



등록특허 10-2337345



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월09일
(11) 등록번호 10-2337345
(24) 등록일자 2021년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01) C12Q 1/6837 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 1/6837 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2021-0061729
(22) 출원일자 2021년05월13일
심사청구일자 2021년05월13일
(56) 선행기술조사문헌
KR101704382 B1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
임용표
대전광역시 유성구 상대남로 26, 903동 1602호(상대동, 도안신도시9블록 트리폴시티아파트)
이수성
경기도 성남시 분당구 수내로 181, 308동 605호(분당동, 셋별마을)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 7 항

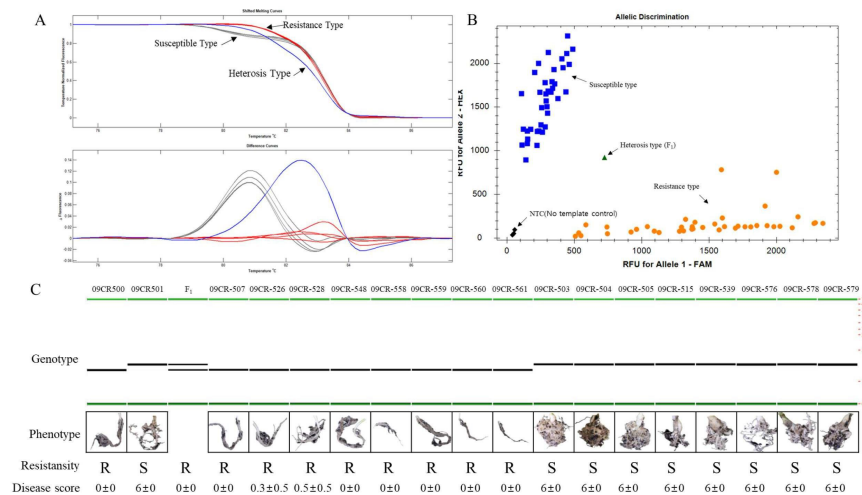
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 품종을 판별하기 위한 마커 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 품종을 판별하기 위한 마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 배추 뿌리혹병 저항성 관련 양적형질유전자좌(QTL)와 이에 기반한 분자마커는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추를 정확하게 판별할 수 있으므로, 배추 뿌리혹병 저항성 배추 품종의 육종에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감할 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2521/30 (2019.08)

C12Q 2600/13 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

(72) 발명자

최수련

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

오상현

대전광역시 대덕구 중리서로 30, 105동 303호(중리동, 영진로알아파트)

(56) 선행기술조사문헌

KR102116428 B1*

GENBANK ACCESSION NO.LR031575 (2018.11.16.)*

NCBI REFERENCE SEQUENCE:

XM033277375(2020.12.07.)*

FENGQUN YU ET AL, SCI REP., 2017, 7(1), 4516

MD MASUD KARIM ET AL, INT J MOL SCI., 2020, 21(14), 5033

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545024141

과제번호 213006055SBD30

부처명 농림축산식품부

과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원

연구사업명 GoldenSeed프로젝트

연구과제명 기능성 물질 생산관련 유전자탐색 및 분자마커 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 충남대학교 산학협력단

연구기간 2017.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545023191

과제번호 213006055SB110

부처명 농림축산식품부

과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원

연구사업명 GoldenSeed프로젝트

연구과제명 채소작물의 종자개발을 위한 육종 특화 통합 DB 구축 및 운영

기 여 율 1/2

과제수행기관명 충남대학교 산학협력단

연구기간 2017.01.01 ~ 2021.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열 중 190번째에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물로서,

상기 서열번호 1의 190번째 뉴클레오타이드에 해당하는 SNP에서 T 염기를 갖는 배추는 배추 뿌리혹병 저항성 배추, G 염기를 갖는 배추는 배추 뿌리혹병 감수성 배추로 판별할 수 있는 것을 특징으로 하는, 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 기재된 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오타이드; 또는 이들의 cDNA를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 마이크로어레이.

청구항 4

서열번호 4 및 5의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 8, 9 및 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 프라이머 세트 조성물.

청구항 5

제4항의 프라이머 세트 조성물; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 7

배추 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제4항의 프라이머 세트 조성물을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 증폭 단계의 산물의 검출은 HRM(High resolution melting) 분석, rhAmp 분석, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 품종을 판별하기 위한 마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 배추 뿌리혹병(clubroot)은 배추 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)에 의해 감염되는 토양병으로, 십자화과 작물에 큰 피해를 입힌다. 배추 뿌리혹병균(*P. brassicae*)은 인공배지에서는 재배되지 않는 활동기생균으로, 배추뿐만 아니라 양배추, 무, 브로콜리 등 거의 모든 배추과 작물에 발생하고 있어 전 세계적으로 큰 피해를 주고 있다. 배추 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 배추 뿌리혹병은 방제하기에 매우 어려운 토양병이다.

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

[0004] 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.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1560736호에는 배추 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)의 TSA 유전자에 기반한 '배추 뿌리혹병 진단용 프라이머 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1815220호에는 뿌리혹병균에 대한 4가지 표현형의 배추 품종을 이용하여 배추 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)의 레이스를 판별하는 방법에 관한 '배추 뿌리혹병균의 레이스를 판별하는 신규한 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 품종을 판별하기 위한 마커 조성물 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 배추 뿌리혹병균 '방림(Banglim)' 병원형(pathotype)에 대해 저항성을 보이는 09CR500계통과 감수성을 보이는 09CR501 계통에서 유래된 배가 반수체(double haploid) 계통인 09CR-DH 집단을 이용하여 유전자 지도를 작성하여 배추 뿌리혹병 저항성 관련 양적형질유전자좌(QTL)를 탐색하였다. 또한, 상기 탐색된 QTL 영역을 대상으로 09CR500(저항성)와 Chiifu(감수성) 배추 간의 염기서열을 비교하여 배추 뿌리혹병 저항성과 밀접하게 연관된 SNP 마커(09CR.11390652)와 InDel 마커(09CR.11755754)를 개발하였고, 상기 SNP 또는 InDel 마커가 배추 뿌리혹병에 대한 저항성 또는 감수성 배추 계통을 정확하게 구별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 중 190번째에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 배추 뿌리혹병 저항성 개체와 감수성 개체 간에 InDel(insertion/deletion) 다형성을 보이는 서열번호 2 또는 3의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 InDel 마커 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 InDel 다형성을 보이는 폴리뉴클레오티드; 또는 이들의 cDNA를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 마이크로레이를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 서열번호 4 및 5의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 6 및 7의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 8, 9 및 10의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 프라이머

