



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0149423
(43) 공개일자 2023년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01) C12Q 1/686 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 1/686 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0048611
(22) 출원일자 2022년04월20일
심사청구일자 2022년04월20일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이궁주
세종특별자치시 남세종로 160, 107동 1001호(집현동, 새나루마을1단지)
송하영
대전광역시 유성구 죽동로 251, 303동 1701호(죽동, 푸르지오아파트)
(74) 대리인
최규환

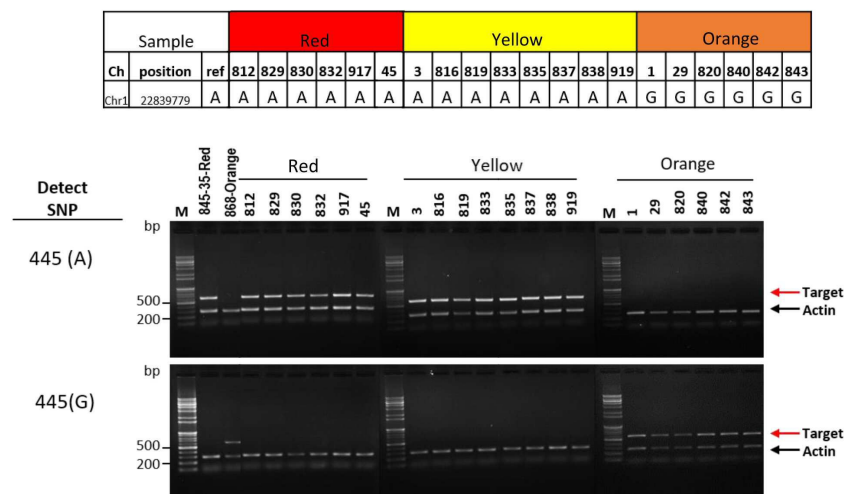
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 주황색 과육의 수박 판별용 SNP-PCR 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 주황색 과육의 수박 판별용 SNP-PCR 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 프라이머 세트는 적색 및 노란색 과육의 수박과 주황색 과육의 수박을 조기에 효율적으로 판별할 수 있어 육종에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감할 수 있으며, 수박 품종의 분자유종 연구 및 수박 육종 산업에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545026577
과제번호	322071031HD050
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	디지털육종전환기술개발
연구과제명	박과채소 유전체 정보기반 원예형질 분자표지 개발 및 고도화
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2022.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 4 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 7 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는, 수박 과육색 판별용 프라이머 세트 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 수박 과육색은 적색, 주황색 또는 노란색인 것을 특징으로 하는, 수박 과육색 판별용 프라이머 세트 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 조성물; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 수박 과육색 판별용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

청구항 5

수박 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제2항의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 조성물을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 수박 과육색을 판별하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 젤 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 주황색 과육의 수박 판별용 SNP-PCR 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수박(*Citrullus lanatus*)은 박과(Cucurbitaceae) 작물 중 하나로, 약 4천년 전 아프리카에서 유래되었으며 현재는 전세계적으로 재배되고 있다. 수박은 열매의 모양, 표면 무늬의 색깔, 과육의 색깔 등으로 구별할 수 있다. 수박은 원형, 아원형, 길쭉한 원통형 등 다양한 모양의 품종들이 있으며, 수박을 재배할 때 일정한 틀을 이용하여 만들어진 사각 수박은 수박 품종에 포함되지 않는다. 우리나라에서는 주로 원형 또는 아원형의 수박 품종을 재배하고 있으며 같은 모양이더라도 표면의 색깔이 초록 및 검초록빛이 나는 품종 등이 재배되고 있다. 또한, 과육의 색이 적색, 주황색, 노란색 등을 띠는 다양한 수박 품종이 있으며, 우리나라를 비롯하여 세계적으로 주로 적색 품종이 많이 재배되고 있다. 수박은 주로 생과일, 화채, 주스 등으로 섭취하고, 종자는 건조시켜 볶은 후 간식으로 섭취할 수 있다. 종자는 단백질, 지방 및 탄수화물이 풍부하고, 과육은 수분함량이 높다. 과육에는 영양소가 풍부하지 않으나, 적색 과육 품종의 경우 리코펜의 함량이 6,300~6,800 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 으로 매우 높다. 최근 기능성 수박의 수요증가로 인해 다양한 과육색의 품종 개발이 중요한 수박 육종의 목표가 되고

있다.

[0003] 분자표지를 이용한 선발(marker-assisted selection, MAS)은 최근 유전체 서열정보가 대량 보급되면서 점차 이용이 확대되었고, 대량의 유전자원을 표준 유전체 서열과 비교하여 유전체 재분석(genome resequencing)이 가능해지면서 수박에서도 기존의 유전자지도(genetic map) 작성과 양적형질유전자좌(quantitative trait locus)의 탐색 없이도 형질연관 SNP와 이를 기반으로 한 분자표지 개발이 가능해졌다. 유전체 재분석은 기존에 공개된 표준 유전체 데이터를 참조하여, 시퀀싱을 수행하는 개체의 서열 단편들을 맞추어 나가며 분석하는 방식을 말한다. 이와 같이 개체의 염기서열 정보를 공개된 표준 유전체와 비교하여 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 및 상기 SNP를 기반으로 한 특정 형질에 대한 분자마커의 개발이 가능하며, 유전자형 분석(genotyping)이 가능하게 되었다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제2011117호에는 수박의 *TRAPPC3*(Trafficking protein particle complex subunit 3, *Cla004209*) 유전자 내 SNP에 기반한 '적색 과육의 수박 품종 선발용 CAPS 마커 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1805164호에는 과채류의 *CYC-B*(chromoplast-specific lycopene β -cyclase) 유전자 프로모터에 위치한 SNP 검정을 통한 '과채류의 오렌지 과색 판정방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 수박 *Psy1*(Phytoene synthase 1) 유전자 내 SNP에 기반한 '주황색 과육의 수박 판별용 SNP-PCR 마커 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 주황색, 적색 및 노란색 과육의 수박 유전자원 내 카로티노이드 함량을 측정하여 주황색 과육의 수박에 베타-카로틴 성분이 가장 많이 함유되어 있음을 확인하였고, 이러한 베타-카로틴이 다량 함유된 주황색 과육은 *Psy1*(Phytoene synthase 1) 유전자와 관련이 있음을 확인하였다. 이후 주황색, 적색 및 노란색 과육의 수박 유전자원의 유전체 정보와 표준유전체의 염기서열 정보를 맵핑하여 *Psy1*(Phytoene synthase 1) 유전자 내 다형성을 보이는 단일염기다형성(SNP) 마커를 발굴한 후 적색 및 노란색 과육의 수박에 특이적인 SNP 기반 프라이머 세트와 주황색 과육의 수박에 특이적인 SNP 기반 프라이머 세트를 제작하였으며, 상기 제작된 프라이머 세트가 적색 및 노란색 과육의 수박과 주황색 과육의 수박을 효과적으로 판별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 4 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 7 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는, 수박 과육색 판별용 프라이머 세트 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 조성물; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 수박 과육색 판별용 키트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 수박 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 조성물을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 수박 과육색을 판별하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 프라이머 세트는 적색 및 노란색 과육의 수박과 주황색 과육의 수박을 조기에 효율적으로 판별할 수 있어 육종에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감할 수 있으며, 수박 품종의 분자유종 연구 및 수박 육종 산업에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 적색, 주황색 및 노란색 과육의 수박을 대상으로 카로티노이드 함량(A)과 카로티노이드 생합성 관련 유전자인 *Psy1*(Phytoene synthase 1)과 *Psy2*의 발현량(B)을 측정한 결과이다. DPA: Day after Pollination.

