



등록특허 10-2116428



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월28일

(11) 등록번호 10-2116428

(24) 등록일자 2020년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6895 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2018.05)

C12Q 2600/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0172078

(22) 출원일자 2018년12월28일

심사청구일자 2018년12월28일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020140126207 A

KR1020100068713 A

KR1020150056922 A

(73) 특허권자

충남대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

임용표

대전광역시 유성구 상대남로 26, 903동 1602호(상대동, 도안신도시9블록 트리폴시티아파트)

최수련

대전광역시 중구 태평로 55, 408동 141호(태평동, 삼부아파트4단지)

오상현

대전광역시 대덕구 증리서로 30, 105동 303호(증리동, 영진로얄아파트)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 6 항

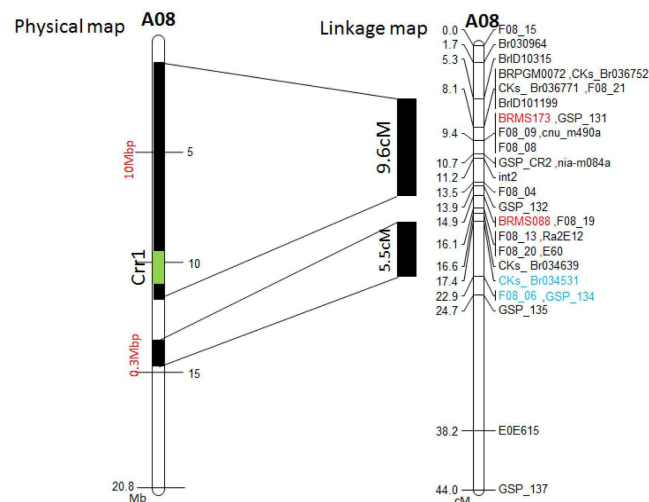
심사관 : 류민정

(54) 발명의 명칭 뿌리혹병 저항성 배추 품종의 판별을 위한 프라이머 세트 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 뿌리혹병 저항성 배추 품종의 판별을 위한 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 분자지표는 저항성 형질이 있는 자원선발(Marker Assisted Selection)에 사용가능할 것이며, 뿌리혹병 저항성품종 육종에 도움이 될 것으로 기대된다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213006-05-2-SB110

부처명 농림부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원(IPET)

연구사업명 기획과제(연구사업단) Golden Seed Project 채소종자사업단

연구과제명 채소작물의 종자개발을 위한 육종특화 통합 DB구축 및 운영

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2017.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 뿌리혹병 저항성 배추 품종을 판별하기 위한 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 뿌리혹병 저항성 배추 품종을 판별하기 위한 키트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 및 완충액을 포함하는 것인 키트.

청구항 4

배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 뿌리혹병 저항성 배추 품종을 판별하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질로 표지되어 있는 것인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 증폭 단계의 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

청구항 7

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뿌리혹병 저항성 배추 품종의 판별을 위한 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뿌리혹병(clubroot)은 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)에 의해 감염되는 토양병으로, 십자화과 작물에 큰 피해를 입힌다. 뿌리혹병균(*P. brassicae*)은 인공배지에서는 재배되지 않는 활물기생균으로, 배추뿐만 아니라 양배추, 무, 브로콜리 등 거의 모든 배추과 작물에 발생하고 있어 전 세계적으로 큰 피해를 주고 있다. 뿌리혹병균은 병든 조직(뿌리혹)에 무수히 많은 휴면포자를 형성하고 이 휴면포자로 좋지 않은 환경에서 생존하거나 월동하게 되는데 이 휴면포자는 토양에서 길게는 15년 동안 생존할 수 있어 뿌리혹병은 방제하기에 매우 어려운 토양병이다.

[0003] 한국에서는 1928년 경기도에서 처음으로 뿌리혹병의 발생이 보고되었고, 매년 배추의 30~70%가 피해를 입고 있다. 배추 품종의 대다수는 뿌리혹병균의 레이스(race) 특이적 저항성을 가지고 있어, 다수의 종자 회사는 뿌리

흑병균의 모든 레이스에 저항성을 가지는 품종의 개발에 집중하고 있다.

[0004] 지금까지 배추에서 뿌리흑병에 대한 두 개의 후보 유전자(*Cra*, *Crr1*) 및 9개의 저항성 QTLs(*Crr2*, *Crr3*, *Crr4*, *CRb*, *CRc*, *CRk*, *CRaki*, *PbBa3.1* 및 *PbBa3.3*)이 보고되었다.