세트 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 배추 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트 조성물을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 배추 뿌리혹병 저항성 관련 양적형질유전자좌(QTL)와 이에 기반한 분자마커는 배추 뿌리혹병(*Plasmiodiophora brassicae*)에 대한 저항성 또는 감수성 배추를 정확하게 판별할 수 있으므로, 배추 뿌리혹병에 대해 저항성을 갖는 배추 품종을 조기에 선별하여 육성할 수 있어 육종에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감하는데 매우 유용할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 배추 뿌리혹병의 발병도(Disease Index) 등급을 보여준다. 0: 무증상, 1: 측근(lateral root)에 국한된 약하게 불룩한 부분 발생, 2: 측근에 적은 수의 작은 구형의 혹 발생, 3: 측근에 여러 개의 작은 혹 발생, 4: 측근의 큰 혹 및 주근(main root)의 약한 부풀음 발생, 5: 주근에 큰 혹 발생, 6: 뿌리 전반에 심각한 혹 발생 및 뿌리 형태의 변형.

도 2는 본 발명에서 제작한 배추(*Brassica rapa*) 연관 지도의 연관 그룹 A08에서 배추 뿌리혹병 저항성 관련 QTL 위치와 후보 유전자를 보여준다. 도 2B에서 09CR.11390652와 09CR.11755754는 각각 본 발명의 SNP 마커 및 InDel 마커 위치이다.

도 3은 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 구별하기 위한 본 발명의 SNP 마커(A, B) 및 InDel 마커(C) 정보를 나타낸 그림이다. 파란색 글씨는 SNP 또는 InDel 다형성을 포함하는 서열을 증폭하기 위한 프라이머 세트 위치를 나타내고, 빨간 글씨는 SNP 위치 염기 또는 InDel 다형성을 나타낸 것이다. A: HRM(High resolution melting) 분석용 프라이머 세트 위치 표시, B: rhAmpTM SNP Genotyping 분석용 프라이머 세트 위치 표시.

도 4는 배추 뿌리혹병 저항성 배추 개체(Resistance type), 감수성 배추 개체(Susceptible type) 및 09CR500(저항성)와 09CR501(감수성)의 교배로 얻어진 F₁ 개체를 대상으로 본 발명의 SNP 마커(A, B) 또는 InDel 마커(C)를 이용하여 PCR을 수행한 결과이다. SNP 마커를 이용하여 생성된 PCR 증폭 산물은 HRM(High resolution melting; A) 분석과 rhAmpTM SNP Genotyping 분석(B)을 통해 확인하였고, InDel 마커를 이용하여 생성된 PCR 증폭 산물은 자동전기영동장치(LabChip[®] GX TouchTM)를 통해 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 중 190번째에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 SNP 조성물을 제공한다.

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

[0017] 본 발명에서 용어, "뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드이며, 특별하게 다르게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오티드의 유사체를 포함한다.

[0018] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 본 발명의 SNP 마커를 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 판별에 사용할 수 있는 것은 서열번호 1로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 190번째 염기가 T 또는 G로 다르게 나타나는 것에 근거한 것이다. 구체적으로, 서열번호 1의 190번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP에서 T 염기를 갖는 배추는 배추 뿌리혹병 저항성 배추, G 염기를 갖는 배추는 배추 뿌리혹병 감수성 배추로 판단할 수 있다.

- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 배추 뿌리혹병은 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 병원균에 의해 발병한 것일 수 있고, 바람직하게는 로컬 병원균 방림(Banglim)에 의한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명은 상기 서열번호 1의 염기서열에서 SNP 위치의 염기 변이체에 관한 것이나, 이러한 SNP 염기 변이가 이중 가닥의 gDNA(게놈 DNA)에서 발견되는 경우, 상기 뉴클레오타이드 서열에 대해 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 따라서 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열에서 SNP 위치의 염기도 상보적인 염기가 된다. 이러한 측면에서, 본 명세서에 제시된 모든 서열은, 특별한 언급이 없는 한, 게놈 DNA의 센스 가닥에 있는 서열을 기준으로 한 것이다.
- [0021] 본 발명은 또한, 배추 뿌리혹병 저항성 개체와 감수성 개체 간에 InDel(insertion/deletion) 다형성을 보이는 서열번호 2 또는 3의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 InDel 마커 조성물을 제공한다.
- [0022] 상기 서열번호 2 및 3은 각각 삽입 또는 결실 부위의 염기서열을 포함하는 다형성 뉴클레오타이드이다. InDel 다형성이란 폴리뉴클레오타이드 서열 중에 일부가 중간에 더해지거나 없어져 품종 혹은 종간에 길이 차이가 생긴 경우를 포함하는 서열을 말한다. 상기 다형성 뉴클레오타이드 서열은 DNA 또는 RNA가 될 수 있다. 본 발명의 일 구현 예에 따른 InDel 조성물에 있어서, 상기 InDel 다형성 염기 정보는 도 3에 나타내었다.
- [0023] 본 발명은 또한, 상기 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 InDel 다형성을 보이는 폴리뉴클레오타이드; 또는 이의 cDNA를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 마이크로어레이를 제공한다.
- [0024] 바람직하게는 상기 다형성 뉴클레오타이드는 아미노-실란, 폴리-L-라이신 또는 알데히드의 활성기가 코팅된 기판에 고정될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 상기 기판은 실리콘 웨이퍼, 유리, 석영, 금속 또는 플라스틱일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 다형성 뉴클레오타이드를 기판에 고정화시키는 방법으로는 피에조일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로피펫팅(micropipetting)법, 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 따른 마이크로어레이는 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드, 그에 의해 코딩되는 cDNA를 이용하여 본 분야의 당업자에게 알려져 있는 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0026] 본 발명은 또한, 서열번호 4 및 5의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 6 및 7의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 8, 9 및 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 프라이머 세트 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 프라이머 세트에 있어서, 상기 서열번호 4 및 5의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 8, 9 및 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트;는 서열번호 1의 염기서열 중 190번째에 위치한 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있는 프라이머 세트로, 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추를 각각 특이적으로 구분할 수 있는 프라이머 세트이다.
- [0028] 본 발명의 프라이머 세트에 있어서, 상기 서열번호 8, 9 및 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 rhPCR(RNase H-dependent PCR)을 통해 rhAmpTM SNP Genotyping 분석을 수행하기 위해 이용될 수 있다. rhPCR은 DNA/RNA 혼성화 이중 가닥의 RNA만 특이적으로 분해하는 리보핵산가수분해효소 H2(ribonuclease H2, RNase H2)를 이용한 PCR 방법으로, rhPCR 반응용 프라이머 세트는 5'에서 3' 방향으로 SNP 위치 염기에 인접한 서열을 표적하는 DNA 염기서열, SNP 위치 염기 및 상기 SNP 위치 염기에 바로 인접한 표적 서열에 상보적인 RNA 염기의 형태로 제작되는 대립 형질 특이적(allele-specific) 프라이머 1 및 2와, 표적 서열에 상보적인 DNA 염기와 RNA 염기서열로 이루어진 좌 특이적(locus-specific) 프라이머로 이루어질 수 있다.
- [0029] 본 발명의 프라이머 세트에 있어서, 상기 서열번호 8 및 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 각각 대립 형질 특이적인 프라이머 1 및 2이고, 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 좌 특이적 프라이머이다. 상기 서열번호 8 및 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 각각 서열 내 20번째, 19번째 염기가 SNP 위치 염기이며, 각각 서열 내 21~25번째, 20~23번째 염기는 RNA 염기이다(표 8). 또한, 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 5' 말단에 서열 내의 RNA 염기를 안정화하기 위해 GC의 염기를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0030] rhPCR 기법은, RNase H2가 증폭단계의 프라이머와 주형 DNA 간의 결합(annealing) 과정에서 RNA 염기를 포함하고 있는 대립 형질 특이적인 프라이머와 주형 DNA가 결합된 RNA/DNA 이중가닥을 인식하여 프라이머 상의 RNA 가닥만을 특이적으로 분해하고, RNase H2의 RNA 분해(절단)를 통해 생성된 3' 말단의 하이드록시기(-OH)를 고도로 인식할 수 있는 변형된 중합효소에 의해서 중합반응이 개시되게 된다.
- [0031] 또한, 상기 서열번호 6 및 7의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 배추 뿌리혹병 저항성 배추 개체에서 32 bp 염기가 결실된 서열번호 2의 InDel 다형성과 뿌리혹병 감수성 배추 개체에서 32 bp 염기가 삽입된 서열번호 3의 InDel 다형성을 포함하는 서열을 증폭할 수 있는 프라이머 세트로, 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추를 각각 특이적으로 구분할 수 있는 프라이머 세트이다.
- [0032] 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.
- [0033] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 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.
- [0034] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 19개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 4의 프라이머(19개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 4의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명은 또한, 상기 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 키트를 제공한다.
- [0036] 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 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 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.
- [0037] 본 발명은 또한,
- [0038] 배추 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0039] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트 조성물을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0040] 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하는 방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 방법은 배추 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, Wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다.
- [0042] 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 수행 시 ^{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 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 조합은 상기에 기재된 바와 같다.