도 2는 적색 및 노란색 과육의 수박과 주황색 과육의 수박의 *Psy1* 유전자 CDS(coding sequence) 445번째에 존재하는 SNP 위치(A)와 상기 SNP에 기반하여 제작된 프라이머 세트의 염기서열 정보(B)를 보여준다. 노란색: 인위

적으로 변형된 염기.

도 3은 적색 및 노란색 과육의 수박에 특이적인 SNP 기반 프라이머 세트(Red, Yellow flesh CIPSY1 445(A) specific primer; 표 6의 서열번호 1, 2, 3 또는 4와 서열번호 9)와 주황색 과육의 수박에 특이적인 SNP 기반 프라이머 세트(Orange flesh CIPSY1 445(G) specific primer; 표 6의 서열번호 5, 6, 7 또는 8와 서열번호 9)를 이용하여 적색 및 주황색 과육의 수박 유전자원을 대상으로 PCR을 수행한 결과로, A는 다양한 annealing temperature(60℃, 61℃, 62℃) 및 cycle 수(28, 30)의 조건으로 PCR을 수행하여 수박 과육색 판별을 위한 프라이머 세트를 선발한 결과이고, B는 선발된 프라이머 세트와 반응 조건을 이용하여 적색 또는 주황색 과육의 수박 유전자원을 대상으로 PCR을 수행한 결과이다.

도 4는 적색 및 노란색 과육의 수박에 특이적인 SNP 기반 프라이머 세트(서열번호 4 및 9), 또는 주황색 과육의 수박에 특이적인 SNP 기반 프라이머 세트(서열번호 7 및 9)를 이용하여 표 1의 수박 유전자원을 대상으로 PCR을 수행한 결과이다.

도 5는 적색 및 노란색 과육의 수박에 특이적인 SNP 기반 프라이머 세트(서열번호 4 및 9), 또는 주황색 과육의 수박에 특이적인 SNP 기반 프라이머 세트를 이용하여 표 2 및 표 3의 수박 유전자원을 대상으로 PCR을 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 4 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 7 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는, 수박 과육색 판별용 프라이머 세트 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 프라이머 세트 조성물에 있어서, 상기 수박 과육색은 적색(red), 주황색(orange) 또는 노란색(yellow)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0013] 본 발명의 프라이머 세트 조성물은 바람직하게는 상기 2개의 프라이머 세트에 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 프라이머 세트를 포함하며, 바람직하게는 2개의 프라이머 세트를 모두 포함할 수 있다.
- [0014] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 4, 7 및 9의 서열 내의 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 4의 프라이머(25개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 4의 서열 내의 22개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 4, 7 및 9의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 서열번호 4 및 7의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 정방향 프라이머이며, 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 역방향 프라이머이다.
- [0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 수박 과육색 판별용 프라이머 세트에 있어서, 상기 서열번호 4 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 또는 서열번호 7 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 서열번호 10의 수박 유래 *PsyI*(Phytoene synthase 1) 유전자의 염기서열 중 445번째 염기에 위치한 SNP 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있다.
- [0017] 구체적으로, 서열번호 4 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 적색 및 노란색 과육의 수박 유래 *PsyI* 유전자의 염기서열 중 445번째에 위치한 SNP 염기(A)를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있으며, 서열번호 7 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 주황색 과육의 수박 유래 *PsyI* 유전자의 염기서열 중 445번째에 위치한 SNP 염기(G)를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있다. 따라서, 서열번호 4 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하면 적색 및 노란색 과육의 수박을 판별할 수 있고, 서열번호 7 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하면 주황색 과육의 수박을 판별할 수 있다.
- [0018] 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.
- [0019] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic aci

d)을 포함할 수 있거나, 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.

- [0020] 본 발명은 또한, 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 조성물; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 수박 과육색 판별용 키트를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 키트에 있어서, 상기 수박 과육색은 적색(red), 주황색(orange) 또는 노란색(yellow)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 키트에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 수박 과육색 판별용 키트는 또한 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 진단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.
- [0024] 본 발명은 또한,
- [0025] 수박 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0026] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 조성물을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0027] 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 수박 과육색을 판별하는 방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 프라이머 세트 조성물과 수박 과육색은 전술한 것과 같다.
- [0029] 본 발명의 방법은 수박 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 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. 표적핵산을 증폭하는 방법은 중합효소 연쇄반응(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 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 이용 가능한 키트를 이용할 수도 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 수박 시료는 수박의 잎, 줄기, 과피, 과육 또는 종자 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 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.
- [0032] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 수박 과육색을 판별하는 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하며, 상기 증폭 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, ABe 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.

