



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0050462
(43) 공개일자 2017년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2013.01)

C12Q 2600/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0152009

(22) 출원일자 2015년10월30일

심사청구일자 2015년10월30일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

이상협

서울특별시 강남구 삼성로 151, 11동 1001호 (대치동, 선경아파트)

단다

서울특별시 광진구 광나루로17길 14-6, 201호 (군자동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **오이 유전자형 식별용 조성물 및 이를 이용한 식별 방법**

(57) 요약

본 발명은 오이의 유전자형 식별용 조성물, 이를 이용한 식별 방법과 식별용 키트 및 유전자형 식별을 통한 오이 모계 육종 계통 선발 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 실험실에서 유전자형을 식별할 수 있어 모계 선발에 소요되는 노동력 및 노력을 줄일 수 있고, 특히 대립유전자가 동형인지 이형인지 구분할 수 있어, 일반적인 교배에 의한 식별 방법보다 분석에 소요되는 시간을 2-3년은 단축시킬 수 있으며, 성 발현을 확인하는 과정에서 포장 환경의 영향을 받지 않아 식별의 정확도와 신뢰도를 높일 수 있어 실제로 육종 효율을 높이는데 크게 기여할 수 있다.

대표도 - 도1

```

WFEJ : CATTTAATACATTGTGTGATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
WJEF11 : CATTTAATACATTGTGTGATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
Gy14 : CATTTAATACATTGTGTGATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
WDSGD : CATTTAATACATTGTGTGATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
TH169 : CATTTAATACATTGTGTGATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
9930 : CATTTAATACATTGTGTGATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
TH118FLM : CATTTAATACATTGTGTGATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
WMEJ : CATTTAATACATTGTGTGATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
WNEF8 : CATTTAATACATTGTGTGATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
B10 : CATTTAATACATTGTGTGATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
*****
WFEJ : AATTAGAGTGAATA
WJEF11 : AATTAGAGTGAATA
Gy14 : AATTAGAGTGAATA
WDSGD : AATTAGAGTGAATA
TH169 : AATTAGAGTGAATA
9930 : AATTAGAGTGAATAATCGAATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
TH118FLM : AATTAGAGTGAATAATCGAATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
WMEJ : AATTAGAGTGAATAATCGAATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
WNEF8 : AATTAGAGTGAATAATCGAATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
B10 : AATTAGAGTGAATAATCGAATCGAAGCAGAGAAATAGTACTTACCAAAAAGATTG
*****
WFEJ : AATAGAAAGTGAATTCGAATTAAGAGTGAAGGTTTGGCTTGAAGTAAATTTT
WJEF11 : AATAGAAAGTGAATTCGAATTAAGAGTGAAGGTTTGGCTTGAAGTAAATTTT
Gy14 : AATAGAAAGTGAATTCGAATTAAGAGTGAAGGTTTGGCTTGAAGTAAATTTT
WDSGD : AATAGAAAGTGAATTCGAATTAAGAGTGAAGGTTTGGCTTGAAGTAAATTTT
TH169 : AATAGAAAGTGAATTCGAATTAAGAGTGAAGGTTTGGCTTGAAGTAAATTTT
9930 : AATAGAAAGTGAATTCGAATTAAGAGTGAAGGTTTGGCTTGAAGTAAATTTT
TH118FLM : AATAGAAAGTGAATTCGAATTAAGAGTGAAGGTTTGGCTTGAAGTAAATTTT
WMEJ : AATAGAAAGTGAATTCGAATTAAGAGTGAAGGTTTGGCTTGAAGTAAATTTT
WNEF8 : AATAGAAAGTGAATTCGAATTAAGAGTGAAGGTTTGGCTTGAAGTAAATTTT
B10 : AATAGAAAGTGAATTCGAATTAAGAGTGAAGGTTTGGCTTGAAGTAAATTTT
*****

```

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

장춘영

서울특별시 광진구 광나루로17길 14-6, 광개토관
1330호 (군자동, 세종대학교)