- [0043] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하는 방법은 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하며, 상기 증폭 단계의 산물의 검출은 HRM(high resolution melting) 분석, rhAmp 분석, DNA 칩, 겔 전기영동, 모세관 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] HRM 분석 기술은 핵산 서열에서의 변이를 확인하기 위해 사용된 상대적으로 새로운 포스트 PCR 분석 방법이다. 이 방법은 PCR 해리곡선에서 작은 차이를 감지하는 것을 기초로 한다. 이것은 RT-PCR 기기와 연결되어 사용된 염료를 갖는 dsDNA의 온도에 따른 해리 정도의 차이를 HRM 분석을 위해, 특이적으로 고안된 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고 처리한다. 또한, 증폭 산물을 검출하는 방법 중 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.
- [0045] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 서열번호 4 및 5의 프라이머 세트; 또는 서열번호 8, 9 및 10의 프라이머 세트;를 이용하여 PCR을 수행한 경우 증폭 산물의 분석은 SNP 유전형 분석(single nucleotide polymorphism genotyping) 방법을 이용할 수 있고, 바람직하게는 HRM(High resolution melting) 또는 rhAmpTM SNP Genotyping 분석 방법을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 서열번호 6 및 7의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 경우 164 bp의 단일 밴드(동형접합체)를 나타내면 뿌리혹병 저항성 배추 계통으로 판별할 수 있고, 196 bp의 단일 밴드를 나타내면 뿌리혹병 감수성 배추 계통으로 판별할 수 있다. 또한, 본 발명에서 뿌리혹병 저항성 관련 형질은 단일 우성 유전자에 의해 조절되므로, 164 bp와 196 bp의 2개의 밴드(이형접합체)를 나타내면 뿌리혹병 저항성 배추 계통으로 판별할 수 있다.
- [0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] **재료 및 방법**
- [0051] **1. 식물재료**
- [0052] 배추(*Brassica rapa*) 맵핑 집단은 배추 뿌리혹병 방범에 대해 저항성을 보이는 09CR500 및 감수성을 보이는 09CR501의 교배로 만든 F₁ 개체로부터 소포자 배양(micro spore culture)으로 유래된 배가만수체(double haploid, DH) 집단(N=81)을 이용하였다(바이오브리딩 육종 회사 제공). 상기 09CR-DH 집단의 종자를 비닐하우스에서 재배하였고, 신선한 잎을 채취하여 DNA 추출 전까지 -70℃에서 보관하였다.
- [0054] **2. 배추 뿌리혹병균 접종 및 증상 평가**
- [0055] 배추 뿌리혹병균 방범(Banglim)은 종자회사 바이오브리딩(BioBreeding Co., 한국)이 심각한 뿌리혹병이 발생한 국내 지역(강원도 평창군 방림면)에서 수집한 로컬 병원균으로, 방림 병원균의 독특한 병원성을 유지하기 위해 병원균을 배추에 지속적으로 감염시켰다.
- [0056] 구체적으로, 표현형 평가는 2009년과 2012년도에 안성과 대전의 온실에서 2 개의 부모 식물체를 포함한 81개의 DH 계통을 사용하여 수행되었다. 식물체에서 뿌리혹병 증상을 조사하기 위해, 배추 뿌리혹병균 '방림'의 포자 현탁액(2×10^6 포자/ml)을 준비한 후 포자 현탁액 5ml를 관개방법(토양 주입)으로 2주된 유묘에 접종하였으며, 배추 뿌리혹병 증상은 접종 후 6주째에 평가하였다. 혹(club) 형성의 정도에 대한 평가 기준은 도 1에 나타난 총 7개의 척도(scale)로 분류되었다. 식물체들의 평균 척도가 2 이하인 경우에 저항성으로 평가하였다.
- [0057] QTL(Quantitative trait locus)을 분석하기 위해 척도를 질병 지수(발병도, Disease Index)로 변환하였고, 질병 지수는 다음과 같은 계산식으로 계산되었다.
- [0058] 질병지수 = $[(n_1 + 2n_2 + \dots + 6n_6) / N_T \times 6] \times 100$.

