

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0117170 (43) 공개일자 2010년11월03일
(51) Int. Cl. <i>C12N 15/29</i> (2006.01) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>C12N 15/11</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0035772 (22) 출원일자 2009년04월24일 심사청구일자 2009년04월24일	(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교 (72) 발명자 임용표 대전광역시 유성구 지족동 SK허브 914호 형휘 중국 요녕 심양시 대동구 연합로54 110041 심양농과대학교 원예대학 (74) 대리인 최규환	

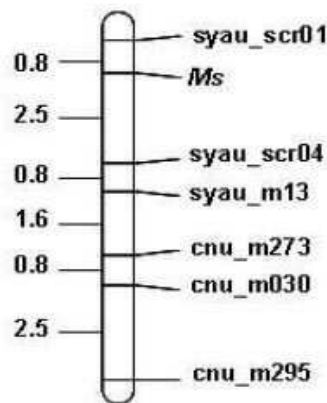
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 배추의 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자 Ms의 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 배추의 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자 Ms에 근접한 분자표지에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 배추의 유전자적 다중대립인자(genic multiple-allele) 음성불임 유전자 Ms 및 이에 대한 SSR 및 SCAR 마커를 포함하는 배추 유전자지도, 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자 Ms에 대한 분자 마커, 상기 마커에 대한 프라이머 쌍, 상기 프라이머 쌍을 포함하는 배추의 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자 Ms를 동정하기 위한 키트, 상기 프라이머 쌍을 이용하여 배추의 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자 Ms를 동정하는 방법, 및 염색체 R07에 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자 Ms를 갖는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 식물체에 관한 것이다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 607002-05

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관

연구사업명 농림기술개발연구사업

연구과제명 배추 분자마커 연구 사업단 과제 “대량 유전자 분자표지 발굴”

기여율

주관기관 충남대학교

연구기간 2007년 07월 30일 ~ 2012년 07월 29일

특허청구의 범위

청구항 1

AB01(MsMs)을 자성친으로, 지부(Chiifu)(msms)를 반복친으로 여교잡하여 SSR 및 AFLP 분석을 실시하여 작성된 배추의 유전자적 다중대립인자(genic multiple-allele) 웅성불임 유전자 *Ms* 및 이에 대한 SSR 마커를 포함하는 것을 특징으로 하는 배추 유전자지도.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*는 염색체 R07에 위치하는 것을 특징으로 하는 배추 유전자 지도.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 SSR 마커는 *cnu_m273*, *cnu_m030*, 또는 *cnu_m295*, 또는 *syau_m13*인 것을 특징으로 하는 배추 유전자 지도.

청구항 4

제1항에 있어서, 도 5에 기재된 것을 특징으로 하는 배추 유전자 지도.

청구항 5

유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*에 대한 분자 마커 *cnu_m273*.

청구항 6

유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*에 대한 분자 마커 *cnu_m030*.

청구항 7

유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*에 대한 분자 마커 *cnu_m295*.

청구항 8

SSR 마커 *cnu_m273*에 대한 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍.

청구항 9

SSR 마커 *cnu_m030*에 대한 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍.

청구항 10

SSR 마커 *cnu_m295*에 대한 서열번호 7 및 8의 프라이머 쌍.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 따른 프라이머 쌍; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 배추의 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*를 동정하기 위한 키트.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 내열성 DNA 중합효소, dNTPs, 및 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 13

배추에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제8항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 따른 프라이머 쌍을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 배추의 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자 *Ms*를 동정하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

염색체 R07에 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자(genic multiple-allele male sterile gene) *Ms*를 갖는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 식물체.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자 *Ms*가 유전자 지도 상에서 분자 마커 *cnu_m273* 으로부터 4.9 cM에 위치하는 것을 특징으로 하는 배추 식물체.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자 *Ms*가 유전자 지도 상에서 분자 마커 *cnu_m030* 으로부터 5.7 cM에 위치하는 것을 특징으로 하는 배추 식물체.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자 *Ms*가 유전자 지도 상에서 분자 마커 *cnu_m295* 으로부터 8.2 cM에 위치하는 것을 특징으로 하는 배추 식물체.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 배추의 유전자적 다중대립인자 음성불임 유전자 *Ms*의 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)는 많은 경제적으로 중요한 채소 식물을 포함하는 *Brassica* 속에 속하며, 분명한 잡종 강세를 지닌 양성화를 지닌 전형적인 allogamous 식물의 예이다. 잡종 종자 생산의 양식은 잡종 강세의 이용을 위하여 매우 중요하다. 식물에 있어서 잡종 강세 현상을 이용한 1 대 잡종 품종 육성은 오래전부터 계속되어 오고 있고, 현재 시판되는 채소 종자의 대부분이 F_1 잡종 종자이다. F_1 잡종 종자 채종 방법으로는 인공교배, 자웅주, 중간 교잡, 자가불화합성(selfincompatibility), 음성 불임성 등이 있으나 음성 불임성을 이용하는 방법을 제외하고는 시간, 노력, 균일도 및 경제성에서 어려운 문제가 많으므로 많은 작물에서 음성 불임 자원을 개발하고 육종에 이용하기 위한 연구가 계속되고 있다.

