  :      * :*    .:  .*    :*     : * : *

Heinz1706     DIINNNNRSIPQISSKRTMHGGLYWNNDEATTTTTTIDRNHSPNTKRFLVENNEDDGL-N
San Marzano   DIINNNNRSIPQISSKRTMHGGLYWNNDEATTTTTTIDRNHSPNTKRFLVENNEDDGL-N
LA1793        ---------YQQIHSTNIVKEND---------------------AWRFVLERRSNNNNNN
LA3013        ---------YQQIHSTNIVKEND---------------------AWRFVLERRSNNNNNN
                         ** *.. :: .                      : **::*...::.  *

Heinz1706     MNNIS---RITNHEQSSS---------IANFLSQFPQNPSIQQQQQQQEEVLGSLNDGVV
San Marzano   MNNIS---RITNHEQSSS---------IANFLSQFPQNPSIQQQQQQQEEVLGSLNDGVV
LA1793        YEPFSKYKKVPCEQRGRWTHEYFANYKSTKLHCQFPEPVSSKSFDS-------------T
LA3013        YEPFSKYKKVPCEQRGRWTHEYFANYKSTKLHCQFPEPVSSKSFDS-------------T
               : :*    ::  .::.             ::: .***:  * :. :.            .

Heinz1706     FRQPYNQVTGMNWYS---------------
San Marzano   FRQPYNQVTGMNWYS---------------
LA1793        TTTTTRRSIGISWGRLSTTLSSYWHELVLL
LA3013        TTTTTRRSIGISWGRLSTTLSSYWHELVLL
                   .:  *:.*
```

서 열 목 록

<110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION

<120> COMPOSITION FOR SELECTION OF LONG-SHELF LIFE VARIETIES IN TOMATO

<130> 07046

<160> 21

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel forward primer

<400> 1

tgcagctaga tgattgggtt t 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel reverse primer

<400> 2

acctccatgc atcgttctct 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel forward primer

<400> 3

ttgggacgga tagagttact tt 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel reverse primer

<400> 4

tccgacgtct aacaaaatgt c 21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel forward primer

<400> 5

acgtatcgcg aggattcatc 20

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel reverse primer

<400> 6

cgttattagg ctttgagaag gac 23

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel forward primer

<400> 7

gctaatgacg acctccactt c 21

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel reverse primer

<400> 8

ttgtgtggac atactttgat cg 22

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel forward primer

<400> 9

accacaagaa tctcaagaca tg 22

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel reverse primer

<400> 10

cgtagtacga ggttgataaa ttcg 24

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel forward primer

<400> 11

gtttatcatt ttctctcttc cc 22

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel reverse primer

<400> 12

aattagcaac gaaattcgtc 20

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel forward primer

<400> 13

cagcgatgaa caattattgt gtc 23

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel reverse primer

<400> 14

aggatatttt ctatctcttg gac 23

<210

> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel forward primer

<400> 15

cttcttatca tgtgtttaac gc 22

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel reverse primer

<400> 16

cctcatatta accacgcgta 20

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel forward primer

<400> 17

tacgaaatag ccgaaagagg t 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel reverse primer

<400> 18

tcgatcccaa catatcatgc a 21

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel forward primer

<400> 19

tttgcagcta gatgattggg 20

<210

> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nor InDel reverse primer

<400> 20

atcgattgat tttacagggc ta 22

<210> 21

<211> 265

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Solanum lycopersicum

<400> 21

gctagatgat tgggttttat gtcgaattta caagaagaat aacacacaaa ggtccataga 60

tgatttgcat gatatgttgg gatcgatacc acaaaatgta ccaaattcaa tattacaagg 120

aataaagcct tcaaactatg gtacaatatt gctcgaaaat gaatcgaata tgtacgatgg 180

aattatgaat aacacgaacg atattatcaa caataataat agatccattc cacaaatatc 240

gtcaaagaga acgatgcatg gaggt 265