[0059] n_1 부터 n_6 까지는 각 척도별로 증상이 있는 식물의 수를 나타내고, N_1 는 테스트에 사용된 총 식물의 수를 의미한다.

[0061] 3. DNA 추출

[0062] 게놈 DNA는 부모 식물체 및 DH 계통($n=81$)의 수집한 잎으로부터 CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide) 방법을 통해 추출하였다. 3개의 라운드-펀칭 시료를 tissue-lyser를 이용하여 그라인딩한 후, CTAB 버퍼 500 μ l를 포함하고 있는 1.5 ml 튜브에 옮겼다. 상기 튜브를 65℃의 항온수조에 20분간 반응시킨 후, 동량의 클로로포름:이소아밀 알콜(chloroform:isoamyl alcohol=24:1)을 첨가하고 혼합한 후 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 그 후, 동량의 98% 이소프로판올을 넣어 DNA를 침전시키고, 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. DNA 펠렛을 70%의 차가운 에탄올로 세척하고, 건조시킨 후 100 μ l의 증류수를 이용하여 녹였다.

[0064] 4. 마커 개발 및 유전형 분석

[0065] 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 개체를 판별하기 위한 마커를 개발하기 위해 이전에 보고된 'Chiifu' 및 'Kenshin' 사이로부터 개발된 SNP(single nucleotide polymorphic)와, 09CR-DH 집단을 이용한 유전자 지도 구축을 위해 InDel 영역을 표적으로 하는 106개의 프라이머 세트를 이용하였고, 유전자 지도의 프레임을 구성하기 위해 SSR 마커도 사용하였다(표 1; Mol. Breed., 2015, 35, 54. Pang et al.; Hortic. Environ. Biote., 2020, 61, 327-338, Choi et al.; BMC genomics, 2011, 12(1), 1-9, Wang Y et al.; BMC genomics 2009, 10, 432, Kim et al.). 이러한 마커 세트는 이전 유전자 지도와 현재 유전자 지도를 비교하기 위한 앵커 마커(anchor merker)로 사용되었다.

표 1

본 발명에서 사용된 마커 요약

Maker ID	Type	Plants source ^a	Number of maker	Polymorphic rate (%)
cnu_s000-483 ^b	SNP		459	24.0
cnu_i001-032	InDel	Chiifu, Kenshin	32	68.8
F00-00 ^c	SNP		192	34.4
cnu_i222-383	InDel	Chiifu, 09CR500	106	62.3
BrID&EoE615 ^d	InDel	Chiifu	8	37.5
cnu_m000a, nia_m000a ^e	SSR		10	60.0

^a The genome sequence of Chiifu (reference genome), Kenshin and '09CR500' were used to develop markers for the construction of linkage map. (reference genome v1.2, <http://brassicadb.org/brad/index.php>). ^b Pang et al. 2015; ^c Choi et al. 2020. ^d Wang et al.2011. ^e Kim et al. 2009

[0066]

[0068] 또한, 유전자 지도를 포화시키기 위해서 Genome Analyzer IIX 시스템(Illumina)과 paired-end 방식을 이용하여 30배 Illumina sequence coverage로 09CR500(저항성) 계통 시퀀싱을 수행하였다. fastqc 소프트웨어를 이용하여 시퀀스 품질을 체크하여 저품질 리드(low quality read)를 제거한 후 Bowtie2를 이용하여 정제된 리드(clean read)를 참조 유전체에 정렬하여 BAM 파일을 생성하였다. 이 과정으로 생성된 BAM 파일을 SAM tools 및 BCFtools를 이용하여 리시퀀싱된 09CR500과 참조 유전체(Chiifu) 간의 SNP 및 짧은 InDel 변이를 검출하였다. SNP 유전형 분석은 HRM 분석에 기반한 LightScanner System(Idaho Technologies, 미국)과, 96.96 Dynamic ArrayTM IFC(Fluidigm, 미국)를 이용한 Fluidigm[®] EPITM system을 통해 분석되었다.

[0070] 5. 유전자 지도의 작성 및 QTL 분석

[0071] 유전자 지도는 JoinMap version 4.0 소프트웨어(<https://www.kyazma.nl/index.php/JoinMap/>)를 이용하여 작성하였다. 연결된 유전자좌는 2.0-3.0 범위의 LOD 그룹핑 임계값(logarithm of odds threshold)을 사용하여 그룹화되었고, 총 10개의 연관 그룹(LG, linkage group)을 형성하였다. 각 연관 그룹에서 LOD 그룹핑 내 마커 순서를 배열하기 위해 재조합 빈도는 0.4보다 작게, LOD는 1보다 크게 설정하였고, 재조합 빈도는 Kosambi의 계산 방법을 이용하여 cM(centiMorgans)으로 변환하였으며, MapChart를 이용하여 유전자 지도를 작성하였다.

[0073] 6. 배추 뿌리혹병 저항성 관련 후보 유전자 탐색

[0074] QTL 영역에서 후보 유전자를 예측하기 위해 브라시카 데이터베이스(Brassica database, BRAD) 버전 3.0을 사용하였고, 후보 유전자의 도메인은 CLC genomic workbench 12.0.2(CLC 바이오, 덴마크)에서 제공하는 Pfam 데이

터베이스 버전 32.0(<https://pfam.xfam.org/>)에서 참조 유전체의 서열 분석을 통해 확인하였다.

7. 마커 개발 및 검증

본 발명에서는 참조 유전체(Chifu)와 뿌리혹병 저항성 계통인 09CR500 사이로부터 SNP 마커 및 InDel 마커를 개발하였고, 상기 SNP 및 InDel 마커를 증폭하기 위한 프라이머 세트를 제작하였다(도 3).

