



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년06월03일
(11) 등록번호 10-1627197
(24) 등록일자 2016년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2013.01)
C12Q 2600/13 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0015252
(22) 출원일자 2015년01월30일
심사청구일자 2015년01월30일
(56) 선행기술조사문헌
KR101091157 B1
KR100045573 B1
PLoS ONE 8(1): e53541.
NCBI BLAST 서열검색

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
임용표
대전광역시 유성구 상대남로 26, 903동 1602호 (상대동, 도안신도시9블록 트리폴시티아파트)
최수련
대전광역시 중구 태평로 55 삼부아파트4단지 408동 141호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 7 항

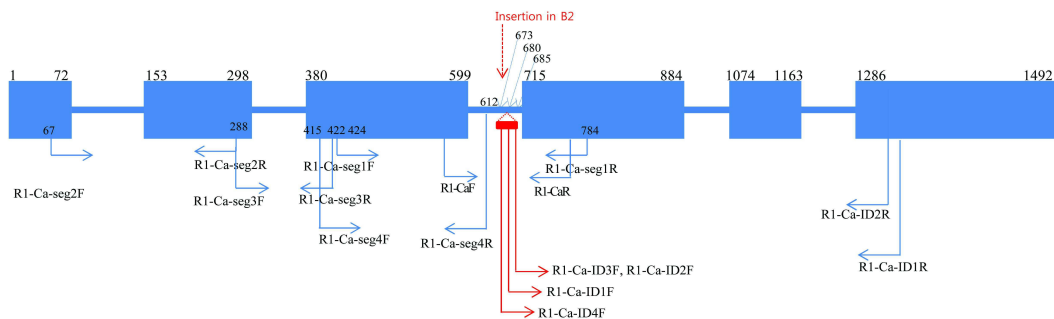
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 열근 무 품종을 구분하기 위한 특이 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 정상 무(*Raphanus sativus*) 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커, 상기 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커를 증폭하기 위한 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 키트 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

우효나

대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 KT&G 농업생명공학과 303호

이수희

충청북도 충주시 목행산단4로 13 한라비발디아파트 106동 1502호

선헌정

경기도 용인시 기흥구 죽전로 20 죽전누리에뜰아파트 104동 601호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213002-04-1-SB110

부처명 농림부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 기획과제(GSP 채소종자사업단)

연구과제명 채소작물의 종자개발을 위한 육종 특화 통합 DB 구축 및 운영

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2013.07.25 ~ 2022.05.02

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 정상 무(*Raphanus sativus*) 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커.

청구항 2

제1항의 정상 무(*Raphanus sativus*) 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커를 증폭하기 위한 프라이머 세트.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호 8 및 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 10 및 서열번호 11의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 12 및 서열번호 13의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 14 및 서열번호 15의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 16 및 서열번호 17의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 18 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 18 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상으로 이루어진 것을 특징으로 하는 프라이머 세트.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 따른 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

청구항 6

- (a) 무(*Raphanus sativus*)에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- (b) 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제2항 또는 제3항에 따른 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- (c) 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 겔 전기영동, 모세관 전기영동, DNA 칩, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 열근 무 품종을 구분하기 위한 특이 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 정상 무(*Raphanus sativus*) 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커, 상기 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커를 증폭하기 위한 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 키트 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 정상

[0001]

무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 십자화과에 속하는 무(Radish, *Raphanus sativus* (2n=18))는 엽채 및 근채 생산용으로 전세계적으로 널리 재배된다. 무의 뿌리는 매콤한 맛과 아삭하고 씹히는 식감을 갖고 있다. 열근은, 특히 주로 식용 근채인 무에 있어서 품질을 떨어뜨리며, 추한 외관을 유도하게 되므로, 시장성에 부정적인 경제적 영향을 끼치는 중요한 생리학적 장애이다. 토마토, 고추, 체리 및 여타 수많은 여러 과실에서 과실 생장 또는 숙성 동안 열근이 나타날 수 있다.
- [0003] 세포 경직성(cell rigidity), 신장 및 칼슘 사이의 더욱 복잡한 관계가 Burstrom의 연구(Burstrom, H.G. 1968. Biol. Rev. 43:287)에서 표방된 바 있다. 그는 뿌리 세포 생장이 두 단계로 일어나는 것으로 결론지었다: a) 세포벽의 가소성(plasticity) 및 탄력성에서의 증가, 및 b) 신규 세포벽 재료의 생합성 및 정지. 칼슘(Ca^{2+}) 신호 전달 및 항상성을 수반하는 경로는 방대한 식물 과학 분야에서 가장 중요한 신호전달 경로들 중 하나이다. Ca^{2+} 결합 단백질들 중 하나는 잠재적으로 식물에서 Ca^{2+} 감수성 및 비감수성 방식으로 세포질, 주변부 및 통합 막 단백질로서 활동할 가능성이 있는 아넥신(annexin)이다. 세포간 칼슘 항상성 및 중심주에서의 막 역학 배향의 결정 및 엑소시토시스(exocytosis)에서의 그의 관여는, 식물 생장 및 발생 및 비세포성 스트레스에 대한 응답성에 영향을 끼칠 수 있다. 그러한 다중기능적 단백질은 대다수의 식물 기관에 총 라이프사이클을 통틀어 분포되어 존재한다. 칼슘은 세포벽의 경직성을 증가시키며, 세포 신장을 억제한다.
- [0004] 아넥신은 다중기능성의 구조적으로 연관되어 있는 단백질 계열이다. 그러한 단백질들은 식물계 전반에 흔히 존재하는 것이며, 가근, 근관 및 화분관 팁과 같은 상이한 식물 부위들의 극성 발생에 참여하는 중요한 칼슘 의존형 막-결합 단백질이다. 단백질의 식물 아넥신 계열의 상이한 구성원들이 F-액틴에 결합하여 ATP 및 GTP를 가수분해할 수 있고, 퍼옥시다아제로서 또는 양이온 채널로서 작용할 수 있다. 그러한 시험관내 특징은 그들의 특이적인 세포하위 위치선정 및 발현 패턴과 함께 비생물성 스트레스 및 근류착생(nodulation)의 두 가지 모두에서 식물 생장 및 신호전달 조절에 관여되는 단백질과 연관되어 있다.
- [0005] 유전형 사이에 열근 감수성에 있어서의 유전적 차이는 과실 형태 및 크기, 과실 생장 속도, 당 함량 및 과실 소피와 상관 있다. 경제적으로 중요한 작물임에도, 이 작물에서 수확 및 품질 형질의 유전학, 생물성 및 비생물성 스트레스가 별로 연구되지 않았다. 최근 십수년간, 다양한 생식질을 이용한 상이한 연구팀에서의 연구에서 무의 여러 분자량 마커 및 유전자 연관 지도를 제공하게 되었으며, 추가로는 카드름 축적에 대한 정량적인 형질 좌(QTL), 질병 내성, 글루코시놀레이트, 뿌리 형상이 밝혀졌다.
- [0006] 한국등록특허 제1411890호에서는 '초위성체 마커를 이용한 무 품종 식별 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1361296호에서는 '무의 위황병 저항성 연관 마커를 표지하는 프라이머 세트 및 이를 이용한 저항성 무 품종 선발 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 열근 무 품종을 구분하기 위한 특이 마커 및 이의 용도에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명에서는 무에서 열근 형질을 나타내는데 ANNR835 단백질이 관여하는 것을 새롭게 알아내었고, 상기 단백질 코딩 유전자에 SNP(single nucleotide polymorphism) 및 InDel 영역이 존재하는 것을 확인하였다. 특히, 본 발명에서는 정상 무에서 분리한 ANNR835 단백질 코딩 유전자(서열번호 1) 서열을 기준으로 열근 무에서 641번째에 7개의 삽입 서열(TGGATCT)이 존재하는 차이점을 밝혀내었다.
- [0008] 따라서, 본 발명에서는 상기 삽입 서열(TGGATCT)이 존재하는 영역을 포함하도록 정방향 프라이머 4개를 작성하고, 나머지 역방향 프라이머를 포함하는 PCR용 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 정상 무에서는 PCR 산물이 검출되지 않고, 열근 무에서는 PCR 산물이 검출되는 것을 확인함으로써, 효과적으로 열근 무를 판별할 수 있다는 점을 확인하였다(도 10 참고).
- [0009] 또한, 열근 무에서는 상기 삽입 서열(TGGATCT) 영역이 포함되는 ANNR835 단백질 코딩 유전자의 일부 영역만 확보되어 그 이유를 정확히 알 수 없으나, 본 발명에서 개발한 5개의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 결