[0003] 지금까지 F_1 잡종종자의 생산은 주로 자가불화합성을 이용하여 이루어져 왔다. 그러나 자가불화합성의 이용에는 과도한 양친유지 비용, 자식세대 진전에 따른 내혼약세현상, 및 잡종종자의 낮은 순도 등의 문제점이 있다. 즉, 자가불화합성을 이용할 경우에는 자식체를 줄이는데 한계가 있다. 비록 자가불화합성이 잘 고정된 양친계를 사용하여도 노화 수분에 의하여 얼마간의 자식체가 섞여 나오기 때문이다. F_1 잡종 품종에 자식체가 섞여 있으면 종자의 순도가 떨어지고, 심한 경우에는 소비자로부터 보상요구가 오게 되어 종자 분규의 원인이 될 수 있다.

[0004] 음성 불임성이란 화분, 꽃밥, 수술 등의 웅성기관에 이상이 생겨 불임이 생기는 현상으로 여러 종류의 식물에서 이러한 현상을 나타내고 있다. 이는 주로 자연돌연변이, 종속간 잡종 또는 돌연변이 유기체 처리 등에 의해 인위적 또는 자연적으로 발생하고 있다. 음성 불임의 원인에는 유전적인 원인에 의한 것과 환경적인 원인에 의한 것이 있는데, 대부분 육종에 쓰이는 음성 불임계통은 유전적인 원인에 의한 음성 불임계통이다. 이러한 유전적

인 원인에 의한 웅성 불임은 3가지 형으로 나눌 수 있는데 핵유전자적 웅성 불임성(Genic Male Sterility; GMS), 세포질적 웅성 불임성(Cytoplasmic Male Sterility; CMS) 및 세포질-유전자적 웅성 불임성(Cytoplasmic-Genic Male Sterility; CGMS)으로 나뉜다. CMS와 CGMS는 모두 세포질 내 미토콘드리아 이상에 의한 것인데 임성회복 유전자의 존재 여부에 따라 CMS와 CGMS를 나누기도 한다 (Rundfeldt (1960) Pflanzenzuchtung 44:30-62; Shivanna & Johri (1985) Pollen sterility, in the angiosperm pollen, structure and function. Wiley Eastern Ltd. New Delhi).

[0005] 웅성불임 계통의 이용은 자가불화합성에 비해 배추의 교잡육종을 위한 매우 경제적이며 안정된 방법이다. 이상적인 웅성불임 계통의 웅성불임 식물의 비율은 100% 이어야 하며, 주요 경제적 형질의 조합능력 또한 높아야 한다. 상기와 같은 고품질의 웅성불임 계통을 얻기 위하여서는, 웅성불임의 근원을 찾고 유전법칙을 밝히는 것이 결정적인 과정이다.

[0006] 지금까지는, 배추의 웅성불임 재료는 유전자 웅성불임(GMS) 및 세포질 웅성불임(CMS)으로 나눌 수 있었다. CMS에 비하여, GMS는 수술의 완전한 퇴화, 안정된 불임 및 기대하지 않은 형질을 동반하지 않는 것과 같은 분명한 이점이 있다. 그러나, 배추에서 이전에 발견되었던 유전자 웅성불임은 대개 하나의 열성 유전자 또는 우성 유전자에 의하여 조절되는 것으로 여겨졌다. 웅성불임성의 유지된 선발에 검정교잡이 적용되면, 이들 계통에서 웅성불임 식물은 오직 50%에 달할 수 있게 된다. Feng 등 (1995, Acta Hort 402:133-140)은 AB 계통 간에 웅성불임 식물 및 웅성가임 식물의 교배로 배추에서 100% 웅성불임인 4 개의 안정된 유전 계통을 얻었다. 다음해에, 이들 웅성불임 재료의 유전원리를 밝히기 위하여 특별한 유전적 분석이 고안 및 수행되어, "배추의 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자의 유전적 가설"이 최종적으로 제안되었으며 (Feng *et al.* (1998) Acta Hort 467:133-142), 이는 본 발명의 대부분을 만족스럽게 설명한다. 지금까지, 배추의 다른 생태형들 간, 꽃배추, 밀크배추 (Feng *et al.* (2007) Acta Hort Sin 34:659-664) 및 청경채 (Wang *et al.* (2005) Acta Hort Sin 32:628-631)에 유전자가 전달되었으며, 특정 고품질의 웅성불임 계통이 도 2의 모델에 따라 성공적으로 개발되었다. 상기 모델은 1 개의 유전자좌에 3 개의 대립인자 즉, 웅성불임에 대한 "Ms" 대립인자, 웅성가임에 대한 "ms"인자, 및 임성회복에 대한 "Ms^f"로 구성되어 있다. 이들 대립인자의 우성-열성 관계는 Ms^f>Ms>ms 이었다 (Feng *et al.* (1996) Acta Hort 467:133-142). 100% 웅성불임율을 지닌 웅성불임 계통을 얻기 위한 유전적 모델은 도 2와 같다.

