(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월08일
(11) 등록번호 10-1836109
(24) 등록일자 2018년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2013.01)
C12Q 2600/13 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0063460
(22) 출원일자 2017년05월23일
심사청구일자 2017년05월23일
(56) 선행기술조사문헌
Muhammad A. Mushtaq et al. Front. Plant Sci. 7:311
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
허윤강
대전광역시 유성구 계백로93번길 79-59(송정동)
이명진
대전광역시 서구 청사로 254, 101동 1405호(둔산동, 둥지아파트)
노일섭
전라남도 순천시 생목길 1, 101동 1402호(생목동, 벽산아파트)
(74) 대리인
최규환

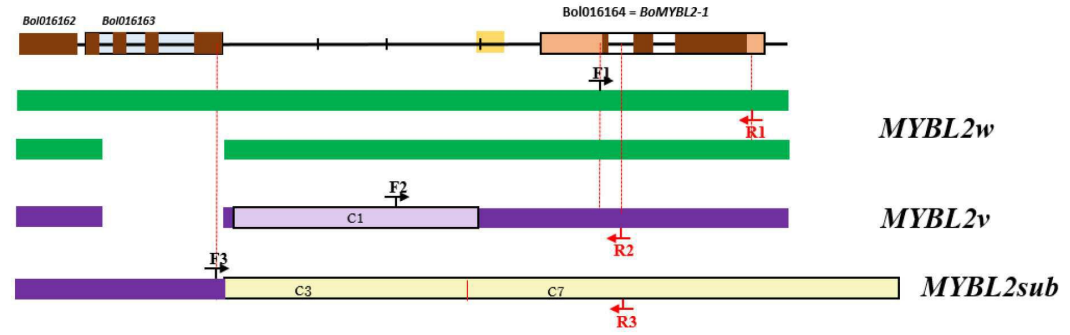
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **자색 양배추 품종을 선발하기 위한 분자 마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 판별하기 위한 분자 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 *BoMYBL2-1* 유전자 특이적 분자 마커를 양배추 작물에 적용하면, 기존 연구 결과로 판별하지 못한 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 PCR을 수행함으로써 판별할 수 있어 육종에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감할 수 있어 유용할 것으로 기대된다. 또한, 본 발명의 방법으로 육성한 자색 양배추 품종 및 적배추류의 보급은 재배 농가 및 소비자에게도 고품질의 양배추 및 배추류 생산 및 공급을 가능하게 할 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도7



(56) 선행기술조사문헌

Christian Dubos et al. The Plant Journal (2008) 55, 940-953

Li-Wei Chiu et al. Plant Physiology, November 2010, Vol. 154, pp. 1470-1480

Na Zhang et al. Front. Plant Sci. 7:197

KR1020160105163 A

KR1020160107429 A

CN105506163 A

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213007-05-1-SB620

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 GSP(Golden Seed Project)

연구과제명 양배추 엽색, 숙기 및 종/아종 구분 분자마커 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2017.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 양배추(*Brassica oleracea*) 유래의 *BoMYBL2-1*(*Brassica oleracea MYBL2-1*) 유전자 변이체를 포함하는 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 선발하기 위한 분자 마커.

청구항 2

삭제

청구항 3

서열번호 29 및 서열번호 32의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 또는 서열번호 30 및 서열번호 33의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류 선발용 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트.

청구항 4

제3항에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 선발하기 위한 키트.

청구항 5

제1항의 분자 마커를 포함하는 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류 선발용 프로브.

청구항 6

제1항의 분자 마커가 고정화된 기판을 갖는 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류 선발용 마이크로어레이.

청구항 7

양배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제3항에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 선발하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자색 양배추 품종과 자색 양배추 유래 잡종 적배추 등을 선발하기 위한 분자 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 안토시아닌은 플라보노이드 생합성 회로에 의해 만들어지며 현화식물에 널리 분포하고 꽃이나 과실의 분홍색,

자색, 적색 및 푸른색 등을 띄게 하는 중요한 수용성 색소이다. 안토시아닌은 화분(꽃가루)과 종자 분산의 매개체를 유인하는데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 자외선, 저온, 건조 스트레스 및 미생물에 의한 손상 등 다양한 스트레스로부터 식물을 보호하는 역할을 한다. 안토시아닌에 의한 스트레스 저항성은 주로 안토시아닌의 항산화활성에 기인하기 때문에, 사람의 건강증진 및 병 치유에도 각광을 받고 있다. 안토시아닌은 시력을 증진시키고, 심혈관 질환의 발병을 낮추며, 비만조절과 당뇨병을 완화하고, 소염 등의 다양한 성질로 항암효과가 현저하다. 최근에 안토시아닌은 건강증진 및 병의 치유 이외에 식품산업에 대량으로 소모되고 있어 안토시아닌 고함유 작물의 생산이 요구된다.

[0003] 안토시아닌의 생합성에 관여하는 유전자는 2 그룹으로 나뉜다: 초기 생합성 유전자(early biosynthetic genes, EBGs)와 후기 생합성 유전자(late biosynthetic genes, LBGs). EBGs에는 *CHS*(chalcon synthase), *CHI*(chalcone isomerase), *F3H*(flavanone 3-hydroxylase), *F3'H*(flavanone 3'-hydroxylase) 및 *FLS*(flavonol synthase) 유전자가 있으며, 세 개의 R2R3-MYB 전사인자 단백질(MYB11, MYB12 및 MYB111)에 의해 발현이 조절된다. 반면 LBGs는 *DFR*(dihydroflavonol 4-reductase), *LDOX*(leucoanthocyanidin oxygenase), *ANR*(anthocyanidin reductase) 또는 *UD3GT*(UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase)를 포함하며, 이 유전자들은 MYB-bHLH-WD40 (MBW) 복합체에 의해 발현이 활성화된다. MBW 복합체는 TT2(TRANSPARENT TESTA2; R2R3-MYB/MYB123), TT8(bHLH042) 및 TTG1(TRANSPARENT TESTA GLABRA 1, a WDR protein)로 구성되며, 이들 복합체 형성은 다양한 환경요인과 억제자인 MYBL2 및 SPL 등에 의해 조절된다. MYBL2(MYB-like 2)는 하나의 R3-MYB 도메인을 지닌 작은 MYB 단백질로, MBW 복합체의 TT8와 결합하여 후기 안토시아닌 생합성 유전자의 발현을 억제하고, 모델식물인 애기장대에서 *MYBL2* 유전자의 발현 억제는 안토시아닌 함량을 증가시킨다는 보고가 있었다.

[0004] 자색 또는 적색을 지닌 배추과에 대한 연구결과 안토시아닌 생합성관련 유전자 및 조절 전사인자의 발현의 증가가 안토시아닌 축적과 밀접한 관련이 있음이 밝혀졌다. 자색박초이(*Brassica rapa* var. *chinensis*)와 적겨자(*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee)의 경우는 *TT8* 및 대부분 안토시아닌 생합성 유전자의 발현의 증가와 관련이 있었으며, 자색 콜리플라워(또는 꽃양배추)(*B. oleracea* L. var. *botrytis*)에서는 *BoMYB2*와 *bHLH-WD40*의 발현증가와 관련이 있었고, 적양배추(*B. oleracea* var. *capitata*)의 엽색도 *BoMYB2*와 *BoTT8*과 같은 전사인자의 발현 증가와 대부분 생합성관련 구조유전자의 발현 증가의 결과 안토시아닌의 축적이 증가되었기 때문이었고, 자색케일(*B. oleracea* var. *acephala* f. tricolor)은 *BoPAP1*의 발현증가와 이에 따른 *DFR* 및 *ANS* 유전자의 발현 증가에 원인이 있었다.

[0005] 위와 같은 자색 또는 적색 작물은 자연적 돌연변이에 기인한 것으로 밝혀지고 있다. 사과의 경우는 *MYB10* 유전자(*MdMYB10*) 프로모터의 재배열 결과이고, 분홍색 양파는 *ANS*(anthocyanidin synthase)와 *DFR* 유전자에 돌연변이 결과이며, 콩의 검정 종피는 *CHS* 유전자 프로모터 결실의 결과 때문이었다. 그러나 자색양배추의 기원과 변이에 대해서는 알려진 바 없다. 자색양배추의 원인을 규명하고 이를 활용할 경우 건강식품 및 색소추출용으로 시장의 수요가 증대하고 있는 자색양배추와 자색 양배추 유래 잡종 적배추의 육종에 크게 기여할 수 있을 것이다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1680570호에서는 '양배추 자색 품종 판별용 SNP 마커 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1680571호에서는 '저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 품종 판별용 SNP 마커 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이, '자색 양배추 품종을 선발하기 위한 분자 마커 및 이의 용도'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 자색 양배추 품종을 조기에 정확하게 선발하기 위한 마커를 개발하기 위해 시도한 결과, 안토시아닌 합성 억제 전사인자인 *BoMYBL2-1* 유전자의 프로모터에 변이가 일어났거나, *BoMYBL2-1* 유전자의 코딩 부위에 치환이 일어나 BoMYBL2-1의 기능이 상실된 경우, 자색의 양배추로 표현되는 점을 확인하였다.

[0008] 이로부터 2종의 자색 양배추 선발용 마커를 개발하였으며, 특히 서열번호 29의 염기서열 및 서열번호 32의 염기서열 또는 서열번호 30의 염기서열 및 서열번호 33의 염기서열로 이루어진 양배추(*Brassica oleracea*) 유래의 *BoMYBL2-1*(*Brassica oleracea MYBL2-1*) 유전자 특이적 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 개발하여 자색 양배추 품종을 용이하게 판별하는 방법을 제공함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 양배추(*Brassica oleracea*) 유래의 *BoMYBL2-1*(*Brassica oleracea MYBL2-1*) 유전자 변이체를 포함하는 자색 양배추 품종을 선발하기 위한 분자 마커를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 분자 마커를 검출할 수 있는 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류 선발용 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 선발하기 위한 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 분자 마커를 포함하는 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류 선발용 프로브를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 분자 마커가 고정화된 기판을 갖는 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류 선발용 마이크로어레이를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 프라이머를 이용하여 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 선발하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 *BoMYBL2-1* 유전자 특이적 분자 마커를 양배추 작물에 적용하면, 기존 연구 결과로 판별하지 못한 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 PCR을 수행함으로써 판별할 수 있어 육종에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감할 수 있어 유용할 것으로 기대된다. 또한, 본 발명의 방법으로 육성한 자색 양배추 품종 및 적배추류의 보급은 재배 농가 및 소비자에게도 고품질의 양배추 및 배추류 생산 및 공급을 가능하게 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 양배추 MYBL2-1를 클로닝하기 위한 전략과 프라이머 위치를 나타낸다. A: Reference map. B: PCR로 증폭되는 DNA 부분(5로 표시). 이때 사용된 프라이머는 표 2를 참고. DNA 상의 아라비아 숫자는 bp를 의미함.

도 2는 온실(G: 무저온 처리구)과 야외(C: 저온 처리구)에서 자란 8종의 내혼계 양배추의 분석 결과이다. 게놈 DNA-PCR 및 RT-PCR. 온도 처리는 2014년 10월 13일부터 11월 12일까지 1개월 동안 하였으며, 온실의 경우 최저 평균 20도 최고 평균 30도였고, 야외는 최저가 평균 6도 최고는 평균 18도였다.

도 3은 상단은 *BoMYBL2-1* 유전자의 구조와 프라이머 위치를 나타내며, 하단은 *BoMYBL2-1* 유전자의 존재와 발현 분석을 게놈 DNA-PCR 및 RT-PCR로 확인한 결과이다. 양배추 *actin 2* 유전자(*BoACT2*)가 대조구로 사용되었다.

도 4는 녹색 양배추와 프로모터가 치환된 자색양배추 *MYBL2-1* 서열의 비교 결과이다. 녹색음형의 *표는 반복서열이고, 음영부분은 exon 서열임. 반복서열 이후부터 녹색양배추와 자색양배추 서열이 잘 보존되었으며 녹색과 자색 특이적 SNP 및 다른 유전적 다양성은 발견되지 않음. 단, 반복서열 전방 프로모터 부분이 녹색양배추와 자색양배추가 상이한 서열로 되어 있음. 마커용 프라이머 위치가 프라이머 이름과 함께 표시되어 있음.

도 5는 *BoMYBL2-1*가 치환된 자색양배추 DNA 서열의 비교 결과이다. *MYBL2-1* 유전자가 다른 염색체 DNA로 치환된 서열을 비교한 결과 일부 다형성이 존재하였으나, 안토시아닌 함량과는 무관하기 때문에 7S4-51, 7S4-63의 서열은 3'-부분을 읽지 않았고 비교에서 제외하였다. 마커용 프라이머 위치가 표시되어 있음.

도 6은 *BoMYBL2-1* 유전자와 주변의 DNA 구성을 나타낸다. 녹색은 녹색계통의 양배추를 표시하고, 자색은 자색계통의 양배추를 표시한다. *BoMYBL2w*, *BoMYBL2v*, 및 *BoMYBL2sub*은 각각 야생형, 변이체(프로모터 부분이 치환된 변이체) 및 치환된 *MYBL2-1* 유전자를 묘사한다. A, 앙상불(http://plants.ensembl.org/Brassica_oleracea/Info/Index)에 있는 유전자 구조. B, BRAD(http://brassicadb.org/brad/)에 있는 유전자구조. C, 본 발명에서 얻은 양배추 서열

도 7은 마커개발용 정방향 프라이머(F1, F2 및 F3) 및 역방향 프라이머(R1, R2 및 R3)의 위치를 나타낸다.

도 8은 F1 X R1(BoMYBL2w-F X BoMYBL2w-R) 프라이머 조합을 이용한 PCR 결과를 나타낸다. *BoMYBL2-1* 암호화 부

분이 존재하는 DNA만 증폭됨.

도 9는 F3 X R3(BoMYBL2sub-F X BoMYBL2sub-R) 프라이머 조합을 이용한 PCR 결과를 나타낸다. *BoMYBL2-1*가 다른 DNA로 완전히 치환된 부분만 증폭됨.

도 10은 F2 X R2(BoMYBL2v-F X BoMYBL2v-R) 프라이머 조합을 이용한 PCR 결과를 나타낸다. *BoMYBL2-1*의 프로모터가 치환된 DNA만 증폭됨. 흰색 화살표는 예상되는 DNA 밴드를 나타냄.

도 11은 안토시아닌 합성 조절 유전자의 존재를 확인하기 위한 게놈 DNA-PCR 결과를 나타낸다.

도 12는 안토시아닌 함량과 관련 있는 유전자의 존재를 확인하기 위한 게놈 DNA-PCR 결과를 나타낸다.

도 13은 도 12의 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 발현 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 양배추(*Brassica oleracea*) 유래의 *BoMYBL2-1*(*Brassica oleracea MYBL2-1*) 유전자 변이체를 포함하는 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 선발하기 위한 분자 마커를 제공한다.

[0018] 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 *BoMYBL2-1* 유전자 변이체는 *BoMYBL2-1* 유전자의 프로모터에 변이가 일어난 것이며, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 *BoMYBL2-1* 유전자 변이체는 *BoMYBL2-1* 유전자의 코딩 부위에 치환이 일어나 BoMYBL2-1의 기능이 상실된 것으로, 상기 2가지 *BoMYBL2-1* 유전자 변이체가 존재하면 자색의 양배추로 표현되므로, 상기 2가지 변이체를 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 선발하기 위한 분자 마커로 이용할 수 있는 것이다.

[0019] 또한, 상기 자색 양배추 유래 교잡 적배추류는 자색(적)양배추 유래 유전자를 가지고 있어, 본 발명의 분자마커를 통해 자색 양배추 유래 교잡 적배추류의 선발이 또한 가능하다(한국공개특허 제2012-0066156호, 한국공개특허 제2014-0030851호), 한국공개특허 제2008-0091586호 참고). 이는 신종식물 홍배추(한국공개특허 제2012-0066156호)와 신품종 홍경채(한국공개특허 제2014-0030851호)는 양배추(적양배추)와 배추의 종간잡종인 홍쌈추를 이용한 것(한국공개특허 제2008-0091586호)이기 때문이다.

[0020] 또한, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열 중 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류 선발용 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 제공한다. 프라이머 세트는 통상적으로 정방향 프라이머와 역방향 프라이머로 이루어지므로, 상기 서열번호 1 또는 2의 염기서열 중 정방향 프라이머가 결정되면 역방향 프라이머는 정방향 프라이머의 3'쪽에 위치하는 안티센스 서열일 것이라는 것은 당업자는 용이하게 예상할 수 있을 것이다.

[0021] 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되며, 예를 들면, 10개 이상, 바람직하게는 10-100개, 더욱 바람직하게는 10-50개, 더더욱 바람직하게는 10-30개 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다.