이정환

서울특별시 송파구 올림픽로 135, 222동 102호 (잠
실동, 리센즈)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545008480

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발

연구과제명 오이 노균병 저항성 마커 개발을 통한 노균병 저항성 품종 개발

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.23 ~ 2015.09.22

명세서

청구범위

청구항 1

오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 오이 유전자형 식별용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오타이드는 프라이머 쌍 및 프로브로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인 오이 유전자형 식별용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 자성 오이 특이적 결실은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 나타나는 것인 오이 유전자형 식별용 조성물.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 프라이머 쌍은 서열번호 1의 1 내지 76번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 1의 136 내지 240 번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리버스 프라이머 중에서 하나 이상을 포함하는 것인 오이 유전자형 식별용 조성물.

청구항 5

제 2 항에 있어서,

상기 프라이머 쌍 또는 프로브는 서열번호 2로 표시되는 염기서열 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인 오이 유전자형 식별용 조성물.

청구항 6

제 2 항에 있어서,

상기 프라이머 쌍은 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 리버스 프라이머를 포함하는 것인 오이 유전자형 식별용 조성물.

청구항 7

오이 BCAT 유전자의 3'UTR 영역을 검출할 수 있는 프라이머 쌍 및/또는 프로브를 이용하여 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출하는 단계를 포함하는 오이 유전자형 식별 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 프라이머 쌍은 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 1 내지 76번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 136 내지 240 번째 염기서열 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리버스 프라이머 중에서 하나 이상을 포함하는 오이

유전자형 식별 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 프라이머 쌍은 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 리버스 프라이머를 포함하는 것인 오이 유전자형 식별 방법.

청구항 10

오이 BCAT 유전자의 3'UTR 영역을 검출할 수 있는 프라이머 쌍 및/또는 프로브를 이용하여 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출하는 단계를 포함하는 오이 모계 육종계통 선발 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 프라이머 쌍은 서열번호 1의 1 내지 76번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 1의 136 내지 240 번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 리버스 프라이머 중에서 하나 이상을 포함하는 것인 오이 모계 육종계통 선발 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 프라이머 쌍은 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 리버스 프라이머를 포함하고;

상기 PCR 산물의 크기가 160 bp만 있는 개체를 선발하는 단계를 더 포함하는 오이 모계 육종 계통 선발 방법.

청구항 13

오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 오이 유전자형 식별용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 오이의 유전자형 식별용 조성물, 이를 이용한 식별 방법과 식별용 키트 및 유전자형 식별을 통한 오이 모계 육종 계통 선발 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 상업적으로 생산되는 일대 잡종 종자(F_1 hybrid seed)가 두 개의 다른 단성 오이 육종계통의 교잡에 의하여 생산되기 때문에 자성주(gynoecy, 암꽃만 발현하는 개체)는 오이 육종 프로그램에서 매우 중요한 역할을 한다. 그러므로 모계 모체로 사용하기 위한 자성 오이 계통(gynoecious cucumber line)의 선발은 오이 육종에서 매우 중요한 과정이다. 자성 오이 계통의 전통적인 선발은 육종 포장에서 꽃의 성 발현(flower sex expression)을 관찰하여 결정하였는데, 이러한 전통적인 방법은 선발의 정확성, 조기 검정 및 유지 면에서 여러 가지 제약이 있다. 게다가, 포장 조건 하에서 자성주는 부분적으로 환경적 요인에 의하여 조절되기 때문에, 복잡한 환경적 조건은 선발의 정확성을 감소시킬 수 있다. 또한, 자성주는 단일 우성 형질(single dominant trait)이기 때문에 정확한 선발이 지속적으로 요구되고 있다.

[0003] 전통적인 오이 육종 과정은 노력과 시간이 소비되는 제약이 있으므로, 노력과 시간을 감축시키면서도 정확성을 향상시킬 수 있는 자성주의 분자 선발(selection) 방법의 개발이 필요하다.