[0007] 관행적 육종에서는 원하는 형질의 계통을 선발하기 위해 형태학적 마커를 사용하여 왔으나 이러한 방법은 그 수에 있어서 매우 제한적이고 환경적인 요인이 작용하기 때문에 불확실하다는 단점이 있다. 따라서 최근에는 목적 형질과 연관되어 있는 DNA 마커를 이용하여 육종에 이용하는 분자 육종에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 DNA 마커의 이용은 육종 초기 세대에 선발 가능성, 환경영향 배제 및 양적 형질 분석 등을 가능하게 하므로 육종에 있어서 매우 유용하다. 실제로 많은 작물에서 이러한 DNA 마커 개발이 활발하게 이루어지고 있으며, 육종의 새로운 기술로서 선발 효율을 증대시키고 있다. 식물 육종에 있어서 분자마커의 유용성은 이미 검증되었으나 기존의 분자마커 보다 경제적이고, 대용량으로 신속하게 시료를 검증할 수 있는 분자마커의 개발이 지속적으로 연구되어지고 있다. 분자마커 기술이 발달됨에 따라 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 및 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism) 등 다양한 형태의 분자마커가 개발되었으나 이러한 분자마커들은 비교적 비용이 많이 들고 대량으로 시료를 분석해 내기에는 많은 한계가 있다. 따라서 최근에는 보다 경제적이고 대량 분석이 가능한 SSR(Simple Sequence Repeat) 마커 및 SCAR(Sequence Characterized Amplified Region) 마커의 개발이 활발히 이루어지고 있다.

[0008] 배추과 작물에서 다른 웅성불임 자원에 관하여 특정 분자생물학적 연구가 보고 된 바 있다. Miao 등 (2000, Euphytica 132:227-223)은 여교잡 집단에 근거하여 BSA를 조합한 AFLP 기법으로 유전자 열성 웅성불임 유전자에 밀접하게 연관된 4 개의 STS(Sequence Tagged Site) 마커를 개발하였다. Zhang 등 (2008, Sci. Agri. Sinica 41:2379-2385)은 배추에서 우성 웅성불임 유전자에 밀접하게 연관된 RAPD 마커를 동정하여 2.61 cM 거리의 SCAR 마커로 전환하였다. Ke 등 (2005, Plant Breed. 124:367-370), Hong 등 (2006, Euphytica, 151:401-409), Liu 등 (2007, Chinese J Oil Crop Sci 29:14-19), Lu 등 (2004, Acta Agron Sina 30:104-107), Wang 등 (2006, J Pl Physiol Mol Biol 32:513-518), 및 Wang 등 (2000, Acta Genet Sin 27:1012-1017)은 유채에서 웅성불임 유전자에 연관된 분자적 마커 그룹을 동정하였다. Wang 등 (2000, Acta Hort, Sin. 27:143-144; 2000, Euphytica 112:267-273; 2005, Acta Hort Sin 32:628-631)은 양배추(*Brassica oleracea*)에서 우성 웅성불임 유전자 *Ms-cd1*에 밀접하게 연관된 12 개의 AFLP 마커를 동정하여, 양배추 염색체 3번에 해당하는 연관군 9에 이 유전자를 지도화하였다.

[0009] 배추 웅성불임의 "다중대립인자 모델"의 개발은 식물의 유전자 웅성불임 재료의 이용을 위한 새로운 방식을 창출하였다. 그러나, 그런 웅성불임 재료의 특수한 유전적 기작 때문에, 중간 세대 식물의 유전자형은 웅성불임 계통의 전달 중에 검정교잡으로 동정되어야 한다. 선발된 식물의 목표 유전자와 상의 유전자형은 전달 과정의 자연으로 자손의 개화까지 알 수 없다 (Wang *et al.* (2005) *Acta Hort Sin* 32:628-631). 상기 문제의 해결을 위해서는 유전자표식에 의한 선발(marker-assisted selection; MAS) 방법이 최선의 방법이다. 그러나 지금까지는, 가치 있는 웅성불임 자원에 관한 분자적 마커 연구가 보고된 바가 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명에서는 배추의 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*에 밀접하게 연관된 SSR 마커를 동정하고, *Ms* 유전자에 연관된 AFLP 마커를 SCAR 마커로 전환하며, *Ms* 유전자를 포함하며 이에 근접하는 SSR 마커 및 SCAR 마커를 포함하는 유전자지도를 작성함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 배추의 유전자적 다중대립인자(genic multiple-allele) 웅성불임 유전자 *Ms* 및 이에 대한 SSR 및 SCAR 마커를 포함하는 배추 유전자지도를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*에 대한 분자 마커를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 마커에 대한 프라이머 쌍을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 쌍을 포함하는 배추의 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*를 동정하기 위한 키트를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 쌍을 이용하여 배추의 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*를 동정하는 방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 염색체 R07에 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*를 갖는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 식물체를 제공한다.