[0022] 본 발명의 프라이머 세트는 바람직하게는 서열번호 29 및 32의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 또는 서열번호 30 및 33의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함할 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 29의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 또한, 상기 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 32의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 또한, 상기 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 30의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 또한, 상기 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 33의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0023] 또한, 상기 프라이머는 서열번호 29 및 서열번호 32의 염기서열 또는 서열번호 30 및 서열번호 33의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산

물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복합도(complexity) 뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0025] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 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.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 선발하기 위한 키트를 제공한다.

[0027] 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 표면상에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 분자 마커를 포함하는 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류 선발용 프로브를 제공한다.

[0029] 본 명세서에서 사용된 용어 "프로브(probe)"는 타겟 핵산 서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 단일쇄 핵산 분자이다. 바람직하게는, 프로브는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프로브는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 서열에 완전하게 (perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로 (substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 프로브는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 분자 마커가 고정화된 기판을 갖는 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류 선발용 마이크로어레이를 제공한다.

[0032] "마이크로어레이"란 기판 상에 폴리뉴클레오티드의 그룹이 높은 밀도로 고정화되어 있는 것으로서, 상기 폴리뉴클레오티드 그룹은 각각 일정한 영역에 고정화되어 있다. 이러한 마이크로어레이는 당업계에 잘 알려져 있다. 마이크로어레이는 예를 들면, 미국특허 제5,445,934호 및 제5,744,305호에 개시되어 있으며, 이들 특허의 내용은 참조에 의하여 본 명세서에 포함된다.

[0033] 용어 "기판"은 혼성화 특성을 보유하고, 혼성화의 배경 수준이 낮게 유지되는 조건 하에 마커가 부착될 수 있는 임의의 기판을 말한다. 통상적으로, 상기 기판은 미세역가 (microtiter) 플레이트, 막 (예를 들면, 나일론 또는 니트로셀룰로오스), 미세구 (비드) 또는 칩일 수 있다. 막에 적용하거나 고정하기 전에, 핵산 프로브를 변형시켜 고정화를 촉진시키거나 혼성화 효율을 개선시킬 수 있다. 상기 변형은 단독중합체 테일링 (homopolymer tailing), 지방족기, NH2기, SH기 및 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와의 커플링, 또는 비오틴, 합텐 (hapten) 또는 단백질과의 커플링을 포함할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명은

[0035] 양배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

[0036] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

[0037] 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 자색 양배추 품종 또는 자색양배추 유래 교잡 적배추류를 선발하는 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명의 방법은 양배추 시료에서 게놈(genomic) 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 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서

열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Qβ 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.

[0039] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현 예에서, 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 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.

[0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] **재료 및 방법**

[0042] **양배추 재료**

[0043] 본 발명에 이용한 양배추는 자색의 발현과 연관된 ㈜아시아종묘로부터 분양받은 8개 계통과 미국 캘리포니아 재배종 4종을 1차적으로 사용하였다. ㈜아시아종묘의 양배추 8개 계통은 각각 안토시아닌 발현의 특성이 다른 계통으로서, 저온에서 안토시아닌 축적이 되는 양배추(337, 154), 저온에서 안토시아닌 축적이 없는 양배추(2437, 09WH-45), 자색 양배추(7S4-63, 7S4-51), 녹색 양배추(2409, 842) 4개 분류로 나뉜다. 캘리포니아 재배종은 녹색양배추 2종(Green A와 Green B)과 자색양배추 2종(Purple A와 Purple B)으로 미국 서부에서 재배되고 있는 양배추였다. 그리고 마커 개발 후 검증을 위해 사용한 양배추는 일본 재배종 양배추(자색과 녹색: NP-J-시리즈: 녹색 29종과 자색 6종) 및 한국종묘(주) 제공 자색양배추 21 계통 또는 재배종을 사용하였다. 모든 양배추 정보는 표 1에 정리하였고, 그 외 3종의 콜리플라워 재배종 등은 종자를 시장에서 구입하여 사용하였다. 양배추 재배는 충남대학교 생명과학동 온실에서 재배하였다. 한국종묘(주)의 자색양배추의 일부는 잎 시료를 제공받아 DNA 추출 및 RNA 추출 등에 사용하였다.

표 1

본 발명에 이용한 양배추 목록

Classification	Seed source	Name	Characteristics
Green cabbage	Asia Seed Co. (Inbred line)	337	Anthocyanin accumulation at low temperature
		154	..
		2437	No anthocyanin accumulation at low temperature
		09WH-45	..
		2409	Green cabbage (no anthocyanin accumulation)
		842	..
	Botanical Interests Inc	Green A	95-110 days, Copenhagen Market
	Lake Valley Seed	Green B	65 days, Copenhagen Market
	Asia Seed Co. (F1)	Daebakna	F1 hybrid
	Japan cultivar	NP-J-4	Extreme-early harvest
		NP-J-27	Medium-early harvest
		NP-J-28	Medium-late harvest
		NP-J-31	Early harvest
		NP-J-34	Early harvest
		NP-J-51	Early harvest
		NP-J-90	Medium-early harvest
		NP-J-93	Early harvest
		NP-J-110	Medium harvest
		NP-J-117	Early harvest
		NP-J-135	Medium-early harvest
		NP-J-149	Extreme-ealry harvest
		NP-J-150	Extreme-early harvest
		NP-J-152	Early harvest
		NP-J-161	Medium-early harvest
		NP-J-162	Medium-early harvest
		NP-J-172	Medium-early harvest
		NP-J-173	Medium-early harvest
		NP-J-189	Early harvest
		NP-J-191	Medium harvest
		NP-J-198	Early harvest
		NP-J-199	Early harvest
		NP-J-200	Early harvest
		NP-J-216	Early harvest
		NP-J-218	Early harvest
		NP-J-219	Early harvest
		NP-J-3	Late harvest
		NP-J-35	Late harvest
		NP-J-36	Late harvest
Purple cabbage	Asia Seed Co (Inbred line)	7S4-63	Purple cabbage
		7S4-51	..
	Botanical Interests Inc	Purple A	110-115 dyas, Red Acre
	Lake Valley Seed	Purple B	Red Acre
	Japan cultivar	NP-J-38	Early harvest
		NP-J-126	Medium-early harvest
		NP-J-127	Medium-early harvest
		NP-J-64	Early harvest
		NP-J-71	Medium-early harvest
	Takii Seed Co.	Junsaeng Rubia	
	SAKATA Seed Co.	Red Jewel	
	SAKATA Seed Co.	Varna	
	Bejo Seed Co.	Ranchero	
	Bejo Seed Co.	Autoro	
	Bejo Seed Co.	Integro	
	Bejo Seed Co.	Primero	
	Nick-Zwaan	Rondale	
	HanKook Seed Co	DP60	F1
	..	HK-014	NR(New Recombiantion)
	..	HK-016	BOX-23
	..	HK-017	HKB-035
	..	HK-018N	NR(New Recombiantion)
	..	HK-020	HKB-034
	..	HK-032	HKB-048
	..	HK-034	HKB-059
	..	HK-047	NR(New Recombiantion)
	..	HK-058	NR(New Recombiantion)
	..	HK-069	NR(New Recombiantion)
	..	HK-075	NR(New Recombiantion)

[0044]

[0045] **게놈 DNA 증폭전략 및 염기서열 분석**

[0046] 도 1A와 같이 양배추의 *BoMYBL2-1* (Bo1010164=Bo6g112670) 및 그 주변 유전자에 대한 기존정보(http://brassicadb.org/brad/와 http://plants.ensembl.org/Brassica_oleracea/Info/Index)가 상이하여 (즉, Bo6g112680 = Bo1016161 + Bo1016162 + Bo1016163) 4 종류의 프라이머 세트(도 1B; 표 2)를 여러 조합으로 사용하여 게놈 DNA를 증폭하였다. 양배추의 정확한 클론을 증폭하여 분석하기 위하여, 우선 재배종 케일, 브로콜리 및 콜리프라워로부터 서열을 밝히고, ㈜아시아종묘로부터 분양받은 결구형 양배추 6종의 유전자를 클로닝하여 분석하였다. 이어서, 캘리포니아 재배종 녹색양배추 2종과 자색양배추(아시아종묘, 캘리포니아 재배종 및 한국종묘 제공)들의 DNA를 증폭하고 분석하였다. 양배추 시료로부터 DNA는 액체질소와 막자사발을 이용하여 간 분말을 DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 추출하였다. PCR은 Ex Taq(Takara, Japan)을 이용하여

수행하였고, 조건은 94℃에서 5분 처리하고 94℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 2-5분을 30회 반복 후 72℃에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 1% 아가로스젤로 전기영동하고, 밴드를 절단하여 LaboPass Gel Extraction Kit(COSMOGENETECH, S. Korea)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA는 T&A Cloning Kit(RBC, Taiwan)를 이용하여 벡터에 삽입하고 DH5α 대장균에 형질전환하였다. 형질전환된 균으로부터 LaBoPass Plasmid Mini kit(COSMOGENETECH, S. Korea)를 이용하여 플라스미드 DNA를 분리하였다. 양배추가 배수체이기 때문에 대표적인 염기서열을 발굴하고, 증폭과 염기서열 분석 과정의 에러를 최소화하기 위하여 각 계통마다 10개 전후의 클론을 분석하였으며, 염기서열 분석은 양방향으로 읽었다(Macrogen, S. Korea).

표 2

[0047] *BoMYBL2-1* 유전자 클로닝에 사용된 프라이머

도 1의 DNA 절편	정방향 프라이머(서열번호)		역방향 프라이머(서열번호)		산물크기 (bp)
	이름	서열	이름	서열	
1	F1	5'-CGTTATGTGAAGACCGCAAGGTAGA-3'(3)	R1	5'-CCCTTTGTCTAGCTCACCAGCA-3'(4)	541
2	F1	..	R2	5'-TGCTCTCCAAGTCCTTTCTTGCTC(5)	1,268 (541)
3	F2	5'-ATGGCTGTTAAGAGCGGGAAAGTTGA(6)	R3	5'-GAACAAGAAACGTTACCGGAAGGC(7)	2,950 (2,223)
4	F2	..	R4	5'-CTTGGCACGGTGCAGCATTCCT(8)	3,121 (2,394)
5	F3	5'-GCCTTCCGGTAACGTTTCTTGTTC(9)	R5	5'-GTGAGTTAGTTCATTACTGGCGTGGA(10)	1,178

[0048] **iPCR(inverse PCR) 분석**

[0049] 위에서 작성한 프라이머로 증폭이 되지 않는 자색양배추 유전자를 클로닝하기 위하여 *BoMYBL2-1* 앞에 있는 Bol010163 유전자의 뒷부분 서열을 근거로 iPCR용 프라이머를 제작하고 Universal GenomeWalker™ 2.0 (Clonetech, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 클로닝하였다. 자색양배추부터 추출한 DNA와 콘트롤 DNA를 제한효소 *Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II, *Stu*I으로 37℃에서 16-18시간 절단하고, NucleoSpin Gel 키트와 PCR Clean-Up 키트를 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA는 GenomeWalker 어댑터와 연결하고, 1차 PCR 프라이머(유전자 특이 프라이머: 5'-AGACGTTGATGAGATCAACGGTTGTGA : 서열번호 11)와 2차 프라이머(5'-CATCCAATAAAGGCGAGCAAGAAAGGA : 서열번호 12)를 이용하여 PCR 반응을 수행하여 특이밴드를 증폭하였다. 1, 2차 PCR시 합성의 시간을 3분 이상 주었다. 각각의 증폭산물을 정제하고 T&A 벡터에 클로닝하여 염기서열분석을 하였다. *Pvu*II 라이브러리로부터는 약 700 bp, *Dra*I 라이브러리로부터는 2.1 kbp, *Stu*I 라이브러리로부터는 3,9 kbp DNA가 증폭되었으며, 세 가지 모두로부터 5개 이상씩 클론의 염기서열을 분석하여 정확한 서열을 도출하였다.

[0050] **RT-PCR**

[0051] 전사체 분석을 통하여 안토시아닌 합성과 관련된 유전자의 발현을 연구하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 채취한 시료는 액체질소를 이용하여 동결시킨 뒤, 막자와 막자사발을 이용하여 곱게 갈았다. 총 RNA는 TRIzol Reagent(Lifetechnologies, USA)를 사용하여 추출하였으며, 1 μg의 총 RNA에 RQ1 RNase-Free DNase(Promaga, USA)를 65℃에 10분간 처리하여 DNA를 제거하였다. cDNA 합성은 oligo-dT로 Revertra Ace kit(TOYOBO, Japan)를 사용하여 42℃에서 20분간 합성하였고, 10배 희석하여 PCR에 사용하였다. PCR은 Premix(Elpisbiotech, S.Korea)를 사용하여 수행하였으며, PCR 조건은 94℃에서 5분 처리 후, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초를 20-30회 반복하고 72℃ 5분 처리하였고, 위 조건으로 *BoActin2* 유전자(*BoACT2*)의 프라이머로 증폭된 산물을 기준으로 정량하였다. 사용한 프라이머 정보는 표 3에 정리하였으며, 전기영동은 1.5% 아가로스젤을 이용하였다.

표 3

[0052] 안토시아닌 합성과 관련된 유전자의 발현에 사용된 프라이머

구 분	정방향 프라이머(서열번호)		역방향 프라이머(서열번호)	
	이름	서열	이름	서열
RT-PCR	BoMYB1-F	5’-GGAAACAGGTGGTCTTTGCTGGTA-3'(13)	BoMYB1-R	5’-ACTCCAAGGCATGGAGGAACAAC-3'(14)

	BoMYB2-F	..	BoMYB2-R	5’-CGTTGAGTCCAAGGCATAGAGGAACAAT(15)
	BoMYBL2-1-1F (=1F)	5'-CTACCAGTCTCTCCTTTGAAGAAGAC-3'(16)	BoMYBL2-1-1R(=1R)	5'-GAGTTTTCCTTGATCTCACAGTACATTTCT-3(17)'
	BoMYBL2-1-2F (=2F)	5’-GAAGATTGCCTGGACGAACCGAC-3'(18)	BoMYBL2-1-2R(=2R)	5'-TGACTCGTTCGGCCATGGTTAGAGGA-3'(19)
	BoMYBL2-2F	5’-GTGCCGAGAGATGTAGAGTGGGA-3'(20)	BoMYBL2-2R	5’-TCCGGCACTACTACTAGCACTACTA-3'(21)
	BoDFR1-F	5’-TATTACCGCGCTCTCTCCTATC-3'(22)	BpDFR1-R	5’-ATCCCTGGTTCGGTCTTCTTA-3'(23)
	BoACT2-F	5’-TGCCAATCTACGAGGGTTTC-3'(24)	BoACT2-R	5’-TCTCGATGGAAGAGCTGGTT-3'(25)
gDNA-PCR	BoMYBL2g-1F	5’-CTACCAGTCTCTCCTTTGAAGAAGAC-3'(26)	BoMYBL2g-1R	5’-GAGTTTTCCTTGATCTCACAGTACATTTCT-3'(27)

[0053] **마커 검정**

[0054] 자색양배추와 녹색양배추를 구분하기 위한 PCR 프라이머는 3개의 세트로 구성되었으며, 그 정보는 표 4에 정리하였다. 게놈 DNA 10-30 ng, 정방향 및 역방향 프라이머 각각 5 pmol, 액틴 프라이머 10 pmol, 1X HiPi Plus PCR primer mix를 20 ㎕로 맞추어 PCR를 수행하였으며, PCR 조건은 3 세트를 달리하여 조건을 확립하였다. *BoMYBL2-1* 유전자의 존재를 확인하기 위한 BoMYBL2w-F X BoMYBL2w-R 조합의 경우는 94℃에서 5분 처리 후, 94℃ 30초, 65℃ 30초, 72℃ 2분을 28회 반복하고 72℃ 5분 처리하였다. 프로모터가 치환된 *BoMYBL2-1* 유전자의 존재를 확인하기 위한 BoMYBL2v-F X BoMYBL2v-R 조합의 경우는 94℃에서 5분 처리 후, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분을 30회 반복하고 72℃ 5분 처리하였다. *BoMYBL2-1* 유전자 부위가 치환되어 존재하지 않는 것을 확인하기 위한 BoMYBL2sub-F X BoMYBL2sub-R 조합의 경우는 94℃에서 5분 처리 후, 94℃ 30초, 65℃ 30초, 72℃ 2분을 28회 반복하고 72℃ 5분 처리하였다. PCR 후, 1.5% 아가로스젤에 5 ㎕ 로딩하고 전기영동하였다.