[0033] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 서열번호 4 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하여 적색, 주황색 및 노란색 과육의 수박 계층 DNA를 주형으로 PCR을 수행한 경우 적색 또는 노란색 과육의 수박 시료에서 증폭 반응을 보이면 주황색 과육의 수박으로부터 적색 또는 노란색 과육의 수박을 판별할 수 있고, 상기 서열번호 7 및 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 경우 주황색 과육의 수박 시료에서 증폭 반응을 보이면 적색 또는 노란색 과육의 수박으로부터 주황색 과육의 수박을 판별할 수 있다.

[0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 재료 및 방법

[0038] 1. 수박 유전자원 및 수박 유전체 재분석

[0039] 유전체 재분석(genome resequencing)에 활용된 수박 유전자원은 국내 육종회사에서 자체 육성된 순계(>F4~F8세대)가 분양된 자원으로, 적색 과육의 수박 6개, 노란색 과육의 수박 8개, 주황색 과육의 수박 6개로 구성되어 있다(표 1). 상기 순계의 유전체 재분석 결과 주황색 과육에 특이적인 대립유전자 연관 SNP에 기반한 프라이머 세트의 검증에는 국내에서 재배 유통되고 있는 다양한 과육색의 수박 유전자원을 사용하였다(표 2 및 표 3).

표 1

본 발명에서 사용된 수박 유전자원 (1)

S. No	Cultivar (generation)	Fruit shape	Skin color	Stripe type	Flesh color	Typical Picture
1	812(F8)	Circular	Green	Jubile	Red	
2	829(F8)	Elliptic	Green	Jubile	Red	
3	830(F8)	Elliptic	Black	Crimson	Red	
4	832(F8)	Elliptic	Bluish violet	Non (Solid)	Red	
5	917(F4)	Circular	Green	Jubile	Red	
6	45(F6)	Circular	Ultramarine blue	Jubile	Red	
7	3(F8)	Circular	Green	Jubile	Yellow	
8	816(F8)	Circular	Green	Jubile	Yellow	
9	819(F8)	Circular	yellow	Non (Solid)	Yellow	
10	833(F8)	Elliptic	Green	Jubile	Yellow	
11	835(F5)	Elliptic	Black	Non (Solid)	Yellow	
12	837(F8)	Elliptic	Black	Non (Solid)	Yellow	
13	838(F8)	Elliptic	Black	Non (Solid)	Yellow	
14	919(F4)	Circular	yellow	Jubile	Yellow	
15	1(F8)	Circular	Green	Jubile	Orange	
16	29(F8)	Elliptic	Yellow green	Non (Solid)	Orange	
17	820(F8)	Circular	yellow	Jubile	Orange	
18	840(F8)	Elliptic	Yellow green	Non (Solid)	Orange	
19	842(F8)	Elliptic	Black	Non (Solid)	Orange	
20	843(F8)	Elliptic	Black	Non (Solid)	Orange	

[0040]

표 2

본 발명에서 사용된 수박 유전자원 (2)

Generation	Accessions	Fruit shape	Skin color	Stripe type	Flesh color	Typical Picture
F8	1	Circular	Black	Non(Solid)	Red	
F8	3	Elliptic	Green	Jubile	Red	
F8	5	Circular	Green	Jubile	Yellow	
F8	6	Circular	Black	Non(Solid)	Yellow	
F8	7	Circular	Green	Jubile	Yellow	
F8	8	Elliptic	Black	Non(Solid)	Yellow	
F8	9	Circular	Green	Jubile	Orange	
F8	10	Elliptic	Green	Jubile	Orange	
F8	11	Elliptic	Black	Non(Solid)	Orange	
F8	12	Elliptic	Black	Non(Solid)	Orange	

표 3

본 발명에서 사용된 수박 유전자원 (3)

Generation	Flesh color	Accessions
F8	Red	105, 110, 115, 120, 130
F8	Yellow	102, 103, 104
F8	Orange	101, 128, 129

2. 수박 유전체 재분석(whole genome resequencing) 및 SNP 탐색

상기 표 1 내지 3의 수박 유전자원의 종자를 플라스틱 셀 트레이에 과종하고 온실(충남대학교, 한국)에서 재배한 후 실생의 2~3번째 잎을 채취하여 액체질소에 곧바로 동결시킨 후 -80°C 에서 보관하였다. DNA는 0.2g의 잎 조직을 이용하여 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide) 방법으로 추출하였고, DNA 순도와 농도는 Nanodrop 1000 Spectrophotometer(Thermo Scientific, 미국)을 이용하여 측정하였다. 유전체 재분석을 위해 최종 quality 및 quantity check($1.6\text{--}2.2$ at $260/280$, >1.62 at $260/230$, and $>30\text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)를 통과한 고순도 DNA는 국내 유전체분석 회사에 의뢰하였다.

유전체 재분석은 Illumina사의 Hiseq 2000과 Nextseq의 paired-end sequencing 방법을 이용하여 수행하였고, 이를 위해 100~150 bp의 짧은 DNA 단편을 위한 라이브러리를 제작하였으며 염기분석 후 SolexaQA package(v.1.13)을 통해 3가지 기준[(1) p-value 0.05, (2) Phred score (the accuracy of base calling value between 0 and 40, Dynamic Trim ≥ 20), (3) short read length (length sort) ≥ 25 bp]을 통과한 염기서열 정보만을 분석에 활용하였다.

그 다음, 수박 표준 유전체(97103 v1, <http://cucurbitgenomics.org/>)에 맵핑하여 각각 유전자원 특이 SNP 매트릭스를 만들었고, 이 중 신뢰성이 낮은 SNP, 즉 품질기준[read depth <3 , mapping quality <30 , biallelic SNP(InDel), unmapped reads]을 통과하지 못한 SNP는 제거하였다. 필터링된 SNP는 동형접합(homozygous, $\geq$

90% of reads), 이형접합(heterozygous, 40-60% of reads) 및 동형접합 또는 이형접합으로 구별할 수 없는 다른 종류로 분류되었다.

[0049] 3. PCR

[0050] 수박 과육색 판별용 프라이머 세트 선발을 위한 PCR은 게놈 DNA(10 ng), 10 pmol의 정방향 프라이머(표 6의 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8) 및 역방향 프라이머(표 6의 서열번호 9), PCR premix(EzPCR™ XO 5x Premix, ELPIS-BIOTECH, 한국) 및 증류수가 혼합된 총 20 μ l의 혼합물을 사용하여 수행하였다.