[0004] 오이(*Cucumis sativus* L.)는 대표적인 자용동주 식물체로, 한 식물체에 독립된 암꽃과 수꽃이 존재한다. 또한, 오이는 자성(gynoecious), 양성웅화동주형(andromonoecious) 및 양성(hermaphroditic)의 세 가지 다른 성 타입

의 꽃을 갖는다. 오이에서 성 발현은 유전적, 환경적 그리고 호르몬 인자들의 복합적인 영향에 의해 조절되고 (Malepszy and Niermiowicz-Szczytt 1991; Perl-Treves 1999), 성 발현의 유전 및 분자 메카니즘은 잘 알려져 왔다. 오이 꽃의 성 발현은 주로 우성 및 두 개의 다른 열성 자위인 양성웅화동주형(m, 수꽃 및 자웅동체 꽃, andromonoecious)와 웅성(a, 또는 양성, 수꽃, androecious)으로 이루어진 세 개의 성-결정 유전자들에 의하여 결정되며, 암꽃 성 발현은 단일 우성 유전자인 *F*(Female)에 의하여 조절된다(Shifriss, 1961; Kubicki, 1969).

[0005] 지금까지, 오이 계통의 구조적 변이가 암꽃 성 발현(female sex expression)을 조절한다고 여겨왔는데, 최근 30.2 kb 중복 여부가 암꽃 성 발현을 조절한다고 밝혀졌다. 따라서, 이러한 30.2 kb 중복 영역의 중단점을 스페닝하는 마커(프라이머 F/프라이머 R)를 이용하여 자성(gynoecious) 과 양성웅화동주형(andromonoecious)을 구분할 수는 있다. 하지만 이러한 분자마커는 30.2 kb 중복 여부만 판별하는 우성(dominant) 마커이므로, 동형접합성 자성 계통과 이형접합성 자성 계통을 구분하지 못하다는 한계점이 있다. 특히 이형접합성 자성 계통은 모계 육성과정에서 제거되어야 할 개체들이기 때문에, 이러한 문제점을 극복할 수 있는 공우성(co-dominant) 마커의 개발이 여전히 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-1553964 B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기 문제점을 해결하고자 하는 것으로, 오이 유전자를 바이오 마커로 하여 유전자형을 식별하는 조성물, 오이 유전자형 식별용 키트 및 오이 유전자형 식별 방법에 관한 것이다.

[0008] 본 발명은 또한, 상기 오이 유전자를 바이오 마커로 하여 오이 모계 육종 계통을 선발하는 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 오이의 *BCAT* 유전자 3'UTR 영역에서 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 오이 유전자형 식별용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 오이 *BCAT* 유전자의 3'UTR 영역을 검출할 수 있는 프라이머 쌍 및/또는 프로브를 이용하여 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출하는 단계를 포함하는 오이 유전자형 식별 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 오이 *BCAT* 유전자의 3'UTR 영역을 검출할 수 있는 프라이머 쌍 및/또는 프로브를 이용하여 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출하는 단계를 포함하는 오이 모계 육종계통 선발 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 오이의 *BCAT* 유전자 3'UTR 영역에서 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 오이 유전자형 식별용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 실험실 규모에서 유전자형을 식별할 수 있어 포장 환경에서 모계 선발에 소요되는 노동력 및 시간을 줄일 수 있고, 특히 대립유전자가 동형인지 이형인지 쉽게 구분할 수 있어, 일반적인 교배에 의한 식별 방법보다 분석에 소요되는 시간을 2~3년은 단축할 수 있으며, 성 발현을 확인하는 과정에서 포장 환경의 영향을 받지 않아 식별의 정확도와 신뢰도를 높일 수 있어 실제적인 육종 효율을 높이는데 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 오이 각 계통의 *BCAT* 유전자의 3'UTR 영역의 염기서열을 비교분석 한 것으로, 검게 표시된 부분은 품종 간의 보존 염기서열(conserved nucleotide sequence)을 나타내고, 회색으로 표시된 부분은 자성 계통 특이적에서 56 bp 결손(결실) 영역을 나타낸다.