과, 정상 무와 열근 무에서 PCR 산물의 크기 차이로 인해 품종 구별이 가능한 것을 확인하였다.

[0010] 따라서, 본 발명에서는 정상 무(*Raphanus sativus*) 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커 및 상기 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커를 증폭하기 위한 효율적인 프라이머 세트를 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 정상 무(*Raphanus sativus*) 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커를 증폭하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 다른 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 키트를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 이용하여 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에서 개발한 정상 무(*Raphanus sativus*) 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커 및 상기 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 마커를 증폭하기 위한 프라이머 세트를 이용하여 효과적으로 열근 무 품종을 선별할 수 있으므로, 무를 이용한 관련 산업에 유용한 기술로 제공될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 무의 열근 형질 분석을 위한 식물 재료와 맵핑 집단을 형성하는 방법을 나타낸다.

도 2는 4개의 연관 그룹으로 분류된 무 유전자 지도를 나타낸다. 각각의 색깔은 애기장대의 5개의 염색체와 상동성을 나타낸다. 조사된 QTL은 QTL 이름에 의해 연관 그룹의 오른쪽에 다른 음영의 네모 바(bars)로 표시하였다. 열근 형질에 관여하는 QTL을 무의 유전자 지도와 애기장대 유전체를 통해 비교분석하였고, 무 유전자 지도에서 QTL 부위에 해당하는 애기장대 위치를 찾고자 무 유전자 지도의 마커를 이용하여 상동성 영역을 탐색하였으며, 분자마커에 해당하는 애기장대의 유전자를 표기하고자 했다.

도 3은 무에서 서열 비교에 의해 오솔로그 후보 유전자(AT5G14450.1)의 동정 결과를 나타낸다. QTL 영역에서 형질연관성이 있어서 선발한 후보 유전자(CW5)의 유전자 구조 및 835(p1-CW5-CW5)와 B2(p2-CW5-CW5)에서 서열 다양성(InDel 영역 표기)을 표시하였다.

도 4는 무에서 서열 비교에 의해 오솔로그 후보 유전자(AT5G12380.1)의 동정 결과를 나타낸다. QTL 영역에서 형질연관성이 있어서 선발한 후보 유전자(Ca)의 유전자 구조 및 835(P1W1-W1F)와 B2(P2W1-W1F)에서 서열 다양성(InDel 영역 표기)을 표시하였다.

도 5는 무 계통에서 열근 형질에 대한 5개의 주요 QTL 및 애기장대의 염색체 5번에서 상동성 영역을 나타낸다. 또한, 835(P1) 및 B2(p2)에서 2개의 후보 유전자, ANNAT8(R1-Ca gene) 및 AT5G14450.1(R1-CW gene)의 전사체 발현량을 RT-PCR로 확인한 결과이다.

도 6은 후보 유전자 ANN835(R1-Ca gene)의 총 유전자 서열을 확보하기 위해 유전자 클로닝을 수행하는 과정을 나타낸다.

도 7은 분석된 ANN835(R1-Ca gene) 단백질의 아미노산 구조 및 애기장대와 아미노산 서열의 정렬 결과를 나타낸다.

도 8은 본 발명에서 분리된 835(P1)로부터 유래된 ANN835 마커에서, 열근 무 품종을 구분하기 위해 분석에 사용된 프라이머 위치를 나타낸다. 붉은색 표기는 B2(P2, 열근 형질)에 있는 삽입 서열(insertion sequence)을 나타내고, 여기서 InDel 마커(R1-CaID1, R1-CaID2, R1-CaID3 및 R1-CaID4)를 개발하였다.

도 9는 본 발명에서 개발한 프라이머 세트를 각각 이용하여 P1(835) 및 P2(B2)를 대상으로 PCR을 수행한 후 폴리아크릴아미드 겔로 확인한 결과이다(W1, 서열번호 2 및 서열번호 3; R1-Ca, 서열번호 8 및 서열번호 9; R1-

Ca-seg1, 서열번호 10 및 서열번호 11; R1-Ca-seg2, 서열번호 12 및 서열번호 13; R1-Ca-seg3, 서열번호 14 및 서열번호 15; R1-Ca-seg4, 서열번호 16 및 서열번호 17).