[0051] PCR 과정은 전변성 94℃ 5분; 변성(denaturation) 94℃ 30초, 결합(annealing) 60/61/62℃ 30초, 신장(extension) 72℃ 30초의 과정을 총 28/30회 반복; 최종 신장 72℃ 5분의 조건으로 수행하였다. PCR 증폭 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였다.

[0052] 선발된 프라이머 세트를 사용하여 마커의 SNP 감지 정확도와 과육색 판별 정확도 검정을 위한 PCR은 게놈 DNA(10 ng), 각각 10 pmol의 적색 및 노란색 과육의 수박에 특이적인 SNP 기반 프라이머 세트(정방향 프라이머, 서열번호 4; 및 역방향 프라이머, 서열번호 9) 또는 10 pmol의 주황색 과육의 수박에 특이적인 SNP 기반 프라이머 세트(정방향 프라이머, 서열번호 7; 및 역방향 프라이머, 서열번호 9), PCR 반응 대조군으로써 수박의 actin(Cla007792)유전자 증폭을 위한 10 pmol의 정방향 프라이머(5'-GTACCTGCCATGTATTGTTGCCAT-3', 서열번호 11) 및 역방향 프라이머(5'-CCTCTCTCAGTGAGAATCTTCATC-3', 서열번호 12), PCR premix(EzPCR™ XO 5x Premix, ELPIS-BIOTECH, 한국) 및 증류수가 혼합된 총 20 μ l의 혼합물을 사용하여 Multiplex PCR을 수행하였다.

[0054] 실시예 1. 수박 과육색과 카로티노이드 생합성 관련 유전자의 연관성 검증

[0055] 적색, 주황색 및 노란색 과육의 수박을 대상으로 색좌표 값(ΔE^* ab; CR-400/410 색차 색도계(Konica Minolta, 일본) 사용; PLoS ONE, 2019, 14(10), e0223441) 및 카로티노이드 함량과 카로티노이드 생합성의 첫단계에 관여하는 *Psy1*(Phytoene synthase 1) 유전자와 *Psy2* 유전자의 발현량을 측정하였다.

표 4

3색 과육별 수박의 과육에서 색좌표 값(ΔE*ab) 및 카로티노이드 함량 측정

Sample	generation	Color-difference meter				Fruit color	Sugar contents (br ix. g/100g)	Lutein (mg/g)	Lycopene (mg/g)	β-carotene (mg/g)	Phytoene (mg/g)
		L*	a*	b*	ΔE*ab						
845-35	F4	54.19	30.42	20.45	5.64	Red	8.9	N.D	0.32	0.35	0.15
868	F4	67.24	11.95	38.76	28.72	Orange	7.0	N.D	0.01	0.59	0.14
884-5	F4	74.68	2.95	50.76	45.31	Yellow	9.1	N.D	0.00	0.06	0.05

L* : 명도
a* : 적색(+)과 녹색(-)의 정도를 나타내는 일체 좌표 값
b* : 노란색(+)과 파란색(-)의 정도를 나타내는 일체 좌표 값
ΔE: 색공간에서 두 색의 위치 사이의 거리

[0056]

[0058] 먼저 카로티노이드 함량을 측정한 결과, 적색 및 노란색 과육의 수박에 비해 주황색 과육의 수박에서 베타-카로틴(β-carotene)이 가장 많이 함유된 것을 확인하였다(표 4 및 도 1A).

[0059] 또한, 수박 과육의 성숙에 따른 *Psy1*과 *Psy2* 유전자의 발현 수준을 측정한 결과, 성숙 기간이 증가됨에 따라 *Psy2* 유전자에 비해 *Psy1* 유전자의 발현 수준이 더 높은 것을 확인하였다(도 1B). 상기 결과를 통해, 적색 및 노란색 과육의 수박과 베타-카로틴이 다량 함유된 주황색 과육의 수박을 판별하기 위한 마커 개발에 있어서 *Psy1* 유전자를 표적 유전자로 선발하였다.

[0061] 실시예 2. 수박 과육색 판별을 위한 SNP 마커 발굴

[0062]

차세대염기서열분석(Next Generation Sequencing, NGS) 기술 중 하나인 유전체 재분석을 통해 표 1의 수박 유전 자원 계통의 전장 계통 서열 데이터를 얻은 후 염기서열 분석을 수행한 결과, 수박의 1번 염색체와 8번 염색체에서 적색 및 노란색 과육의 수박과 주황색 과육의 수박 간의 SNP가 존재함을 확인하였으며, 1번 염색체에 *Psy1*(Phytoene synthase1, *Clao009122*) 유전자가 존재함을 확인하였다(표 5).