도 2는 *Cs-BCAT-F/Cs-BCAT-R*를 이용한 PCR 증폭의 결과를 나타낸 것으로, a는 F_1 , F_2 개체($F_2-1 \sim F_2-10$) 및 그

부모(M, G)의 PCR 산물로 M은 부계(WNE F8), G는 모계(WJE F11)를 의미하고, b는 오이 근교계통의 각 계통(accession)의 PCR 산물로, 1 ~ 13의 개체는 순서대로 하기 표 5의 SJ01 ~ SJ13을 나타낸다.

도 3은 Cs-ACS1G-pro를 이용한 F₁, F₂ 개체(F₂-1 ~ F₂-15) 및 그 부모(M, G)의 PCR 결과를 나타내는 것으로, M은 부계(WNE F8), G는 모계(WJE F11)를 의미한다.

도 4는 오이 BCAT 유전자의 3'UTR 영역에서 결실되는 영역의 염기서열을 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 오이 유전자형 식별용 조성물을 제공한다.
- [0016] 상기 올리고뉴클레오타이드는 프라이머 쌍 및 프로브로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 일 수 있다.
- [0017] 상기 자성오이 특이적 결실은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 나타나는 것 일 수 있다.
- [0018] 상기 프라이머 쌍은 서열번호 1의 1 내지 76번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 1의 136 내지 240 번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리버스 프라이머 중에서 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 프라이머 쌍 또는 프로브는 서열번호 2로 표시되는 염기서열 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0020] 상기 프라이머 쌍은 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 리버스 프라이머를 포함할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 오이 BCAT 유전자의 3'UTR 영역을 검출할 수 있는 프라이머 쌍 및/또는 프로브를 이용하여 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출하는 단계를 포함하는 오이 유전자형 식별 방법을 제공한다.
- [0023] 상기 프라이머 쌍은 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 1 내지 76번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 136 내지 240 번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리버스 프라이머 중에서 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 프라이머 쌍은 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 리버스 프라이머를 포함할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 오이 BCAT 유전자의 3'UTR 영역을 검출할 수 있는 프라이머 쌍 및/또는 프로브를 이용하여 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출하는 단계를 포함하는 오이 모계 육종계통 선발 방법을 제공한다.
- [0027] 상기 프라이머 쌍은 서열번호 1의 1 내지 76번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 1의 136 내지 240 번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리버스 프라이머 중에서 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0028] 상기 모계 육종 계통 선발 방법은 상기 프라이머 쌍은 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 리버스 프라이머를 포함하고; 상기 PCR 산물의 크기가 160 bp만 있는 개체를 선발하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 오이 유전자형 식별용 키트를 제공한다.

