(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0041159
(43) 공개일자 2023년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2600/13 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0124404
(22) 출원일자 2021년09월16일
심사청구일자 2021년09월16일

(71) 출원인
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
김정구
전라북도 전주시 완산구 척동1길 32-3, 1동 304호 (효자동3가)
이근표
전북 전주시 덕진구 오공로 70 우미린1차 104-1603
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진동

전체 청구항 수 : 총 6 항

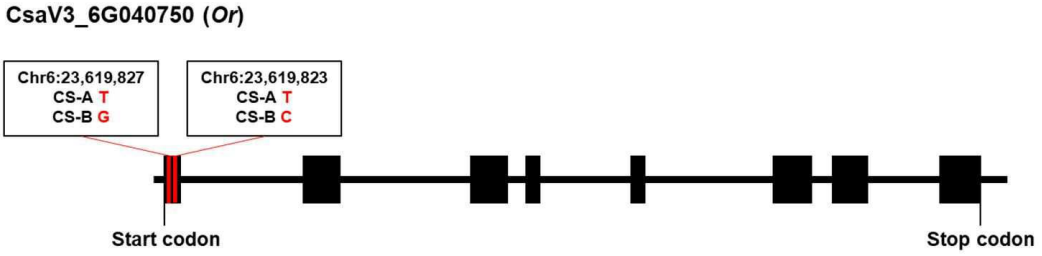
(54) 발명의 명칭 **오이의 오렌지색 과육 판별용 프라이머 세트 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 오이(*Cucumis sativus*)의 오렌지색 과육 판별용 프라이머 세트, 이를 포함하는 키트, 조성물 및 오이의 오렌지색 과육 판별 방법에 관한 것이다.

본 발명의 프라이머 세트를 활용하여 오렌지 과육색을 가지는 오이를 종자 시기 및 생육 초기에 판별할 수 있다. 또한, 본 발명은 신품종 오이의 분자 육종 개발에 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)

(72) 발명자
오은아
전라북도 전주시 완산구 서곡로 34, 105동 1302호
(효자동3가, 서곡청솔아파트)
정진호
전라북도 전주시 완산구 거마평로 93 쌍용모악파크
빌라 503-1312

송기환
서울특별시 성북구 북악산로 813 정릉우성아파트
102-1801

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067396
과제번호	PJ013432022021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(농진청)
연구과제명	국내 고유 오이 유전체해독 및 내병성 관련 유용유전형질 발굴(1주관)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국립농업과학원
연구기간	2018.01.08 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 2의 염기서열로 표시되는, 오이(*Cucumis sativus*)의 오렌지색 과육 판별용 프라이머 세트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 *Or* 유전자(Protein ORANGE-LIKE, *Or* gene)를 증폭시키는 것을 특징으로 하는, 오이의 오렌지색 과육 판별용 프라이머 세트.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 증폭용 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는, 오이의 오렌지색 과육 판별용 프라이머 세트.

청구항 4

제 1항의 프라이머 세트를 포함하는 오이의 오렌지색 과육 판별용 키트.

청구항 5

제 1항의 프라이머 세트를 포함하는 오이의 오렌지색 과육 판별용 조성물.

청구항 6

오이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제 1항의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행해 증폭하는 단계: 및

상기 증폭된 시료를 이용하여 HRM (High-Resolution Melting) 분석을 수행하는 단계를 포함하는,

오이의 오렌지색 과육을 판별하는 판별 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 오이(*Cucumis sativus*)의 오렌지색 과육 판별용 프라이머 세트, 이를 포함하는 키트, 조성물 및 오이의 오렌지색 과육 판별 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 오이(*Cucumis sativus*)는 가장 많이 재배되는 채소작물 중 하나로, 경제적으로 큰 중요성을 가진다. 현재까지 오이의 다양한 형질에 대한 변이가 연구되어 왔으며, 이중에서 과육의 색깔은 오이의 시장성에 큰 영향력을 미치는 형질 중 하나이다. 오이의 과육 색깔은 대부분 흰색이지만 오렌지색 과육을 가지는 오이에 대한 연구도 오래 전부터 진행되어 왔는데, 오렌지색 과육을 가지는 오이는 비타민 A의 전구체인 β카로틴의 함량이 높기 때문이다.