표 5

베터-카로틴이 다량 함유된 주황색 과육의 수박 선발용 SNP 마커 탐색																										
Chr	Position	Ref	Allele	Orange flesh										Red flesh					Yellow flesh				Feature	description		
				1	29	820	840	842	843	45	812	829	830	832	917	3	816	819	833	835	837	838			919	
Chr1	22060784	G	G/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	A/A	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A	G/G	A/A	G/G	A/A	Intron	Transmembrane protein 53		
Chr1	22114183	A	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	CDS	Unknown Protein	
Chr1	22114194	A	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	CDS	Unknown Protein	
Chr1	22115647	A	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	N	Intron	Unknown Protein	
Chr1	22115689	T	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	T/T	Intron	Unknown Protein	
Chr1	22115901	C	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	C/C	T/T	C	Intron	Unknown Protein
Chr1	22132976	G	G/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	A/A	G/G	A/A	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A	G/G	A/A	Intron	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	
Chr1	22134019	A	A/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A	C/C	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	Intron	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	
Chr1	22134121	A	A/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A	C/C	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	Intron	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	
Chr1	22134568	T	T/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	A/A	T/T	T/T	T/T	A/A	Intron	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	
Chr1	22135604	A	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	Intron	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	
Chr1	22135953	A	A/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	A/A	A/A	T/T	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	T/T	T	Intron	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	
Chr1	22137066	C	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T	Intron	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	
Chr1	22137124	T	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	Intron	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	
Chr1	22137140	C	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	C/C	T/T	Intron	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	
Chr1	22137374	A	A/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	A/A	A/A	T/T	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	T/T	A/A	A/A	A/A	A/A	T/T	CDS	Pentatricopeptide repeat-containing protein	
Chr1	22173861	T	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T	Intron	RNA-binding protein 5/10	
Chr1	22742900	C	C/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G	Intron	Phytoene synthase	
Chr1	22838779	A	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	CDS	Sucrose synthase 5	
Chr1	22901586	C	C/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	Intron	Oxidoreductase (NADH dehydrogenase)	
Chr8	20519148	T	T/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	G/G	T/T	G/G	G/G	T/T	T	Intron	Bi functional arginine demethylase and lysyl-hydroxylase JHDB	
Chr8	20452929	C	C/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	Intron	Bi functional arginine demethylase and lysyl-hydroxylase JHDB	
Chr8	20455966	C	C/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	Intron	Bi functional arginine demethylase and lysyl-hydroxylase JHDB	
Chr8	20458887	T	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	T	Intron	Bi functional arginine demethylase and lysyl-hydroxylase JHDB	
Chr8	20463863	G	G/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G	Intron	Bi functional arginine demethylase and lysyl-hydroxylase JHDB	
Chr8	20463881	G	G/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G	Intron	Bi functional arginine demethylase and lysyl-hydroxylase JHDB	
Chr8	20502246	G	G/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G	Intron	Alcohol dehydrogenase 1	
Chr8	20503926	G	G/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G	Intron	Alcohol dehydrogenase 1	
Chr8	20504474	A	A/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	C/C	A/A	A/A	A/A	A/A	Intron	Alcohol dehydrogenase 1	
Chr8	20504921	T	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	T	Intron	Alcohol dehydrogenase 1	
Chr8	20510550	T	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	T	CDS	Histone H3	
Chr8	20515436	T	T/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	G/G	T/T	G/G	G/G	T/T	T	CDS	Oxidoreductase (NADH dehydrogenase)	
Chr8	20540551	A	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	CDS	Blue copper-like protein	
Chr8	20545558	A	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	Intron	Plastid-targeted protein 4	
Chr8	2054726	G	G/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G	Intron	Plastid-targeted protein 4	

[0063]

[0065]

수박의 *Psy1* 유전자 서열에 존재하는 SNP는 *Psy1* 유전자 CDS(coding sequence)의 445번째에 존재하며, 이 SNP 위치에서 주황색 과육의 수박은 G 염기를 가지고, 적색 및 노란색 과육의 수박은 A 염기를 가진다. 상기 표 5를 보면, 주황색 과육의 수박 9개 계통은 모두 'G/G' 유전자형을 가진 반면, 적색 및 노란색 과육의 수박 계통들은 모두 'A/A' 유전자형을 갖고 있다.

[0066]

서열번호 10의 *Psy1* 유전자 CDS로부터 번역된 *Psy1* 단백질은 총 421개의 아미노산 서열로 이루어져 있으며, 상기 SNP 변이 염기를 포함하는 코돈이 암호화하는 아미노산은 아미노산 서열의 149번째에 존재한다. SNP 염기의 종류에 따라 주황색 과육의 수박에서는 글루탐산(Glutamic acid, E)으로, 적색 또는 노란색 과육의 수박의 경우

리신(Lysine, K)으로 번역되었다(도 2A).

실시예 3. 수박 과육색 판별을 위한 SNP 마커 기반 프라이머 세트 개발

수박의 과육색 판별을 위해 수박 유래 *Psy1* 유전자에서 적색 및 노란색 과육의 수박과 주황색 과육의 수박 게놈 서열간의 SNP를 이용하여 프라이머 세트를 개발하였다.

구체적으로, 서열번호 10의 *Psy1* 유전자 CDS의 445번째에 존재하는 SNP 염기를 프라이머 세트의 3'-말단에 위치하게 하고, 5'-말단 쪽으로 첫번째, 두번째 또는 세번째의 염기를 인위적으로 변형시켜 특이성을 향상시킬 수 있는 프라이머 세트를 제작하였다(도 2B). 따라서, 본 발명에서는 적색 및 노란색 수박의 SNP에 기반한 정방향 프라이머 4개(CIPSY1-RY 445(A) SNP F1, F2, F3, F4), 주황색 수박의 SNP 기반한 정방향 프라이머 4개(CIPSY1-Or 445(G) SNP F1, F2, F3, F4) 및 모든 수박에 공통적인 역방향 프라이머 1개(CIPSY1-RY0 445 SNP R1)를 제작하였다.

표 6

본 발명의 프라이머 세트 정보

프라이머 명칭	서열정보 (5'→3') (서열번호)
- Motified allele specific forward PCR primers	
(Red, Yellow flesh CIPSY1 445(A) specific primer)	
CIPSY1-RY 445(A) SNP F1	GTGAAGTTTGTGCAGAGTATGCC <u>A</u> (1)
CIPSY1-RY 445(A) SNP F2	GGTGAAGTTTGTGCAGAGTATGC <u>AA</u> (2)
CIPSY1-RY 445(A) SNP F3	GGTGAAGTTTGTGCAGAGTATG <u>ACA</u> (3)
CIPSY1-RY 445(A) SNP F4	GGTGAAGTTTGTGCAGAGTAT <u>TCCA</u> (4)
(Orange flesh CIPSY1 445(G) specific primer)	
CIPSY1-Or 445(G) SNP F1	TGAAGTTTGTGCAGAGTATGCC <u>G</u> (5)
CIPSY1-Or 445(G) SNP F2	GTGAAGTTTGTGCAGAGTATGC <u>AG</u> (6)
CIPSY1-Or 445(G) SNP F3	GTGAAGTTTGTGCAGAGTATG <u>ACG</u> (7)
CIPSY1-Or 445(G) SNP F4	GTGAAGTTTGTGCAGAGTAT <u>TCCG</u> (8)
- Co-applied reverse primer	
CIPSY1-RY0 445 SNP R1	GAAAAGCTCTTCCAACCTTGCC <u>T</u> (9)

밑줄 : SNP 위치 염기

굵은 글씨 : 인위적으로 변형된 염기

실시예 4. 수박 과육색 판별을 위한 프라이머 세트 선발

상기 표 6의 프라이머 세트 8개를 이용하여, 다양한 annealing temperature(60℃, 61℃, 62℃) 및 cycle 수 (28, 30)의 조건으로 적색, 주황색 및 노란색 과육의 수박 시료를 대상으로 PCR을 수행하였다.