도 10은 본 발명에서 개발한 InDel 마커(R1-CaID1, R1-CaID2, R1-CaID3 및 R1-CaID4)를 각각 이용하여 P1(835) 및 P2(B2)를 대상으로 PCR을 수행한 후 아가로스 젤로 확인한 결과이다(Group 1: R1-CaID1F(서열번호 18) 및 R1-Ca-ID1R(서열번호 19), Group 2: R1-CaID1F(서열번호 18) 및 R1-Ca-ID2R(서열번호 21), Group 3: R1-CaID2F(서열번호 20) 및 R1-Ca-ID1R(서열번호 19), Group 4: R1-CaID2F(서열번호 20) 및 R1-Ca-ID2R(서열번호 21), Group 5: R1-CaID3F(서열번호 22) 및 R1-Ca-ID1R(서열번호 19), Group 6: R1-CaID3F(서열번호 22) 및 R1-Ca-ID2R(서열번호 21), Group 7: R1-CaID4F(서열번호 23) 및 R1-Ca-ID1R(서열번호 19), Group 8: R1-CaID4F(서열번호 23) 및 R1-Ca-ID2R(서열번호 21)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 정상 무(*Raphanus sativus*) 품종으로부터 얻은 무 품종을 구분하기 위한 마커를 제공한다.
- [0018] 상기 마커는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 정상 무(*Raphanus sativus*) 품종으로부터 얻은 무 품종을 구분하기 위한 마커를 증폭하기 위한 프라이머 세트를 제공한다. 상기 프라이머 세트는 상기 마커를 증폭하면서 정상 무 품종으로부터 얻은 무 품종을 구분할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 서열번호 8 및 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 10 및 서열번호 11의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 12 및 서열번호 13의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 14 및 서열번호 15의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 16 및 서열번호 17의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 18 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 18 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명에서 서열번호 8 및 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 10 및 서열번호 11의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 12 및 서열번호 13의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 14 및 서열번호 15의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 16 및 서열번호 17의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트는 정상 무(835, P1)와 열근 무(B2, P2)에서 SNP 또는 부수적(minor) InDel 부위가 있어, 상기 5개의 프라이머 세트를 이용하여 정상 무(835, P1)와 열근 무(B2, P2)를 대상으로 PCR을 수행하면 정상 무(835, P1)와 열근 무(B2, P2)에서 PCR 산물의 크기 차이로 구별이 가능한 것이다(도 9 참고).
- [0021] 본 발명에서 서열번호 18 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 18 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트 중에서 정방향 프라이머인 서열번호 18, 서열번호 20, 서열번호 22 및 서열번호 23은 정상 무(835, P1)와 비교하여 열근 무(B2, P2)에서만 특이적으로 존재하는 삽입 서열(TGGATCT) 부위에서 제작한 것이다. 이 삽입 서열(TGGATCT) 부위는 본 발명에서 새롭게 개발한 InDel 마커에 해당하며, 따라서, 상기 8개의 프라이머 세트를 이용하여 정상 무(835, P1)와 열근 무(B2, P2)를 대상으로 PCR을 수행하면 정상 무(835, P1)에서는 PCR 산물을 확인할 수 없으나, 열근 무(B2, P2)에서는 PCR 산물을 확인할 수 있는 차이점이 있다(도 10 참고).
- [0022] 바람직하게는, 13개의 프라이머 세트, 즉, 서열번호 8 및 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 10 및 서열번호 11의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 12 및 서열번호 13의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 14 및 서열번호 15의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 16 및 서열번호 17의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 18 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 18 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 서열번호 19의 올리고

뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 서열번호 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 서열번호 21의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 모두 포함할 수 있다.

[0023] 상기 13개의 프라이머 세트를 동시에 이용하면 정상 무(*Raphanus sativus*) 품종으로부터 열근 무 품종을 더욱 효율적으로 판별할 수 있다.

[0024] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 8 및 9의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 10 및 11의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 12 및 13의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 14 및 15의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 16 및 17의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 18 및 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 18 및 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 21 올리고뉴클레오타이드 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머(22개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 1 및 서열번호 2의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0025] 또한, 서열번호 8 및 9의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 10 및 11의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 12 및 13의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 14 및 15의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 16 및 17의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 18 및 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 18 및 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 20 및 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 22 및 21의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 19의 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 23 및 21 올리고뉴클레오타이드의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.

[0026] 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.

[0027] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하기 위한 키트를 제공한다.

[0029] 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0030] 또한, 본 발명은

[0031] (a) 무(*Raphanus sativus*)에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

[0032] (b) 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

[0033] (c) 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 정상 무 품종으로부터 열근 무 품종을 구분하는 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 방법은 무에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당 업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, wizard prep 키트(프로메가사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 SCAR 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(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 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[0035] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 본 발명의 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 SCAR 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.

[0036] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 겔 전기영동, 모세관 전기영동, DNA 칩, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있으며, 겔 전기영동은 증폭산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 모세관 전기영동을 수행할 수 있다. 모세관 전기영동은 예를 들면, ABl Sequencer를 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.

[0037] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 재료 및 방법

[0039] 식물 재료 및 생장 조건

[0040] 유 등(Yu et al., 2013, Theor Appl Genet 126:2553-2562)에 의해 '835' (P1)와 'B2' (P2)의 근계(inbred lines)를 교배하여 유도된 F2 맵핑 집단을 이용해 유전자 맵이 개발되었다(도 1). '835'(P1)은 타원형 뿌리, 긴 잎 및 우산형 분포를 나타내며, 'B2'(P2)는 가는 뿌리, 짧은 잎 및 기립 형성을 나타낸다. 표현형 조사를 위해, 각 220본의 F2를 자가수정해 유도된 8본의 F3 식물을 2012년 및 2013년에 걸쳐 9월부터 11월까지의 2회 복제에서 복제시마다 식재했다. 종자들은 대한민국 대전에 위치한 국립 충남대학교의 뜰에 심었다. F3 맵핑 집단 및 부모 라인에서 12가지 형상 및 수확 구성요소 형질을 기록했다. 생장기간 동안 뿌리에서의 생리학적 변화를 조사하기 위해, 뿌리 생리학적 특징을 매주 시험했다.

[0041] 통계적 분석 및 QTL 맵핑

[0042] 무 유전자 맵을 업데이트했다. Win QTL Cart 2.5 소프트웨어 (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>) (Wang 등, 2006 Windows QTL Cartographer V2.5. User manual Bioinformatics Research Centre, North Carolina State University, Raleigh)를 이용해 QTL을 실시하고, 복합 간격 맵핑 기능(composite interval mapping function (CIM))을 전방 및 후방 단계별 퇴행, 10cM 창 크기, 5개의 대조군 마커 및 1cM 스텝 크기에 대한 네 가지 파라미터가 있는 Model6를 이용해 실행했다. 역치값은 순열에 의해 결정했다(1000회).

[0043] 애기장대 및 브라시카 라파 사이의 비교 맵 정렬

[0044] 무와 애기장대 및 브라시카 라파 사이의 형상 및 수확 구성요소 형질에 대한 기능적으로 보존되는 유전자좌를 밝혀내기 위해, QTL 맵의 비교 정렬을 그들 두 종 사이에서 실시했다. 비교를 위해, 이 등(Li et al., 2012, DNA Res 20: 1-16)의 브라시카 라파 QTL 맵을 이용했다. Schranz 등의 문헌(2006 Trends Plant Sci 11:535-542)에서 제안했던 상동 염색체 분절 및 십자화과 빌딩 블록의 신테니 분석 및 식별을 Ramchiary 등의 문헌(2011 DNA Res 18:305-320)의 방법에 따라 실시했다. 본 발명에서 QTL에 대응하는 애기장대 신테니 영역에서, 애기장대 유전체에서 전사되는 단위체로서 정의된 유전자좌를 TAIR 데이터베이스(<http://www.arabidopsis.org/>)에서 검색하여 관련된 후보 유전자를 찾아냈다.