효과

[0017] 본 발명에 따르면, 배추의 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*의 인식에 필요한 정보를 함유한 SSR 마커 및 SCAR 마커를 포함하는 유전자지도는 유전자표식에 의한 선발(MAS) 및 유전자지도를 이용한 클로닝(map based cloning)에 유용한 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 AB01(*MsMs*)을 자성친으로, 지부계통(*Chiifu*)(*msms*)을 반복친으로 여교잡하여 SSR 및 AFLP 분석을 실시하여 작성된 배추의 유전자적 다중대립인자(genic multiple-allele) 웅성불임 유전자 *Ms* 및 이에 대한 SSR 및 SCAR 마커를 포함하는 것을 특징으로 하는 배추 유전자지도를 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 따른 배추 유전자지도에서, 상기 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*는 염색체 R07에 위치할 수 있다. 또한, 상기 SSR (Simple Sequence Repeat) 마커는 *cnu_m273*, *cnu_m030*, 또는 *cnu_m295* *syau_m13*일 수 있다. 본 발명의 배추 유전자지도는 더욱 바람직하게는 도 5에 기재된 것일 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한, *cnu_m273*, *cnu_m030*, 및 *cnu_m295*로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*에 대한 분자 마커를 제공한다. 상기 SSR 마커 *cnu_m273*는 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*로부터 하부 4.9 cM 거리에 위치하며, SSR 마커 *cnu_m030*는 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*로부터 하부 5.7 cM 거리에 위치하며, SSR 마커 *cnu_m295*는 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*로부터 하부 8.2 cM 거리에 위치한다. 본 발명은 또한, SSR 마커 *cnu_m273*에 대한 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍, SSR 마커 *cnu_m030*에 대한 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍, SSR 마커 *cnu_m295*에 대한 서열번호 7 및 8의 프라이머 쌍을 제공한다.

[0021] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1 내지 서열번호 4의 서열 내의 16개 이상, 17개

이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머(21개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 1의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 서열번호 2의 프라이머(20개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 2의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.

- [0022] 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.
- [0023] 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.
- [0024] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 프라이머 쌍; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 배추의 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*를 동정하기 위한 키트를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 키트에서, 프라이머 쌍은 전술한 바와 같으며, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 내열성 DNA 중합효소, 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.
- [0026] 본 발명은 또한,
- [0027] 배추에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0028] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명에 따른 프라이머 쌍을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0029] 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 배추의 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*를 동정하는 방법을 제공한다.
- [0030] 상기 프라이머 쌍을 이용하여 미지의 육종 소재 및 계통에 대하여 다양한 핵산증폭 기법을 이용하여 증폭하여 전기영동방법에 의해 배추의 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*를 동정하는 방법을 포함한다.
- [0031] 본 발명의 방법에서, 프라이머 쌍은 서열번호 1 내지 12의 염기서열로 이루어진다.
- [0032] 본 발명의 방법은 배추에서 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 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍을 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, PCR 이란 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.
- [0033] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현예에서, 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 표지

는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍은 상기에 기재된 바와 같다.

[0034] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 모세관 전기영동을 수행할 수 있다. 모세관 전기영동은 예를 들면, ABI Sequencer를 이용할 수 있다. 또한, 겔 전기영동을 수행할 수 있으며, 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0035] 본 발명은 또한, 염색체 R07에 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*를 갖는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 식물체를 제공한다.

[0036] 상기 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*를 갖는 배추 식물체의 *Ms* 좌위는 염색체 R07에 위치하며, 유전자 지도 상에서 분자 마커 *cnu_m273*으로부터 4.9 cM에, 분자 마커 *cnu_m030*으로부터 5.7 cM에, 분자 마커 *cnu_m295*로부터 8.2 cM에 위치할 수 있다.

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 실험방법

[0039] 1. 식물체

[0040] 배추의 유전자 웅성불임 재료 "AB01"(MsMs); 배추 내교배 계통 "지부 (Chiifu)"의 유전자형은 검정교잡에 근거하여 *msms*로 결정되었으며, 임용표 (충남대학교, 한국)에 의해 제공된 다국적 브라시카 게놈 프로그램 (MBGP)의 모델 재료이다.

[0041] 2. 지부 (Chiifu)의 유전자형 결정

[0042] F₁세대에서 가임 및 불임의 분리비에 따라 유전자 다중 대립인자 웅성불임좌 상의 지부 (Chiifu)의 유전자형 결정을 위하여, 웅성친으로서 지부 (Chiifu)가 유전자 웅성불임 계통 "MS-11"(Msms), 유지계통 "ms-05"(*msms*), AB 계통의 불임 식물 "AB02-1"(MsMs) 및 가임 식물 "AB02-2"(Ms^fMs)과 검정교잡되었다.

[0043] 3. DNA 분리 및 BSA

[0044] 게놈 DNA는 Guillemaut 및 Marechal-Drouard (1992, Pl Mol Biol Rep 10:60-65)의 방법을 약간 변형시킨 방법으로 양친 및 BC₁ 식물체의 신선한 잎에서 분리되었다. 10 개의 가임 및 10 개의 불임 개체로부터 동량의 DNA를 합하여 가임 및 불임 bulks가 준비되었다. 양친 및 2 개 bulks의 DNA가 SSR 및 AFLP 기법과 조합된 BSA (Michelmore *et al.* (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:9828-1832)에 사용되었다.

[0045] 4. SSR 분석

[0046] 임용표 (충남대학교)에 의해 이미 개발된 268 SSR 프라이머 쌍이 다형성에 대하여 스크리닝되었다. DNA 증폭은 1 unit *Taq* 중합효소, 0.5 μM 프라이머, 200 μM dNTPs, 1.5-2.0 mM MgCl₂, 1xPCR 버퍼 및 40 ng 게놈 DNA 주형을 함유하는 20 μl 용액에서 수행되었다. PCR은 95°C에서 5 분에 이어, 94°C에서 DNA 변성 30 초, 적절한 어닐링 온도에서 45 초, 및 72°C에서 연장 60 초를 30-35회 순환시킨 후 72°C에서 7 분간 최종 연장하였다. PCR

은 BIO-RAD iCycler PCR로 수행되었으며, PCR 산물은 6% 폴리아크릴아마이드겔 상에서 분리되었다.