SNP 마커의 검증을 위해 HRM(high-resolution melting)과 rhAmpTM SNP Genotyping 분석 방법을 이용하였다. 먼저 HRM 분석을 위해 게놈 DNA(8 ng) 4 μ l, 0.25 μ M 프라이머 4 μ l, LCgreen 0.3 μ l, dNTP 0.25 μ l, 10X 완충 용액 1 μ l, 중합효소 0.03 μ l 및 증류수 0.42 μ l를 혼합하여 총 10 μ l의 PCR 반응물을 만들고, 95℃ 5분 → [95℃ 1초, 55℃ 15초, 72℃ 15초](45회 반복) → 72℃ 5분의 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 LightScanner system(BioFire Defense, 미국)을 통해 분석하였다.

또한, rhAmp 분석을 위해 DNA(3-10 ng) 2 μ l, Combined Master Mix와 Reporter Mix 5.3 μ l, rhAmp SNP Assay(20X) 0.5 μ l 및 Nuclease-Free Water 2.2 μ l를 혼합하여 총 10 μ l의 PCR 반응물을 만들고, 95℃ 10분 → [95℃ 10초, 60℃ 30초, 68℃ 20초](40회 반복) → 99.9℃ 15분의 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 CFXTM Manager software version 3.0(Bio-Rad, 미국)을 통해 분석하였다.

또한, InDel 마커의 검증을 위해 DNA(8 ng) 4 μ l, 0.25 μ M 프라이머 0.4 μ l, dNTP 0.25 μ l, 10X 완충용액 1 μ l, 중합효소 0.03 μ l 및 증류수 0.32 μ l를 혼합하여 총 10 μ l의 PCR 반응물을 만들고, 95℃ 5분 → [95℃ 30초, 55℃ 20초, 72℃ 30초](35회 반복) → 72℃ 5분의 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 LabChip[®] GX TouchTM을 통해 분석되었다.

실시예 1. 배추 뿌리혹병 저항성 확인

본 발명에서 사용된 09CR500은 배추 뿌리혹병 방림 군주에 대해 강한 저항성을 보이는 개체로 '방림'에 대해 어떠한 병증을 나타내지 않는 반면, 09CR501은 배추 뿌리혹병에 대해 심각한 병증을 보이는 감수성 개체이다. 09CR500 및 09CR501을 모부본 개체로 사용하고, 이들의 교배로 만든 F₁ 개체로부터 소포자 배양으로 유래된 배가반수체09CR-DH(n=81) 집단을 대상으로 배추 뿌리혹병에 대한 저항성을 평가하였다.

그 결과, 배추 뿌리혹병에 대한 저항성 및 감수성의 DH 개체의 분리비가 1:1이었고(표 2), 이를 통해 09CR500의 배추 뿌리혹병에 대한 저항성이 단일 우성 유전자에 의해 조절되는 것임을 알 수 있었다.

표 2

배추 뿌리혹병군 방림(Banglim)에 대한 질병지수 평가

Location	Plant Materials	Total No.	Phenotype of			Expected R _{tio} (R:S)	χ ²
			Resistance (R)	Susceptible (S)	Missing (-)		
Daejoen	09CR500	10	10	0	0	-	-
	09CR501	10	0	10	0	-	-
	DH population	81	40	40	1	1:1	0.01
Anseong	09CR500	10	10	0	0	-	-
	09CR501	10	0	10	0	-	-
	DH population	81	39	40	2	1:1	0.06

실시예 2. 전체 게놈 시퀀싱 및 유전자 지도 제작

이전에 보고된 마커(표 1)를 이용하여 09CR-DH 집단의 유전자 지도를 작성한 후 상기 지도를 포화시키기 위해 뿌리혹병 저항성 계통인 09CR500의 게놈을 이용하여 시퀀싱한 결과, 총 25.32 Gb 시퀀스(202.58 M reads) 데이터가 생성되었다. 어댑터 서열과 낮은 품질의 리드(unknown bases, N>5%)를 제거하여, Q30 기준으로 92.19%의 고품질 염기서열 23.19 Gb를 얻었다. 게놈 커버리지(genome coverage)는 43.81배이었고, 전체 서열의 약 94.10%가 평균 깊이(average depth) 87.06배로 참조 유전체(Chiifu, v 1.2)에 정렬되었다. 이후 두 게놈 간의 서열 변이를 확인한 결과, 2,401,195개의 단일염기다형성(SNP) 중에서 77.8%가 동형접합 유전자형을 가졌고, CDS 영역에 28,200개의 비동의 SNP가 있음을 확인하였다. 또한, 총 595,678개의 삽입 및 결실(InDel)이 확인되었으며, 이 중 44,291개가 CDS 영역에 위치하고 있음을 확인하였다(표 3).

표 3

총 SNP 및 InDel 분포 확인

SNPs					InDels			
Homozygous	Heterozygous	Total	Syn CDS ^a	Non-syn CDS ^b	Insertion	Deletion	Total	CDS
1,867,179	534,016	2,401,195	11,510	28,200	301,252	294,426	595,678	44,291

[0089]

[0091]

총 807개의 프라이머 세트(Mol. Breed., 2015, 35, 54. Pang et al.; Hortic. Environ. Biote., 2020, 61, 327-338, choi et al.; BMC genomics, 2011, 12(1), 1-9, Wang Y et al.; BMC genomics 2009, 10, 432, Kim et al.)를 뿌리혹병 저항성(O9CR-500) 및 이병성(O9CR-501) 부모계통 간의 다형성 조사에 사용하였다. 분석 결과, 33.8%의 분자마커에서 모부본간 다형성이 확인되었다.

[0092]

또한, JoinMap 4 프로그램을 사용한 연관 지도 제작은 222개의 마커로 총 10개의 연관 지도(A01~A10)를 만들었고, 유전자 지도는 총 길이 731.7 cM로, 좌간 평균 거리 4.4 cM를 보여주었다. 연관 그룹의 길이는 29.3 cM부터 131.2 cM 범위로 확인되었고, 각 연관 그룹 내의 마커의 수는 6~84개로 확인되었다(표 4).