[0005] 분자유전학적 방법에 기반한 염색체 지도는 분자마커의 위치와 재조합 비율에 기반한 유전자 사이의 상대적인 거리를 결정할 수 있게 하였다. 더욱이, 분자유전학적 지도의 구성은 지도 기반 유전자 클로닝(map-based gene cloning), QTL(quantitative trait loci)의 발견을 가능하게 하였고, MAS(Marker Assisted Selection)의 위치를 예측할 수 있게 되었다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1815220호에는 뿌리흑병균에 대한 4가지 표현형의 배추 품종을 이용하여 배추 뿌리흑병균(*Plasmodiophora brassicae*)의 레이스를 판별하는 방법에 관한 '배추 뿌리흑병균의 레이스를 판별하는 신규한 방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2014-0023618호에는 *Plasmodiophora* 속의 베타튜불린 유전자를 특이적으로 인식할 수 있는 프라이머 세트에 관한 '배추뿌리흑병 진단용 프라이머 및 이를 이용한 검출 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 뿌리흑병 저항성 배추 품종의 판별을 위한 프라이머 세트 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 뿌리흑병에 저항성을 가진 09CR-500과 이병성을 가진 09CR-501에서 유래된 배가반수체(double haploid, DH) 계통인 09CR 집단을 가지고 방범 균주를 이용하여 2년에 걸쳐 표현형 검정을 진행하였다. 총 703개의 마커를 대상으로 다형성 검정을 하여, 227개의 다형성 마커를 선발하였으며, 유전자지도 작성을 위하여 집단에서 유전자형 조사를 실시하였다. 작성된 유전자 연관 지도는 150개의 마커가 총 10개의 그룹에 분포되어 있으며, 총 길이는 678.4cM이고 두 유전자 좌의 평균거리는 5.2cM로 확인되었다. 표현형 데이터를 토대로 QTL 맵핑을 한 결과, A04, A05 그리고 A08의 유전자 연관지도에서 QTL이 탐지되었고, 이 중 A04, A05의 경우 역치 값보다 낮은 LOD 값을 보였으며, A08의 위치에 2개의 QTL이 확인되었으며 이 중 한 QTL은 기존에 보고된 *Crr1*의 연관 마커를 포함하고 있음을 확인하였다. A08의 또 다른 QTL은 보고된 적이 없는 위치에 있는 것으로 확인되었다. 이 새로운 위치의 QTL에는 저항성 관련 유전자가 4개 존재하는 것을 확인하고, 이에 기반한 뿌리흑병 저항성 배추 품종을 확인할 수 있는 프라이머 세트를 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 뿌리흑병 저항성 배추 품종을 판별하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 뿌리흑병 저항성 배추 품종 판별용 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 이용한 뿌리흑병 저항성 배추 품종을 판별하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 뿌리흑병에 저항성을 보이는 배추를 선발할 수 있는 신규의 양적형질 유전자좌를 확인하였고, 이에 기반한 뿌리흑병 저항성 배추 품종을 확인할 수 있는 프라이머 세트를 개발하였다. 본 발명의 양적형질 유전자를 이용하면 뿌리흑병 저항성 관련 형질의 유전적 배경에 대한 정보를 제공할 수 있고, 배추 뿌리흑병 저항성 품종을 특이적으로 판별할 수 있게 함으로써, 뿌리흑병 저항성 배추 품종 육종에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 뿌리흑병의 발병도(Disease Index) 등급을 보여준다. 0: 무증상, 1: 측근(lateral root)에 국한된 약하게 불룩한 부분 발생, 2: 측근에 약간의 작은, 분리된 구형의 혹 발생, 3: 측근에 중간정도의 혹 발생, 4: 측근의 큰 혹 및 주근(main root)의 약한 부풀음 발생, 5: 주근에 큰 혹 발생, 6: 뿌리 전반에 걸친 심각한 혹 발생.

도 2는 뿌리혹병 저항성(09CR-500) 및 이병성(09CR-501) 부모계통 사이의 다형성 분석 결과이다.

도 3은 SNP 마커(GSP_228, 237, 235, 230, 227, 117)를 이용한 유전형분석 결과로, 빨간색 선은 09CR-500, 검정색 선은 09CR-501을 의미한다.

도 4는 본 발명에서 제작한 배추(*Brassica rapa*)의 연관 지도이다.

도 5는 배추(*B. rapa*)의 연관 그룹에서 뿌리혹병 저항성 QTLs를 보여준다.

도 6은 배추(*B. rapa*)의 연관 그룹 A04 및 A05에서 뿌리혹병 저항성 QTLs를 보여준다.

도 7은 배추(*B. rapa*)의 연관 그룹 A08에서 뿌리혹병 저항성 QTLs를 보여준다.

도 8은 배추(*B. rapa*)의 연관 그룹 A08에서 뿌리혹병 저항성 QTLs의 위치를 나타낸다.