그 결과, annealing temperature 62℃와 28 cycles의 조건으로 PCR을 수행할 경우 적색 및 노란색 과육의 수박 SNP에 기반한 정방향 프라이머 F3(서열번호 3) 또는 F4(서열번호 4)와 공통의 역방향 프라이머 R1(서열번호 9)의 조합(도 3A의 왼쪽 겔 사진)으로 PCR 수행하였을 때 적색 과육의 수박에서만 밴드가 검출되었고, 주황색 과육의 수박 SNP에 기반한 정방향 프라이머 F3(서열번호 7) 또는 F4(서열번호 8)와 공통의 역방향 프라이머 R1(서열번호 9)의 조합(도 3A의 오른쪽 겔 사진)으로 PCR을 수행하였을 때 주황색 과육의 수박에서만 밴드가 검출된 것을 확인하였다.

또한, 상기 4개의 프라이머 세트 조합 중에서 적색 및 노란색 과육의 수박 SNP에 기반한 프라이머 세트(서열번호 4 및 9)와 주황색 과육의 수박 SNP에 기반한 프라이머 세트(서열번호 7 및 9)를 이용하여 적색 과육의 수박(845-35-Red)과 주황색 과육의 수박(868-Orange)을 대상으로 PCR을 수행하였다.

[0077] 그 결과, 적색 및 노란색 과육의 수박 SNP에 기반한 프라이머 세트는 적색 과육의 수박 시료에서만 증폭 반응을 보였고, 주황색 과육의 수박 SNP에 기반한 프라이머 세트는 주황색 과육의 수박 시료에서만 증폭 반응을 보이는 것을 확인하였다(도 3B).

[0078] 이를 통해, 본 발명의 적색 및 노란색 과육의 수박 SNP에 기반한 프라이머 세트(CIPSY1 445(A) specific primer AF4&R1; 서열번호 4 및 9)와 주황색 과육의 수박 SNP에 기반한 프라이머 세트(CIPSY1 445(G) specific primer AF3&R1; 서열번호 7 및 9)를 적색 및 노란색 과육의 수박과 주황색 과육의 수박을 판별하기 위한 프라이머 세트로 최종 선발하였다.

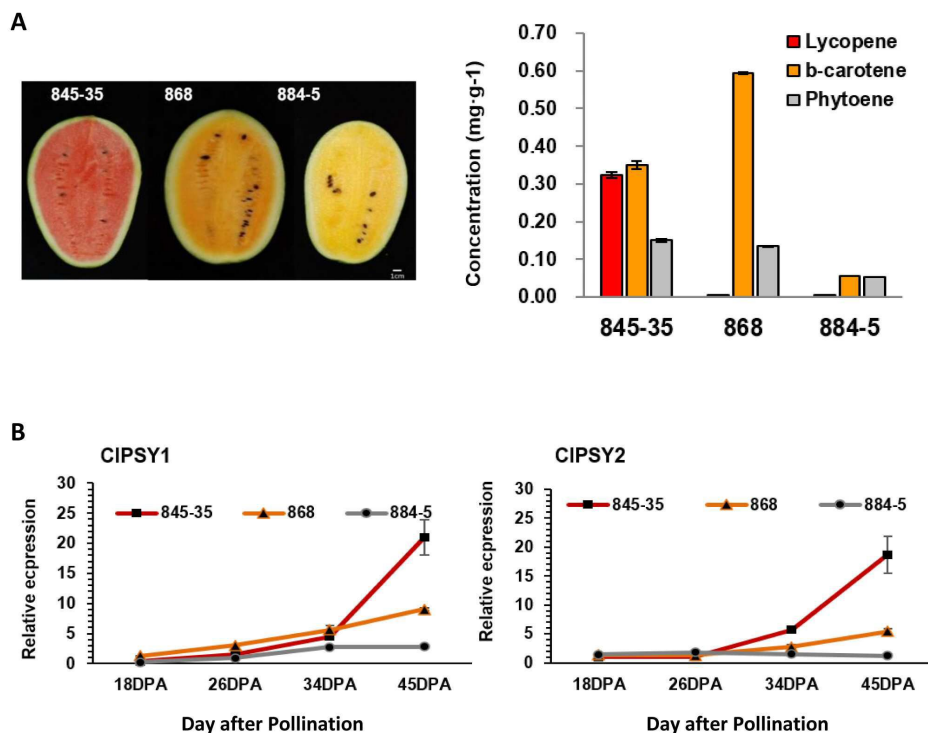
[0080] 실시예 5. 수박 과육색 판별용 프라이머 세트의 검증

[0081] 상기 최종 선발된 적색 및 노란색 과육의 수박 SNP에 기반한 프라이머 세트(서열번호 4 및 9)와 주황색 과육의 수박 SNP에 기반한 프라이머 세트(서열번호 7 및 9)를 이용하여 표 1, 표 2 및 표 3의 적색, 주황색 및 노란색 과육의 수박 유전자원을 대상으로 PCR을 수행하였다.

[0082] 그 결과, 적색 및 노란색 과육의 수박 SNP에 기반한 프라이머 세트는 적색 및 노란색 과육의 수박 시료에서만 증폭 반응을 보여 621 bp 크기의 단일 밴드가 검출된 반면, 주황색 과육의 수박 시료에서는 증폭 반응을 보이지 않았다. 또한, 주황색 과육의 수박 SNP에 기반한 프라이머 세트는 주황색 과육의 수박 시료에서만 증폭 반응을 보여 621 bp 크기의 단일 밴드가 검출된 반면, 적색 및 노란색 과육의 수박 시료에서는 증폭 반응을 보이지 않았다(도 4 및 도 5).