표 4

[0055] 자색양배추와 녹색양배추를 구별하기 위한 마커 개발용 프라이머

번호	구분	약어	이 름	기 술	서 열(서열번호)
1	정방향	F1	BoMYBL2w-F	Wild-type *BoMYBL2*	5'-CTACCAGTCTCTCCTTTGAAGAAGAC-3'(28)
2	..	F2	BoMYBL2v-F	Variant *BoMYBL2*	5'-TGTCCACTATCAACAAAAGATGATC-3'(29)
3	..	F3	BoMYBL2sub-F	Substituted *BoMYBL2*	5'-GTTCAAGCTCATTGTGAACGGA-3'(30)
4	역방향	R1	BoMYBL2w-R	Wild-type *BoMYBL2*	5'-GAGTTTTCCTTGATCTCACAGTACATTTCT-3'(31)
5	..	R2	BoMYBL2v-R	Variant *BoMYBL2*	5'-CAAACTCACCCGTGCAAATGTACAT-3' (32)
6	..	R3	BoMYBL2sub-R	Substituted *BoMYBL2*	5'-GGACCACCGTGAGAGAGAGA-3'(33)
7	정방향	-	BoACT2-F	*B. oleracea actin 2*	5'-TACGGTAACATCGTGCTCAGTG-3'(34)
8	역방향	-	BoACT2-R	..	5'-GATCCAGACACTGTACTTCCTC-3'(35)

[0056] **안토시아닌 생합성 관련 유전자의 존재 확인**

[0057] 자색양배추가 *BoMYBL2-1* 유전자의 발현결핍 이외에 다른 유전자의 결함여부와 관계가 있는지 알아보기 위하여 안토시아닌 생합성을 조절하는 여러 전사인자의 존재를 PCR로 확인하였다. 사용한 프라이머는 표 5에 요약하였고, PCR 조건은 94℃에서 5분 처리 후, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초를 20-30회 반복하고 72℃ 5분 처리하였다. PCR 결과는 1.5% 아가로스젤로 확인하였다.

표 5

[0058] *MYBL2-1*가 자색양배추 특이적으로 결핍되었다는 것을 증명하기 위해 다른 유전자의 존재를 증명하는 프라이머 (안토시아닌 생합성을 조절하는 주요 전사인자)

Gene	정방향 프라이머(서열번호)		역방향 프라이머(서열번호)		산물 크기
	이 름	서 열	이 름	서 열	(bp)
BoPAP (*Production of anthocyanin pigment*)	BoMYB1-F	5'-CAATGGCTGCAGCCATCTCC-3'(36)	BoMYB1-R	5'-CCTTTTGGAACGAGCCCGTCA-3'(37)	192
	BoMYB2-F	5'-TGAAGCCAAGTATCAAGAGAGGAAAACTC-3'(38)	BoMYB2-R	5'-TCATCTAGCAAACTTTCCCACCACC-3'(39)	622
	BoMYB3-F	5'-GATCTTCTTCTTCGCCTTCATAAGCTTC-3'(40)	BoMYB3-R	5'-GATCTTCTGCTCCGCCTTCATAAACT-3'(41)	457
	BoMYB4-F	5'-CCTTCCTTGTTCTTCTACTACACCAGC-3'(42)	BoMYB4-R	5'-ACTAACAAGCTCAGATTTATCGTCGTCT-3'(43)	210
BoMYBD	MYBD-F2	5'-CTCAGAAGTATTTCCTCCGCCGTAC-3'(44)	MYBD-R	5'-TCAAGCAACTCCCATTATACTATCTCCAT-3'(45)	280
BoSPL9 (*Squamosa promoter binding protein-like 9*)	SPL9-F	5'-TTGGTCCGATGACGGTTACAATGG-3'(46)	SPL9-R	5'-TCAGAGAGACCAGTTGTTATGGTGTGAA-3'(47)	270
BoMYBH (*MYBD homolog*)	MYBH-1-F2	5'-CTGAACCAACCAAGAAAGAGGAGACTCA-3'(48)	MYBH-1-R	5'-TTAGACCGCATGTACCACGTTGGT-3'(49)	240
	MYBH-2-F2	5'-ACCCATTTCCATTCCCAGTATGGTCT-3'(50)	MYBH-2-R	5'-CTAAGCATTCGGGTGAAATGGTGATTGTC-3'(51)	230
BoMYB11	BoMYB11-F	5'-AGACTCTGGACAAGCCAAAAGGTCT-3'(52)	BoMYB11-R	5'-CATGATCCAGTGGTTCTCCAGAGTTCT-3'(53)	280
BoMYB12	BoMYB12-1F	5'-GTGTTTACATCGAGTGTTGGTGATGGG-3'(54)	BoMYB12-1R	5'-CCACGACACCACTGGATCAGAAG-3'(55)	140
	BoMYB12-2F	5'-ATGCATGCAACGTGCTCACTTCA-3'(56)	BoMYB12-2R	5'-CCTCTTTCTCACCGCAAAGGCTATTC-3'(57)	240
BoANL (*Anthocyaniniless*)	BoANL-F	5’-CCCGTAAGAGTGTGGACGAT-3'(58)	BoANL-R	5’-AAGAAACGGAGTTGCCTTGA-3'(59)	150
Unknown	Bo5529-F	5’-CACTCGAAACATGGGATGCTGAGA-3'(60)	Bo5529-R	5’-CATCCAGATTCGTAAGCTCGTCCA-3'(61)	180
Unknown	Bo10412-F	5’-GAACCGGATTCAAGTTTCCA-3'(62)	Bo10412-R	5’-CAAACGTTTTGCTTCCAGGT-3'(63)	173
Chalcoe synthase 1	BoCHS1-F	5’-ACCCGGATACCTCTGCTGGA-3'(64)	BoCHS1-R	5’-GGAGTTCCAGTCGCTTATCCCTAAG-3'(65)	220
Chalcoe synthase 2	BoCHS2-F	5’-GGATCCTGATGCATCCGTAGGG-3'(66)	BoCHS2-R	5’-GGAGTTCCAGTCACTTATCCCTAGC-3'(67)	220
Homeodomain-like superfamily protein	BoKAN3-F	5’-GATTAACGGCAAAACGAGGA-3'(68)	BoKAN3-R	5’-AACCGAGCTTCACTTGAGGA-3'(69)	331
GATA transcription factor 22	BoGATA22-F	5’-TCCGATTGTAACACGACCAA-3'(70)	BoGATA22-R	5’-CGCCACAGATGTGGTCATAC-3'(71)	270
MYB-likeTF family protein	BoMYBH-F	5’-ACCGCAACTACAATCATTCCCGA-3'(72)	BoMYBH-R	5'-CTTCTTCTTGGACTCTCCAAGGCT-3'(73)	200
bHLH 51	BobHLH51-F	5’-GGAAAGACAGGGCTGAGTCGG-3'(74)	BobHLH51-R	5'-CTTTGTGAGAACGCTAACGATCTCTGAG-3'(75)	350

bHLH 51-like	BobHLH51L-F	5’-GGCAACTTCCCGTCGGATGAG-3'(76)	BobHLH51L-R	5'-CTTTGTGAGGACCCTAATGATCTCCG-3'(77)	360
LOB domain-containing protein 37	BoLBD37-F	5’-GCGTAGGCGAGTTGATTCTTCGG-3'(78)	BoLBD37-R	5'-TCGTGGTAGTAGTCGTCGTCGC-3'(79)	130
LOB domain-containing protein 37-like	BoLBD37L-F	5’-TAGCGTGTTCGGAGCAACAACC-3'(80)	BoLBD37L-R	5'-GTGTTATCCCAAAACGACGTCGGTG-3'(81)	150
LOB domain-containing protein 38	BoLBD38-F	5’-GATCGGAATGTCTACCACCACTCAA-3'(82)	BoLBD38-R	5'-CGTTCACTGGCGATGTGATCCAG-3'(83)	250
LOB domain-containing protein 38-like	BoLBD38L-F	5’-AGCTCTAGAACCAGGCCTACGA-3'(84)	BoLBD38L-R	5'-CCTACGCGTACGAATCTTTCACCA-3'(85)	230
LOB domain-containing protein 39	BoLBD39-F	5’-TCCTCAGATGAGTCTACCGAGATCTG-3'(86)	BoLBD39-R	5'-CCGATGGACTTCCCGGATGATC-3'(87)	240
Phytochrome interacting factor 3	BoPIF3-F	5’-CGGGTATGGGGCATCATTACCA-3'(88)	BoPIF3-R	5'-GTATAGAACCCACCAGCAGAGACG-3'(89)	180
Phytochrome interacting factor 3-like	BoPIF3L-F	5’-GTCCCTCGGTTAACCACGGA-3'(90)	BoPIF3L-R	5'-CCATCGTTGAAGAAGAACCCGTGA-3'(91)	120
bZIP transcription factor	BoHY5-F	5’-GTCAGGACCAGACACAAGCAACG-3'(92)	BoHY5-R	5'-AGCGTTAGAACCACGCTTCCC-3'(93)	280
bZIP transcription factor-like	BoHY5L-F	5’-GGTCAGGACAGGACACAGATAGCT-3'(94)	BoHY5L-R	5'-AACCACCTCCTCCTCCTCCT-3'(95)	280

[0059] **실시예 1. *BoMYBL2-1* 유전자의 선발**

[0060] *BoMYBL2-1* 유전자와 자색양배추 또는 안토시아닌 합성과의 관련성을 알아보기 위해서 *BoMYB1* (Bo1042409 = Bo3g081880), *BoMYB2*(Bo1012528 = Bo6g100940), *BoDFR1*(Bo1035269 = Bo9g058630) 및 *BoMYBL2-1* 유전자의 발현을 온실에서 자란 양배추와 저온에 노출된 양배추를 대상으로 RT-PCR을 수행하였다(도 2). 이때 사용한 프라이머 서열은 표 3에 정리하였다. 애기장대 *MYBL2* 유전자(At1G71030)에 해당하는 양배추 유전자는 2종류가 존재하여[*BoMYBL2-1*(Bo1016164 = Bo6g112670)과 *BoMYBL2-2*(Bo1034966 = Bo2g070770)] 나누어 분석하였다. 참고로 사용한 *BoDFR1* 유전자는 자색양배추인 7S4-51을 제외하고 모든 양배추에서 저온처리에 의해 모두 발현이 유도되었으므로 안토시아닌 합성과 저온과의 관계를 극명하게 하였다. 안토시아닌 합성의 주요한 조절전사인자인 *BoMYB1*과 *BoMYB2*의 발현도 자색양배추에서 현저하였다. 중요한 발견은 *BoMYBL2-2*는 모든 조건에서 발현되어 안토시아닌 합성과 직접 관련이 없는 것으로 판단되며, *BoMYBL2-1*은 자색양배추에서는 발현이 전혀되지 않고, 337과 154를 제외한 대부분의 양배추에서 안토시아닌 합성이 증가되는 저온에 노출된 양배추에서 발현이 감소하였다. 따라서 *BoMYBL2-1*도 애기장대의 경우와 같이 안토시아닌 합성을 억제하는 것 같았다. 특이한 점은 ㈜아시아종묘의 자색양배추(7S4-51, 7S4-63)에는 *BoMYBL2-1* 유전자가 없는 것으로 게놈 DNA PCR(도 2의 gDNA-PCR) 판명되었다는 것이다.

[0061] ㈜아시아종묘 자색양배추에는 *BoMYBL2-1* 유전자가 없는 것으로 도 2의 경우 판명되었는데, 다른 자색양배추에도 적용되는지 알아보기 위하여 녹색과 자색의 내혼계양배추와 캘리포니아 재배종을 대상으로 유전자의 존재와 발현을 알아보았다(도 3). 모든 녹색 양배추는 *BoMYBL2-1* 유전자를 지니고 있을 뿐 아니라 발현도 탐지되었다. 그러나 자색양배추는 2가지 경우가 존재하였다. 내혼계 자색양배추(7S4-63, 7S4-51)와 재배종 Purple A는 *BoMYBL2-1* 유전자가 없어 그 발현산물인 전사체도 RT-PCR에 의해 탐지되지 않았다. 그러나 Purple B의 경우는 유전자는 존재하나 발현산물은 탐지되지 않았다. 따라서 유전자가 존재하든 하지 않든 전사체가 만들어지지 않

으면 자색양배추가 된다는 결론을 내릴 수 있었다. 즉, 억제자인 *BoMYBL2-1*가 없어 안토시아닌이 제어없이 합성된다고 볼 수 있다. 이러한 결론을 뒷받침하기 위하여 이들 양배추의 *MYBL2-1* 유전자(프로모터 포함)을 클로닝하여 분석하기로 하였다.

[0062] **실시예 2. *BoMYBL2-1* 유전자의 클로닝과 서열 분석**

[0063] *BoMYBL2* 유전자 클로닝은 4종류의 프라이머 세트(도 1B; 표 2)를 여러 조합으로 사용하여 게놈 DNA를 증폭하였다. 그러나 적양배추에서는 증폭이 되지않아 우선 재배종 케일, 브로콜리 및 콜리플라우어로부터 클로닝을 하여 표준 유전자로 활용하였고, 그 다음에 ㈜아시아 종묘의 8개 계통과 캘리포니아 재배종 녹색양배추 2종과 자색2종 및 한국종묘(주)로부터 분양받은 자색양배추 B90과 B98로부터 유전자를 증폭하여 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 짧은 PCR 산물로부터 염기서열을 읽고, 다시 가장 긴 DNA 서열을 증폭하고 서열분석을 통하여, DNA의 다른 부분이 증폭되어 잘못 애노테이션(annotation) 되는 것을 방지하였다(도 4). 그러나 아시아종묘 양배추(7S4-51, 7S4-63)과 한국종묘양배추(B98) 등은 클로닝이 되지 않아 inverse PCR(iPCR)을 통하여 *MYBL2-1* 유전자 부분에 해당되는 서열을 얻어 분석하였다(도 4). 대부분 자색양배추에는 *MYBL2-1* 유전자가 없어 서열비교를 할 수 없었으나, 녹색양배추와 프로모터가 치환된 자색양배추 B90과 PurpleB의 *MYBL2-1* 서열은 비교가 가능하였다(도 5). *MYBL2-1* 유전자의 mRNA 서열 전방 긴 반복서열부분(150 bp)부터 *MYBL2-1* 유전자의 3' 부분까지 비교적 잘 보존적이었다. 그러나 앞의 프로모터 부분은 자색양배추 유전자에서 치환되었기 때문에 녹색과 자색 사이에 상당한 차이가 있었고, 자색양배추의 치환된 프로모터 부분에는 이 유전자의 발현에 필요한 전사인자 결합부위가 없어졌을 가능성이 있다. 자색양배추 Purple A, B98 및 아시아종묘의 7S4-51과 7S4-63은 iPCR로 증폭하였고, Purple A와 B98 서열만 비교하였다(도 6).

[0064] 전체 유전자의 서열을 종합하여 모식도로 비교하면 도 7과 같다. 즉, 프로모터가 치환된 변이체인 *BoMYBL2v*에서는 프로모터가 양배추 1번 염색체(C1)의 서열로 치환되었고, 자색양배추 Purple B와 B90이 이 유전자를 가지고 있었다. 반면에 *MYBL2-1* 유전자 전체가 치환된 *BoMYBL2sub*(substituted BoMYBL2)는 3번 염색체와 7번 염색체에 존재하는 서열이 중복되어 끼어든 것이다. 결구형 양배추에서는 Bol016163 부분이 결실되어 있다. 오직 재배종 케일과 콜리플라우어에서만 존재하였다.

[0065] **실시예 3. 자색양배추와 녹색양배추를 구분하는 마커 개발**

[0066] *BoMYBL2-1* 유전자 및 그 프로모터 부분을 이용하여 녹색양배추와 자색양배추를 구분하는 PCR 마커를 개발하고 검증하였다. 프라이머 위치는 도 7과 같고, 서열은 표 4와 같다. 특이한 PCR 조건은 재료 및 방법에 기술한 바와 같다. 양배추 시료는 ㈜아시아종묘 내혼계 녹색양배추 6종, 자색양배추 2종, 한국종묘제공 자색내혼계 및 교배조합 21종, 일본 재배종 녹색양배추 29종, 자색양배추 6종, 캘리포니아 재배종 자색양배추 2종을 이용하였다.