도 9는 새롭게 확인된 뿌리혹병 저항성 QTL에서 4개의 후보 유전자를 보여준다. A에서 빨간색 글씨는 *Crr1* 연관 마커의 위치를 나타내며, 파란색 글씨는 새로운 위치의 마커를 나타낸다. B에서 빨간색 박스는 Serine/threonine-protein kinase gene를, 초록색 박스는 F-box family protein-related gene을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 뿌리혹병 저항성 배추 품종을 판별하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 제공한다.
- [0014] 상기 프라이머는 서열번호 1 및 2의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 또한, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 2의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명에 따른 상기 프라이머 세트는, 뿌리혹병 저항성 09CR-500 품종과 이병성 09CR-501 품종을 교배하여 얻은 배가반수체(double haploid) 계통을 대상으로 다형성 마커를 이용하여 작성된 배추의 뿌리혹병 저항성 관련 양적형질 유전자좌에 기반한 것으로, 상기 양적형질 유전자좌는 8번 염색체의 3,629,009 ~ 12,113,951 bp에 위치하는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 양적형질 유전자좌(QTLs: quantitative trait loci) 분석은 분자표지인자를 이용하고 측정이 가능한 형질에 관여하는 염색체의 특정 부분을 확인함으로써, 특정 환경에서 수량성, 병 저항성 등 주요 형질에 관여하는 유전자의 수 및 염색체 위치, 개개 유전자의 영향력, 상위작용, 양적형질 유전자좌와 환경과의 상호작용, 그리고 양적형질 유전자좌와 유전적인 배경과의 상호작용 등 주요 농업형질의 유전적 배경에 대한 전반적이고 직접적인 정보를 얻을 수 있다.
- [0017] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 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.
- [0018] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명은 또한, 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 뿌리혹병 저항성 배추 품종을 판별하기 위한 키트를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 키트는 또한 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, 역전사 완충액 및 PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

- [0022] 본 발명은 또한,
- [0023] 배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0024] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0025] 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 뿌리혹병 저항성 배추 품종을 판별하는 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 방법은 배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, Wizard prep 키트(Promega사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 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 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.
- [0027] 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 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 전술한 것과 같다.
- [0028] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 뿌리혹병 저항성 배추 품종을 선별하기 위한 방법은 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하며, 상기 증폭 단계 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 모세관 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 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. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{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.
- [0029] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] **재료 및 방법**
- [0031] **1. 식물재료**
- [0032] 배추(*Brassica rapa*) 맵핑 집단은 뿌리혹병 저항성 라인(09CR-500) 및 이병성 라인(09CR-501)의 교배로 만든 F₁ 개체로부터 소포자 배양으로 유래된 배가반수체(double haploid, DH) 계통으로부터 만들었다. 바이오브리딩 육종 회사에 의해 제공되는 소포자 배양(micro spore culture)에 의해 제조된 82 DH 계통을 이용하였다. 82 DH 계통 종자를 비닐하우스 내에서 재배하고, 신선한 잎을 채취하여 DNA 추출 전까지 -70℃에서 보관하였다.
- [0033] **2. 뿌리혹병균 접종**
- [0034] 뿌리혹병균(로컬 병원균 "Banglim" 2×10^6 포자/ml)의 접종은 5ml의 포자 상층액을 이용하여 2주령의 09CR-500, 09CR-501 및 82 DH 계통의 유묘에 수행하였다(2011년 및 2012년). 접종 8주 후에 뿌리를 세척하고, 표준화된 프

로토콜에 따라 혹(club) 형성의 정도를 평가한 후, 4℃에 보관하였다(도 1).

3. DNA 추출

게놈 DNA는 부모 식물체 및 82 DH 계통의 수집한 잎으로부터 CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide) 방법을 통해 추출하였다. 3개의 라운드-펀칭 시료를 tissue-lyser를 이용하여 그라인딩한 후, 500μl의 CTAB 버퍼를 포함하고 있는 1.5ml 튜브에 옮겼다. 상기 튜브를 65℃의 항온수조에 20분간 반응시킨 후, 동량의 클로로포름:이소아밀 알콜(chloroform:isoamyl alcohol=24:1)을 첨가하고 혼합한 후 13,000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 그 후, 동량의 98% 이소프로판올을 넣어 DNA를 침전시키고, 13,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. DNA 펠렛을 70%의 차가운 에탄올로 세척하고, 건조시킨 후, 100μl의 증류수를 이용하여 녹였다.

4. PCR 분석 및 마커 유전형분석

DNA 증폭은 4ng의 게놈 DNA, 10X 버퍼, 0.25mM dNTPs, 2 pmol의 각 프라이머, 0.1 unit의 Taq 중합효소(Intron Bio, 한국)로 이루어진 혼합물로 수행되었다. 본 발명에서는 *Brassica rapa* 표준유전체(reference genome) *chiifu-401-42* 및 *kenshin* 사이로부터 개발된 SNP(single-nucleotide polymorphism) 마커, SSR(simple sequence repeat) 마커 및 InDel(insertion/deletion) 마커를 유전형분석에 사용하였다. SNP 분석은 HRM(high-resolution melting) 및 Fluidigm 분석을 사용하였다. SNP 마커를 이용한 유전형분석을 위한 PCR 반응 조건은 다음과 같다: 95℃ 2분 → [95℃ 15초, 55℃ 20초, 72℃ 20초](45회 반복) → 72℃ 7분. SSR 및 InDel 마커를 이용한 유전형분석을 위한 PCR 조건은 하기와 같다: 95℃ 5분 → [95℃ 45초, 55℃ 45초, 72℃ 45초](35회 반복) → 72℃ 7분. PCR 산물은 6% 폴리아크릴아미드 겔 또는 2.5% 아가로스 겔에 로딩한 후 라이트-스캐너(Idaho technology, 미국)를 통해 확인하였다. 유전형분석 결과는 각 연관 그룹에 대한 좌(locus) 순서에 따라 정렬하였다.