[0045] **후보 유전자들의 서열 및 발현 분석**

[0046] Illumina GAII 차세대 시퀀서를 이용하여 부모 라인 '835' 및 'B2'의 전체 유전체 재서열 분석을 실시했다. 애기장대와 비교함으로써 무 유전체 내에서 선행기술에서 경계를 정한 24가지 십자화과 빌딩 블록에 준해 Denovo 어셈블이 있는 서열에서, 애기장대 유래의 이미 특징분석된 후보 유전자들을 선별하고, 상동성 검색 접근법 및 신테니 분석을 이용해 중요한 형질 QTL을 보유하는 블록들에서 무 유전체 내 오솔로그 유전자를 찾아냈다. RNA는 20일령 잎 시료로부터 추출하고, 이 등의 문헌(Li et al., 2012, DNA Res 20: 1-16)에 따라 유전자 특이적 프라이머(표 5의 서열번호 6 및 서열번호 7 세트, 서열번호 8 및 서열번호 9 세트)를 이용해 반-정량적 RT-PCR 분석을 실시했다.

[0047] **프라이머를 이용한 PCR 산물의 확인**

[0048] 835(P1)와 B2(P2) 계통에 대한 총 DNA PCR 분석을 수행하였다. PCR 반응물 조성은 0.5 유닛의 Taq 폴리머라제(Bioneer, Daejeon, Korea), 각 프라이머 5 pmol, 250 μM dNTPs, 2.0 mM MgCl₂, 1×버퍼, 그리고 게놈 주형 DNA 10 ng을 함유한 10 μl의 혼합물을 이용하여 수행하였다. PCR 반응은 열처리를 95℃에서 5분간 수행한 후, 94℃에서 45초 변성단계, 59℃에서 45초 프라이머 연결단계, 72℃에서 45초 DNA 합성단계를 총 35회 반복하고 최종 익스텐션 단계를 72℃에서 7분간 처리하는 과정으로 수행하였다. PCR 산물은 8% 폴리아크릴아미드 겔을 이용하였고, InDel마커는 1% 아가로스 겔(SeaKem LE Agarose, Talara)을 이용하여 각각 전기영동하여 확인하였다.

[0049] **실시예 1. QTL 분석 및 마커의 열근과의 상관성**

[0050] 선행기술(Yu et al., 2013, Theor Appl Genet 126:2553-2562)에서 개발한 F2 집단을 이용한 유전자 분석을 실시했다. 정량적 형질 좌(QTL) 분석은 1개의 주요 좌를 밝혀냈다. 열근과 관련된 4가지 상이한 QTL을 본 발명자들의 표현형 관찰에 의해 4개의 연관 그룹 LG 1, LG 3, LG 5 및 LG 8 (각 1 QTL)에서 검출했다(표 1). 4가지 QTL에 대한 LOD 값들은 2.58 내지 6.57의 범위였고, R²는 1.62% 내지 9.65%의 범위였다. 이들 다수에서, 한가지 주된 qCL1가 연속 2년간 검출되어, 그 좌가 열근 저항성 형질 부여에 중요한 좌일 수 있음을 시사했다. 2011년도 절근 침지법(root-cut dipping method)에서 표현형 차이(R²) 9.65%의 대부분이 설명되었다. 상기 좌는 LG1 상에서 RSS391 및 ACMP0400 사이의 마커 간격으로 맵핑되었고, 0.11 내지 0.15의 부가 효과를 지닌 4.13 내지 5.57 범위의 비교적 높은 LOD값을 나타냈다. 그러한 QTL은 열근 좌(Cr1)로 지칭했다. 추가로, qC2, 3은 2013년도에만 검출되었으나, 2012년도 시험에서는 검출되지 않았고, qC4는 2012년도에만 검출되었다. 또한 십자화과 식물이 주요 및 부속 QTL을 보유하는 블록도 밝혀냈다. 주요 QTL 십자화과 식물 블록은 열근 저항성 좌에 있어서 더욱 중요한 R 이었다(도 2). LG3(qC2) 중의 F 블록, LG5(qC3) 및 LG8 (qC4) 중의 M 블록은 J 및 O 블록을 포함했다. 도 2의 맨 왼쪽(*A. thaliana*)은 무 유전자 맵에서 QTL 부위에 해당하는 애기장대 위치를 찾고자 무 유전자 맵의 마커를 이용하여 상동성 영역을 탐색하였고, 분자 마커에 해당하는 애기장대의 유전자를 표기한 것이다.

표 1

무에서 열근현상에 관여하는 QTL

Trait	QTL	linkage group	Marker interval	block region	2012				2013			
					LOD	R ² (%)	Additive effects	Dominance effects	LOD	R ² (%)	Additive effects	Dominance effects
Cracking	qC1	1	RSS3911-ACMP0400	R	4.13	4.84	0.110	0.10	6.57	10.65	0.150	0.08
	qC2	3	enu_mBRPGM0916-RS S0607	F					2.92	2.01	0.02	0.39
	qC3	5	RSS2308-ACMP240	M					4.54	3.5	0.19	0.03
	qC4	8	At4g10-At2g41	J/O	2.58	1.62	-0.04	-0.07				

[0051]

[0052]

실시예 2. 비교 맵핑에 의한 상관 유전자 예측

[0053]

애기장대 및 브라시카 라파 서열과 관련하여 주요 QTL 영역 내의 SSR 마커의 BLASTN 분석에 의해, QTL 영역 내의 상동체들을 세포벽 구성성분, 세포질, 액포 및 이온 수송 제어 유전자의 예측에 적용했다. 프라이머를 표 2에 제시된 유전자 증폭을 위해 고안했다. 증폭 생성물들은 LaboPass Purification Kit (COSMO GENETECH)로 정제하고, pGEM-T Easy Vector (Promega)에 클로닝했다. 각 PCR 생성물을 가닥-서열 분석을 위해 한국의 Macrogen Corporation에 보냈다. 부모 라인 사이의 뉴클레오티드 서열 비교 후, In/del 및 SNP 마커(도 3, 도 4, 표 3, 표 4)를 고안해 F2 집단을 이용한 연관 맵 상에서 그러한 유전자들을 맵핑했다. 주요 QTL에서, 마커 RSS391 및 ACMP400은 AT5G14990.1 및 AT5G12980.1과 각각 높은 상동성을 갖는 것으로 나타났다. 그 영역에서, 세포벽 구성원, 세포질, 액포 및 이온 수송 관련 유전자 ANNAT8(R1-Ca gene) 및 AT5G14450.1(R1-CW gene)을 애기장대 및 무 유전체와의 비교에 의해 후보 유전자로서 선별했다. 더욱이, 특이적 프라이머(표 5의 서열번호 6 및 서열번호 7 세트, 서열번호 8 및 서열번호 9 세트)를 이용해 두 가지 관련 유전자들의 RT-PCR을 실시했고(도 5), ANNAT8(R1-Ca gene)의 유전자 발현 수준이 'B2'에서보다 '835'에서 더욱 높다는 것을 발견했다(도 5의 맨 오른쪽 젤 사진 참고). 그러나, AT5G14450.1(R1-CW gene)은 부모 라인 사이에 서열 차이가 관찰되었음에도 불구하고 발현 차이를 나타내지 않았다.