[0003] β카로틴은 자연계에 존재하는 500여 종류의 카로티노이드(carotenoid) 중 하나이며, 당근, 클로렐라, 스피룰리나, 고추 등의 녹황색 채소와 과일에 많이 함유되어 있다. β카로틴은 동물의 소장벽에서 β카로틴 15,15'-단일산화효소(15,15'-monooxygenase)에 의해서 두 분자의 비타민 A로 분해된다. β카로틴은 이외에도 항산화, 항암, 항염 등의 다양한 약리 활성을 가지는 것으로 보고되고 있으며, 현재 이와 관련하여 활발하게 연구가 진행되고

있다.

[0004] 그러나 현재까지 오이의 오렌지색 과육과 연관된 변이를 이용하여 오렌지색 과육을 판별할 수 있는 분자표지에 관한 연구 및 선행기술은 전무하다. 따라서 오이의 오렌지색 과육을 생육 초기에 판별하고 오이의 분자육종에 기여할 수 있는 분자표지의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2018-0094217호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 오이의 오렌지색 과육 판별용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 과제는 프라이머 세트를 포함하는 키트 또는 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 과제는 프라이머 세트, 키트, 또는 조성물을 포함하여 오이의 오렌지색 과육을 판별하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 실시예는 서열번호 1 및 2의 염기서열로 표시되는, 오이의 오렌지색 과육 판별용 프라이머 세트이다.

[0010] 상기 프라이머 세트는 *Or* 유전자(Protein ORANGE-LIKE, *Or* gene)를 증폭시키는 것일 수 있다.

[0011] 상기 프라이머 세트는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 증폭용 프라이머 세트일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 오이의 오렌지색 과육 판별용 키트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 오이의 오렌지색 과육 판별용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 오이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행해 증폭하는 단계: 및 상기 증폭된 시료를 이용하여 HRM (High-Resolution Melting) 분석을 수행하는 단계를 포함하는, 오이의 오렌지색 과육을 판별하는 판별 방법을 제공한다

발명의 효과

[0015] 본 발명의 프라이머 세트를 활용하여 오렌지색 과육을 가지는 오이를 종자 시기 및 생육 초기에 판별할 수 있다. 또한, 본 발명은 신품종 오이의 분자 육종 개발에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 오이의 *Or* 유전자상의 SNP 위치를 나타낸다.

도 2는 CsaOR-HRM 분자표지의 검증 및 적용 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0018] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 표시되는, 오이(*Cucumis sativus*)의 오렌지색 과육 판별

용 프라이머 세트에 관한 것이다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서, 흰색 과육을 가지는 오이 및 오렌지색 과육을 가지는 오이의 유전체를 분석하여, 오렌지색 과육 표현형에 특이적인 변이를 탐색하고, 해당 유전자의 단백질 서열 변화를 초래하는 변이를 선발하여 오이의 오렌지색 과육 판별용 분자표지를 개발하였다.

[0020] 본 발명의 용어 '분자표지'는 DNA 염기서열과 같은 분자들의 차이를 이용하여 특정형질의 표지자로 사용할 수 있는 표지 분자를 말한다. 염색체 상에서 물리적 위치를 나타내고, 특정표현형질을 지시하므로 특정형질을 다른 작물품종에 도입할 때 사용할 수 있는 유전적 표지자로 사용할 수 있다.

[0021] 본 발명의 분자표지는 서열번호 1 및 2의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트를 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 상기 프라이머 세트는 흰색 및 오렌지색 과육을 구분하여 오이의 오렌지색 과육 판별용 분자표지로 사용될 수 있다.