[0067] 실험결과, *MYBL2-1* 유전자가 있는 양배추는 모든 녹색양배추와 4개의 자색양배추(B90, Purple B, NP-J-156, HK-047)로(도 8) 프라이머 조합 F1 X R1(BoMYBL2w-F X BoMYBL2w-R)으로 증폭되었다. 반면에 자색양배추 중에서 치환된 것을 선발하는 F3 X R3(BoMYBL2sub-F X BoMYBL2sub-R) 프라이머 조합에서는 자색양배추 중에서 B90을 제외한 모든 자색양배추에서 검색되었다(도 9). 프로모터가 치환된 자색양배추를 판별하기 위해서 사용한 F2 X R2(BoMYBL2v-F X BoMYBL2v-R) 프라이머 조합에서는 4개의 자색양배추에서만 DNA가 증폭되었다(도 10). 결론적으로 모든 녹색양배추는 *BoMYBL2-1* 유전자를 지니고 있고, 자색양배추는 프로모터가 치환된 유전자(*BoMYBL2*-variant = *BoMYBL2v*) 유전자가 동형접합이거나(예, B90), 유전자부위가 완전히 다른 서열로 치환된 *BoMYBL2*-substitution(*BoMYBL2sub*) 동형접합(대부분 자색양배추)이거나 *BoMYBL2v*와 *BoMYBL2sub*의 이형접합(예, Purple B, NP-J-0156, HK-047) 유전자를 가지고 있음을 알 수 있다.

[0068] **실시예 4. *MYBL2-1* 유전자의 발현 결여와 자색양배추**

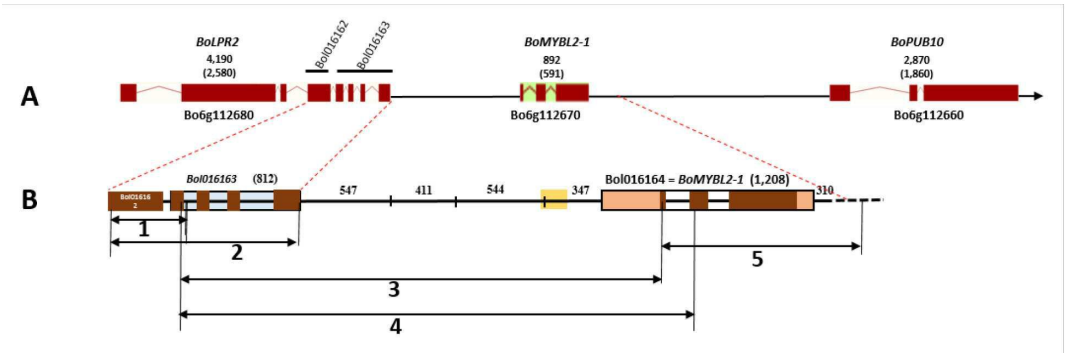
[0069] 자색양배추가 오직 안토시아닌 생합성 억제 전사인자인 *MYBL2-1* 유전자의 발현결여 결과인지 혹은 다른 유전자의 존재와 발현이 관계가 있는지를 알아보았다. 대상 유전자는 표 5와 같이 안토시아닌 생합성관련 유전자 및 조절유전자 등 30개이고 동일한 프라이머를 이용하여 게놈 PCR과 RT-PCR을 수행하였다. 유전자 존재 여부를 조사한 게놈 PCR 결과 *BoMYBL2-1*을 제외한 모든 유전자가 녹색과 자색양배추 및 3종의 콜리플라워에 존재하였다(도 11 및 도 12). 단 질소결핍시 안토시아닌 함량이 증가하는데 관련된 *BoLBD37L*과 *BoHY5L*의 경우 증폭된 DNA 크기가 달라 다형성이 존재할 수 있음을 시사하고 있다. 결론적으로 조사한 모든 유전자가 존재하고 있었다.

[0070] 자색양배추에서 안토시아닌 합성과 관련된 유전자의 유무는 *BoMYMBL2-1*를 제외하고는 차이가 없었으나, 발현의 차이가 존재할 가능성이 있어 중요한 유전자의 발현을 자색양배추에서 측정하였다. 이때 녹색양배추 대박나를 대조구로 사용하였다(도 13). 그 결과 자색 양배추 사이에 색도 차이가 안토시아닌 함량과 유전자의 발현에 연

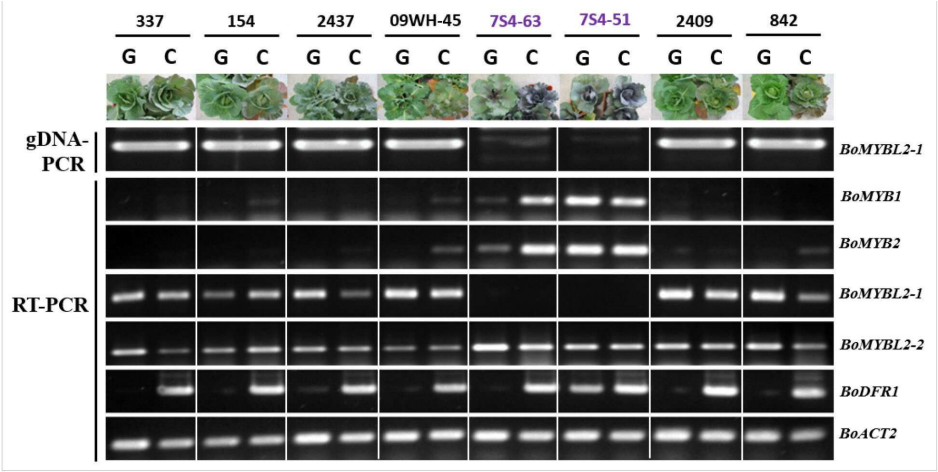
관이 없었다. 자색양배추에서 *BoMYB1*과 *BoMYB3*는 대박나와 같은 양으로 발현되고, *BoMYB4*는 발현이 되지 않으며 *BoMYB2*만이 자색에서 높게 발현하였다. *BoCHS2*와 *BoF3H*, *BoDFR1*은 자색에서 발현이 대박나에서보다 높았다. 이상의 결과를 종합하였을 경우 다른 유전자의 돌연변이는 없는 것 같고, 오직 *MYBL2-1*의 돌연변이가 자색양배추가 만들어진 원인인 것으로 판명되었다.

도면

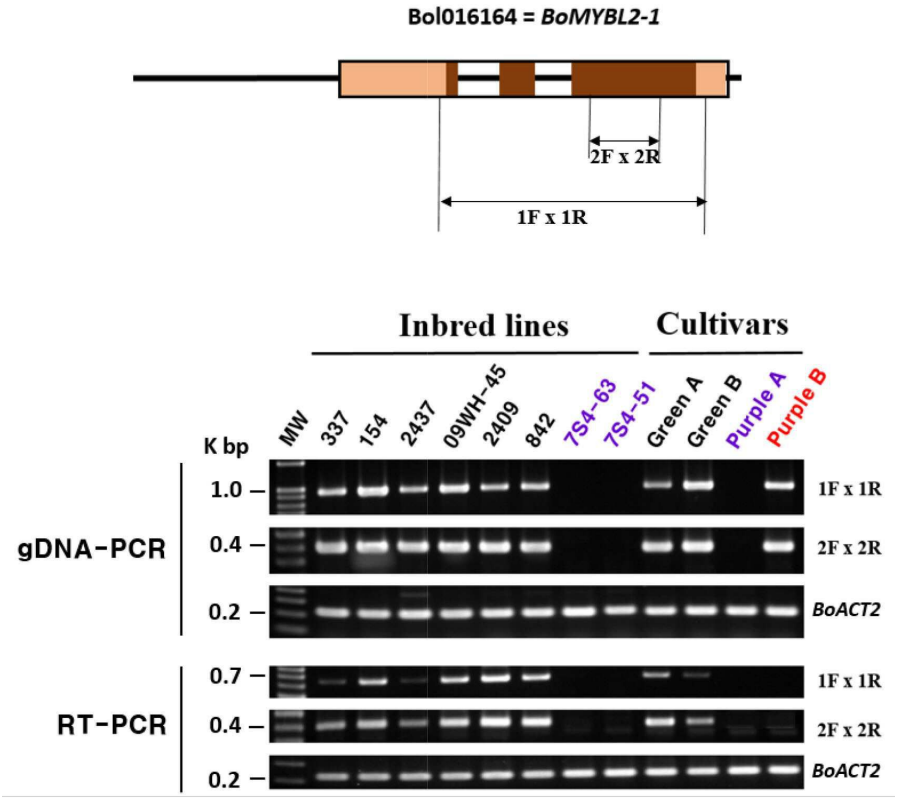
도면1



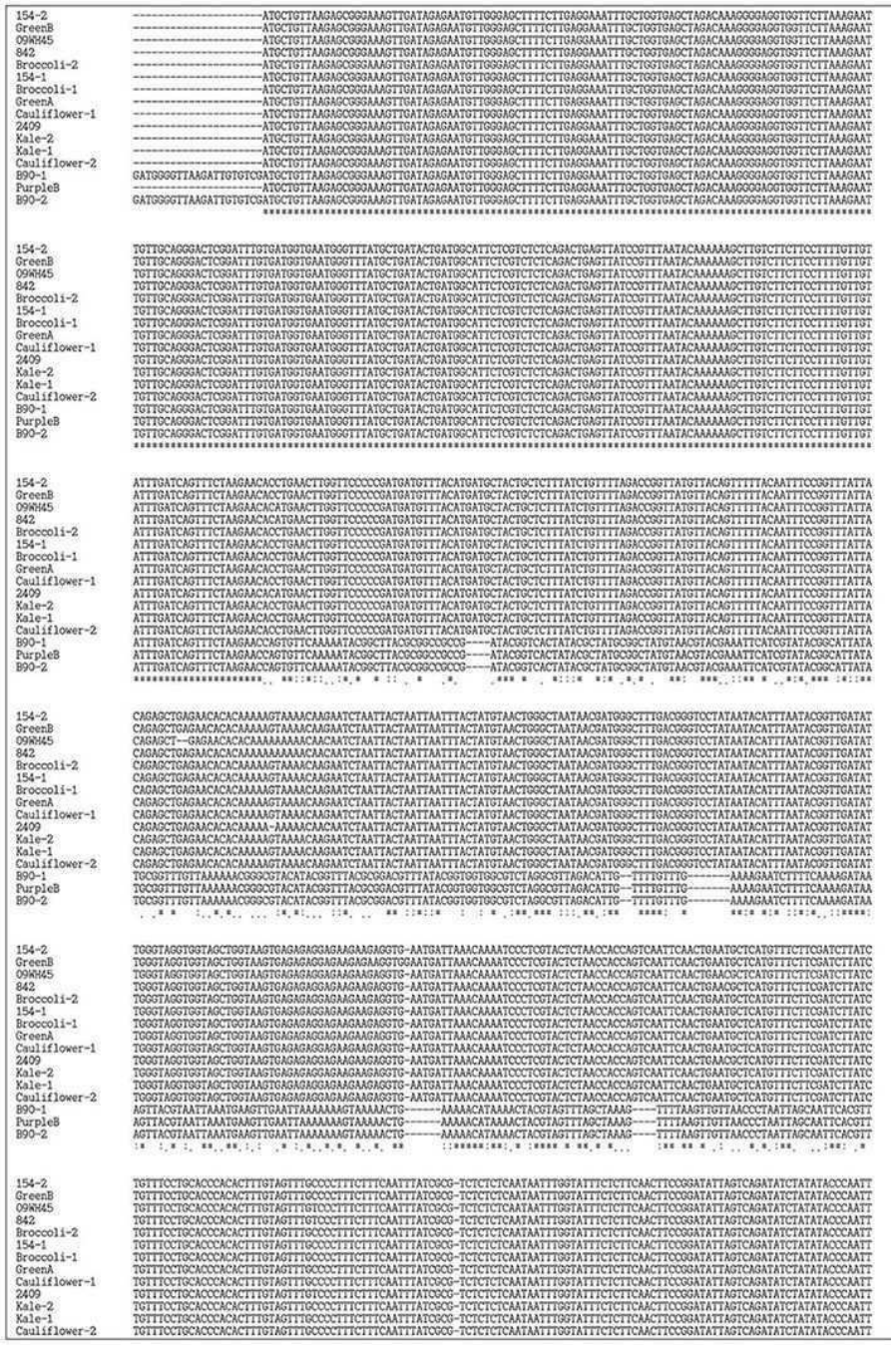
도면2



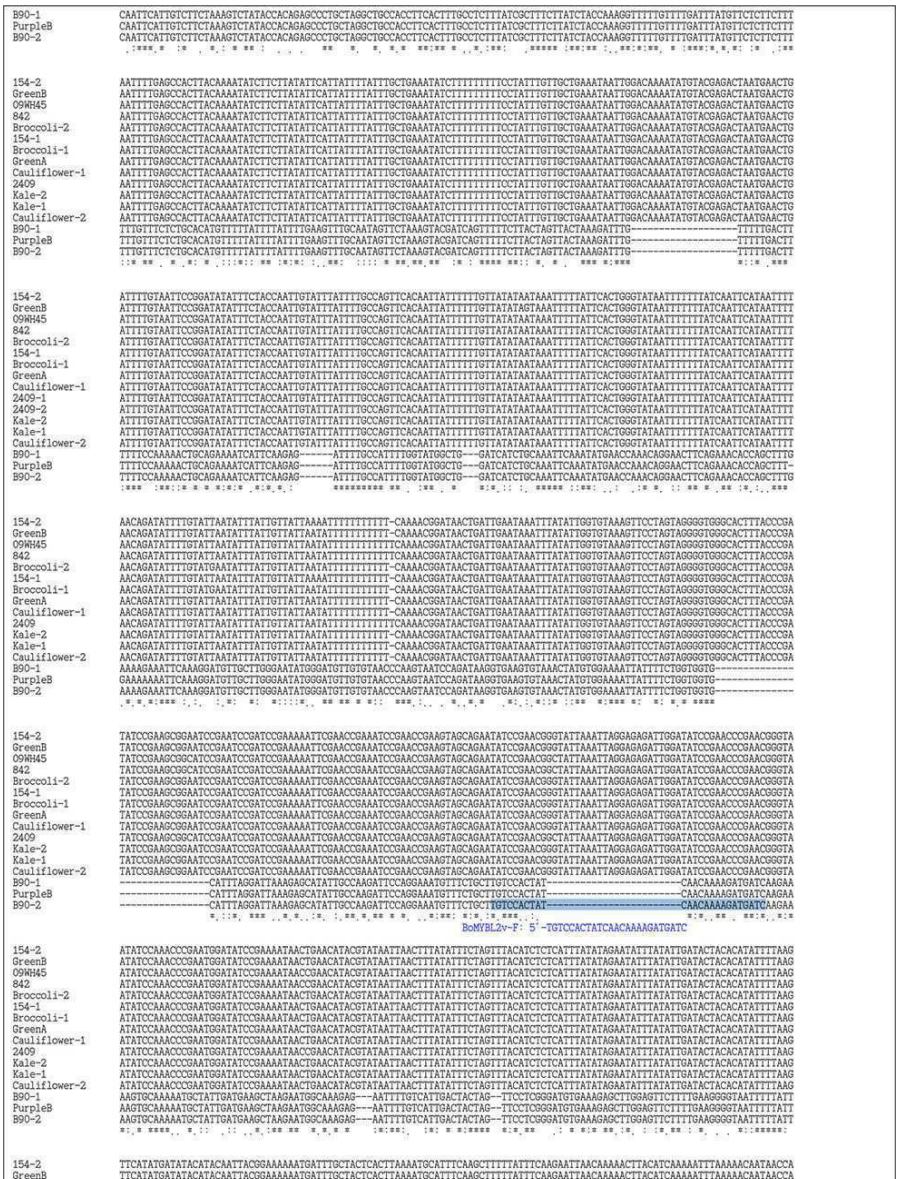
도면3


Bol016164 = BoMYBL2-1
2F x 2R
1F x 1R
Inbred lines
Cultivars
MW
337
154
2437
09WH-45
2409
842
7S4-63
7S4-51
Green A
Green B
Purple A
Purple B
K bp
gDNA-PCR
1.0
0.4
0.2
1F x 1R
2F x 2R
BoACT2
RT-PCR
0.7
0.4
0.2
1F x 1R
2F x 2R
BoACT2