5. 유전자 지도의 작성

김 등(Kim et al., 2009, BMC Genomics 10:432)에 의해 기술된 09CR 유전자형분석 결과를 JoinMap V.4.0 소프트웨어(<https://www.kyazma.nl/index.php/JoinMap/>)를 이용하여 유전자 지도를 작성하였다. 연관 그룹은 LOD(limit of detection) 그룹핑 역치 범위 4.0~8.0로 확인하였다. Kosambi의 맵핑 함수를 재조합 값의 지도 상 거리로 전환하는데 사용하였으며, 마커 순서를 배열하기 위해 재조합 빈도는 0.4보다 작게, LOD는 1.0보다 크게 설정하였다. 연관 그룹은 이전의 보고에서 명시한 바를 기준으로 하여 동일하게 A01에서 A10 염색체로 배정하였다.

6. QTL 분석 및 뿌리혹병 저항성의 유전자 지도

QTL(quantitative trait loci) 맵핑은 WinQTL cartographer 2.5 소프트웨어(<https://brcwebportal.cos.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)를 사용하여 수행하였고, QTL은 CIM(composite interval mapping) 방법으로, 2cM 간격 및 10cM 범위에서 수행하여 확인하였다. QTL의 존재를 선언하기 위하여, genome wide 역치값($p \leq 0.05$)은 모든 유전적 간격을 통해 각 형질 결과의 1,000 순열(permutation)로부터 추정하였다.

실시예 1. Disease scoring

두 모부분 개체 및 82 DH 개체에서 질병 심각도의 테스트는 질병 발달의 다양한 정도에 근거하여 확인하였다. 82 계통에서 질병의 증상은 매우 다양하게 관찰되었다(표 1 및 표 2). 발병도(disease index, DI)는 하기의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$DI = \frac{(0n_0 + 1n_1 + \dots + 6n_6) \times 100}{6 \times N_T}$$

N_T : total number of plants tested.

n_0 : number of plants with no symptom.

n_1 : number of plants with very slight swelling usually confined to lateral roots.

n_2 : number of plants with a few small, separate globular clubs on the lateral roots.

n_3 : number of plants with moderate clubbing on lateral roots.

n_4 : number of plants with large clubs on lateral roots slight swelling of main roots.

n_5 : number of plants with larger clubs in main roots.

n_6 : number of plants with severe clubbing all over roots.

[0046]

뿌리혹병의 발병도(DI) 점수 (2011년)

DI 점수	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	Total
Number of line	11	16	4	3	3	1	3	9	5	23	82

표 2

[0047]

뿌리혹병의 발병도(DI) 점수 (2012년)

DI 점수	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	Total
Number of line	32	4	3	2	0	0	0	0	2	39	82

[0048]

실시예 2. 유전자 지도의 제작

[0049]

총 227개의 분자 마커를 뿌리혹병 저항성(09CR-500) 및 이병성(09CR-501) 부모계통 사이의 다형성 조사에 사용하였다. 분석 결과, 32.2% (227개)의 분자마커에서 대부분간 다형성이 확인되었다.

표 3

[0050]

분석에 사용한 마커 요약

마커 종류	No. of total primer assayed	No. of polymorphism	No. of non-polymorphism	percent of polymorphism
SNP	628	198	430	31.5%
SSR/InDel	75	29	46	38.6%
Total	703	227	476	32.2%

표 4

[0051]

유전형분석 결과 요약

마커 종류	No. of total marker	No. of genotyping with population	No. of markers mapped
SNP	198	142	125
SSR/InDel	29	29	25
Total	227	171	150

[0052]

JoinMap 4 프로그램을 사용한 연관 지도의 제작은 150개의 마커로 총 10개의 연관 지도를 만들었고, 유전자 지도는 총 길이 678.4cM로, 좌간 평균 거리 5.2cM를 보여주었다. 연관 그룹의 길이는 27.1부터 129.9cM 범위로 확인되었고, 각 연관 그룹 내의 마커의 수는 5-31개로 확인되었다(표 5 및 도 4).