[0023] 본 명세서에 사용된 용어 '프라이머(primer)'는 자유 3' 말단에 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 갖는 짧은 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형의 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액, 중합반응을 위한 시약, 상이한 4가지 뉴클레오티드 트리포스페이트(nucleotide triphosphate) 및 DNA 중합효소 또는 역전사효소의 존재 하에 적절한 온도에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.

[0024] 본 발명에서 상기 프라이머 세트에 포함되는 프라이머는 올리고뉴클레오티드가 이용될 수 있고, 또한 뉴클레오티드 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.

[0025] 본 발명의 프라이머 세트는 *Or* 유전자(Protein ORANGE-LIKE, *Or* gene)를 증폭하는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명에서 차세대염기서열분석(Next-generation sequencing, NGS) 데이터로 분석한 오이 유전체의 6번 염색체에 존재하는 상기 *Or* 유전자 서열상에서 오렌지색 과육과 연관된 2개의 유의미한 SNP 변이가 발견되었다. 이를 이용하여 HRM 분자표지 프라이머 세트를 제작하였으며, 상기 프라이머 세트는 오이의 오렌지색 과육 연관 유전자형의 구분이 가능함을 확인하였다.

[0027] 본 발명에서 상기 프라이머 세트는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 마커 증폭용 프라이머 세트일 수 있다.

[0028] 본 발명의 용어 '단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)'은 DNA 염기서열의 한 부분에서 개체에 따라 다른 변이가 나타나는 것으로, 보통 염기 1000개 당 1개의 변이가 나타나며, DNA 복제 과정에서의 발생한 오류와 생화학적 염기 변형을 수선하지 못함으로써 염기가 바뀌는 것으로부터 비롯된다. SNP는 차세대 염기서열 분석 방법(Next Generation Sequencing, NGS)을 이용하여 분석하고 확인할 수 있다.

[0029] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 프라이머 세트를 포함하는 오이의 오렌지색 과육 판별용 키트에 관한 것이다.

[0030] 본 발명의 키트에서, 상기 프라이머 세트 이외에 상기 증폭반응을 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있으며, 구체적으로 DNA 폴리머라제(polymerase), dNTPs, 버퍼(buffer) 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 안내책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면상 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0031] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 프라이머 세트를 포함하는 오이의 오렌지색 과육 판별용 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명은 또 다른 관점에서, 오이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행해 증폭하는 단계: 및 상기 증폭된 시료를 이용하여 HRM (High-Resolution Melting) 분석을 수행하는 단계를 포함하는, 오이의 오렌지색 과육을 판별하는 판별 방법에 관한 것이다.

[0033] 본 발명에서 상기 오이 시료는 오이의 종자, 뿌리, 잎, 줄기 및 열매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 조직일 수 있다.

[0034] 상기 오이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계는, 오이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 방법으로 DNA 추출 키트를 사용할 수 있으며, 당업계에 공지된 발명을 당업자에 의해 용이하게 변형시켜 사용할 수 있다.

[0035] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 HRM (High-Resolution Melting) 분석을 수행하는 단계는, 분리된 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트를 이용하여 HRM (High-Resolution Melting) 분석을 수행하는 것이나 이에 제한되는 것은 아니며, 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭 및 검출하기 위한 임의의 기타 적당한 방법을 사용할 수 있고, 당업계에 공지된 방법을 당업자에 의해 적절하게 변형하여 사용할 수 있다.

[0036] 본 명세서에 사용된 용어 'HRM(High-Resolution Melting)' 분석은 Real-Time PCR 실험기법 중 하나로, PCR 생산물이 DNA 서열에 따라 가지는 고유의 Tm 값을 활용하여 DNA 서열 차이를 분석하는 기법이다. 형광 물질을 활용하여 PCR 산물의 증폭을 실시간으로 모니터링하는 Real-Time PCR 과정에서, DNA의 이중가닥과 결합하는 형광 물질인 intercalating dye는 형광 파장을 방출하게 된다. 이때 온도를 서서히 증가시키며 고유의 온도값에 도달하면, PCR 생산물인 이중가닥 DNA는 단일가닥으로 변성되고, 방출되는 형광 파장은 급격하게 감소하게 된다. 이때의 온도를 Melting Temperature(Tm)이라고 하며, 각 PCR 생산물은 생산물 내 A-T의 이중결합과 C-G의 삼중결합의 비율 차이에 의해 고유한 Tm 값을 가지게 된다. 이 Tm의 차이를 검출하여 서열의 차이를 검출하는 기법이 HRM(High-Resolution Melting) 분석법이다.