[0047] 또한, 본 발명에서 SSR 지도 정보에 근거하여, 근접한 거리의 유전자에 연관된 SSR 마커를 동정하기 위하여 Primer 3 소프트웨어 (Rozen and Skaletsky 2000, *In*:Krawez and Misener (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386)를 사용하여 특정 BAC 클론 상에 SSR을 플랭킹하는 10 SSR 프라이머 쌍을 디자인하였다. 프라이머 디자인의 기준은 하기와 같다: 증폭된 DNA 단편의 크기가 100-400 bp의 범위일 것, 쌍인 두 개의 프라이머 간의 Tm의 차이는 3°C 미만일 것, 프라이머의 Tm은 55°C 내지 63°C 범위 내에 있을 것, 및 GC 함량은 35%를 초과할 것.

[0048] 5. AFLP 분석

[0049] *Ms* 좌위에 근접하기 위하여, AFLP 분석이 수행되었다. AFLP 기법은 Vos 등 (1995, *Nucleic Acids Res* 21:4407-4414)을 약간 변형한 방법에 따랐다. 게놈 DNA (500 ng)를 총 25 μ l 용액에 37°C에서 밤새 *Pst*I 및 *Mse*I으로 잘랐다. 75°C에서 제한효소를 불활성화시킨 후, 총 50 μ l 용액에 37°C에서 3 시간 동안 배양하여 어댑터를 라이게이션하였다. 상기 반응물을 10 배 희석하여, 그 중 5 μ l를 2.5 mM dNTP, 1xPCR 버퍼 (15 mM $MgCl_2$), *Pst*I+G/*Mse*I+C 각각 27 ng, 및 1 U *Taq* DNA 중합효소가 함유된 용액을 사용하여, 예비증폭 반응을 위한 DNA 주형으로 사용하였다. 상기 증폭물을 50 배 희석하여 선택적 PCR을 위한 DNA 주형으로 사용하였다. 16 개의 *Pst*I+GNN 및 16 개의 *Mse*I+CNN 프라이머로 조합된 256 프라이머 쌍이 마커 동정에 사용되었다. 선택적 PCR은 1xPCR 버퍼 (15 mM $MgCl_2$), 2.5 mM dNTP, 30 ng *Mse*I+CNN, 15 ng *Pst*I+GNN, 및 0.4 U *Taq* DNA 중합효소를 사용하여 수행되었다. 모든 증폭은 Vos 등 (1995, *Nucleic Acids Res* 21:4407-4414)에 기재된 PCR 조건으로 BIO-RAD iCycler로 수행되었다. PCR 산물은 동량의 로딩 염료 (98% 포름아마이드, 10 mM EDTA, 자이렌 사이아놀 및 브로모페놀 블루 각각 0.001%)와 혼합되었다. 시료는 94°C에서 5 분간 배양되어 변성된(denatured) 상태로 85 W에서 Long Ranger gel (FMC) 상에서 분리되었다. 전기영동 후, 겔은 silver staining kit (Bioneer)로 발색되었다.

[0050] 6. AFLP 마커의 SCAR 마커로의 전환

[0051] AFLP 마커를 함유하는 겔 조각을 100 μ l 무균수에 5 분간 끓였다. 원심분리 후, 상등액 5 μ l를 해당 선택적 프라이머 조합을 사용하여 동일한 PCR 조건으로 증폭하였다. 증폭물을 1.0% 아가로스겔에서 분리하여, 겔 추출 키트(Tiagen)를 사용하여 추출하였다. 추출된 AFLP 단편을 pGEM-T Easy Vector system I (Promega)으로 클로닝하였다. AFLP 클론을 ABI PRISM 377 자동 시퀀서를 사용하여 양쪽 말단에서 서열결정하였다. SCAR 마커 개발을 위한 프라이머 쌍은 Primer 3 program (http://www.broad.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)을 사용하여 2 개의 말단 서열에 근거하여 디자인되었다. 연이어, BC₁식물의 게놈 DNA를 증폭하기 위하여 예비증폭 조건을 사용하였다. 증폭 산물은 2% 아가로스겔 상에서 분리되었다.

[0052] 7. 연관 분석

[0053] 개발된 SSR 및 SCAR 마커가 244 BC₁식물을 조사하는데 사용되었다. 분자 마커 및 유전자적 다중대립인자 웅성불임 유전자 *Ms*에 대한 연관 분석은 JoinMap[®] 3.0 (Van Ooijen and Voorrips (2001) JoinMap[®] Version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps. CPRO-DLO, Wageningen)으로 수행되었다. 유전자지도는 최소 LOD 스코어 3 및 최대 재조합 비율 0.4에 근거하여 작성되었다. 유전자지도 거리는 코삼비 함수 (Kosambi function: Kosambi (1944) *Ann Eugen* 12:172-175)를 사용하여 계산되었다.