표 5

[0053]

본 발명에서 제작한 배추(*Brassica rapa*)의 연관 지도 요약

Linkage	No. of marker	Genetic length (cM)	Average distance (cM)
A01	5	27.134	4.321
A02	12	38.222	3.426
A03	18	67.565	4.065
A04	10	29.874	3.412
A05	13	109.417	9.471
A06	16	96.391	6.425
A07	13	69.592	6.326
A08	31	44.002	1.457
A09	19	129.935	7.487
A10	13	66.356	6.021
Total	150	678.488	

[0054] 실시예 3. 뿌리혹병 저항성 관련 QTL 분석

[0055] 표현형 분석 결과와 유전형분석 결과를 비교하여 QTL 맵핑을 수행하였다. 그 결과, 연관 그룹 A04, A05 및 A08에서 확인된 QTL이 뿌리혹병 저항성과 관련된 것으로 예측되었다(도 5). 첫 번째 QTL은 A04에 위치하며, 4.90의 LOD 값을 가지며, 표현형적 변이는 18.2%를 나타내었다. 상기 좌(locus)는 GSP_056과 GSP_238 마커 사이에 위치하며, 0.00~10.38cM 사이에서 피크를 보였다. 두 번째 QTL은 A05에 위치하며, 56.57의 LOD 값을 가지며, 44.89%의 표현형적 변이를 나타내었다. 이 좌는 F05_13과 GSP_080 마커 사이에 위치하며, 48.56~63.99cM 부위에서 피크를 보였다. 세 번째 QTL은 A05에 위치하며, 5.19의 LOD 값을 가지며, 45.71%의 표현형적 변이를 나타내었다. 상기 좌는 GSP_080과 F05_09 마커 사이에 위치하며, 63.99~68.58cM 부위에서 피크를 보였다. 네 번째 QTL은 A08에 위치하며, 73.05의 LOD 값, 96.19%의 표현형적 변이를 보여주었다. 상기 좌는 CKs_br030964와 CKs_br034531 마커 사이에 위치하며, 1.73~17.42cM에서 피크를 보였다. 다섯 번째 QTL은 A08에 위치하며, 59.06의 LOD 값, 50%의 표현형적 변이를 보여주었으며, CKs_br034531과 F08_06 마커 사이에 위치하고, 17.42~22.87cM 부위에서 피크를 보였다. 상기 5개의 QTLs 중 낮은 LOD 값을 보여준 3개의 QTLs를 제외한, A08 상에 위치한 2개의 QTLs를 분석에 이용하였다.

[0056] 연관 지도의 A08 상의 QTLs를 참조 서열의 물리적 지도와 비교한 결과, 첫 번째 QTL은 3,629,009~12,113,951 bp의 위치에, 두 번째 QTL은 13,013,367~13,373,695 bp 위치에 대응되었다(도 8). 새로운 QTL에서 뿌리혹병 저항성 관련 4개의 유전자가 확인되었다(도 9). 후보 유전자 중 3개는 Serine/Threonine-protein kinase 패밀리와 유전적으로 관련있는 것으로 확인되었는데, Serine/Threonine-protein kinase는 여러 식물체에서 R 유전자로 클로닝된 바 있다.

[0057] 실시예 4. 뿌리혹병 저항성 관련 QTL 기반 분자마커 제작 및 저항성 판별능 분석

[0058] 상기 실시예 3에서 네 번째 QTL을 뿌리혹병 저항성 개체 선발을 위한 마커로 사용하기 위해(마커이름: GSP_CR2), 프라이머 세트(서열번호 1 및 서열번호 2)를 제작하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 82 DH 집단에서 유전자형을 분석하고, 해당 결과를 82 DH 집단의 병 저항성 표현형에 대한 결과와 비교한 결과, 상기 분자마커를 통해 배추의 뿌리혹병 저항성을 판별할 수 있음을 알 수 있었다.

표 6

GSP_CR2 마커를 이용한 뿌리혹병 저항성 판별 결과 및 표현형 결과 비교

모본(저항성) 부분(이병성)

	09CR-500	09CR-501	09CR-502	09CR-503	09CR-504	09CR-505
GSP_CR2 마커분석 결과	R	S	S	S	S	S
병 처리 후 결과	R	S	S	S	S	S
	09CR-506	09CR-507	09CR-508	09CR-509	09CR-510	09CR-511
GSP_CR2 마커분석 결과	R	R	R	S	S	S
병 처리 후 결과	R	R	R	R	S	S
	09CR-512	09CR-513	09CR-514	09CR-515	09CR-516	09CR-517
GSP_CR2 마커분석 결과	R	S	R	S	R	S
병 처리 후 결과	R	S	R	S	R	S
	09CR-518	09CR-519	09CR-520	09CR-521	09CR-522	09CR-523
GSP_CR2 마커분석 결과	S	R	R	R	R	S
병 처리 후 결과	S	R	R	R	R	S
	09CR-524	09CR-525	09CR-526	09CR-527	09CR-528	09CR-529
GSP_CR2 마커분석 결과	R	R	R	S	R	-
병 처리 후 결과	R	R	R	S	R	-
	09CR-530	09CR-531	09CR-532	09CR-533	09CR-534	09CR-535
GSP_CR2 마커분석 결과	R	R	S	S	S	S
병 처리 후 결과	R	R	S	S	S	S
	09CR-536	09CR-537	09CR-538	09CR-539	09CR-540	09CR-541
GSP_CR2 마커분석 결과	S	S	S	S	S	R
병 처리 후 결과	S	S	S	S	S	R
	09CR-542	09CR-543	09CR-544	09CR-545	09CR-546	09CR-547
GSP_CR2 마커분석 결과	R	R	R	S	R	R
병 처리 후 결과	R	R	R	S	R	R
	09CR-548	09CR-549	09CR-550	09CR-551	09CR-552	09CR-553
GSP_CR2 마커분석 결과	R	S	R	S	S	S
병 처리 후 결과	R	S	R	S	S	S
	09CR-554	09CR-555	09CR-556	09CR-557	09CR-558	09CR-559
GSP_CR2 마커분석 결과	S	S	S	S	R	R
병 처리 후 결과	S	S	S	S	R	R