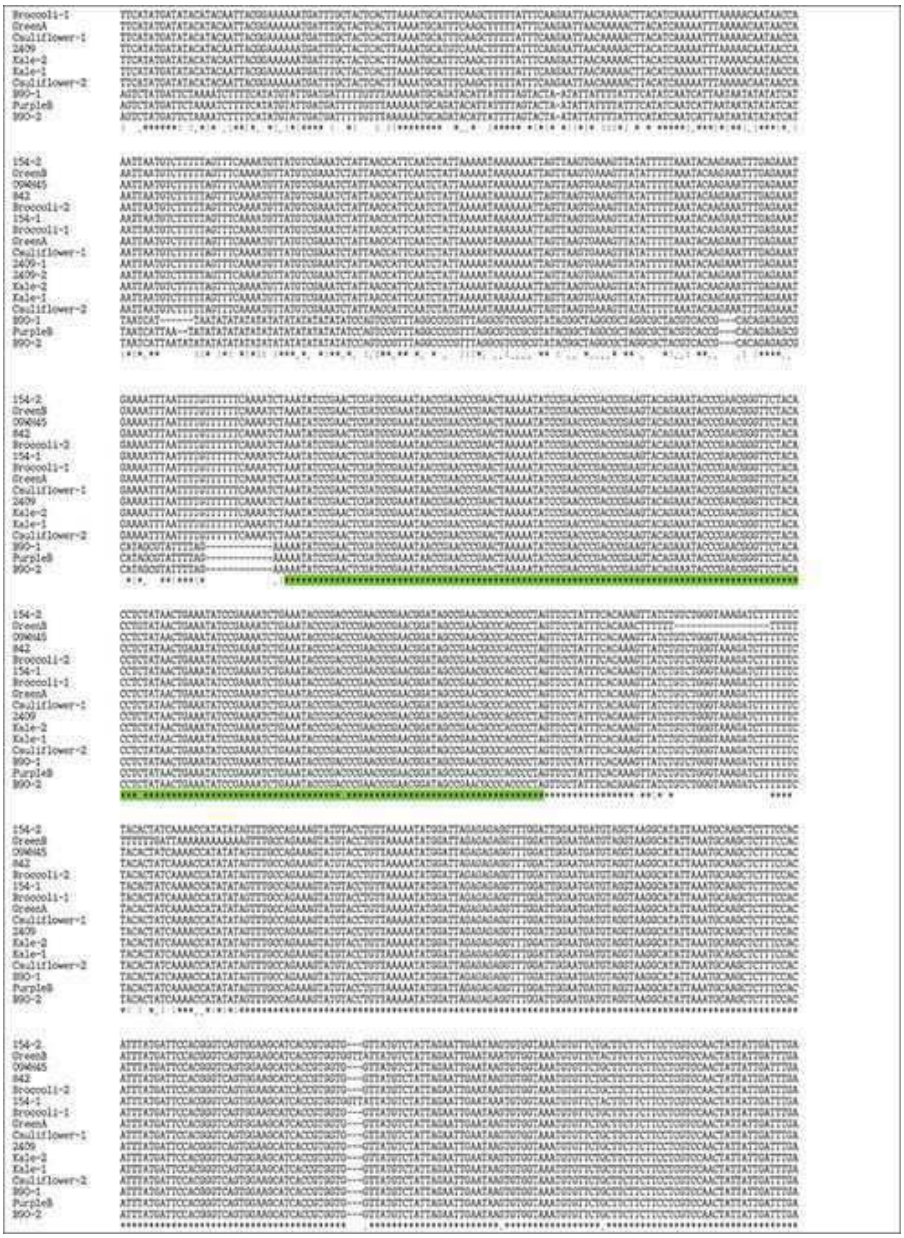
도면4a



도면4b



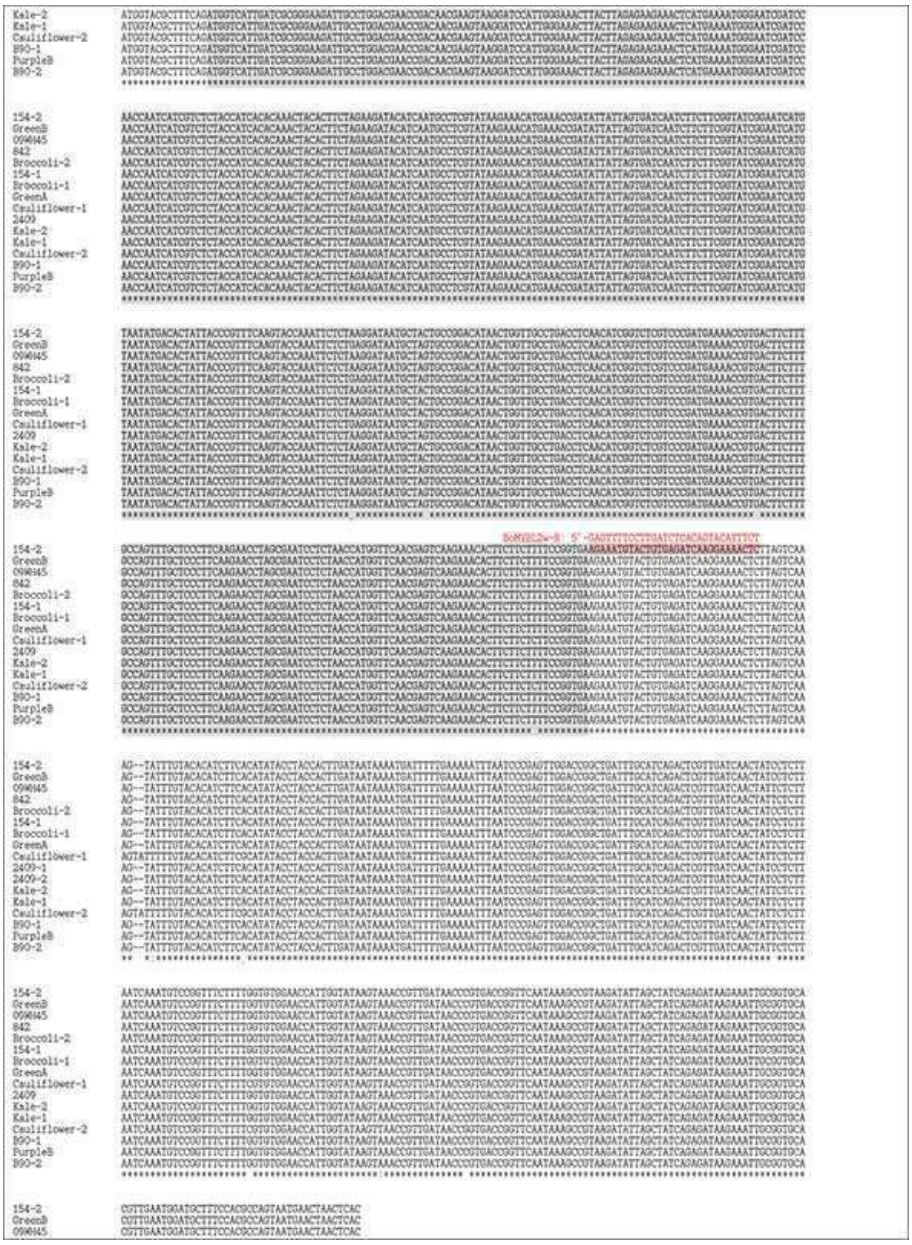
도면4c



도면4d



도면4e



도면4f


842 CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
Broccoli-2 CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
154-1 CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
Broccoli-1 CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
GreenA CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
Cauliflower-1 CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
2409 CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
Kale-2 CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
Kale-1 CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
Cauliflower-2 CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
B90-1 CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
PurpleB CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC
B90-2 CGTTGAATGGATGCTTTCCACGCCAGTAATGAACTAACTCAC

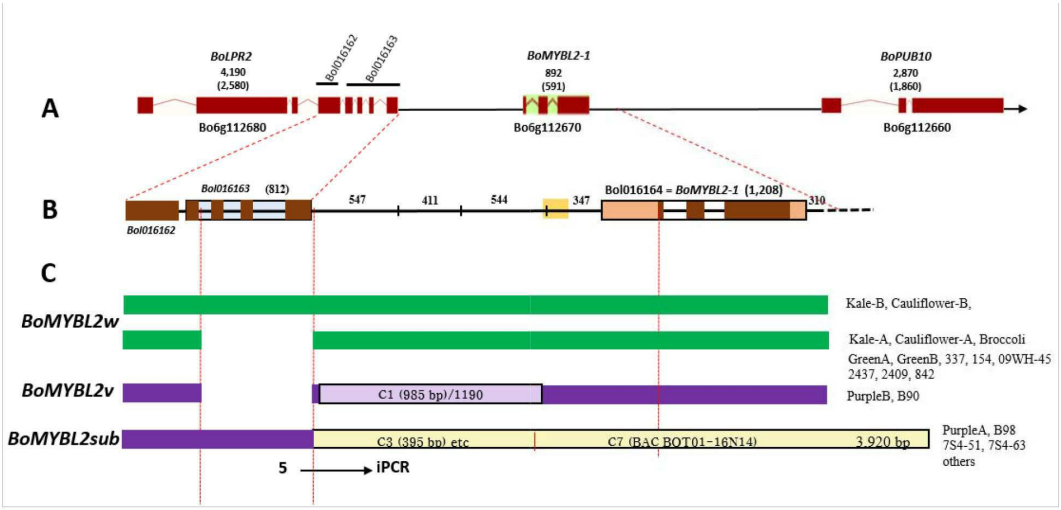
도면5a


B98 ATGTTGAAGAACCACAACTGCATGCCTGATAACGCTCTTCTCAGCACTCTCATCCACTGGCTTTGCATAGACGGGAGAGTTACAGAAGCGAGGAAGTTGTTGGACGAGTTTGAGAAAGGC
PurpleA ATGTTGAAGAACCACAACTGCATGCCTGATAACGCTCTTCTCAGCACTCTCATCCACTGGCTTTGCATAGACGGGAGAGTTACAGAAGCGAGGAAGTTGTTGGACGAGTTTGAGAAAGGC
B98 TCCATCCCTAGTCTCTTGACGTACAACACGTTGATCTCTGGGATGTGCGAGAAGGGAGAGCTGACGGAGGCGGGTCGGTTATGGGACGACATGGTTGAGAGGAAGTGTAAGCCGAATGCT
PurpleA TCCATCCCTAGTCTCTTGACGTACAACACGTTGATCTCTGGGATGTGCGAGAAGGGAGAGCTGACGGAGGCGGGTCGGTTATGGGACGACATGGTTGAGAGGAAGTGTAAGCCGAATGCT
B98 TTCACGTATAACGTTCTGATCGAAGGGCTGTGCAAGAAGGGGAATGTTAAGGAAGGTGTCAGGGTTCTTGAAGAGATGCTGGAAAATGGTTGTTTTCCGAATAAAACGAGGTTCTTGATA
PurpleA TTCACGTATAACGTTCTGATCGAAGGGCTGTGCAAGAAGGGGAATGTTAAGGAAGGTGTCAGGGTTCTTGAAGAGATGCTGGAAAATGGTTGTTTTCCGAATAAAACGAGGTTCTTGATA
B98 TTGTTCGAGGGGTTGCAGGAGTCAGGGAAAGAAGAGGATGGGGTTAAGATTGTGTCGATGGCTGTTAAGAGCGAGAAAGTTGATAGAGAATGTTAGGAGCTTTTCTTGAGGAAATTTGCT
PurpleA TTGTTCGAGGGGTTGCAGGAGTCAGGGAAAGAAGAGGATGGGGTTAAGATTGTGTCGATGGCTGTTAAGAGCGAGAAAGTTGATAGAGAATGTTAGGAGCTTTTCTTGAGGAAATTTGCT
B98 GGTGAGCTAGACAAAGGGGAGGTGGTTCTTAAAGAATTGTTGCATGAAGTTTCTGACTCTTGAAGAAGCAAGGTGGTTCTTAAAAAAAAATGTTATAAGGGCAATGATCTAGATTCAAGG
PurpleA GGTGAGCTAGACAAAGGGGAGGTGGTTCTTAAAGAATTGTTGCATGAAGTTTCTGACTCTTGAAGAAGCAAGGTGGTTCTTAAAAAAAAATGTTATAAGGGCAATGATCTAGATTCAAGG
B98 GATTTGGTAGCACATAGCTTTATCAAAGGTTGGTTGCGTTTTGATCTGCTCCAAGGTAAGTACAATCCTTTGATCTCATAGCTCAGAGAAAAAGGAAGATGGCGTTTGTGACCACTGCGG
PurpleA GATTTGGTAGCACATAGCTTTATCAAAGGTTGGTTGCGTTTTGATCTGCTCCAAGGTAAGTACAATCCTTTGATCTCATAGCTCAGAGAAAAAGGAAGATGGCGTTTGTGACCACTGCGG
B98 AAGTCTGTGACGCAGCTGATTCGGAGTGGTGAGACAGATATTCTCAGGTCCTGTTGTCACTGTCAAAGTGTTCGAAGACAATGGCTTGATCCTTAAGTTCCTCGAGGAGAAAAGGTAACT
PurpleA AAGTCTGTGACGCAGCTGATTCGGAGTGGTGAGACAGATATTCTCAGGTCCTGTTGTCACTGTCAAAGTGTTCGAAGACAATGGCTTGATCCTTAAGTTCCTCGAGGAGAAAAGGTAACT
B98 GAATCTCATTCTTTAAAAACCTAAACTTGATTTGTAACTTTCACTACTTGCACAGAGATAAAGATAATGACTATGACATGATTTATGATTACACAAGCACATAGTTGTTACTTTGCTTAG
PurpleA GAATCTCATTCTTTAAAAACCTAAACTTGATTTGTAACTTTCACTACTTGCACAGAGATAAAGATAATGACTATGACATGATTTATGATTACACAAGCACATAGTTGTTACTTTGCTTAG
B98 AGTGTAATCTATCACGTTGCAAACGGGTGAATTAGTTGTTATTTTGCTTAGTTTTCAAGTTTTGGATGATGTTATTAAGGAAACGGGAGAGTACTTGTGGAGGGAGCCAACGATGTGCAA
PurpleA AGTGTAATCTATCACGTTGCAAACGGGTGAATTAGTTGTTATTTTGCTTAGTTTTCAAGTTTTGGATGATGTTATTAAGGAAACGGGAGAGTACTTGTGGAGGGAGCCAACGATGTGCAA
BoMYBL2sub-F:5′-GTTCAAGCTCATTGTGAACGGA
B98 TACTCGGAGGCAACCCCGTGGTTCAAGCTCATTGTGAACGGATGCATCAGAGACGTTGATGAGATCAACGGTTGTGATATTGGAGTGAGAGCTTTGGCCTCTCATCCAATAAGGCGAGC
PurpleA TACTCGGAGGCAACCCCGTGGTTCAAGCTCATTGTGAACGGATGCATCAGAGACGTTGATGAGATCAACGGTTGTGATATTGGAGTGAGAGCTTTGGCCTCTCATCCAATAAGGCGAGC
B98 AAGAAAGGACTTGGAGAGCAATGAGTTCCAGTTAATATTGCATTTGTGATGGTGAATGGGTTTATGCTGAACACATGAACTTGGTTCCCCCCGATGATGTTTACATATGATGCTACTGCT
PurpleA AAGAAAGGACTTGGAGAGCAATGAGTTCCAGTTAATATTGCATTTGTGATGGTGAATGGGTTTATGCTGAACACATGAACTTGGTTCCCCCCGATGATGTTTACATATGATGCTACTGCT
B98 CTTTATCTGTTTTAGATCGGTTATGCTTCTCACGGGTGGAAAAGTATTATGGCTGGAAGAGAGCTACTGCGAAAGGGTCTAGGCTGGTCGGTTGGGGATGGAGAGCAGATCCGTATCTGG
PurpleA CTTTATCTGTTTTAGATCGGTTATGCTTCTCACGGGTGGAAAAGTATTATGGCTGGAAGAGAGCTACTGCGAAAGGGTCTAGGCTGGTCGGTTGGGGATGGAGAGCAGATCCGTATCTGG
B98 GATGATCTCTGGCTGTCGTCAAAGACTCCATTACAACCGATGGGCCCAGCGAACCCGGAAAGCGCCTCCCTAAAGGTTAAGGATCTCCTCTGTCCACTTACAAATAAGTGGGAGACTGAG
PurpleA GATGATCTCTGGCTGTCGTCAAAGACTCCATTACAACCGATGGGCCCAGCGAACCCGGAAAGCGCCTCCCTAAAGGTTAAGGATCTCCTCTGTCCACTTACAAATAAGTGGGAGACTGAG
B98 AAAATTAGGAGGCTACTACCTCAGTATGGGGACACCATTTTGAGAATTACAACACACCTTCGGGATGCTCTGTTCTGGCTACCGGAAAAATCAAGTAGATACACTACGAAATCAGGCTAT
PurpleA AAAATTAGGAGGCTACTACCTCAGTATGAGGACACCATTTTGAGAATTACAACACACCTTCGGGATGCTCTGTTCTGGCTACCGGAAAAATCAAGTAGATACACTACGAAATCAGGCTAT
B98 GGGGTTGGTATGACTTGTGATAAGTCGCTGGGTGAAGCAAATAACCCTGTTGATTGGGTGAAGCACATCTGGAATGTTAAAACGGCCCCCAAGCTGAAGGACTTTCTGTGGAGAGTAATA
PurpleA GGGGTTGGTATGACTTGTGATAAGTCGCTGGGTGAAGCAAATAACCCTGTTGATTGGGTGAAGCACATCTGGAATGTTAAAACGGCCCCCAAGCTGAAGGACTTTCTGTGGAGAGTAATA
B98 TCGGAACTGAGCTTTAACTGCAAGAAATGTGGGGCACATGAGGACGATCTCCATGTTTTTCTCACCTGTCCAATGGCGGAGGAAGTATGGAGTAATATCCCGACAGTACTCAAACCATCA
PurpleA TCGGAACTGAGCTTTAACTGCAAGAAATGTGGGGCACATGAGGATGATCTCCATGTTTTTCTCACCTGTCCAATGGCGGAGGAAGTATGGAGTAATATCCCGACAGTACTCAAACCATCA
B98 CCATCTCTTACTTCTATAGCGGAACTGATCGAGCAGGGACCTAACTTGGTTTCACTTCCACCAGTTGGTCTGAGCTCTCCTTTATGGCCTTGGGTGCTGTGGAACCTTTGGAAAGCAAGG
PurpleA CCATCTCTTACTTCTATAGCGGAACTGATCGAGCAGGGACCTAACTTGGTTTCACTTCCACCAGTTGGTCTGAGCTCTCCTTTATGGCCTTGGGTGCTGTGGAACCTTTGGAAAGCAAGG
B98 AACAAACTTGTGTTTGAAAACAGAGTATTCTCAGCCCAAGAGATTGTTCTGAAGAGCATTACTGATGCAAAGGAATGGAGTGAGGCACAACTACCTGATCGATTACCGAGTTCCTCCATC
PurpleA AACAAACTTGTGTTTGAAAACAGAGTATTCTCAGCCCAAGAGATTGTTCTGAAGAGCATTACTGATGCAAAGGAATGGAGTGAGGCACAACTACCTGATCGATTACCGAGTTCCTCCATC
B98 CACTCCCCTGTCCAAACCAACCAACGAGCCGTTACTGCCCCCCAAGGATCCAAGATGGAGTACTGGTCTGCAATGTTGATGCAGCTTGGGATGCAATTTCTGGTGGCTGTGGTATAGGTG
PurpleA CACTCCCCTGTCCAAACCAACCAACGAGCCGTTACTGCCCCCCAAGGATCCAAGATGGAGTACTGGTCTGCAATGTTGATGCAGCTTGGGATGCAATTTCTGGTGGCTGTGGTATAGGTG
B98 GAATATTCTCAGGGCAATCAGGGTCTTCTCTACCGAACTTCTCGAACTCTCACAGTCATGTTTCCTCAGCTCTAATGGCAGAAGCCATTGCTGTACATCGGGCGGTATCTCTTGCCGTGT
PurpleA GAATATTCTCAGGGCAATCAGGGTCTTCTCTACCGAACTTCTCGAACTCTCACAGTCATGTTTCCTCAGCTCTAATGGCAGAAGCCATTGCTGTACATCGGGCGGTATCTCTTGCCGTGT
B98 TCTCAAACGTCCGATCCCTGGCAGTTCTATCCGACTCTTTGTCCCTGGTTAATTTATTGAACGAGGGCGAGACTCAACCTGAACTGTTCGGTATCATGTTTGACATCTATCACTTTATCC
PurpleA TCTCAAACGTCCGATCCCTGGCAGTTCTATCCGACTCTTTGTCCCTGGTTAATTTATTGAACAAGGGCGAGACTCAACCTGAACTGTTCGGTATCATGTTTGACATCTATCACTTTATCC
B98 CTCTGTTTGATGTAATTTCTTTCCATTTTATCTCTCGAAACTTCAATGTGGAAGCCGATTTGGTGGCAAAATCAGCCTTTGCTGGGTCTGTAATGAACTCCTCTGTTGGAGCTTAGACTC
PurpleA CTCTGTTTGATGTAATTTCTTTCCATTTTATCTCTCGAAACTTCAATGTGGAAGCCGATTTGGTGGCAAAATCAGCCTTTGCTGGGTCTGTAATGAACTCCTCTGTTGGAGCTTAGACTC
B98 CAATGAGAAATGAAATTCTTGTTTGTTCAAAAAAAAAAGATCTGTTATAAATCCATGATATGGATATGTGGATTGCCATTAACCATCGAGGAGGTTTACATCTGACCCGACTATCCGGTC
PurpleA CAATGAGAAATGAAATTCTTGTTTGTTCAAAAAAAAAAGATCTGTTATAAATCCATGATATGGATATGTGGATTGCCATTAACCATCGAGGAG-GTTACATCTGACCCGACTATCCGGTC
B98 TGTCTACACTCGTCTCCGGTCCGTCTACATCCGTCCAAGACTAGACTCATTCAGCCGGAGCATTTATGAGCTTTGACCAAGTCTAGATCTTTGTGGTCAATATGTATTAAATGTGTAGAT
PurpleA TGTCTACACTCGTCTCCGGTCCGTCTACATCCGTCCAAGACTAGACTCATTCAGCCGGAGCATTTATGAGCTTTGACCAAGTCTAGATCTTTGTGGTCAATATGTATTAAATGTGTAGAT
B98 TCTAAACCCTTATGAACCTCCACTATATATTGATAGTGAGAGCTAATGAGAAAGACACAACTTTCACAACAACACTTCTCTCATATTTCTAACACGTTATCAGCACGATTGTGCTCTCCA
PurpleA TCTAAACCCTTATGAACCTCCACTATATATTGATAGTGAGAGCTAATGAGAAAGACACAACTTTCACAACAACACTTCTCTCATATTTCTAACACGTTATCAGCACGATTGTGCTCTCCA
B98 CCTGAGAAATCTCTCTCAGCCGGCGATCCCCTTTCCGGCCAGCTCCTCCGGTGCTCAGCCTTTGCTCCACCGGCGCTCAGCCTTCTCTCCACCAGGCCAACTCTCTCTCTCCGCCGGAAA
PurpleA CCTGAGAAATCTCTCTCAGCCGGCGATCCCCTTTCCGGCCAGCTCCTCCGGTGCTCAGCCTTTGCTCCACCGGCGCTCAGCCTTCTCTCCACCAGGCCAACTCTCTCTCTCCGCCGGAAA
BoMYBL2sub-R: 5′-GGACCACCGTGAGAGAGAGA