표 2

무 유전자지도에서 열근형질에 관여하는 주요 QTL결과에 해당하는 애기장대 정보

	A	C	F	G	H	I	J	K	L	M
1										
2	cracking	primer ID	locus	locus	Gene name	Accession Number	Chrom	Start (bp)	End (bp)	Traits involved
3	cell wall	CW1	crack	AT5G11720.1	orf	Gene:2181929	5	55796	59128	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds LOCATED IN: apoplast, vacuole, plant-type cell wall
4		CW2		AT5G12950.1	orf	Gene:2182279	5	44770	48792	catalytic activity; LOCATED IN: vacuole, plant-type cell wall
5		CW3		AT5G13980.3	orf	Gene:1009022432	5	58969	64898	Glycosyl hydrolase family 38 protein; mannose metabolic process, carbohydrate metabolic process; LOCATED
6		CW4		AT5G14430.2	orf	Gene:1006239097	5	71729	74722	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein; LOCATED IN: Golgi apparatus, p
7		CW5		AT5G14450.1	orf	Gene:2145692	5	4658441	4660175	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein; FUNCTIONS IN: hydrolase activity, acting on ester bond
8	cytosol	CY1		AT5G12030.1	orf	Gene:2143023	5	78648	79278	Encodes a cytosolic small heat shock protein with chaperone activity that is induced by heat and osmotic stres
9		CY2		AT5G13510.1	orf	Gene:2185050	5	4341262	4342095	Ribosomal protein L10 family protein; FUNCTIONS IN: structural constituent of ribosome
10		CY3		AT5G14840.1	orf	Gene:2222641	5	4719077	4722279	shaggy-like kinase 13 (SK13); FUNCTIONS IN: protein serine/threonine kinase activity, protein kinase activity,
11	vacuole	VA1		AT5G13740.1	ZIF1	Gene:2173253	5	4432306	4436668	Encodes ZIF1 (ZINC-INDUCED FACILITATOR1), a member of the Major Facilitator Superfamily (MFS) of mem
12	rapa	BR1		AT5G16910.1		Gene:2148170	5	5561679	5566580	encodes a gene similar to cellulose synthase. Located in Golgi membranes
13		BR2		AT5G16780.1	orf	Gene:2149009	5	5517490	5522238	Encodes a protein belonging to SART-1 family. The gene is expressed in the basal region of the developing em
14		actin					5			
15										
16	vacuol	VA2		AT5G11700.2		Gene:5019474482	5	3762462	3771416	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: glycine-rich protein (TAIR:AT4G32920.3);
17		VA3-1		AT5G11710.1		Gene:2181919	5	3772818	3776662	EPSIN1 plays an important role in the vacuolar trafficking of soluble proteins at the trans-Golgi network via its
18		VA3-2								
19		VA4		AT5G14020.1		Gene:2159102	5	4523520	4525863	Endosomal targeting BRO1-like domain-containing protein; INVOLVED IN: N-terminal protein myristoylation;
20		VA5		AT5G14120.1		Gene:2174682	5	4555949	4558710	Major facilitator superfamily protein; LOCATED IN: plasma membrane, vacuole; EXPRESSED IN: 26 plant str
21		VA6		AT5G14570.1	NRT2.7	Gene:2222651	5	4695084	4697078	Encodes ATNRT2.7, a nitrate transporter that controls nitrate content in seeds. Expression is detected in repi
22										
24	calcium	W1		AT5G12380.1	ANNAT8	Gene:3709128	5	4009223	4010687	annexin 8 (ANNAT8); FUNCTIONS IN: calcium-dependent phospholipid binding, calcium ion binding;
25										

[0054]

표 3

QTL영역에서 형질연관성이 있을 것으로 선발한 후보 유전자(CW5)의 자세한 정보

QTL locus	PrimerID	Locus	Accession Number	Chromosome NO.	Start (bp)	End (bp)	Traits involved
qC-1	CW 5	AT5G14450.1	Gene:2145692	5	4658441	4660175	hydrolase activity;GDSL-like Lipase/Acyl hydrolase superfamily protein

[0055]

표 4

QTL영역에서 형질연관성이 있을 것으로 선발한 후보 유전자(W1)의 자세한 정보

QTL locus	PrimerID	Locus	Gene name	Accession Number	Chromosome NO.	Start (bp)	End (bp)	Traits involved
qC-1	W1	AT5G12380.1	ANNAT8	Gene:3709128	5	4009223	4010687	calcium ion binding; calcium-dependent phospholipid binding,

[0056]

[0057] 실시예 3. 무에서의 후보 유전자 ANNAT8 클로닝 및 서열 특징분석

[0058] 애기장대 ANNAT8 및 두 부모 라인 denovo 어셈블 서열을 비교하고, 프라이머 디자인을 위해 보존되는 서열을 찾아냈다. 상기 신규한 무 아넥신 유전자 (AnnXR '835')는 무 '835' 유전체 DNA로부터 분리했다(도 6). AnnXR '835'의 전장 cDNA는 산출된 분자량이 34.25kDa이고, 등전점이 6.61인 301개 아미노산 단백질을 코딩하는 906bp의 오픈 리딩 프레임 포함한다. 서열 분석은 cDNA 서열이 아넥신 계열의 구성원에 속한다는 것을 보여줬다. 무 아넥신의 추정된 아미노산 서열의 PROSITE 데이터베이스 분석(<http://www.expasy.org/ScanProsite>)은 4개의 아넥신 슈퍼패밀리 도메인 및 첫번째 및 네번째 도메인 내 GXGTD /GTDE 모티프의 2개의 타입 II Ca²⁺ 결합 서열을 밝혀냈다(도 7). 추가로, DxxG 모티프는 수많은 추정되는 번역 후 변형 부위에 포함되어 있는 GTP 결합 활성

및 막 구조의 안정성을 유지하기 위한 막에서의 전자 이동 프로세스에 관여되는 His40 중요 퍼옥시다아제를 제공한다.

실시예 4. 본 발명의 프라이머를 이용한 열근 무의 판별

본 발명에서는 열근 형질과 연관성이 있는 선발된 후보유전자(애기장대에서 ANNAT8)를 무 식물체에서 해당 유전자를 정상 무와 열근 무에서 각각 클로닝하였다. ANNAT8 유전자를 835(정상 무)에서는 총 염기서열을, B2(열근 무)에서는 일부 염기서열을 분리하였다. 이들 중 나타나는 염기서열 차이(SNP, InDel 부위, 도 4 참고)를 중심으로 상기 표 5와 같이 프라이머 세트를 디자인하였다. 도 8은 유전자 구조 모식도에서 해당 프라이머의 위치를 표기한 것이다.

상기 표 5에서 염기서열 차이(SNP, InDel)를 반영하여 디자인한 프라이머 (Marker name 참조)로 P1(835), P2(B2) 간에 PCR을 수행한 결과 PCR 산물의 크기에서 차이가 나타나 열근 형질 진단 마커로 사용 가능함을 확인하였다(도 9).