[0059]

표 7

GSP_CR2 마커를 이용한 뿌리혹병 저항성 판별 결과 및 표현형 결과 비교

	09CR-560	09CR-561	09CR-562	09CR-563	09CR-564	09CR-565
GSP_CR2 마커분석 결과	R	R	S	S	R	S
병 처리 후 결과	R	R	S	S	R	R

	09CR-566	09CR-567	09CR-568	09CR-569	09CR-570	09CR-571
GSP_CR2 마커분석 결과	S	S	R	R	R	R
병 처리 후 결과	S	S	R	R	R	R

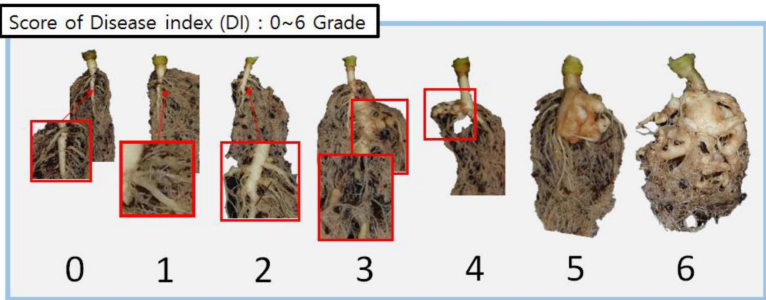
	09CR-572	09CR-573	09CR-574	09CR-575	09CR-576	09CR-577
GSP_CR2 마커분석 결과	S	R	R	S	S	S
병 처리 후 결과	S	-	R	S	S	S

	09CR-578	09CR-579	09CR-580	09CR-581	09CR-582	09CR-583
GSP_CR2 마커분석 결과	S	S	R	R	R	R
병 처리 후 결과	S	S	R	R	R	R

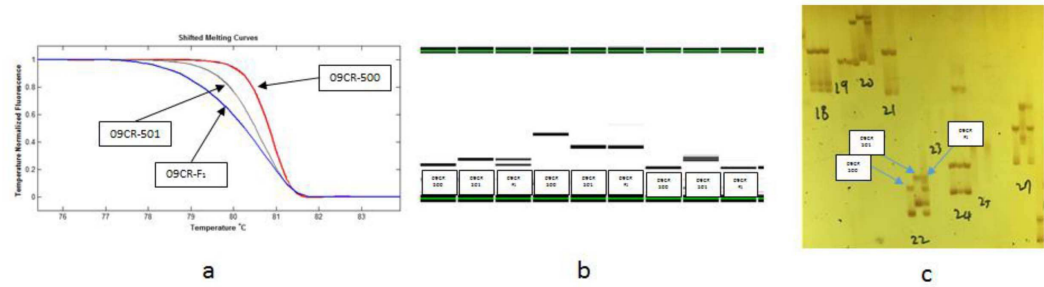
[0060]