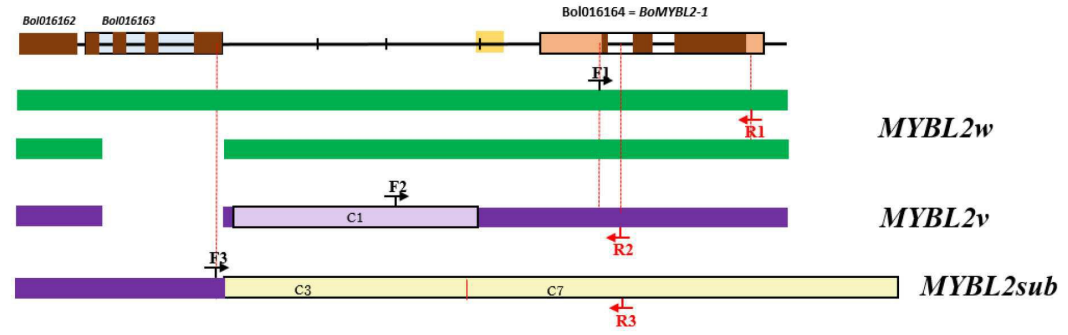
도면5b


⇨아시아종묘 자색양배추서열은 읽지않음

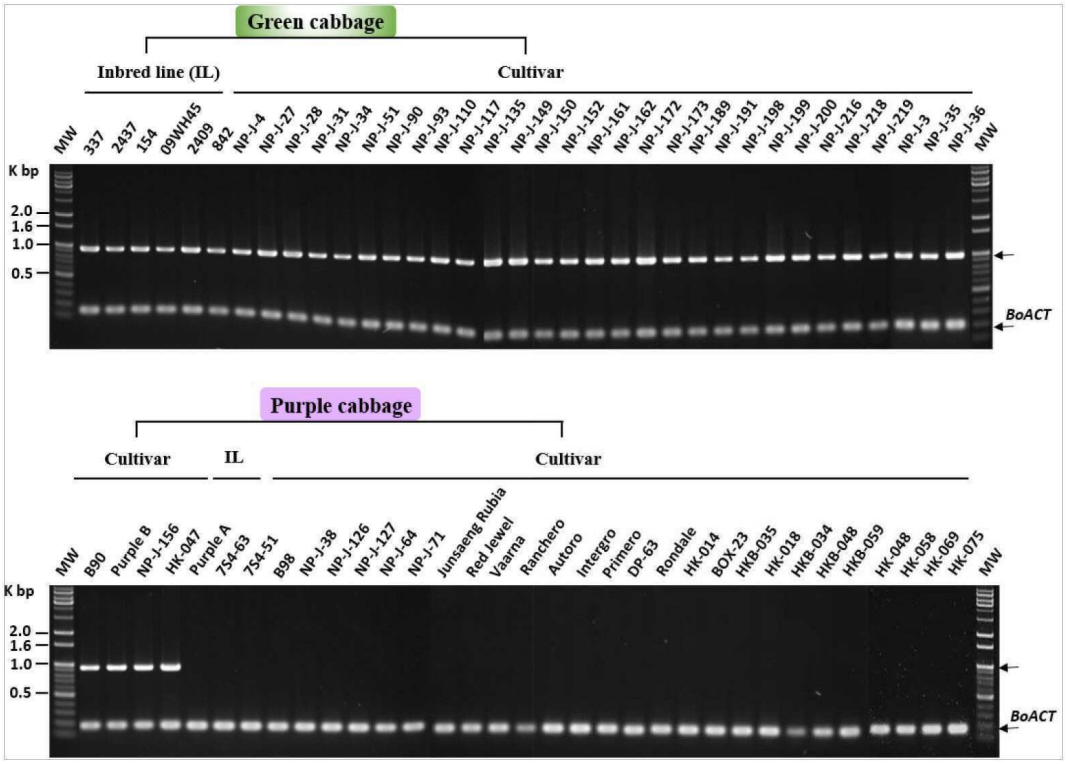
도면6


A
BoLPR2
4,190
(2,580)
Bo6g112680
Bol016162
Bol016163
BoMYBL2-1
892
(591)
Bo6g112670
BoPUB10
2,870
(1,860)
Bo6g112660
B
Bol016163 (812)
547
411
544
347
Bol016164 = BoMYBL2-1 (1,208)
310
Bol016162
C
BoMYBL2w
Kale-B, Cauliflower-B,
Kale-A, Cauliflower-A, Broccoli
GreenA, GreenB, 337, 154, 09WH-45
2437, 2409, 842
BoMYBL2v
C1 (985 bp)/1190
PurpleB, B90
BoMYBL2sub
C3 (395 bp) etc
C7 (BAC BOT01-16N14)
3,920 bp
PurpleA, B98
7S4-51, 7S4-63
others
5
iPCR

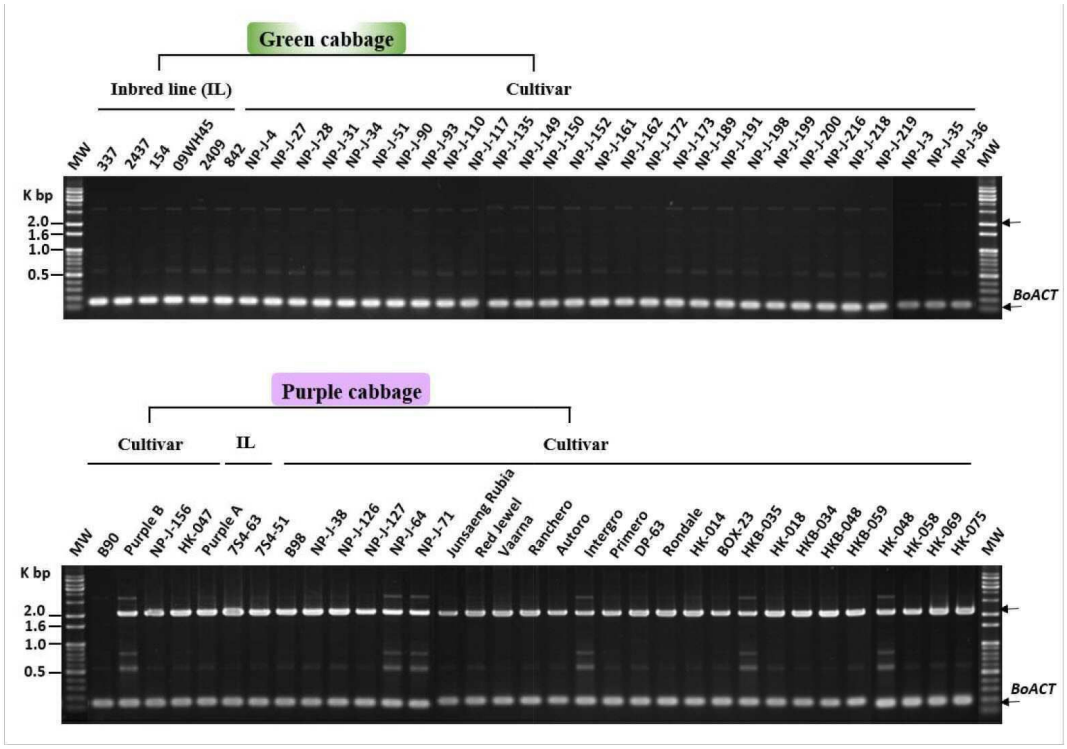
도면7


Bol016162
Bol016163
Bol016164 = BoMYBL2-1
F1
R1
MYBL2w
F2
C1
R2
MYBL2v
F3
C3
C7
R3
MYBL2sub

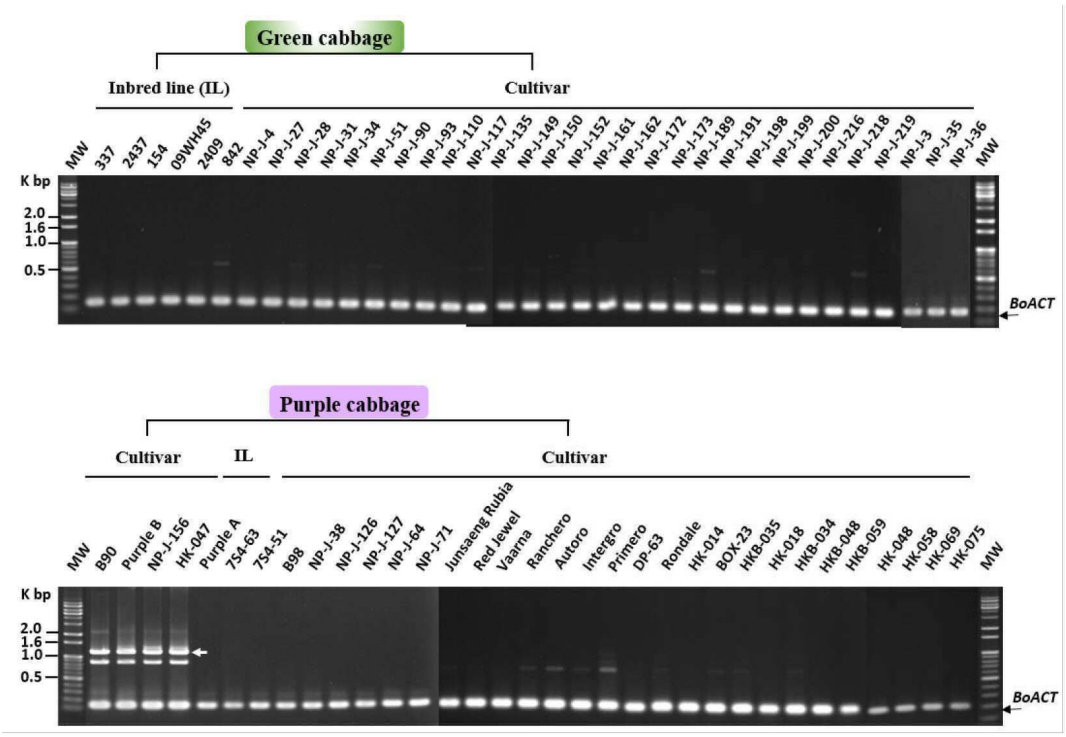
도면8


Green cabbage
Inbred line (IL)
Cultivar
MW 337 2437 154 09WH45 2409 842 NP-J-4 NP-J-27 NP-J-28 NP-J-31 NP-J-34 NP-J-51 NP-J-90 NP-J-93 NP-J-110 NP-J-117 NP-J-135 NP-J-149 NP-J-150 NP-J-152 NP-J-161 NP-J-162 NP-J-172 NP-J-173 NP-J-189 NP-J-191 NP-J-198 NP-J-199 NP-J-200 NP-J-216 NP-J-218 NP-J-219 NP-J-3 NP-J-35 NP-J-36 MW
K bp
2.0
1.6
1.0
0.5
BoACT
Purple cabbage
Cultivar
IL
Cultivar
MW B90 Purple B NP-J-156 HK-047 Purple A 754-63 754-51 B98 NP-J-38 NP-J-126 NP-J-127 NP-J-64 NP-J-71 Junsaeng Rubia Red Jewel Vaarna Ranchero Autoro Intergro Primero DP-63 Rondele HK-014 BOX-23 HKB-035 HK-018 HKB-034 HKB-048 HKB-059 HK-048 HK-058 HK-069 HK-075 MW
K bp
2.0
1.6
1.0
0.5
BoACT