[0038] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 구체적인 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0040] **[실시예 1] 오이의 오렌지색 과육 관련 변이 탐색**

[0041] 흰색 과육을 가지는 오이 (이하 CS-A 라인이라 한다) 및 오렌지색 과육을 가지는 오이(이하 CS-B 라인이라 한다)의 유전체를 차세대염기서열분석(Next-generation sequencing, NCS) 기술을 이용하여 분석하였다. 이후 차세대염기서열분석 데이터를 오이의 참조유전체(Reference Genome) 데이터베이스와 대조하여 변이 정보를 확인하였다. CS-A 라인과 CS-B라인을 비교 분석하여 최종적으로 β카로틴 생합성 관련 유전자 서열 내의 변이를 탐색하였다. 표 1은 오렌지색 과육 연관 후보 변이 정보를 나타낸 것이다.

[0042] 그 결과, 하기 표 1과 같이, β카로틴 생합성 관련 유전자가 암호화하는 단백질 서열의 변화를 초래할 수 있는 15개 변이를 발견하였다.

표 1

[0043]

Chr	위치 Position	상태 Status	Gene ID	AA	AA	유전자 정보 Gene Description	SNP / InDel
chr1	19295790	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_1G032340	V	L	NCED; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase [EC:1.13.11.51]	SNP
chr1	19296096	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_1G032340	P	S	NCED; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase [EC:1.13.11.51]	SNP
chr1	19296097	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_1G032340	N	K	NCED; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase [EC:1.13.11.51]	SNP
chr1	19297612	START_GAINED	CsaV3_1G032340			NCED; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase [EC:1.13.11.51]	SNP
chr2	9534446	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_2G012080	C	R	NCED; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase [EC:1.13.11.51]	SNP
chr4	421165	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_4G000740	I	F	CCS1; capsanthin/capsorubin synthase [EC:5.3.99.8]	SNP
chr4	422747	FRAME_SHIFT	CsaV3_4G000740			CCS1; capsanthin/capsorubin synthase [EC:5.3.99.8]	InDel(8 bp)
chr4	4916062	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_4G007180	S	I	NCED; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase [EC:1.13.11.51]	SNP
chr4	4916163	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_4G007180	E	D	NCED; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase [EC:1.13.11.51]	SNP

chr4	10889227	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_4G017450	V	A	AAO3; abscisic-aldehyde oxidase [EC:1.2.3.14]	SNP
chr5	19675326	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_5G024720	L	I	ABA2; xanthoxin dehydrogenase [EC:1.1.1.288]	SNP
chr6	23615309	FRAME_SHIFT	CsaV3_6G040750			protein ORANGE-LIKE, chloroplastic [Cucumis sativus], *Or* gene	InDel(1 bp)
chr6	23619716	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_6G040750	I	L	protein ORANGE-LIKE, chloroplastic [Cucumis sativus], *Or* gene	SNP
chr6	23619823	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_6G040750	I	T	protein ORANGE-LIKE, chloroplastic [Cucumis sativus], *Or* gene	SNP
chr6	23619827	NON_SYNONYMOUS	CsaV3_6G040750	S	A	protein ORANGE-LIKE, chloroplastic [Cucumis sativus], *Or* gene	SNP

[0044] **[실시예 2] 오이의 오렌지색 과육 판별용 분자표지 설계**

[0045] 발견한 오렌지색 과육 연관 후보 변이 중 ORANGE-LIKE (*Or*) 단백질을 암호화하는 유전자(CsaV3_6G040750, *Or* 유전자) 서열상에 존재하는 2개의 SNP(Single Nucleotide Polymorphism) 변이(23,619,823 bp 및 23,619,827 bp 위치)를 선택하였다.