- [0032] 본 발명의 발명자는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역이 오이의 암꽃 형성 조절 유전자의 유전자형을 식별할 수 있는 공우성 마커임을 확인하고, 오이의 자웅동주성 및 자성 계통의 계통 서열을 분석 및 프라이머를 디자인하여, 동형접합성 자성 오이 계통과 이형접합성 자성 오이 계통을 구분할 수 있는 암꽃 형성 조절 유전자 특이적 공우성 마커(co-dominant marker)를 개발하였고, 상기 공우성 마커가 동형접합성 자성 계통 특이적인 마커임을 확인하기 위해 F2 세대의 개체군을 맵핑하고 다양한 오이 계통(accession)을 스크린하여 본 발명을 완성하였다.
- [0034] 이하에서, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.
- [0035] 본 발명은 다양한 변형을 가할 수 있고, 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 이하에서 기술하는 특정 실시예 및 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니다. 본 발명의 범위는 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함한다.
- [0037] 본 발명에 있어서 "자성주(gynoecey, Gy)"는 고등식물의 암컷에 해당하는 것으로, 표현형에 있어서 암꽃식물 또는 암꽃만 발현하는 개체를 의미하는 것으로, 이하 동형접합성 자성 개체, 동형접합성 자성 오이, 동형접합성 자성 계통 등의 표현으로 혼용하여 사용한다. "불완전자성주(subgynoeceious, Sub-Gy)"는 표현형에 있어서 한 개체에서 초기에는 수꽃이 발현하다가, 나중에는 암꽃만 발현하는 개체를 의미하며, "자웅동주(monoecious, Mo)"는 표현형에 있어서 한 개체에서 암꽃과 수꽃이 번갈아 피는 개체를 의미한다.
- [0038] 본 발명에 있어서 "마커" 좌위 또는 연관된 좌위를 확인할 때 기준으로 사용되는 뉴클레오티드 서열 또는 이의 코딩 생성물(예를 들어, 단백질)을 지칭한다. 마커는 계통 뉴클레오티드 서열로부터 또는 발현된 뉴클레오티드 서열로부터(예를 들어, RNA, mRNA, cDNA 등으로부터), 또는 코딩된 폴리펩티드로부터 유래될 수 있다. 이 용어는 마커 서열에 상보적이거나 이에 플랭킹된 핵산 서열, 예컨대 마커 서열을 증폭시킬 수 있는 프로브 또는 프라이머 쌍으로 사용된 핵산을 포함한다.
- [0039] 본 발명에 있어서 "유전형" 또는 "유전자형"이란 개체의 형태학적, 생리학적 또는 생화학적 특징인 표현형과 구별되는 것으로, 개체의 유전자 구성을 뜻하며, 보다 좁은 의미로 한 유전자 위에 존재하는 대립 유전자들(alleles)을 의미한다. "대립 유전자"란 같은 염색체 위치(same chromosomal locus)를 점유하는 한 유전자의 둘 또는 그 이상의 선택적인 형태(alternative form) 중 하나를 뜻한다.
- [0041] 본 발명은, 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역을 검출할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 구체적으로, 상기 올리고뉴클레오티드는 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 삽입-결실(InDel) 여부를 검출할 수 있는 것이고, 더욱 구체적으로는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출할 수 있는 것이다.
- [0042] 또한, 본 발명은 오이의 암꽃 유전자형 식별을 위한 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역을 포함하는 공우성 마커를 제공한다.
- [0043] 오이(cucumber, *Cucumis sativus* L.)는 쌍떡잎식물 합판화군 박목 박과의 한해살이 덩굴식물로, 7개의 염색체 쌍을 가지며, 쌍을 이루는 염색체중 하나는 부계, 하나는 모계로부터 물려받는다. 오이의 유전 양상은 단일 우성 형질에 의한 것으로 알려져 있고, 대표적인 자웅동주 식물체로, 한 식물체에 독립된 암꽃과 수꽃이 존재한다. 또한 오이는 자성(gynoeceious), 양성웅화동주형(andromonoecious) 및 양성(hermaphroditic)의 세 가지 다른 성 타입의 꽃을 갖는다.
- [0044] 상기 유전자형 식별용 조성물은 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역을 공우성 마커로 하여, 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 동형접합성 자성주(*FF*)에서 특이적인 삽입-결실(InDel)을 검출할 수 있고, 상기 삽입-결실(InDel) 여부를 통해 오이의 암꽃 유전자형이 동형접합성 자성(gynoeceious)인지 이형접합성 자성 또는 자웅동주성인지 식별 할 수 있다. 바람직하게는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 동형접합성 자성(gynoeceious) 특이적 일부 염기서열의 결실 여부를 통해 오이의 유전자형을 식별할 수 있다.
- [0045] 상기 삽입-결실(InDel)은 유전자의 염기배열에서 일부 염기가 삽입(insertion) 되거나 결실(deletion) 경우를 총칭한다.