[0054] 실시예 1. 맵핑 집단 구축

[0055] 자성친으로서 AB01 (*MsMs*) 및 반복친 (*msms*) 으로서 지부 (Chiifu) 간에 244 개체를 포함하는 BC₁ 맵핑 집단을 작성하였다. 식물체는 웅성 불임 또는 가임에 대하여 개화 시에 직접적인 관찰로 조사되었다. 모든 244 식물체 중에서 130 개체는 가임, 114 개체는 웅성 불임으로 분리비 1:1 ($\chi^2_{0.05(1)}=0.401$)에 일치하였다.

[0056] 실시예 2. 지부 (Chiifu)의 유전자형 결정

[0057] 지부 (Chiifu)의 유전자형은 각 검정교잡 조합의 자손 분리비 (표 1)에 따라 동형접합 "msms"로 결정되었다.

[0058] 표 1. 유전자적 다중대립인자 음성불임좌 상에 지부(Chiifu)의 유전자형

[0059]

검검 계통	검정교잡 계통	F ₁ 세대에서 가임 식물의 수	F ₁ 세대에서 불임 식물의 수	분리비	χ^2 *
지부 (Chiifu)	AB02-1 (MsMs)	0	55	모두 불임	
	AB02-1 (Ms ^f Ms)	32	25	1:1	0.632
	ms-05 (msms)	52	0	모두 가임	
	MS-11 (Msms)	31	25	1:1	0.446
* 0.05 확률 수준에서 유의					

[0060] 실시예 3. Ms 유전자에 연관된 SSR 마커의 동정

[0061] Ms 유전자의 유전자지도 상의 위치를 알기 위하여, 양친, AB01 및 지부 (Chiifu) 간에 다형성을 동정하기 위하여 배추 전체 계통에 미치는 268 개의 SSR 프라이머가 사용되었다. 182 개의 SSR 프라이머가 다형성을 보였으며, 염색체 R07 상에 하나의 SSR 마커, cnu_m273이 BC₁ 집단에서 Ms 유전자에 밀접하게 연관된 것으로 동정되었다 (표 2). 연관 정보에 근거하여, R07의 연관지도 상에 모두 23 개의 SSR 프라이머가 스크리닝되었다. cnu_m030 및 cnu_m295를 포함하는 다른 두 SSR 마커도 또한 Ms 유전자에 밀접하게 연관된 것으로 동정되었다 (표 2).

[0062] Ms 유전자에 보다 밀접하게 연관된 SSR 마커를 동정하기 위하여, [http://www. brassica-rapa.org](http://www.brassica-rapa.org)에 공개된 BAC 클론의 서열 정보에 따라 특정 BAC 클론 상의 SSR을 플랜킹하게 10 개의 SSR 프라이머가 디자인되었다. 하나의 프라이머, syau_m13만이 Ms 유전자에 연관된 것으로 보여졌다 (표 2). 연관 분석에 근거하여, 상기 Ms 유전자에 연관된 모든 SSR 마커는 Ms 유전자로부터 한 편에 위치하였으며, 분리비는 1:1에 맞았다. Ms에 연관된 마커 만 이 표 4에 제시되었다.

[0063] 표 2. Ms 유전자에 연관된 SSR 마커

[0064]

SSR 마커	프라이머 서열 (5'>3') ^a	모티프	반복 횟수	크기 (bp)	PCR 조건 ^b
syau_m13	TGTTCTGACTGGAACTAGTGT (서열번호 1) 및 GTCAAAATGAGTCGTAAAGAAAGC (서열번호 2)	GA	45	300	60℃, 45s 72℃, 45s
cnu_m273	ATAAGGGCATCGCCTCAACA (서열번호 3) 및 TGCACGCATCCACATAAACA (서열번호 4)	AG	23	273	58℃, 45s 72℃, 60s
cnu_m030	GAAACAAATTATTTAAAAATCAGACCA (서열번호 5) 및 TGGAACAATCCGTAAACTATGC (서열번호 6)	AT	16	199	55℃, 45s 72℃, 60s
cnu_m295	GCTGCCTAATAGGGTGCTTG (서열번호 7) 및 AGAGCGCATTCAGTCTGGT (서열번호 8)	CT	12	197	59℃, 45s 72℃, 60s
^a 정방향 및 역방향 프라이머 순					
^b 모든 프라이머에 대한 PCR 조건은 94℃에서 5 분, 94℃에서 30 초의 35 회 사이클					

[0065] 실시예 4. AFLP 마커의 동정 및 SCAR 마커로의 전환

[0066] BSA는 256 (16 개의 *Pst*I+GNN×16 개의 *Mse*I+CNN) 쌍의 AFLP 프라이머 조합으로 수행되었다. 임의의 16 개의

*Mse*I+CNN 프라이머 중 임의의 것과 조합된 *Pst*I+GTA 및 *Pst*I+GGG 프라이머로는 증폭산물이 생성되지 않았다. 나머지 224 쌍의 프라이머 조합 각각으로는 평균 42 개의 증폭산물이 생성되었다. 두 양친 간에 다형성의 빈도는 약 15%이었으며, 2-28%의 범위에 있었다.