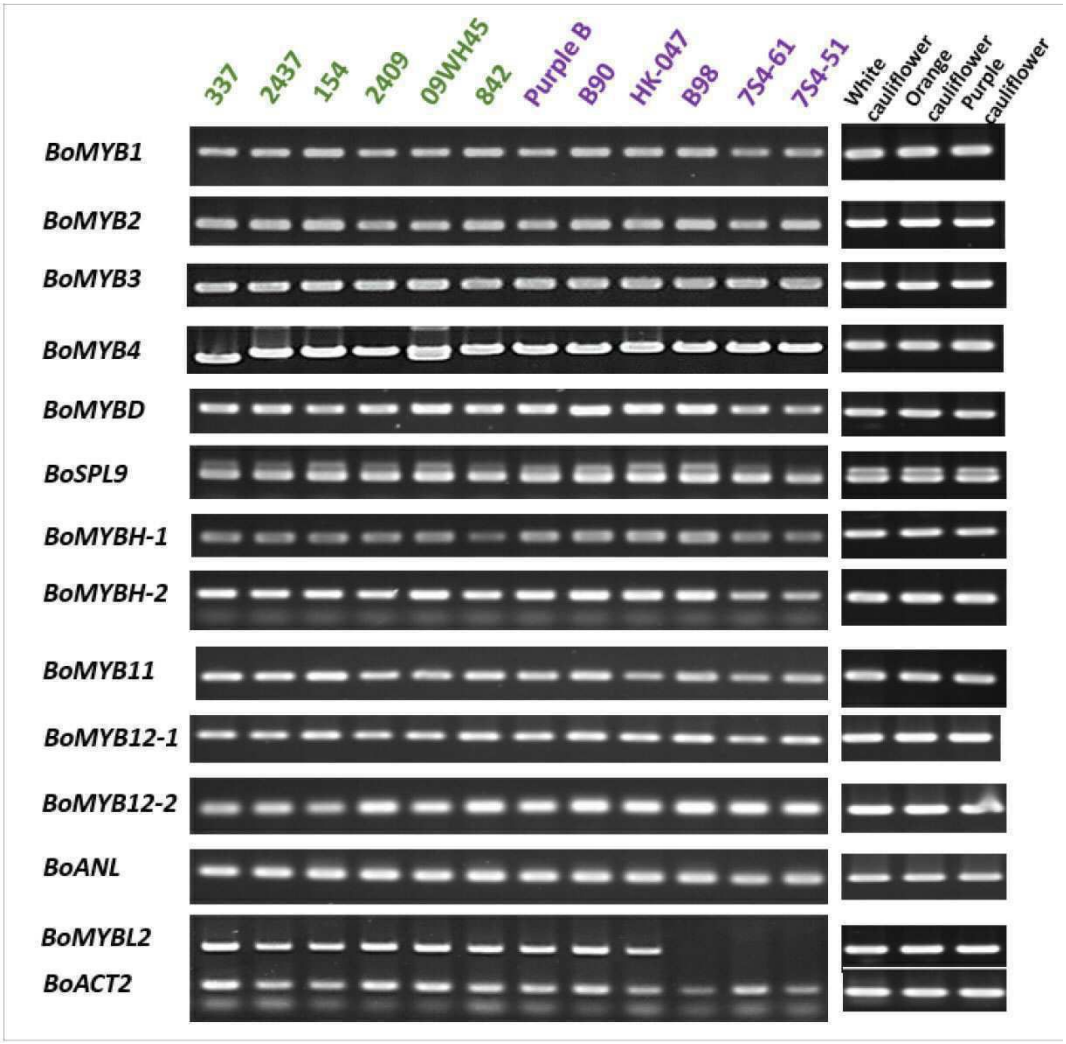
도면9


Green cabbage
Inbred line (IL)
Cultivar
MW 337 2437 154 09WH45 2409 842 NP-J-4 NP-J-27 NP-J-28 NP-J-31 NP-J-34 NP-J-51 NP-J-90 NP-J-93 NP-J-110 NP-J-117 NP-J-135 NP-J-149 NP-J-150 NP-J-152 NP-J-161 NP-J-162 NP-J-172 NP-J-173 NP-J-189 NP-J-191 NP-J-198 NP-J-199 NP-J-200 NP-J-216 NP-J-218 NP-J-219 NP-J-3 NP-J-35 NP-J-36 MW
K bp
2.0
1.6
1.0
0.5
BoACT
Purple cabbage
Cultivar
IL
Cultivar
MW B90 Purple B NP-J-156 HK-047 Purple A 754-63 754-51 B98 NP-J-38 NP-J-126 NP-J-127 NP-J-64 NP-J-71 Junsaeng Rubia Red Jewel Vaarna Ranchero Autoro Intergro Primero DP-63 Rondale HK-014 BOX-23 HKB-035 HK-018 HKB-034 HKB-048 HKB-059 HK-048 HK-058 HK-069 HK-075 MW
K bp
2.0
1.6
1.0
0.5
BoACT

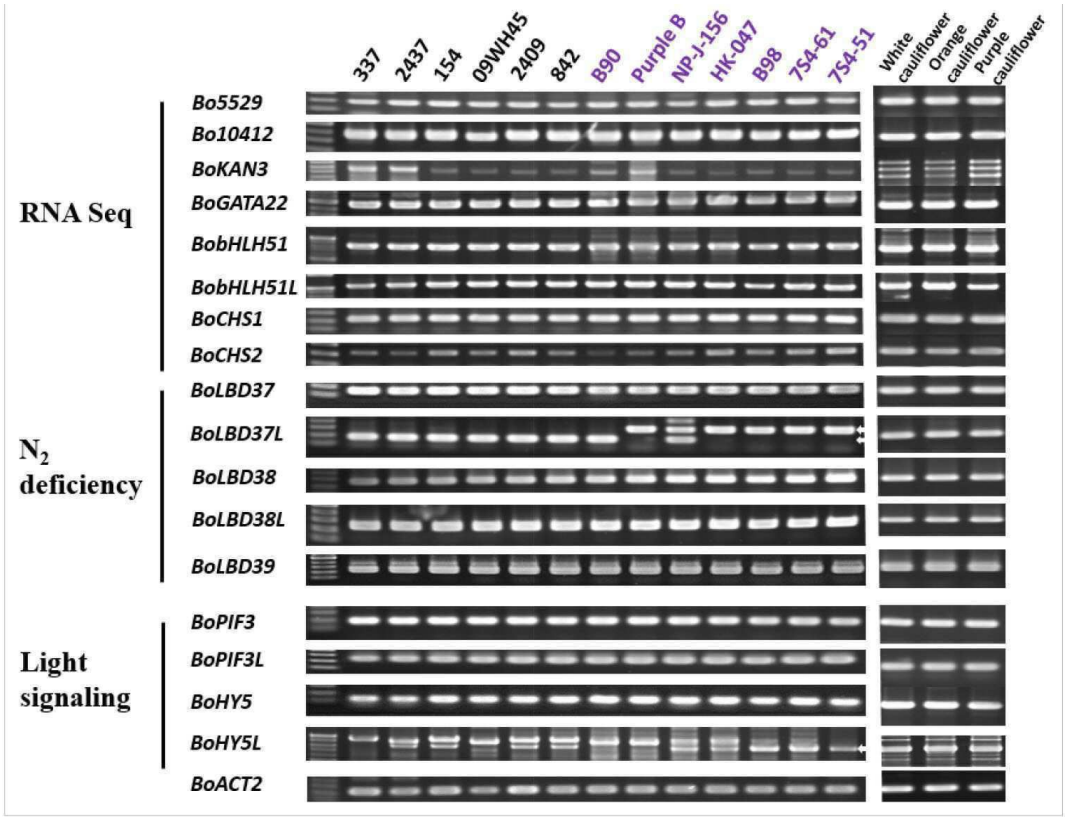
도면10


Green cabbage
Inbred line (IL)
Cultivar
MW 337 2437 154 09WH45 2409 842 NP-J-4 NP-J-27 NP-J-28 NP-J-31 NP-J-34 NP-J-51 NP-J-90 NP-J-93 NP-J-110 NP-J-117 NP-J-135 NP-J-149 NP-J-150 NP-J-152 NP-J-161 NP-J-162 NP-J-172 NP-J-173 NP-J-189 NP-J-191 NP-J-198 NP-J-199 NP-J-200 NP-J-216 NP-J-218 NP-J-219 NP-J-3 NP-J-35 NP-J-36 MW
K bp
2.0
1.6
1.0
0.5
BoACT
Purple cabbage
Cultivar
IL
Cultivar
MW B90 Purple B NP-J-156 HK-047 Purple A 754-63 754-51 B98 NP-J-38 NP-J-126 NP-J-127 NP-J-64 NP-J-71 Junsaeng Rubia Red Jewel Vaarna Ranchero Autoro Intergro Primero DP-63 Rondale HK-014 BOX-23 HKB-035 HK-018 HKB-034 HKB-048 HKB-059 HK-048 HK-058 HK-069 HK-075 MW
K bp
2.0
1.6
1.0
0.5
BoACT

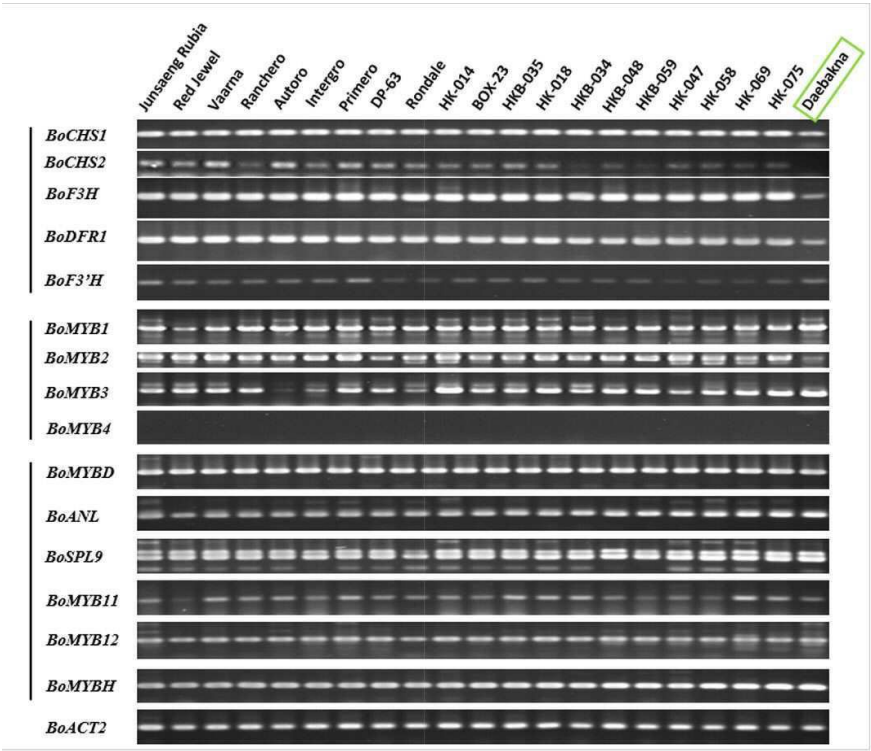
도면11


337
2437
154
2409
09WH45
842
Purple B
B90
HK-047
B98
754-61
754-51
White cauliflower
Orange cauliflower
Purple cauliflower
BoMYB1
BoMYB2
BoMYB3
BoMYB4
BoMYBD
BoSPL9
BoMYBH-1
BoMYBH-2
BoMYB11
BoMYB12-1
BoMYB12-2
BoANL
BoMYBL2
BoACT2

도면12



도면13



서 열 목 록

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

<120> Molecular marker for selecting purple Brassicaceae cultivar and uses thereof