[0046] 도 1은 오이 유전체에서 *Or* 유전자상의 SNP 위치 정보이다. 도 1을 참조하면, *Or* 유전자 서열상에 23,619,823 bp 및 23,619,827 bp 위치에서 단일다형성 부위가 존재함을 확인하였다.

[0047] 따라서, 서열번호 1 및 2의 염기서열은 상기 다형성 부위를 포함하는 다형성 서열(polymorphic sequence)이다. 이를 오렌지색 과육 판별용 분자표지로 사용하기 위해 HRM(High-Resolution Melting) 분자표지 프라이머(이하 CsaOR-HRM이라 한다)를 설계하였다.

[0048] 하기 표 2에 오이의 오렌지색 과육 판별용 HRM 분자표지 1종의 프라이머 서열을 나타내었다.

표 2

[0049]

마커 ID Marker ID	정방향 프라이머 (CsaOR-HRM-1F)	역방향 프라이머 (CsaOR-HRM-1R)	Type
CsaOR-HRM	서열번호 1 CATTAGCCCTATCCCCTTCT	서열번호 2 CTATAATCGATGGACAAGAAAATTG	HRM

[0051] **[실시예 3] 오이의 오렌지색 과육 판별용 분자표지 검증 및 적용**

[0052] 흰색 과육을 가지는 오이인 CS-A 라인, 오렌지색 과육을 가지는 오이인 CS-B 라인, 그리고 CS-A 라인과 CS-B 라인을 교배하여 얻은 식물체 1세대(F_1) 및 2세대(F_2)의 잎으로부터 genomic DNA를 추출하고 분자표지의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0053] PCR은 80ng의 genomic DNA가 사용되었으며, 10x PCR 버퍼(buffer) 2㎕, 2.5Mm dNTP 2㎕, Taq DNA polymerase 0.3㎕, 10pmole forward primer 0.5㎕, 10pmole reverse primer 0.5㎕, Syto9 0.6 ㎕, 그리고 증류수 10.1㎕로 구성된 조성액을 이용해 95℃에서 5분 동안 수행한 뒤, 95℃에서 30초, 57℃에서 30초, 72℃에서 20초의 조건을 55회 반복하여 수행하고, 이후 72℃에서 10분 동안 수행되었다.

[0054] 이어 60℃에서 90℃까지 0.1℃씩 점차적으로 온도를 증가시키며 PCR 생산물의 형광정도를 측정하여 melting curve의 변화를 확인하였다(도 2).

[0055] 도 2는 CsaOR-HRM 분자표지의 검증 및 적용 결과를 나타낸 그래프로, 그래프 안의 검은색 커브는 F_2 집단들의 분포를 나타내며, 파란색으로 표기한 커브가 오렌지색 과육을 가지는 CS-B 라인, 분홍색 커브가 흰색 과육을 가지는 CS-A 라인, 노란색 커브가 F_1 식물체 집단의 커브를 나타낸다.

[0056] 도 2를 참조하면, CsaOR-HRM 분자표지는 흰색 과육을 가지는 라인 및 오렌지색 과육을 가지는 라인을 수소결합 간의 melting curve 차이로 구분할 수 있었다. 또한, 흰색과 오렌지색 유전형(genotype)을 모두 가지는 이형 F_1 식물체도 구분할 수 있었다. 이를 통해 흰색 과육을 가지는 라인과 오렌지색 과육을 가지는 라인 사이의 염기서열 수소결합의 차이를 확인할 수 있었다.

[0057] 하기 표 3은 CsaOR-HRM 분자표지를 오이의 F_2 집단에 적용한 결과를 나타낸다.