표 4

본 발명의 연관 지도 요약

Chromosome	Marker No.	Map length (cM)	Marker interval (cM)	No. of Markers				
				SNP	SSR	InDel	STS	SCAR
A01	6	29.3	4.9	4	2	0	0	0
A02	15	47.3	3.2	12	1	0	0	2
A03	24	82.5	3.4	17	5	1	0	1
A04	12	43.2	3.6	11	1	0	0	0
A05	15	108.0	7.2	14	0	0	1	0
A06	18	103.2	5.7	14	3	1	0	0
A07	13	68.6	5.3	12	1	0	0	0
A08	84	70.5	0.8	25	3	56	0	0
A09	21	131.2	6.2	19	1	1	0	0
A10	14	43.9	3.1	13	1	0	0	0
Total	222	731.7	4.4	141	18	59	1	3

[0093]

[0095]

실시예 3. 배추 뿌리혹병 저항성 관련 QTL 분석

[0096]

배추 뿌리혹병 저항성 표현형과 관련된 게놈 영역을 식별하기 위해 WinQTL cartographer 2.5 및 QTL IciMapping(ICIM) 4.1 소프트웨어를 사용하여 QTL을 분석하였다. WinQTL cartographer 분석 결과, 연관 그룹 A08에서 'PbBrA08^{Banglim}-1 및 PbBrA08^{Banglim}-2'라는 두 개의 중요한 QTL을 확인하였다. 상기 PbBrA08^{Banglim}-1은 18.86~38.86 cM 영역에서 검출되었고, 인접한 마커 O9CR.11390652(29.12 cM) 위치에서 가장 높은 피크값을 보였으며, 74.8의 LOD 값과 97.1%의 표현형적 변이를 보였다. 또한, 상기 PbBrA08^{Banglim}-2는 PbBrA08-1 영역의 내부에 위치하였고, 7.9의 LOD 값과 26%의 표현형적 변이를 보였다(도 2A 및 표 5).

[0097]

연관 지도의 A08 상의 QTLs를 참조 유전체의 물리적 지도와 비교한 결과, 첫번째 QTL 'PbBrA08^{Banglim}-1'은 207,889~13,590,812 bp의 위치에, 두번째 QTL 'PbBrA08^{Banglim}-2'는 2,350,657~13,120,304 bp 위치에 대응되었다.

표 5

배추 뿌리혹병 저항성 관련 QTL 위치 요약

Loci Name	Location	Chr No.	Closest Marker	LOD	R ² (%)	Additive
<i>PbBrA08^{Banglim}-1</i>	Daejeon	8	09CR.11390652	74.8	97.1	-47.0
<i>PbBrA08^{Banglim}-2</i>	Anseong	8	09CR.11390652	7.9	26.0	-26.1

[0098]

[0100]

또한, ICIM 분석을 통해 상기 QTL이 저항성 표현형에 유의하게 연관되어 있고, 이러한 QTL에서 배추 뿌리혹병 저항성 관련 유전자 13개(8개의 TIR-NBS-LRR class 및 5개의 F-box)가 확인되었다(표 6).

표 6

본 발명의 QTL에 존재하는 배추 뿌리혹병 저항성 관련 유전자 정보

Gene ID		Gene position (bp) ^a		Protein description ^c
v1.2	v3.0 ^b	Start	End	
Bra020979	BraA08g013240.3C	11,388,577	11,391,460	Receptor like protein/ LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
Bra020974	BraA08g013300.3C	11,427,768	11,428,159	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
Bra020948	BraA08g013630.3C	11,635,390	11,636,598	F-box/kelch-repeat protein
Bra020945/ Bra020942	BraA08g013650.3C	11,658,233	11,659,423	F-box/kelch-repeat protein
Bra020936	BraA08g013970.3C	11,696,216	11,696,785	Disease resistance protein TAO1
Bra020928	BraA08g014070.3C	11,752,980	11,756,408	Leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase
Bra020918	BraA08g014190.3C	11,809,250	11,815,278	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
Bra020901/ Bra020902	BraA08g014340.3C	11,921,301	11,924,248	F-box protein
Bra020877/ Bra020876	BraA08g014690.3C	12,162,113	12,169,372	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
Bra020861	BraA08g014830.3C	12,271,553	12,276,276	Disease resistance protein TAO1
Bra020860	BraA08g014850.3C	12,289,217	12,290,401	F-box protein
-	BraA08g014890.3C	12,326,397	12,329,524	Protein STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY/Leucine-rich repeat receptor protein kinase/Probable serine/threonine-protein kinase
Bra020847	BraA08g014970.3C	12,365,097	12,366,311	F-box protein

^a Physical location in *B. rapa* version 3.0. ^b Gene ID used data released after November 13, 2019. ^c Gene functions were assigned according to the best match of the alignments against Swiss-port databases (<https://www.uniprot.org/>) using BLASTP v2.9.0+ and Pfam database version 32.0 (<https://pfam.xfam.org/>)

[0101]

[0103]

실시예 4. 배추 뿌리혹병 저항성 관련 QTL 기반 분자마커 개발 및 저항성 판별능 분석

[0104]

배추 뿌리혹병에 대해 저항성을 보이는 09CR500 개체와 감수성을 보이는 Chiifu를 대상으로 QTL(*PbBrA08^{Banglim}*) 영역에 해당하는 염기서열을 비교하여 변이를 분석한 결과, 단일염기서열변이(Single Nucleotide Variation, SNV) 15,739개, 결실(deletion) 1,347개, 삽입(insertion) 1,873개 및 치환(substitution) 166개를 확인하였다. 또한, *PbBrA08^{Banglim}*에 존재하는 배추 뿌리혹병 저항성 후보 유전자 13개(표 6) 중에서 *BraA08g013300.3C* 및 *BraA08g013970.3C* 유전자는 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 유전자형 간에 변이가 없음을 확인하였고, 나머지 11개 유전자에서 802개 변이 위치를 확인하였다.

[0105]

그 다음, *BraA08g013300.3C*, *BraA08g013970.3C*, *BraA08g013630.3C* 및 *BraA08g014890.3C* 유전자를 제외한 나머지 9개 유전자의 서열 변이에 기반하여 총 34개의 프라이머를 설계하여 유전자형 분석을 수행한 결과, *PbBrA08^{Banglim}*과 밀접한 연관을 보이는 SNP 마커(09CR.11390652)와 InDel 마커(09CR.11755754)를 개발하였고(도 2B), 상기 마커를 증폭하기 위한 프라이머 세트를 제작하였다(표 7 및 표 8).