도면

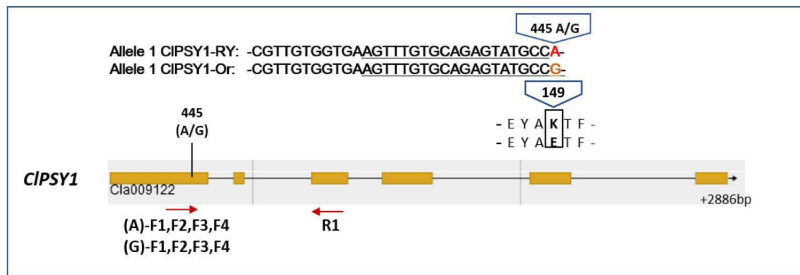
도면1



도면2

A

* 인위적 불일치를 도입한 대립유전자 특이적 PCR 프라이머 제작 및 선발



B

- Modified allele specific forward PCR primers

Allele 1 CIPSY1-RY: CGTTGTGGTGAAGTTTGTGCAGAGTATGCCA

CIPSY1-RY 445(A) SNP F1: GTGAAGTTTGTGCAGAGTATGCCA

CIPSY1-RY 445(A) SNP F2: GTGAAGTTTGTGCAGAGTATGCCAA

CIPSY1-RY 445(A) SNP F3: GTGAAGTTTGTGCAGAGTATGCCACA

CIPSY1-RY 445(A) SNP F4: GTGAAGTTTGTGCAGAGTATGCCATCCA

Allele 1 CIPSY1-Or: CGTTGTGGTGAAGTTTGTGCAGAGTATGCCG

CIPSY1-Or 445(G) SNP F1: TGAAGTTTGTGCAGAGTATGCCG

CIPSY1-Or 445(G) SNP F2: GTGAAGTTTGTGCAGAGTATGCCAG

CIPSY1-Or 445(G) SNP F3: GTGAAGTTTGTGCAGAGTATGCCACG

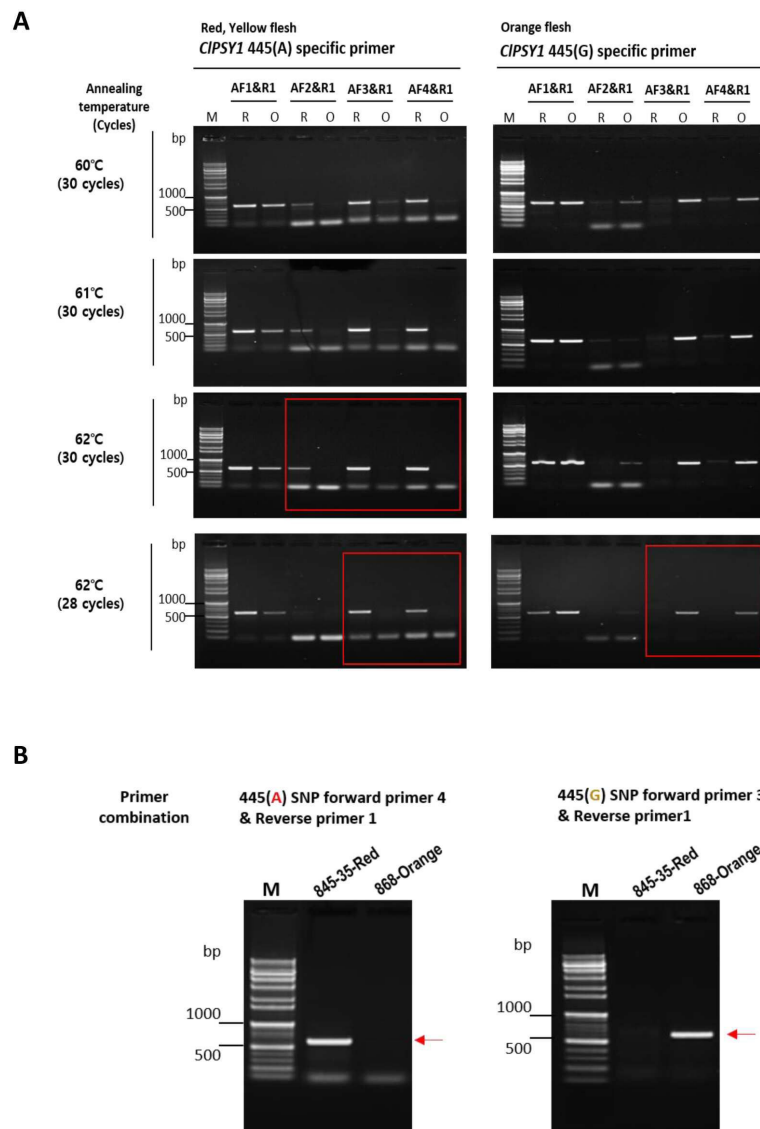
CIPSY1-Or 445(G) SNP F4: GTGAAGTTTGTGCAGAGTATGCCCG

- Co-applied reverse primer

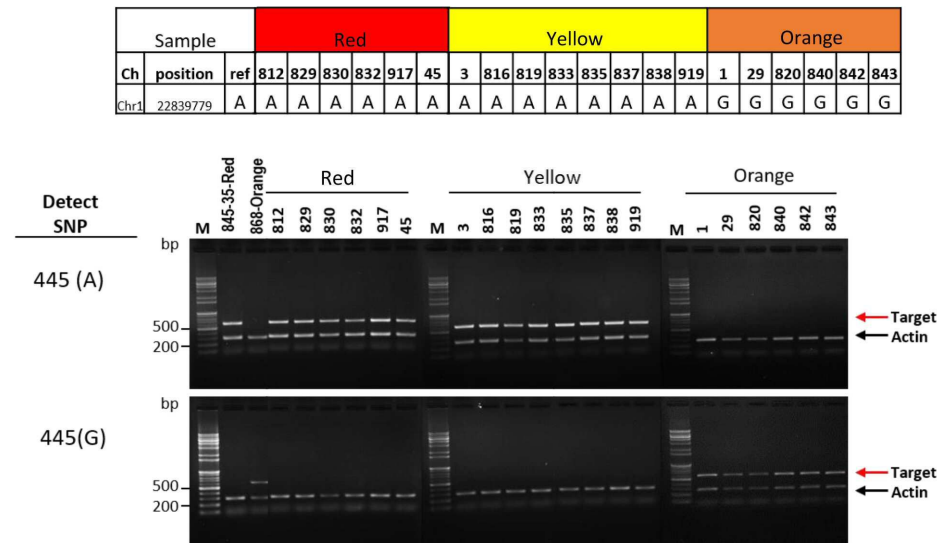
CIPSY1-RYO_445 SNP R1: 5'-GAAAAAGCTCTTCCAACCTTGCCT-3'