[0067] 두 양친 간에 검출된 2,288 개의 다형 좌위 중, 18 개는 두 bulks에 대하여 다형성을 보였다. 두 bulks에서 유래된 BC₁ 개체에서 상기 후보 마커의 확인에서 2개는 244 개의 BC₁ 식물체의 평가에 최종적으로 사용된 (표 4) 유전자에 밀접하게 연관된 것으로 보였다. 유전자지도 작성집단 내에서, 이들 모든 마커는 *Ms* 유전자에 연관되었다.

[0068] 모든 경우에, 2 프라이머 쌍은 Primer3 software를 사용하여 디자인되었다 (표 3). PCR 조건은 두 양친 각각 및 2 개의 bulks로부터의 사전증폭 산물을 사용하여 최적화되었으며, 두 bulks의 BC₁개체의 게놈 DNA로 추가적으로 확증되었다. 상기 분석의 결과는 이들 AFLP 마커 중 2 개는 성공적으로 SCAR 마커로 전환되었음을 나타낸다. syau_scr01은 P01로부터 전환된 우성 SCAR 마커이었으며, syau_scr04는 P04로부터 전환된 공우성 마커였다.

[0069] 표 3. *Ms* 유전자에 연관된 AFLP 마커 및 전환된 SCAR 마커

[0070]

AFLP 마커	AFLP 프라이머	SCAR 마커		마커 유형	크기	PCR 조건 ^b
		명칭	프라이머 서열 (5'→3') ^a			
P01	Pggc/Mctt	syau_scr01	GCAAATTTGTCAAACCTTACC (서열번호 9) 및 TCCACCACATTACTTCCCAA (서열번호 10)	우성	378bp	58℃, 45s 72℃, 60s
P04	Pgca/Mcac	syau_scr04	AGGATATATCTTGGCTCACGAG (서열번호 11) 및 CATCAATAGTGGCGTATGTCTG(서열번호 12)	공우성	207bp	58℃, 45s 72℃, 60s

^a 정방향 및 역방향 프라이머 순
^b 모든 프라이머에 대한 PCR 조건은 94℃에서 5 분, 94℃에서 30 초의 35 회 사이클

[0071] 실시예 5. SSR 및 SCAR 마커를 이용한 *Ms* 유전자의 맵핑

[0072] 총 244 개의 BC₁ 식물체가 SSR로 스크리닝되어 SCAR 마커로 전환되었다. 웅성불임 특이 마커는 대부분의 웅성 불임 식물에 존재하며, 가임 식물에는 없는 것으로 밝혀졌다. SSR 및 SCAR 마커의 분리를 보여주는 특정 예는 도 3 및 4에 도시되어 있다. *Ms* 유전자 및 상기 마커 간에 재조합을 보이는 개체의 수는 하기와 같다: syau_m13와는 8 개체, cnu_m273와는 12 개체, cnu_m030과는 14 개체, cnu_m295와는 20 개체, syau_scr01과는 4 개체, 및 syau_scr04와는 6 개체. 상기 마커는 또한 유전자지도 작성집단(mapping population) 내에서는 정상적으로 분리되었다 (표 4). 상기 마커에 대한 분리 자료의 JoinMap[®] 3.0을 사용한 연관 분석은 상기 마커들이 모두 최소 LOD에서 같은 연관 그룹에 속하는 것으로 나타났다 (도 5).

[0073] 우성 마커 syau_scr01, 및 공우성 마커 syau_scr04는 각각, 0.8 cM 및 2.5 cM의 거리에서 *Ms* 유전자를 밀접하게 플랭킹하는 것으로 보였다. syau_m13, cnu_m273, cnu_m030, 및 cnu_m295를 포함하여 모든 다른 마커는, syau_scr04와 같은 쪽에서 발견되었다.

[0074] 표 4. BC₁ 집단에서 *Ms* 좌위, 4 SSR 마커 및 2 SCAR 마커의 분리

[0075]

형질 또는 마커	마커 지닌 BC ₁ 식물의 수 ^a		기대비	χ^2 *
	aa	Aa		
<i>Ms</i>	130	114	1:1	0.922
cnu_m273	130	114	1:1	0.922
cnu_m030	128	116	1:1	0.496
cnu_m295	130	114	1:1	0.922
syau_m13	134	110	1:1	2.168
syau_scr01	130	114	1:1	0.922
syau_scr04	136	108	1:1	2.988