표 7

본 발명의 SNP 및 InDel 마커 정보

Maker ID	Marker Type	Locus name	Primer information(5'→3')(서열번호)	
			Forward	Reverse
09CR.11390652	SNP-HRM	<i>PbBrA08^{Banglim}</i>	TCCGAGCCAAAAGAACAAG(4)	CAACCCACAAAACACACCA(5)
09CR.11755754	InDel		TCGCTCCAGGTACATAACT(6)	ACTAACCATGTCAAACCTGC(7)

[0106]

표 8

본 발명의 SNP 및 InDel 마커 정보

Maker ID	Marker Type	Locus name	Primer information(5'→3')(서열번호)	
			Allele Specific Primer 1	Allele Specific Primer 2
09CR.11390652	SNP-rhAmp	<i>PbBrA08^{Banglim}</i>	TCCCAGCTGAAATCCAACrArTrCrArC(8)	CCCAGCTGAAATCCAACrArTrCrA(9)
			Locus Specific Primer	GCCATGTCCTAATCCTACACCrArGrA(10)

(상기 rA, rT, rC, rA, rG는 RNA 염기)

[0107]

[0109]

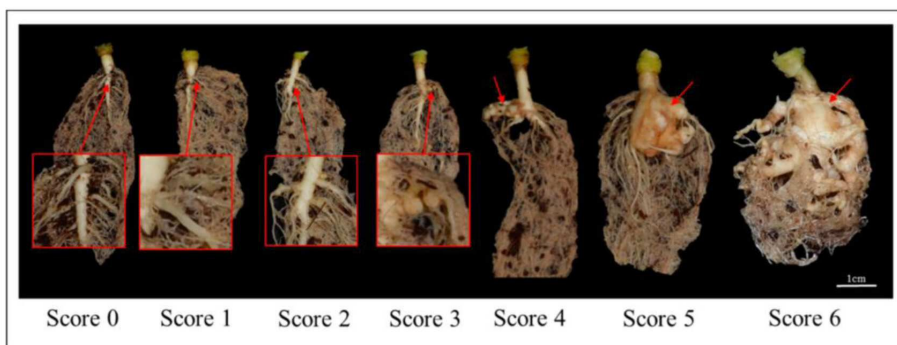
상기 제작된 SNP 또는 InDel 마커 증폭용 프라이머 세트를 각각 이용하여 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 계통의 판별능을 분석하였다. 먼저 서열번호 4 및 5의 SNP 마커 증폭용 프라이머 세트를 이용한 HRM(High Resolution Melt) 분석과 서열번호 8, 9 및 10의 SNP 마커 증폭용 프라이머 세트를 이용한 rhAmp 분석을 수행한 결과, SNP에 따라 배추 뿌리혹병 저항성 또는 감수성 배추 계통이 정확하게 구별되었고, 모부분 개체 09CR500(저항성) 및 09CR501(감수성)의 F₁ 개체는 이형접합 유전자형(heterozygous, H)인 것으로 확인되었다(도 4A 및 4B).

[0110]

또한, 서열번호 6 및 7의 InDel 마커 증폭용 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 후 PCR 산물을 전기영동 수행한 결과, 뿌리혹병 저항성 계통에서는 164 bp 크기의 밴드가 나타났고, 감수성 계통에서는 196 bp 크기의 밴드가 나타난 것을 확인하였다. 또한, F₁ 개체에서는 두개의 밴드 패턴이 모두 나타나 이형접합 유전자형을 가진 개체임을 확인하였고, 배추 뿌리혹병균 방림에 대해 저항성을 나타내는 09CR500 계통이 단일 우성 유전자에 의해 조절되는 특성에 따라 F₁ 개체는 배추 뿌리혹병에 대해 저항성을 가지는 개체임을 알 수 있었다(도 4C).

도면

도면1



Score 0 : no symptoms

Score 1 : very slight swelling, usually confined to lateral root

Score 2 : a few tiny globular nodules on the lateral roots

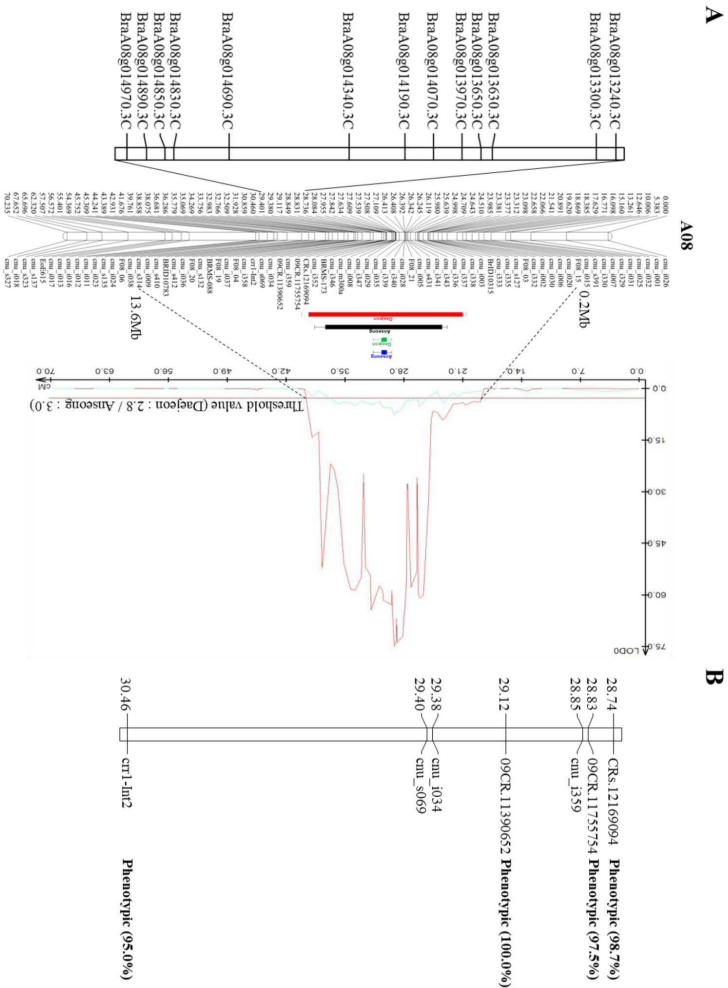
Score 3 : several small sized nodules on lateral roots

Score 4 : large clubs on lateral roots joining together to form a lump and slight swelling of main roots

Score 5 : large clubs on main roots

Score 6 : severe clubs (lumps) formation all over roots and complete change of root morphology

도면2



도면3

A

저항성 : 09CR-500 = T
감수성 : Chiifu = G
CATGAACCTCTCCATAACAATCTCCAAGGTCCAATACCACGAAGCACACAGTTTCAAAGACAAAAGTGTCTGCGTTCA
TGGATAACCTAGACTCTACGGTCTCGAAGATATATGTGGAAAAATTCATGTCCCTAATCCTACACCACAAGAGTCCGAAG
ATCTGTCCGAGCCAAAGAACAAGTGAT[T/G]AGTTGGATTTCAGCTGGGATAGCCTATGGACCTGGTGTGTTTGTG
GGTTGGTGATTGGACATAGATTCTCTCCACGCATACACAATTGGTTCATGTAAGTTCTATCGAAAGCAAGCACAAAAT
AGTCGCCAAA