(AGGCAAGTTGGAAGAGCTTTTC)

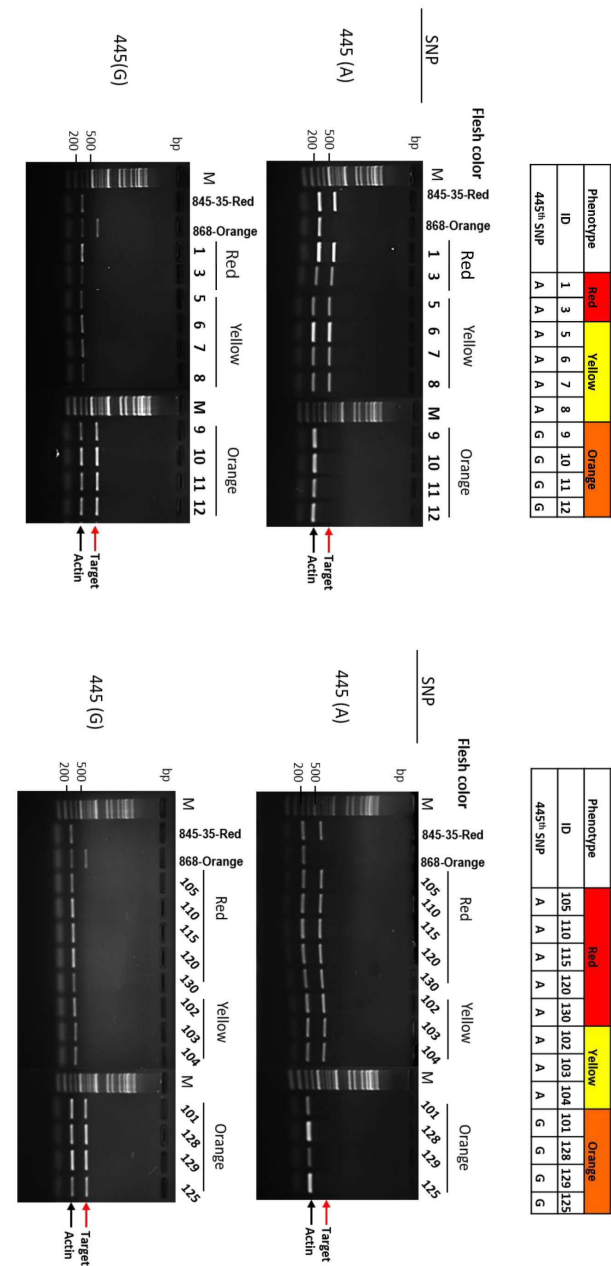
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> SNP-PCR marker for discriminating orange flesh watermelon and uses thereof
- <130> PN22135
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gtgaagtttg tgcagagtat gccca

24

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggtgaagttt gtgcagagta tgcaa

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ggtgaagttt gtgcagagta tgaca

25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ggtgaagttt gtgcagagta ttcca

25

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tgaagtttgt gcagagtatg ccg

23

<210> 6

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 gtgaagtttg tgcagagtat gcag 24
 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 gtgaagtttg tgcagagtat gacg 24

 <210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 gtgaagtttg tgcagagtat tccg 24
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 gaaaagctct tccaaccttg cct 23
 <210> 10
 <211> 1266
 <212> DNA
 <213> Citrullus lanatus
 <400> 10
 atgtcttttg ctcttcggtt gggtgtttct cccaacgtcg aactttcccc atcgagcttt 60

gggtttcttg attcagttcg agatggatcc caaatccccg attcttccag attcttctcg 120
 cgaaatcgag cggcgaatct gatgagcaag aaacagaaat gggggaatca ctctcactct 180
 acagaactga aataccaat tctctgtgaa ggtggatag gctctgttat tgcagcaagt 240
 atggtggcga atccccccgg agaaatggcc gtctcagctg agcagaaggt gtataacgta 300
 gttatgaaac aggcggcttt ggtaaacgg caactgagaa ccgccggaga attggatgtg 360
 aagccggata ttgttctcc ggggactttg agcttgttga atgaagctta tgatcgttgt 420
 ggtgaagttt gtgcagagta tgccaagaca ttttatctgg gaactatgtt gatgactcct 480

gagaggcaaa aggctatttg ggcaatttat gtatggtgta ggaggacaga tgaacttggt 540
 gatgggcaa atgcttcaca tataaacacct actgcattgg acagatggga ggcaaggttg 600
 gaagagcttt tccaaggag gccttttgat atgctcgatg cagcttttagc cgataccgtt 660
 actaagtttc cagttgatat tcagccgttc aaagatatga tcgaagggat gaggatggat 720
 cttaggaagt cgagatacaa gaattttgac gaactttatc tttactgcta ttatgttgct 780
 ggaactgttg ggttgatgag tgttcctatc atgggcattg cacctgactc ccaagcaagc 840
 acagagagtg tgtataattc tgccttagca ttaggcatag ctaatcagct cacaacatt 900

ctcagagatg ttggagaaga tgctagaaga ggaagaatat atctaccaca agatgagcta 960
 gcacaggcag gactttcaga tgaggacata ttgctggaa gagtaactga taaatggaga 1020
 aacttcata agagtcagat taagagagct agaattgtct ttgatgagc tgagaaagga 1080
 gttttggagc ttaataaagc tagcagatgg ccggtgtggg cctcattgct attatatagg 1140
 caaatattgg atgagattga agcaaatgac tacaacaact tcacaaagag ggcttatgtg 1200
 agcaaagcca aaaaaatatt ggctttgcct atggcttatg caaggtctct ccttggccct 1260
 tcatga 1266

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

gtacctgcca tgtattgttg ccat 24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

cctctctcag tgagaatctt catc

24