P1(835)과 P2(B2)에서 나타내는 염기서열 차이 중 붉은색 상자로 표기된 InDel(insertion seq.) 부분으로, 이 부분을 중심으로 열근을 구분할 수 있는 마커(PCR 증폭 유무)를 개발하고자 P2(B2)에 존재하는 염기서열 부위를 프라이머로 이용하여 디자인하였다(도 8 참고). 이들 프라이머 조합을 이용하여 PCR 했을 때 도 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, 정상 무에서는 PCR 산물이 검출되지 않고, 열근 무에서는 PCR 산물이 검출되는 것을 확인함으로써, 효과적으로 열근 무를 판별할 수 있다는 점을 확인하였다.

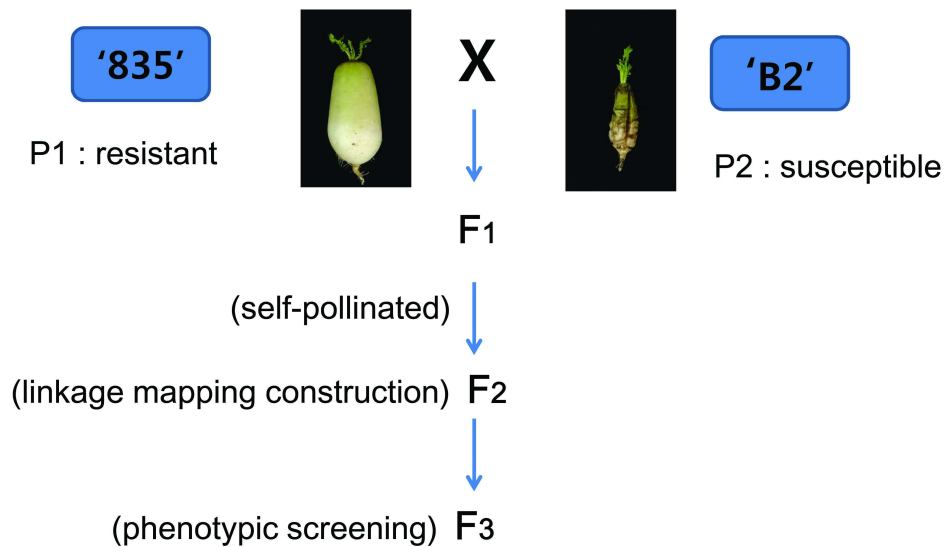
표 5

열근 형질 판별을 위해 본 발명에서 사용한 프라이머 서열 정보

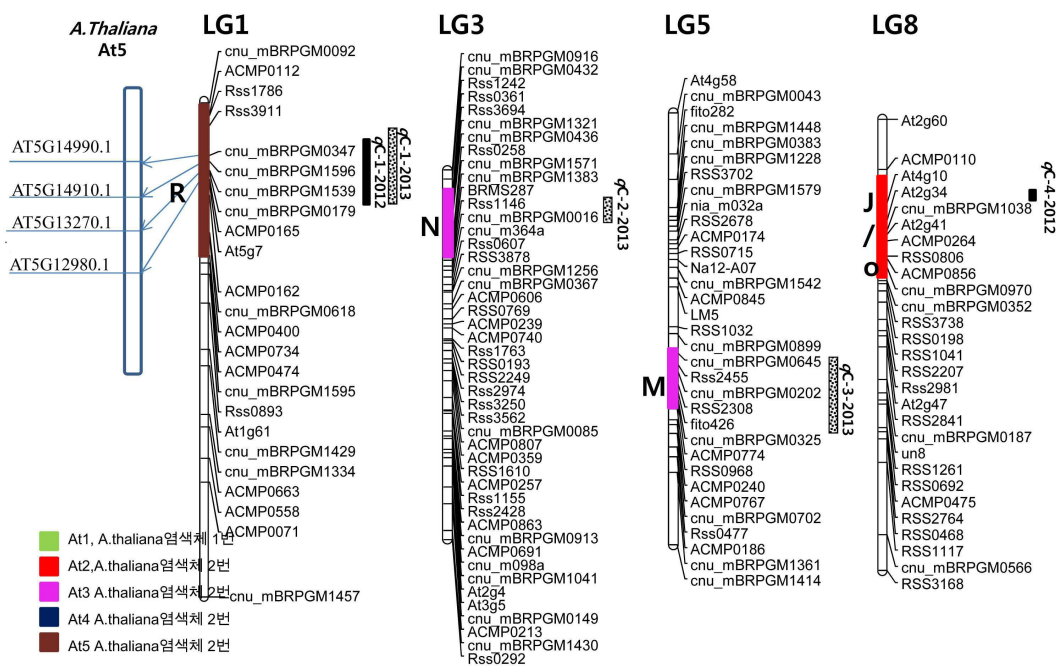
Marker name	정방향 프라이머(서열번호)	역방향 프라이머(서열번호)	Estimated size of PCR product
W1	CGTGCTTACCGTTGCCTCTA(2)	CACCCTGATCGTTTCTTCGT(3)	406
CW5	GTTGGGTTTCGGACAATGAG(4)	GAACGGAGGGTCTGTGAGC(5)	320
R1-CW	GGGTTAGATTCTGATCTGAAGAG(6)	CCTCCTTGCTGATATATGTTCTG(7)	114
R1-Ca	GAGTAGCTTGGCCTCCGTACTA(8)	TTCTTCGTGATCAACAGCCTTA(9)	193
R1-Ca-seg1	CTCTTGGCTAACTTGGCTCTTC(10)	AACACCCTGATCGTTTCTTCGT(11)	450
R1-Ca-seg2	GCCAAGGTTCTTACTCTTTCTTTT(12)	GATAAAAGCTAGACCTCAAAGTCG(13)	275
R1-Ca-seg3	CGACTTTGAGGTCTAGCTTTTATC(14)	GTAGAGCCAAGTTAGCCAAGAGAG(15)	190
R1-Ca-seg4	AGAGATGCTCTCTTGGCTAACTT(16)	AGTTAAAAGCAAGAAGAGAACAA(17)	284
R1-CaID1F	TAACT GGATC TTGAA CGTTT GAGAC(18)	ATCACACGGGTCAGAGAATCTT(19) ACACGGGTCAGAGAATCTTCAT(21)	없음
R1-CaID2F	GGATC TTGAA CGTTT GAGAC(20)	ATCACACGGGTCAGAGAATCTT(19) ACACGGGTCAGAGAATCTTCAT(21)	없음
R1-CaID3F	GGATCTTGAACGTTTGAGACGTT(22)	ATCACACGGGTCAGAGAATCTT(19) ACACGGGTCAGAGAATCTTCAT(21)	없음
R1-CaID4F	CTAGCTTTAACTGGATCTTGA(23)	ATCACACGGGTCAGAGAATCTT(19) ACACGGGTCAGAGAATCTTCAT(21)	없음