^a 동형접합 및 이형접합 밴드를 보이는 BC₁ 식물의 수: aa 가임 동형접합, Aa 웅성불임 이형접합.
* 0.05 확률 수준에서 유의

도면의 간단한 설명

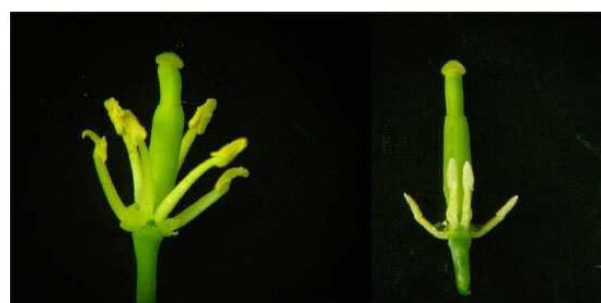
- [0076] 도 1은 유전자 다중 대립인자 웅성불임 유전자를 지닌 정상적인 가임 식물체 및 웅성 불임 식물체의 개화된 꽃 (a), 및 악편 및 화피편이 제거된 가임화 및 웅성 불임화 (b)이다.
- [0077] 도 2는 배추의 유전자 다중 대립인자 웅성불임 유전자 계통의 유전적 모델이다.
- [0078] 도 3은 BC₁ 식물에서 스크리닝된 Ms 유전자에 연관된 두 SSR 마커의 예이다. BC₁ 식물체에서 SSR 마커, syau_m13 (a) 및 cnu_m273 (b)을 보여주는 PCR 산물의 PAGE 전기영동 사진이다. Ps는 웅성불임 양친, Pf는 가임 양친, Bf₁-Bf₁₅는 가임 식물체(msms), Bs₁-Bs₁₅는 유전자 웅성불임 식물체(Msms)이다. 재조합체는 별표로 표시되었다.
- [0079] 도 4는 BC₁ 식물에서 스크리닝된 SCAR 마커의 예이다. BC₁ 식물체에서 SCAR 마커, syau_scr01를 보여주는 PCR 산물의 아가로즈겔 전기영동 사진 (a), 및 BC₁ 식물에서 SCAR 마커, syau_scr04를 보여주는 PCR 산물의 denatured PAGE 전기영동 사진 (b)이다. Ps는 웅성불임 양친, Pf는 가임 양친, Bf₁-Bf₁₅는 가임 식물체(msms), Bs₁-Bs₁₅는 유전자 웅성불임 식물체(Msms)이다. 재조합체는 별표로 표시되었다.
- [0080] 도 5는 지부(Chiifu)/AB01 간에 생성된 BC₁ 집단 (244 개체)에 근거하여 작성된 Ms 좌위의 유전자 연관지도이다. 센티모르간(cM)으로 나타낸 유전적 거리는 코삼비 함수(Kosambi function)를 사용하여 계산되었다.

도면

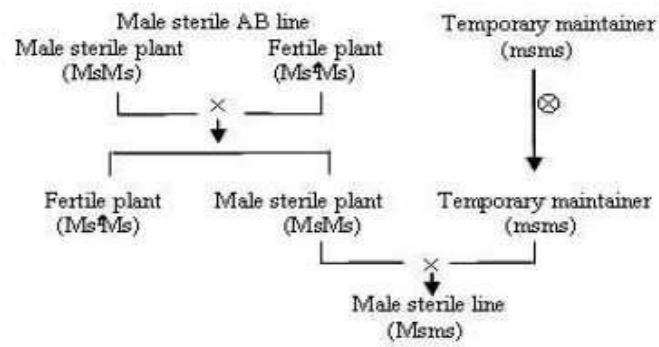
도면1a



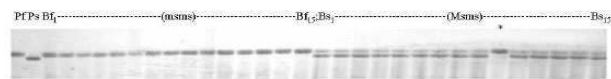
도면1b



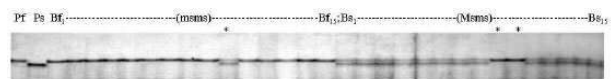
도면2



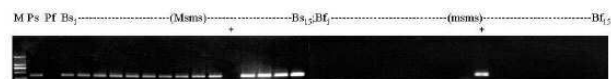
도면3a



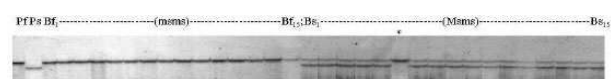
도면3b



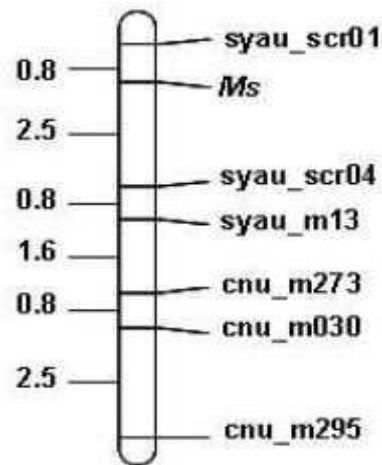
도면4a



도면4b



도면5



서열 목록

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

<120> Marker for Ms, a genic multiple-allele male sterile gene in Chinese

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> syau_m13f primer

<400> 1

tggtcctgac tggaaactag tgt

23

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> syau_m13r primer

<400> 2

gtcaaatga gtcgtaaaga aagc

24

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cnu_m273f primer

<400> 3

ataaggcat cgcctcaaca

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cnu_m273r primer

<400> 4

tgcacgcatc cacataaaca

20

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cnu_m030f primer

<400> 5

gaaacaaatt atttaaaaat cagacca

27

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cnu_m030r primer

<400> 6
tggaacaatc cgtaaaacta tgc

23

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cnu_m295f primer

<400> 7
gctgcctaata agggtgcttg

20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cnu_m295r primer

<400> 8
agagcgcatc caagtctggt

20

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> syau_scr01f primer

<400> 9
gcaaatttgt caaacttcac c 21

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> syau_scr01r primer

<400> 10
tccaccacat tacttccaa 20

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> syau_scr04f primer

<400> 11
aggatatatc ttggctcacg ag 22

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> syau_scr04r primer

<400> 12
catcaatagt ggcgtatgtc tg 22