- [0046] 상기 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역은 오이의 BCAT 유전자 중 1 - 1.5 kb 에 해당하는 영역을 의미하는 것으로, *Cucumis sativus*에 속하는 것이라면 그 계통에 따른 염기서열의 차이가 있다고 하더라도, 삽입-결실(InDel) 변이에 따라 오이의 유전자형을 식별할 수 있다면, 즉 본 발명의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역의 DNA 단편의 크기 또는 존부를 구분하는데 지장이 없는 경우라면 계통 또는 중간 염기서열에 차이가 있다고 하더라도 본 발명에 포함된다.
- [0047] 상기 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 삽입-결실이 발생하지 않고, 종 또는 계통 간 동일한 염기서열을 나타내는 영역을 보존서열 영역이라 정의하고, 상기 보존서열 영역은 서열의 정렬 시 공백부위(gap) 또는 SNP 발생 등과 같은 종 또는 계통 간 약간의 차이가 있으나, 상기 올리고뉴클레오타이드를 통하여 결실부위 검출이 가능한 정도의 차이라면 모두 본 발명에 포함된다.
- [0048] 구체적으로, 상기 결실은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 나타날 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 79 번 염기부터 134 번 염기까지의 위치에서 일어남을 도 1을 참고하면 확인 할 수 있다. 상기 결실 부위의 염기서열은 오이의 종 또는 계통 간 약간의 차이가 있을 수 있고, 일 예로 서열번호 2의 염기서열을 포함 또는 가질 수 있고, 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0049] 더욱 구체적으로, 상기 서열번호 1에서 77 및 78 번 염기, 135 번 염기, 158 번 염기, 173 번 염기 및 199 번 염기 위치에는 각각 독립적으로, 종에 따라 A, T, G 또는 C 염기가 존재하거나 또는 공백(gap)이 나타날 수 있고, 각각 독립적으로 상기 77 및 78 번 염기는 T 또는 공백(gap), 135 번 염기는 A 또는 G, 159 번 염기는 A 또는 G, 173 번 염기는 C 또는 G, 199 번 염기는 A 또는 C 일 수 있다. 또한, 구체적으로 상기 서열번호 1에서 n은 A,T,C,G 또는 공백 중 어느 하나일 수 있고, 일부 계통에서는 n이 공백으로 서열번호 1의 79번째 내지 134 번째 염기가 결실 될 수 있다.
- [0050] 상기 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역의 구체적인 염기서열의 일 예로, WFEJ 계통은 서열번호 3의 염기서열, WJE F11 계통은 서열번호 4의 염기서열, Gy14 계통은 서열번호 5의 염기서열, WDSGD 계통은 서열번호 6의 염기서열, TH169 계통은 서열번호 7의 염기서열, 9930 계통은 서열번호 8의 염기서열, TH118FLM 계통은 서열번호 9의 염기서열, WMEJ 계통은 서열번호 10의 염기서열, WNEF8 계통은 서열번호 11의 염기서열, B10 계통은 서열번호 12의 염기서열을 포함한다. 상기 각 계통의 BCAT 유전자 3'UTR 영역의 염기서열은 BCAT 유전자에서 3'UTR 영역을 어디서 자르느냐에 따라 더 긴 염기서열을 가지거나 포함할 수도 있다.
- [0051] 오이에서 암꽃 성 발현은 단일 우성 유전자에 의하여 조절되는 것으로, 오이에서 암꽃 형성과 관련된 조절인자로 *CsACS* 유전자 있으며, 에틸렌 합성이 증가하면 암꽃이 발생하고, 자성 계통에서 ACS 유전자의 발현이 증가된다고 알려져 있다. 또한 최근 연구결과 자성 계통(Gy)에서 ACS의 중복된 copy가 존재한다는 것이 밝혀져 영역을 검출할 수 있는 마커를 통해 오이 꽃의 성타입을 확인할 수 있다고 하였으나, 상기 중복 카피(copy)의 존부를 확인 하는 것 만으로는, 상기 대립유전자 한 쌍 중에서 한쪽에만 중복 copy가 존재하는지 또는 양쪽에 존재하는지에 대해서만 차이가 나므로 자성 계통 오이의 유전자형이 동형 인지 또는 이형 인지 알 수 없었다. 그러나 오이 자성 계통의 경우 이형의 유전자형을 가진 개체를 모계로 사용할 수 없는바, 오이 육종에서 모계를 선발함에 있어 동형접합성을 가지는 유전자형을 정확하게 식별할 수 있는 공우성 마커가 절실히 필요하였다.
- [0052] 이에 본 발명자는 오이의 ACS 유전자에서 중복 영역이 CS-ACS1 유전자와 BCAT 유전자의 중간 영역의 염기서열이 없어진 형태로 나타나는 것을 실험적으로 확인하였고, 상기 중복 영역을 중심으로 서열 분석 및 프라이머 디자인을 통하여 본 발명에서 동형접합성 자성 계통 특이적으로 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 일부 염기서열에서 결실이 나타나는 것을 밝혀냈고(도 1), 상기 동형접합성 자성 계통 특이적인 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 결실 부위를 공우성 마커로 하여, 오이의 암꽃 형성 조절 유전자의 유전자형을 식별할 수 있는 조성물을 개발하였다.
- [0053] 상기 올리고뉴클레오타이드는 오이 BCAT 유전자의 3'UTR 영역에서 목적하는 결실 여부를 검출할 수 있는 제제라면 모두 포함되며, 일 예로 프라이머 쌍 또는 프로브일 수 있고, 검출의 정확도를 위하여 2 이상의 검출용 제제를 함께 사용할 수도 있다.
- [0054] 상기 프라이머 쌍 또는 프로브는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 자성 오이 특이적 결실부위에 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 상기 특이적 결실부위는 일 예로 서열번호 2의 염기서열을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것 일 수 있다.
- [0055] 상기 올리고뉴클레오타이드는 증폭된 DNA 산물의 길이, GC 함량, 접합 온도(annealing temperature), 합성비용