도면

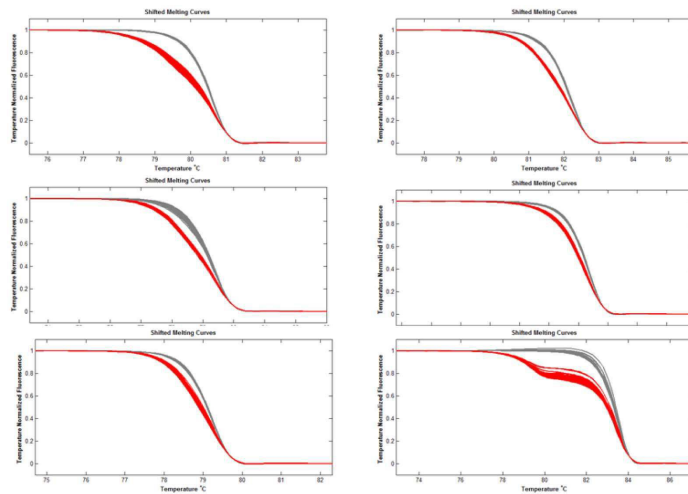
도면1



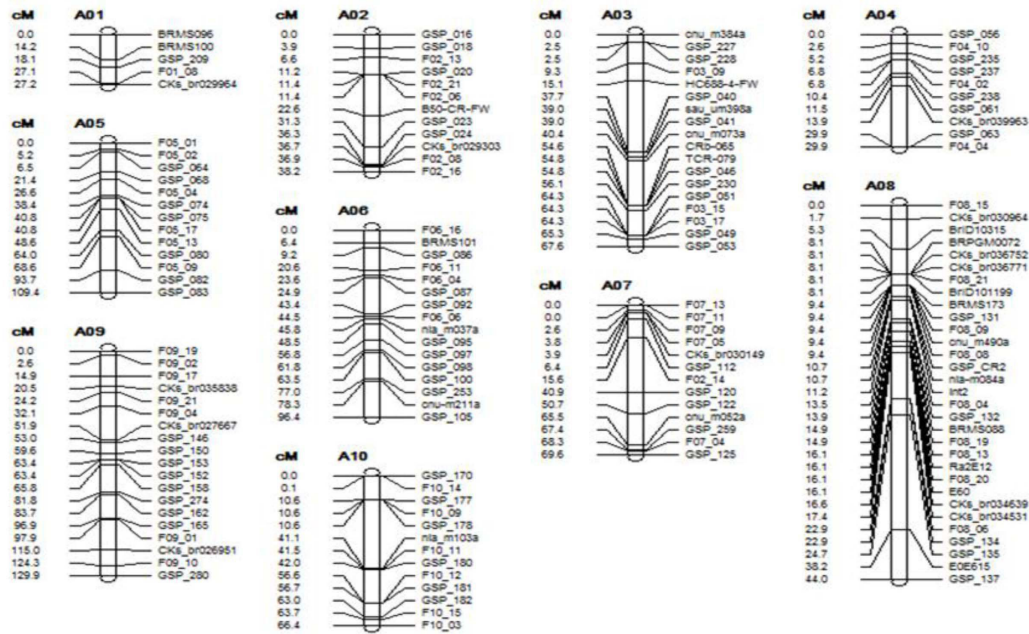
도면2



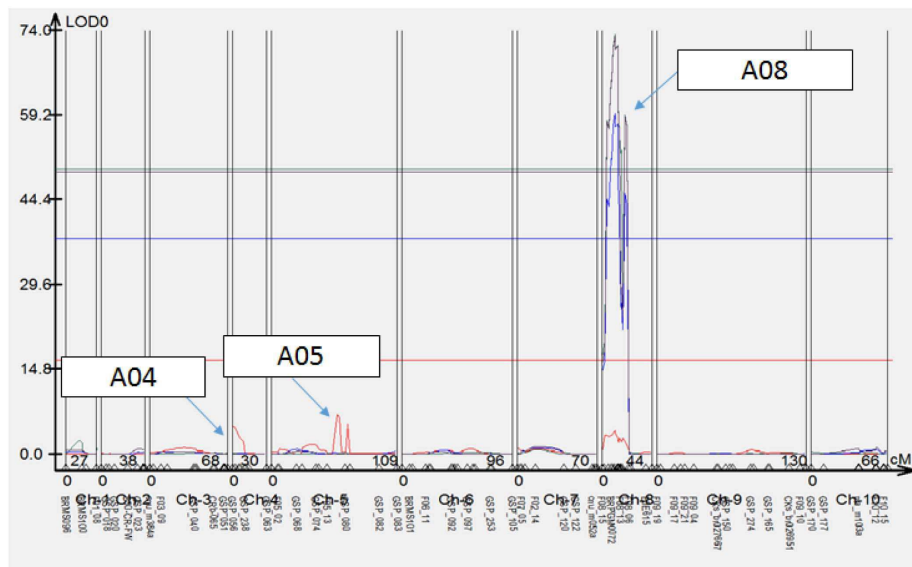
도면3



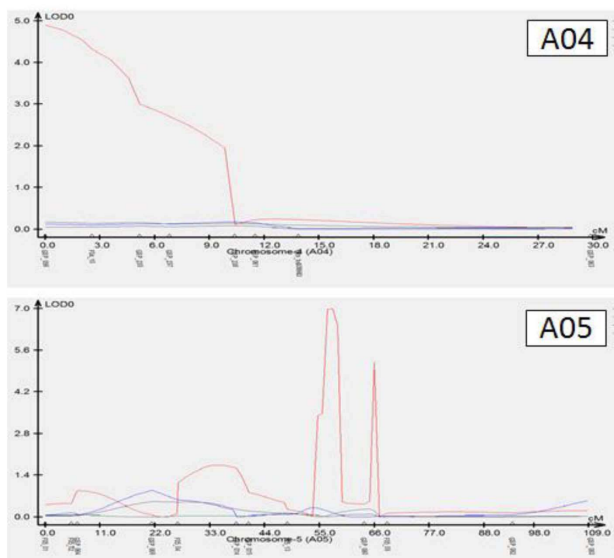
도면4



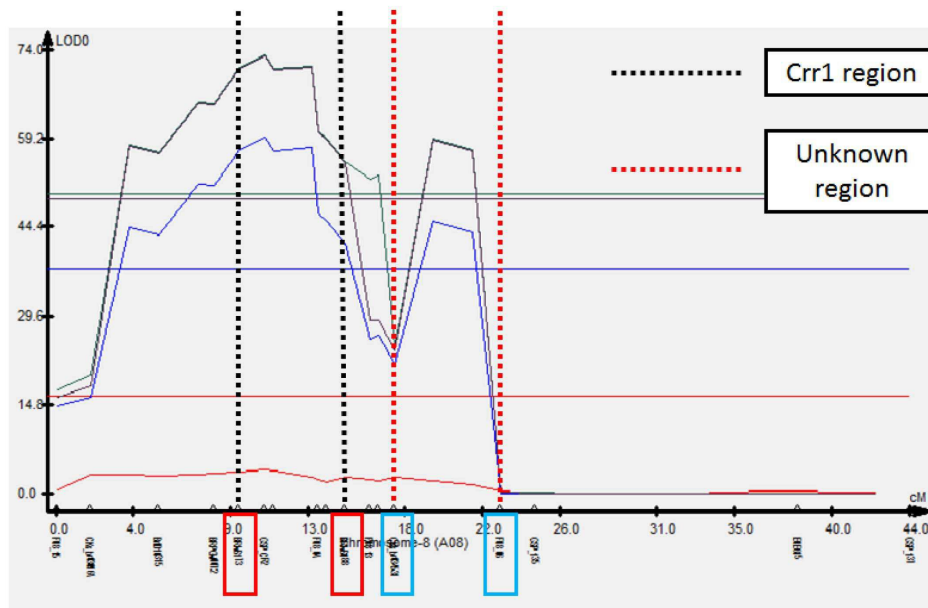
도면5



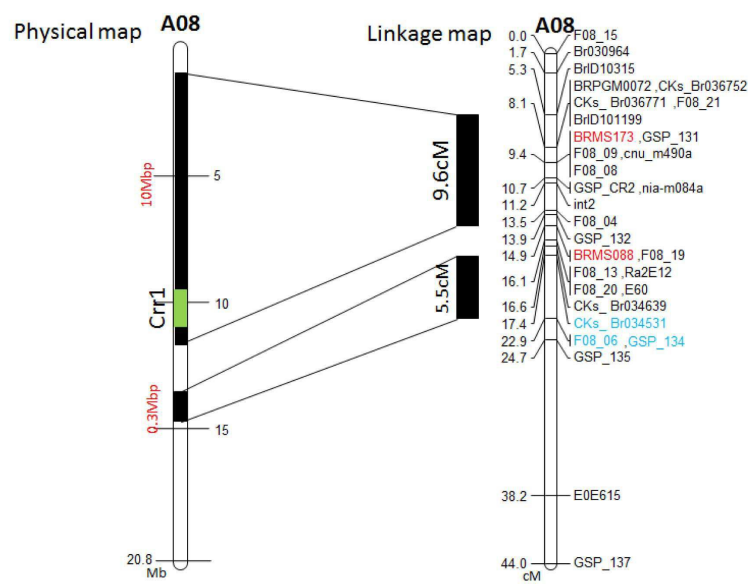
도면6



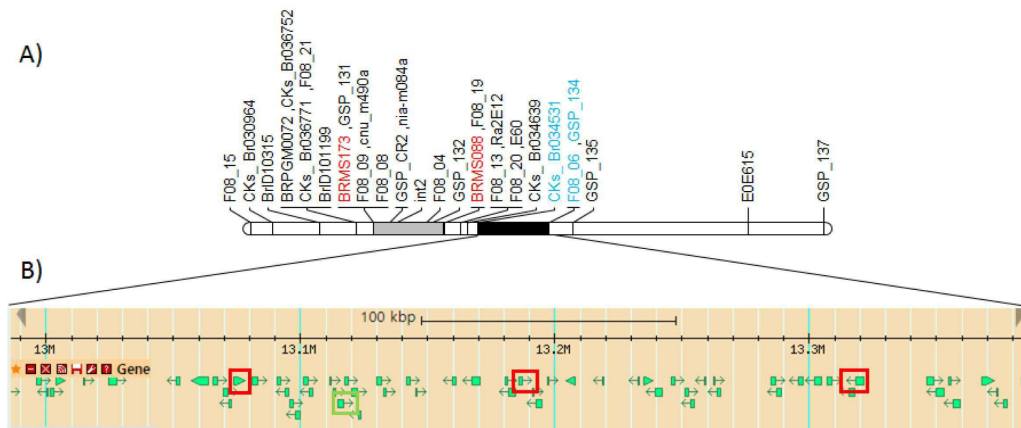
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Primer set for discriminating clubroot disease-resistant Brassica rapa cultivar and uses thereof

<130> PN18547

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

$\langle 210 \rangle$	1
-----------------------	---

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

$\langle 400 \rangle$	1
-----------------------	---

caaagccaca agtttcattc g 21

 $\langle 210 \rangle$ 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

 $\langle 400 \rangle$ 2

aaacattgca tggaccaatt c 21