도면

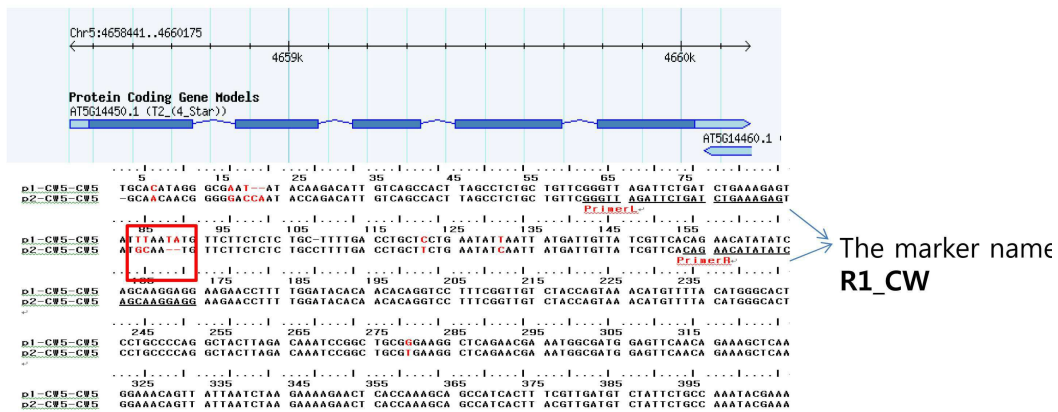
도면1



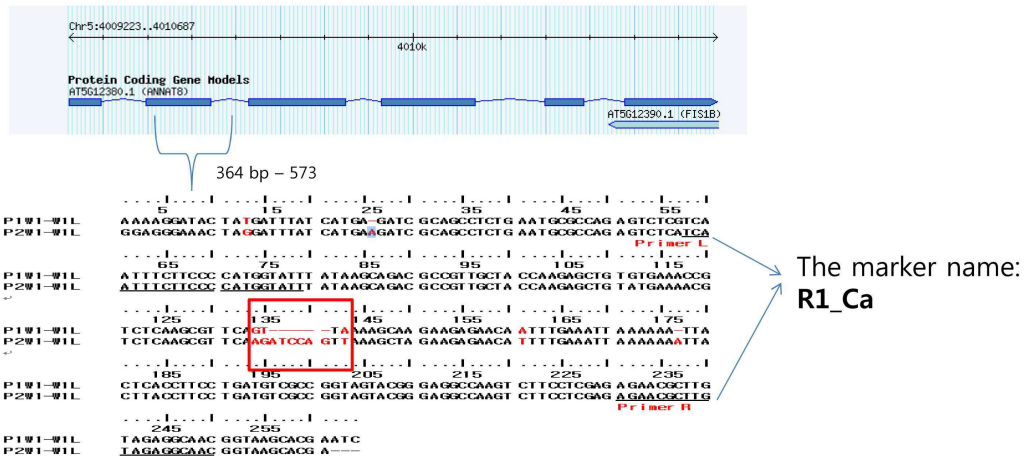
도면2



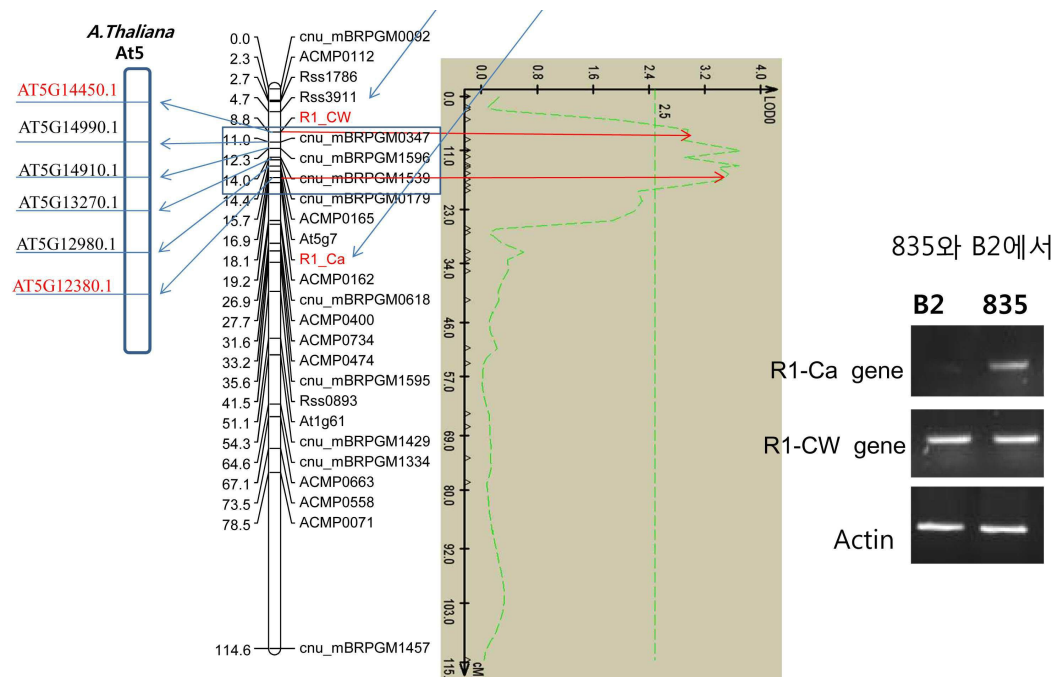
도면3



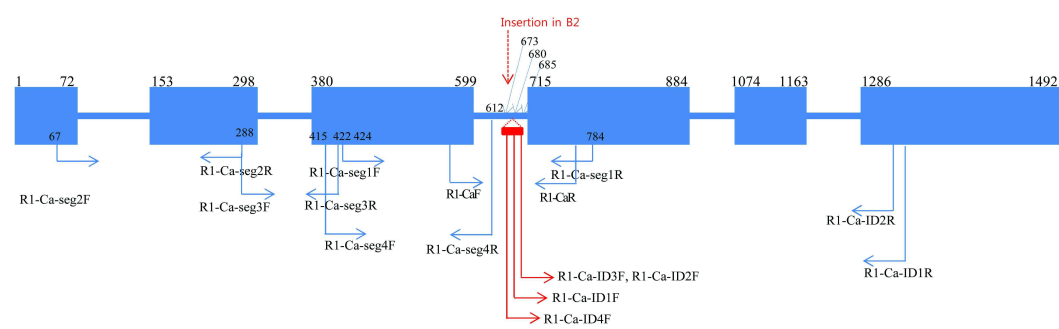
도면4



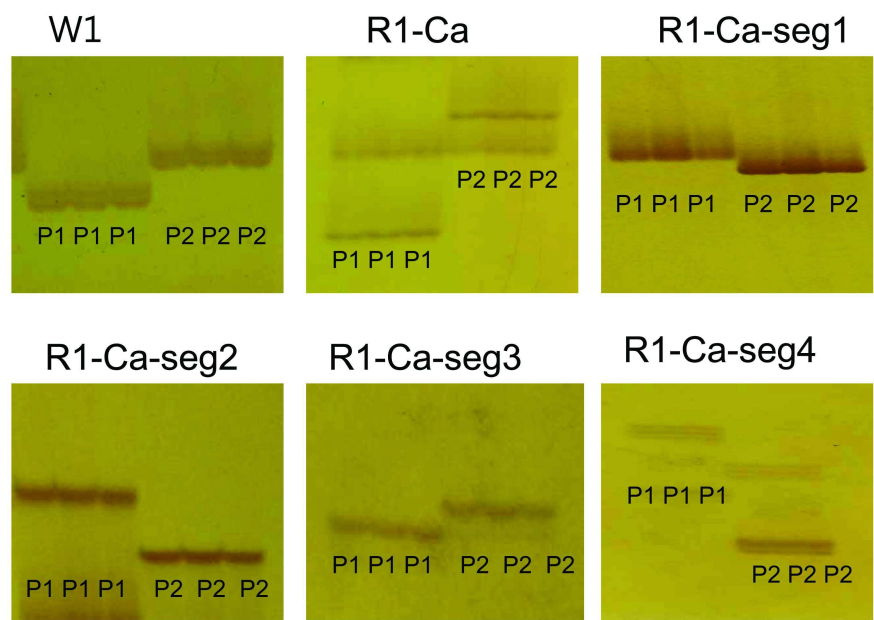
도면5



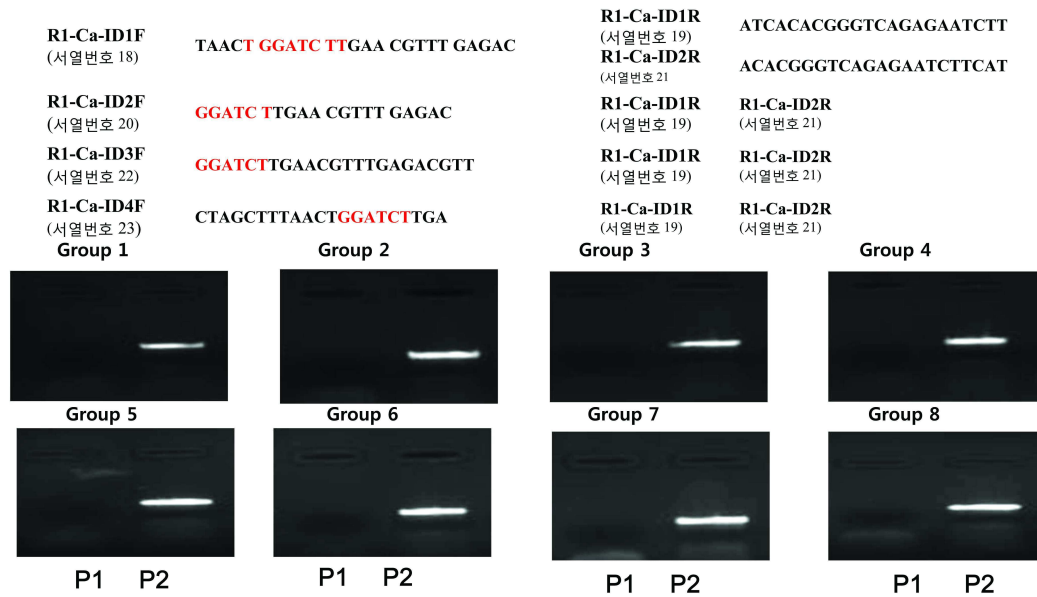
도면8



도면9



도면10



서열목록

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

<120> Specific marker for discriminating root cracking trait in radish
and uses thereof

<130> PN14414

<160> 23

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1490

<212> DNA

<213> Raphanus sativus

<400> 1

atggccacca ttgtttctct ctcacatttc tcccctgtcg aggatgctga aaacatcaag	60
aaggcttgcc aaggttctta ctctttcttt ttgactata gtgattcaag ttctgtttat	120
tactcccccc acctttcttc ttgagtttgc aggatgggga accgatgaaa aggccatcat	180
ctcgatccta ggacaccgaa acttggtcca gaggaaactc ataagacaag cttaccagga	240
gatataccac gaggatctca ttaccagct caaatctgag ctctctggcg actttgaggt	300
ctagctttta tccacttgct atgctctttt ccccttaatt tcacaaaacg tgatttcat	360
ggatttggtta cacctgcaga gagctatatg cttgtgggtt ttggatcctc cagagagaga	420
tgctctcttg gctaacttgg ctctacaaaa gctgttctct gactgcaagg tccttgttga	480
gattgcttgc atgagatccc ctgaagatct attagctacc aggcgtgctt accgttgcc	540

ctacaagcgt tctctcgagg aagacttggc ctcccgtact accggcgaca tcaggaaggt 600

gagtaat ttaatttcaa attgttctct tcttgctttt aactgaacgc ttggcccgggt 660

ttcacacagc tcttggttgc aacggcgtct gcttataaat atgatgggga agatattgac 720

gagactctgg cgcatcaga ggctgcgatt ctcatgatg aaatcatagg taaggctgtt 780

gatcatgaag aaacgatcag ggtgataagt acaaggagca gcgtgcagct ctgcgcaatc 840

ctcaaccgtt acaaggatat ctatggaaga tcgatcacta aggtaaacaa aaaaacatga 900

acatcacaag ttatgttata aattgatgat taaactgtga caaaacaatc aacgggaaat 960

gttaaagaca acaaagaaac gactttttaa atcaatttga ggaaacagag cacctcatac 1020

cagttttttc ttcatgacaa catccggaat gaaacgtttg atggttccca ggatacctc 1080

agccaccctt caaatgagta cctgagtgc ctgcgtgcag caatcaggtg catcaaaaac 1140

cctaaccggg actacgcaaa ggtaagatac cacaatagtt atttcaaat gttacacatg 1200

gtctctat ttttttctt tcccttgacg attaacaggc attcatatat acttgttttt 1260

atttaaactc ctctgcacc taggttttgc gcaatgcaat caacacagtg gggactgatg 1320