Primer binding site

SNP position

B

저항성 : 09CR-500 = T
감수성 : Chiifu = G
CAAGGTCCAATACCACGAAGCACACAGTTTCAAAGACAAAAGTGTCTGCGTTCATGGATAACCTAGACTCTACGGTCT
CGAAGATATATGTGGAAAAATTCTGTCCCTAATCTACACCAAGAGTCCGAAGATCTGCCGAGCCAAAGAACA
GTGAT[T/G]AGTTGGATTTCAGCTGGGATAGCCTATGGACCTGGTGTGTTTGTGGGTGGT

Allele Specific Primer 1 5'
Allele Specific Primer 2 5'

Primer binding site

SNP position

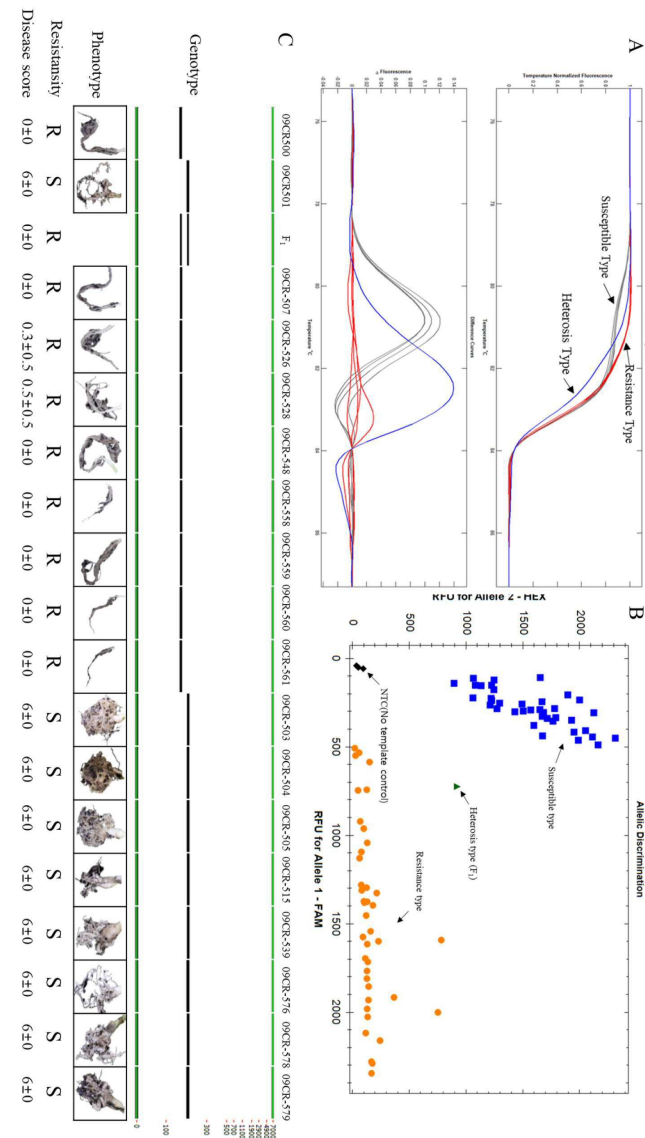
C

저항성 : 09CR-500 = Deletion
감수성 : Chiifu = ATACATGCCAAAATCTATTAGTTTGGCATA, T
TTTATGATGCAAGATGATGGAGCTTCTGAGTGTATGTCATCAGTCGCAGGCTCGTATGGATACAACGCTCCAGGTACATA
ACTGATTCCTCAAC[C/A]CTTGTCTTTCG[A/G]TTACACGTAATA[G/A]TACTTACGGTTAGGCATTAGGTTTCCGTTTCGG
TTGTTTCATGTTTGGCTTATTAGTTTGGGATA[-----/ATACATGCCAAAATCTATTAGTTTG
GCATA]GTTGTCTTTTTTTT[-/T]GAACGACAGTTTG[G/A]CATGGTTAGTCAAAATCCATAATTGCATATTAAAT

Primer binding site

InDel position

도면4



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Marker composition for discriminating chinese cabbage clubroot disease-resistant or sensitive cabbage cultivar and uses thereof
- <130> PN21029
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 326
- <212> DNA
- <213> Brassica rapa

<400> 1

catgaacttc tcccataaca atctccaagg tccaatacca cgaagcacac agtttcaaag 60

acaaaactgt tctgcgttca tggataaccc tagactctac ggtctcgaag atatatgtgg 120

aaaaattcat gtcctaate ctacaccaca agagtccgaa gatctgtccg agccaaaaga 180

acaagtgatt agttggattt cagctgggat agcctatgga cctgggtgtgt tttgtgggtt 240

ggtgattgga catagattct ctccacgcat acacaattgg ttcattgtaa agttctatcg 300

aaagcaagca caaaatagtc gccaaa 326

<210> 2

<211> 254

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 2

tttatgatgc aagatgatgg agcttctgag tgtatgtcat cagtcgcagg ctcgatgga 60

tacatcgctc caggtaacata actgattccc aacccttggt tcttgcatca cacgtaatag 120

tacttacggt taggcattta ggtttccgtt cggtttgttt catgttttgg cttatttagt 180

ttgggatagt ttgtcttttt ttttgaacgg cagtttggca tggttagtca aaatccataa 240

tttgcatatt aaat 254

<210> 3

<211> 286

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 3

tttatgatgc aagatgatgg agcttctgag tgtatgtcat cagtcgcagg ctcgatgga 60

tacatcgctc caggtaacata actgattccc aacacttggt tcttgcttca cacgtaataa 120

tacttacggt taggcattta ggtttccgtt cggtttgttt catgttttgg cttatttagt 180

ttgggataat acatgccaaa atctatttag ttggcatag ttgtctttt tttttgaac 240

ggcagtttga catggttagt caaaatccat aatttgcata ttaaat 286

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4
tcgctccagg tacataact 19

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 5
caaccacaa aacacacca 19

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 6
tcgctccagg tacataact 19

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 7
actaaccatg tcaaactgc 19

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 8
tcccagctga aatccaacta atcac 25

<210> 9
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

cccagctgaa atccaactca tca 23

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gccatgtccc taatcctaca ccacaaga 28