표 3

[0058]

교배조합	F_2 식물체 전체 개수	오렌지 과육색 유전형	이형 유전형	흰색 과육색 유전체	ratio	X^2 P-value
CS-A X CS-B	92	27	42	23	1:2:1	1.04 0.59

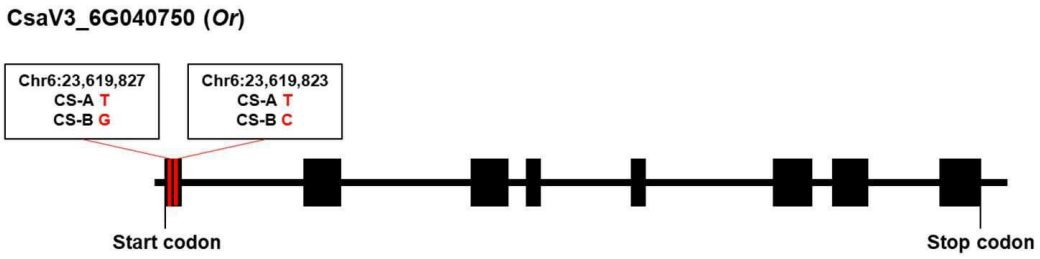
[0059] CsaOR-HRM 분자표지를 92개 F_2 식물체에 확대 적용했을 때 흰색:이형:오렌지색 유전형의 분리비는 1:2:1로 확인되었고, 오렌지색 과육과 CsaOR-HRM 분자표지는 밀접하게 연관되어 있음이 확인되었다.

[0061] 이상으로 본 발명에서는 오이의 차세대염기서열분석(Next-generation sequencing, NCS)을 통해 오렌지색 과육과 연관된 후보 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 변이 15개를 확인하였다. *Or* 유전자상에 존재하는 2개의 SNP 정보를 이용하여 1종의 HRM 분자표지를 설계 및 검증하였으며, 최종적으로 오이의 오렌지색 과육을 판별할 수 있는 분자표지 1종을 개발하였다.

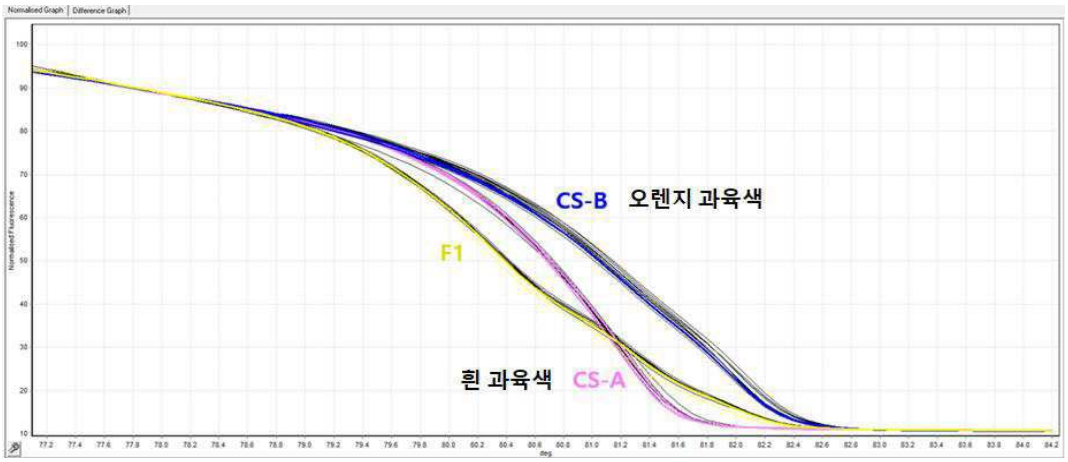
[0062] 이와 같이 본 발명인 오이의 오렌지색 과육 판별용 프라이머 세트를 이용하면 β카로틴의 함량이 높은 오렌지색 과육을 가지고 있는 오이를 종자 시기 및 생육 초기에 판별할 수 있다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

<110> REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)

<120> Primer set for discriminating orange-fleshed cucumber and use thereof

<130> 2021-0242-10-A

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CsaOR-HRM-1F

<400> 1

cattagccct atccccttct 20

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CsaOR-HRM-1R

<400> 2

ctataatcga tggacaagaa aattg 25