aagattctct gaccgtgtg attgtgacac gagcagagaa ggacctgaag aagatcactg 1380

agctgtatca caagaggaac aatgagagtc tcgatcaagc tatagcaaga gagacatcaa 1440

gggactacaa ggcttttctt ctagccttgc taggacacgg aggaatctag 1490

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

cgtgcttacc gttgcctcta 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

caccctgac gtttcttcgt 20

<210> 4

<211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
	gttgggtttc ggacaatgag	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	5	
	gaactggagg gtctgtgagc	20
<210>	6	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	6	
	gggttagatt ctgatctgaa gag	23
<210>	7	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	7	
	cctccttgct gatatatgtt ctg	23
<210>	8	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	8	
	gagtagcttg gcctccgtac ta	22

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 ttcttcgtga tcaacagcct ta 22

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 ctcttggtga acttggtctt tc 22

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 aacaccctga tcgtttcttc gt 22

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 gccaaaggttc ttactctttc tttt 24

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400> 13
gataaaagct agacctcaaa gtcg 24

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 14
cgactttgag gtctagcttt tate 24

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 15
gtagagccaa gttagccaag agag 24

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 16
agagatgctc tcttgctaa ctt 23

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 17
agttaaaagc aagaagagaa caa 23

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 18
 taactggatc ttgaacgttt gagac 25

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 atcacacggg tcagagaatc tt 22

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 ggatcttgaa cgtttgagac 20

<210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 acacgggtca gagaatcttc at 22

<210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 ggatcttgaa cgtttgagac gtt 23

<210> 23
 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

ctagctttaa ctggatcttg a

21