등을 고려하여 사용될 수 있다.

- [0056] 상기 올리고뉴클레오타이드의 결합하는 위치는 크게 제한되지 않으며, 오이의 종 또는 계통 사이의 서열의 정렬 시 발생하는 공백부위(gap) 또는 SNP 발생부위를 피하여 결합할 수 있으나, 공백부위가 1 또는 2 bp로 짧은 경우에는 DNA 결과물에 큰 지장을 주지 않으면 문제되지 않는다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 목적하는 DNA를 특이적으로 증폭할 수 있는 한 크기에 제한되지 않으나, 바람직하게는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역의 염기서열 중 연속하는 4 내지 50 nt에 상보적으로 결합할 수 있는 것 일 수 있다.
- [0057] 상기 올리고뉴클레오타이드가 프라이머 쌍인 경우 SNP 부위를 포함하여 결합 위치를 선정하더라도, 축퇴 프라이머(degenerate primer)를 제조하여 사용할 경우에는 검출에 큰 지장을 주지 않는다.
- [0058] 상기 프로브는 마커 DNA의 결실 영역 염기서열 내에서 또는 상기 염기서열과 인접한 비결실 DNA 염기서열의 일부를 포함하여, 썬던 블롯 분석, 마이크로어레이 혼성화 등을 통해 오이 유전자형을 식별할 수 있다. 상기 결실 영역 내에서만 선택되어 프로브를 디자인하였으면 동형접합성 자성 오이 개체의 시료에서는 혼성화 반응이 일어나지 않는 반면, 이형접합성 자성오이 개체 또는 자웅동주성 계통의 시료에서는 혼성화 반응이 일어나는 것으로 오이의 유전자형을 식별 할 수 있다
- [0059] 상기 프라이머 쌍은 서열번호 1의 1 내지 76번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 1의 136 내지 240 번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리버스 프라이머 중에서 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0060] 상기 프라이머 쌍이 서열번호 1의 보존부위 염기서열에만 결합, 바람직하게는 포워드 프라이머는 결실 영역보다 앞선 영역의 보존염기서열에 결합 및 리버스 프라이머는 결실 영역보다 뒤 쪽 영역의 보존 염기서열에 결합하는 경우, 동형접합성 자성 계통은 이형접합성 자성 계통 또는 자웅동주형 개체와 달리 가장 작은 크기의 PCR 산물만 나타나므로, PCR 산물의 크기 차이로 동형접합성 자성 오이 개체를 식별할 수 있다. 또한, 상기 프라이머 쌍에서 하나의 프라이머는 결실 영역에 상보적인 결합을 하고, 다른 하나는 보존부위의 염기서열에만 결합하는 경우 동형접합성 자성 계통에서만 PCR 산물이 생성되지 않으므로, 다른 개체와 쉽게 식별할 수 있고, 상기의 경우 프라이머 쌍을 두 개 이상 포함하여 사용할 수 있다.
- [0061] 상기 프라이머 쌍 또는 프로브는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 자성 오이 특이적 결실부위에 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것 일 수 있고, 상기 특이적 결실부위는 일 예로 서열번호 2의 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 특이적 결실부위에 결합할 수 있도록 프라이머를 설계하는 경우 DNA 시료에 문제가 있어서 증폭되지 않는 것인지 확인하기 위해, 상기 식별용 조성물은 기준 DNA를 증폭하기 위한 프라이머 쌍을 추가로 포함할 수 있다.