<130> PN17156

<160> 95

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 3245

<212> DNA

<213> Brassica oleracea

<400> 1

atggctgtta agagcgggaa agttgataga gaatgttggg agcttttctt gaggaaattt 60

gctggtgagc tagacaaagg ggaggtggtt cttaaagaat tgttgcaggg actcggattt 120

gtgatggtga atgggtttat gctgatactg atggcattct cgtctctcag actgagttat 180

ccgtttaata caaaaaagct tgtcttcttc cttttgttgt atttgatcag tttctaagaa 240

ccagtgttca aaaatacggc ttacgcggcc gccgatacgg tcactatacg ctatgcggct 300

atgtaacgta cgaaattcat cgtatacggc attatatgcg gtttgttaaa aaacgggcgt 360

acatacggtt tacgcggacg tttatacggt ggtggcgtct aggcgttaga cattgttttg 420

tttgaaaaga atcttttcaa aagataaagt tacgtaatta aatgaagttg aattaaaaaa 480

agtaaaaact gaaaaacata aaactacgta gtttagctaa agttttaagt tgttaaccct 540

aattagcaat tcacgttcaa ttcattgtct tctaaagtct ataccacaga gccctgctag 600

gctgccacct tcactttgcc tctttatcgc tttcttatct accaaaggtt tttgttttga 660

tttatgttct cttctttttt gtttctctgc acatgttttt attttatttt gaagtttgca 720

atagttctaa agtacgatca gtttttctta ctagttacta aagatttgtt tttgactttt 780

ttccaaaaac tgcagaaaat cattcaagag attttgccat tttggtatgg ctggatcatc 840

tgcaaattca aatatgaacc aaacaggaac ttcagaaaca ccagctttga aaaaaattca 900

aaggatgttg cttgggaata tgggatgttg tgtaacccaa gtaatccaga taaggtgaag 960

tgtaaactat gtggaaaatt attttctggt ggtgcattta ggattaaaga gcatattgcc 1020

aagattccag gaaatgtttc tgcttgtcca ctatcaacaa aagatgatca agaaaagtgc 1080

aaaaatgcta ttgatgaagc taagaatggc aaagagaatt ttgtcattga ctactagttc 1140

ctcgggatgt gaaagagctt ggagttcttt tgaaggggta atttttatta gtctatgatt 1200

ctaaaatctt ttcatatgta ttgatgattt ttgtttaaaa aatgcagata cattatttta 1260

gtactaatat tattttattt catatcaatc attaataata tatatcatta atcattaata 1320

tatatatata tatatatata tatatatcca gtccgtttag gccccgttta ggcgtccgcg 1380

tatacggcta ggcgctaggc gctacgtcac cgcacagaga gcgcatagcg tattttagaa 1440

aaatatccga actcgatccg aaataaccga acccgaacta aaaatatccg aacccgaccc 1500

gaagtacaga aatacccgaa cgggttctac acctctataa ctgaaatatc cgaaaatctg 1560

aaatacccga cccgaacccg aacggatagc cgaacgccca cccctagttc ctatttcaca 1620

aagttatctg tctgggtaaa gatctttttt ctacactatc aaaaccatat atagtttgcc 1680

agaaagtatg tacctgttaa aaatatggat tagagagagg tttggattgg aatgatgtag 1740

gtaaggcata ttaaatgcaa gctctttcca catttatgat tccacgggtc agtggaagca 1800

tcaccgtggt ggttatgtct attagaattg aataagtgtg gtaaatgtgt tctgcttctt 1860

cttcctcgtc caactattat tgatttgacc atgcacgctt ctctcaaccc accggtccaa 1920

gtcaaacttc tatccatgta gctatcatcc cctatatatc aattgcttct cgtaaacaac 1980

ctcacaatca atcaactaac aatagaaacc taccagtctc tcctttgaag aagacatgaa 2040

caaaattagc cacggcgctc tatctcggcc ttccggtaac gtttcttgtt caatattgtt 2100

gtatttgctt tcatatgacc aaattcttca taattaaaga tcggtataga agtcatagat 2160

tacatatatg tacatttgca cgggtgagtt tgcaacaaat gtcgttttac tttgtgaaat 2220

ttaatcccta atcatgtttt aggaatgctg caccgtgcca agaggtatag agggagaaag 2280

tacgcaaagc cagaacttaa acaaagcaac ttctcaaaag acgaggacga tctcatcctc 2340

aagcttcatg cacttcttgg caataggttt tcattcttct tctttaattc aatttcgagc 2400

gttattataa aaatataccg taatgtgaat gtttgttttt ttttttgcaa aaaataatgt 2460

gaatgtttgt aataataaga ttttgatggt acgctttcag atggtcattg atcgcgggaa 2520

gattgcctgg acgaaccgac aacgaagtaa ggatccattg ggaaacttac ttagagaaga 2580

aactcatgaa aatgggaatc gatccaacca atcatcgtct ctaccatcac acaaactaca 2640

cttctagaag atacatcaat gcctcgtata agaaacatga aaccgatatt attagtgatc 2700

aatcttcttc ggtatcggaa tcatgtaata tgacactatt acccgtttca agtaccaaat 2760

tctctaagga taatgctagt gccggacata actggttgcc tgacctcaac atcggtctcg 2820

tcccgatgaa aaccgtgact tctttgccag tttgctccct tcaagaacct agcgaatcct 2880

ctaaccatgg ttcaacgagt caagaaacac ttcttctttt ccggtgaaga aatgtactgt 2940

gagatcaagg aaaactctta gtcaaagtat ttgtacacat cttcacatat acctaccact 3000

tgataataaa atgatttttg aaaaatttaa tcccgagttg gaccggctga tttgcatcag 3060

actcgttgat caactattct cttaatcaaa tgtccggttt cttttggtgt ggaaccattg 3120

gtataagtaa accgttgata acccgtgacc ggttcaataa agccgtaaga tattagctat 3180

cagagataag aaattgcggt gcacgttgaa tggatgcttt ccacgccagt aatgaactaa 3240

ctcac 3245

<210> 2

<211> 5156

<212> DNA

<213> Brassica oleracea

<400> 2

atgttgaaga accacaactg catgcctgat aacgctcttc tcagcactct catccactgg 60

ctttgcatag acgggagagt tacagaagcg aggaagttgt tggacgagtt tgagaaaggc 120

tccatcccta gtctcttgac gtacaacacg ttgatctctg ggatgtgcga gaagggagag 180

ctgacggagg cgggtcggtt atgggacgac atggttgaga ggaagtgtaa gccgaatgct 240

ttcacgtata acgttctgat cgaagggctg tgcaagaagg ggaatgttaa ggaaggtgtc 300

agggttcttg aagagatgct ggaaaatggt tgttttccga ataaaacgag gttcttgata 360

ttgttcgagg ggttgcagga gtcagggaaa gaagaggatg gggttaagat tgtgtcgatg 420

gctgttaaga gcgagaaagt tgatagagaa tgttaggagc ttttcttgag gaaatttgct 480

ggtgagctag acaaagggga ggtggttctt aaagaattgt tgcatgaagt ttctgactct 540

tgaagaagca aggtggttct taaaaaaaaa tgttataagg gcaatgatct agattcaagg 600

gatttggtag cacatagctt tatcaaaggt tggttgcgtt ttgatctgct ccaaggtaag 660

tacaatcctt tgatctcata gctcagagaa aaaggaagat ggcgtttgtg accactgcgg 720

aagtctgtga cgcagctgat tcggagtggt gagacagata ttctcaggtc ctgttgtcac 780

tgtcaaagtg ttcgaagaca atggcttgat ccttaagttc ctcgaggaga aaaggtaact 840

gaatctcatt ctttaaaaac ctaaacttga tttgtaactt tcactacttg cacagagata 900

aagataatga ctatgacatg atttatgatt acacaagcac atagttgtta ctttgcttag 960

agtgtaatct atcacgttgc aaacgggtga attagttgtt attttgctta gttttcaagt 1020

tttggatgat gttattaagg aaacgggaga gtacttgtgg agggagccaa cgatgtgcaa 1080

tactcggagg caaccccgtg gttcaagctc attgtgaacg gatgcatcag agacgttgat 1140

gagatcaacg gttgtgatat tggagtgaga gctttggcct ctcatccaat aaaggcgagc 1200

aagaaaggac ttggagagca atgagttcca gttaatattg catttgtgat ggtgaatggg 1260

tttatgctga acacatgaac ttggttcccc ccgatgatgt ttacatatga tgctactgct 1320

ctttatctgt tttagatcgg ttatgcttct cacgggtgga aaagtattat ggctggaaga 1380

gagctactgc gaaagggtct aggctggtcg gttggggatg gagagcagat ccgtatctgg 1440

gatgatctct ggctgtcgtc aaagactcca ttacaaccga tgggcccagc gaacccggaa 1500

agcgcctccc taaaggttaa ggatctcctc tgtccactta caaataagtg ggagactgag 1560

aaaattagga ggctactacc tcagtatgag gacaccattt tgagaattac aacacacctt 1620

cgggatgctc tgttctggct accggaaaaa tcaagtagat acactacgaa atcaggctat 1680

ggggttggta tgacttgtga taagtcgctg ggtgaagcaa ataaccctgt tgattgggtg 1740

aagcacatct ggaatgttaa aacggccccc aagctgaagg actttctgtg gagagtaata 1800

tcggaactga gctttaactg caagaaatgt ggggcacatg aggatgatct ccatgttttt 1860

ctcacctgtc caatggcgga ggaagtatgg agtaatatcc cgacagtact caaaccatca 1920

ccatctctta cttctatagc ggaactgatc gagcagggac ctaacttggt ttcacttcca 1980

ccagttggtc tgagctctcc tttatggcct tgggtgctgt ggaacctttg gaaagcaagg 2040

aacaaacttg tgtttgaaaa cagagtattc tcagcccaag agattgttct gaagagcatt 2100

actgatgcaa aggaatggag tgaggcacaa ctacctgatc gattaccgag ttcctccatc 2160

cactcccctg tccaaaccaa ccaacgagcc gttactgccc cccaaggatc caagatggag 2220

tactggtctg caatgttgat gcagcttggg atgcaatttc tggtggctgt ggtataggtg 2280

gaatattctc agggcaatca gggtcttctc taccgaactt ctcgaactct cacagtcatg 2340

tttcctcagc tctaatggca gaagccattg ctgtacatcg ggcggtatct cttgccgtgt 2400

tctcaaacgt ccgatccctg gcagttctat ccgactcttt gtccctggtt aatttattga 2460

acaagggcga gactcaacct gaactgttcg gtatcatgtt tgacatctat cactttatcc 2520

ctctgtttga tgtaatttct ttccatttta tctctcgaaa cttcaatgtg gaagccgatt 2580

tggtggcaaa atcagccttt gctgggtctg taatgaactc ctctgttgga gcttagactc 2640

caatgagaaa tgaaattctt gtttgttcaa aaaaaaaaga tctgttataa atccatgata 2700

tggatatgtg gattgccatt aaccatcgag gaggttacat ctgacccgac tatccggtct 2760

gtctacactc gtctccggtc cgtctacatc cgtccaagac tagactcatt cagccggagc 2820

atttatgagc tttgaccaag tctagatctt tgtggtcaat atgtattaaa tgtgtagatt 2880

ctaaaccctt atgaacctcc actatatatt gatagtgaga gctaatgaga aagacacaac 2940

tttcacaaca acacttctct catatttcta acacgttatc agcacgattg tgctctccac 3000

ctgagaaatc tctctcagcc ggcgatcccc tttccggcca gctcctccgg tgctcagcct 3060

ttgctccacc ggcgctcagc cttctctcca ccaggccaac tctctctctc cgccggaaaa 3120

ctcctctctc tctcaaattc cggccaactc tctctctctc acggtggtcc tctcagattc 3180
ttgtggtgaa aaaggtaaac aaatcaaaac cttgaaatct aaagaacacc attatatctg 3240
aaacaaatct aggatctata tgaatccata acttataaac aatctatgga tttaaaatac 3300
tgatcttgtt tctatgatcc atatgatcca tatgaaactt gattctaaaa gtatcttgaa 3360
tccataaaac ttaaaattct ctaaaggttc tatgtttctc taaaaactta taaacttatc 3420
aaaataccta aagatctaca tgaatcttgt ttataaaaac ttatgaatca taaaattatt 3480
agagaaagct taaacctttt tgattcaatc cttttgtttg gccattttac cagatgtgat 3540

aaacataagt gtataatctg gccaaaacaa aattccatca atcccttgtt gtgccatttt 3600
cggccagaac tcctaaaatc agtcaaccca tcaataaaat cgaaattaaa atcattcatt 3660
gcatatcctt gactattaat atttattttg taactatcaa agttttaaaa acctttttatg 3720
attttataaa tgcataatcg attttataaa tgcttgtttg attttattaa aagcatatct 3780
ttgactgaaa attatttcta aagttttata agccatagtc tttatatgtc acaaggtaga 3840
ataaaatctg gttgaaatca tttgatcata ttgttaatta aaccaaccat gaaccgattt 3900
catatcatac tgaattttga tcacatagtt tgctagttaa aataaaactt gatctagttt 3960

catccttgaa cttgattcta tgattaaatt atgtactgat catttgcata cctgatagca 4020
tcatttagta aatcattaga tcgaacttga atcatccatg aactgacctt tgcatgcatc 4080
caactatcat attgttaaaa ctggacataa gtatcacata attgaaacca aacatacatg 4140
ttcgcatagc tttagcaatg atgatactag tgcgtctgaa gtggttcatg ttgtttgcat 4200
ctaaatgatt cacactattt gcatatagtt agacaaaatc ggtttccatt taaaatttag 4260
tacatttgct ttattcaaaa tttataaacc aagttttaac cgattttgag aatctacttt 4320
ggtttacaaa tatcttgaac attataaaag ttatttgtct tgtccatgat gcatttttttt 4380

aagtccatcc acattgattg acaaaatttt tatcttaata catataaaat attttctgaa 4440
aataaaatgc ataataaacc atcattatta taaatcatca atctccttgg catataaatt 4500
caagtcctga attatattat gaatccttac tcctttatgg atatttgatt cagatgtcga 4560
aaatcaacaa ccttgaatat gcttccctca atctctccgg agataattac ctccaatggg 4620
agcttgatac caaaatcctc ttaaggtcca gaaaccttgg tgatactatc actgaaggca 4680
ctgagccatc agacaaggat aattacaagg cacttgttgt cattcgccat caccttgctg 4740
aaggtcacaa ggaccagtat ctcacaattg agaatcctct ggaactttga acagagttga 4800

aaaccagatt taatcatcag aaaactgtga tattgccaaa agccctttat gattggagaa 4860

acctgagaat ccaagactat aagtctgtgg aagaatataa ctcggctttg ttcaaaatag 4920

tctcaaagtt gaaactttgt ggtgagacta ttactgatgc tgatatgttg gagaaaacat 4980

tctccacatt ccacaccagc aatgttgtgc ttcagcaaca gtaccgagag aagggtttct 5040

ccacttatgc tgccttaatc tcttgtttgt tgctagctga gcaaaacaat gagttgctca 5100

tgatgaacag tgagctaagg accagcccgg gccgtcgacc acgcgtgccc tatagt 5156

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

cgttatgtga agaccgcaag gtaga 25

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ccctttgtct agctcaccag ca 22

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tgctctccaa gtcctttctt gctc 24

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

atggctgtta agagcgggaa agttga 26

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gaacaagaaa cgttaccgga aggc 24

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cttggcacgg tgcagcattc ct 22

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gccttccggt aacgtttctt gttc 24

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gtgagttagt tcattactgg cgtgga 26

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

agacgttgat gagatcaacg gttgtga 27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

catccaataa aggcgagcaa gaaagga 27

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

ggaaacaggt ggtctttgct ggta 24

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

actccaaggc atggaggaac aac 23

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

cgttgagtcc aaggcataga ggaacaat 28

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

ctaccagtct ctcctttgaa gaagac 26

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

gagttttcct tgatctcaca gtacatttct 30

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

gaagattgcc tggacgaacc gac 23

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

tgactcgttc ggccatggtt agagga 26

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

gtgccgagag atgtagagtg gga 23

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

tccggcacta ctactagcac tacta 25

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

tattaccgcg ctctctccta tc 22

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

atccctggtt cggtcttctt a 21

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

tgccaatcta cgagggtttc 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 25

tctcgatgga agagctggtt 20

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 26

ctaccagtct ctcctttgaa gaagac 26

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 27

gagttttcct tgatctcaca gtacatttct 30

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 28

ctaccagtct ctcctttgaa gaagac 26

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 29

tgtccactat caacaaaaga tgatc 25

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 30

gttcaagctc attgtgaacg ga 22

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 31

gagttttcct tgatctcaca gtacatttct 30

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 32

caaactcacc cgtgcaaatg tacat 25

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 33

ggaccaccgt gagagagaga 20

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 34

tacggtaaca tcgtgctcag tg 22

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 35

gatccagaca ctgtacttcc tc 22

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 36

caatggctgc agccatctcc 20

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 37

ccttttggaa cgagcccgtc a 21

<210> 38

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 38

tgaagccaag tatcaagaga ggaaaactc 29

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 39

tcatctagca aactttccca ccacc 25

<210> 40

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 40

gatcttcttc ttcgccttca taagcttc 28

<210> 41

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 41

gatcttctgc tccgccttca taaact 26

<210> 42

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 42

ccttccttgt tcttctacta caccagc 27

<210> 43

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 43

actaacaagc tcagatttat cgtcgtct 28

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 44

ctcagaagta tttcctccgc cgtac 25

<210> 45

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 45

tcaagcaact cccattatac tatctccat 29

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 46

ttggtccgat gacggttaca atgg 24

<210> 47

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 47

tcagagagac cagttgttat ggtgtgaa 28

<210> 48

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 48

ctgaaccaac caagaaagag gagactca 28

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 49

ttagaccgca tgtaccacgt tggt 24

<210> 50

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 50

acccatttcc attcccagta tggtct 26

<210> 51

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 51

ctaagcattc gggtgaaatg gtgattgtc 29

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 52

agactctgga caagccaaaa ggtct 25

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 53

catgatccag tggttctcca gagttct 27

<210> 54

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 54

gtgtttacat cgagtgttgg tgatggg 27

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 55

ccacgacacc actggatcag aag 23

<210> 56

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 56

atgcatgcaa cgtgctcact tca 23

<210> 57

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 57

cctctttctc accgcaaagg ctattc 26

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 58

cccgtaagag tgtggacgat 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 59

aagaaacgga gttgccttga 20

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 60

cactcgaaac atgggatgct gaga 24

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 61

catccagatt cgtaagctcg tcca 24

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 62

gaaccggatt caagtttcca 20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 63

caaacgtttt gcttccaggt 20

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 64

acccggatac ctctgctgga 20

<210> 65

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 65

ggagttccag tcgcttatcc ctaag 25

<210> 66

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 66

ggatcctgat gcatccgtag gg 22

<210> 67

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 67

ggagttccag tcacttatcc ctagc 25

<210> 68

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 68

gattaacggc aaaacgagga 20

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 69

aaccgagctt cacttgagga 20

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 70

tccgattgta acacgaccaa 20

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 71

cgccacagat gtggtcatac 20

<210> 72

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 72

accgcaacta caatcattcc cga 23

<210> 73

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 73

cttcttcttg gactctccaa ggct 24

<210> 74

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 74

ggaaagacag ggctgagtcg g 21

<210> 75

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 75

ctttgtgaga acgctaacga tctctgag 28

<210> 76

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 76

ggcaacttcc cgtcggatga g 21

<210> 77

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 77

ctttgtgagg accctaatga tctccg 26

<210> 78

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 78

gcgtaggcga gttgattctt cgg 23

<210> 79

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 79

tcgtggtagt agtcgtcgtc gc 22

<210> 80

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 80

tagcgtgttc ggagcaacaa cc 22

<210> 81

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 81

gtgttatccc aaaacgacgt cggtg 25

<210> 82

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 82

gatcggaatg tctaccacca ctcaa 25

<210> 83

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 83

cgttcactgg cgatgtgatc cag 23

<210> 84

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 84

agctctagaa ccaggcctac ga 22

<210> 85

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 85

cctacgcgta cgaatctttc acca 24

<210> 86

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 86

tcctcagatg agtctaccga gatctg 26

<210> 87

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 87

ccgatggact tcccggatga tc 22

<210> 88

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 88

cgggtatggg gcatcattac ca 22

<210> 89

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 89

gtatagaacc caccagcaga gacg 24

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 90

gtccctcggt taaccacgga 20

<210> 91

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 91

ccatcgttga agaagaaccc gtga 24

<210> 92

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 92

gtcaggacca gacacaagca acg 23

<210> 93

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 93

agcgttagaa ccacgcttcc c 21

<210> 94

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 94

ggtcaggaca ggacacagat agct 24

<210> 95

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 95

aaccacctcc tcctcctcct 20