- [0062] 일 예로, 상기 프라이머 쌍 중 하나 또는 둘 모두가 결실부위 내에서 또는 결실부위와 인접부위를 걸치는 곳에서 선택하여 디자인된 경우, 동형접합성 자성 오이 개체의 경우 PCR 산물 자체가 생성되지 않아, 이 경우 밴드 자체의 유무 만으로 동형접합성 자성 오이 개체를 식별할 수 있다.
- [0063] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어서, 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 리버스 프라이머로 이루어진 프라이머 쌍을 이용하여 상기 PCR을 수행하는 경우, PCR 산물이 크기가 216 bp 만 있는 경우 열성(*ff*) 유전자형을 갖는 자웅동주성 계통이었고, 160 bp만 있는 경우 우성(*FF*) 유전자형을 갖는 동형접합성 자성 계통, 그리고 216 bp 및 160 bp 크기 산물이 혼재하는 경우 *Ff* 유전자형을 갖는 이형접합성 자성 계통으로 식별하였다. 상기 오이 유전자형 식별 방법은 오이 암꽃 형성 조절 유전자의 유전자형을 식별할 수 있음을 확인 하였다.
- [0064] 상기 증폭하는 기술은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의하여 통상적으로 사용될 수 있는 범위를 모두 포함하며, 일 예로 중합효소 연쇄반응(PCR), 가닥 치환 증폭(SDA), 고리-매개 등은 증폭(LAMP), 회전환 증폭(RCA), 전사-매개 증폭(TMA), 자기-지속적 서열 복제(3SR), 핵산 서열 기반 증폭(NASBA), 또는 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 중 하나 이상을 사용할 수 있으나, 상기 예에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 중합효소 연쇄반응을 사용하여 수행할 수 있다.
- [0066] 또한, 본 발명은 오이 BCAT 유전자의 3'UTR 영역을 검출할 수 있는 프라이머 쌍 및/또는 프로브를 이용하여 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출하는 단계를 포함하는 오이 유전자형 식별 방법을 제공한다.

- [0067] 상기 오이 유전자형 식별 방법은 PCR 산물의 크기를 분석하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0068] 상기 오이 유전자형 식별 방법은 상기 PCR 산물의 크기에 따라 가장 큰 PCR 산물 만을 나타내는 개체를 자동동 주성 계통, 가장 작은 PCR 산물 만을 나타내는 개체를 동형접합성 자성 계통, 그리고 상기 두 산물을 혼재하여 나타내는 개체를 이형접합성 자성 계통으로 식별하는 단계 또는 PCR 산물이 나타나지 않은 개체를 동형접합성 자성 계통으로 식별하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0069] 상기 오이의 유전자형 식별은 유전자의 염기서열 또는 염기서열의 길이를 확인할 수 있는 방법이라면 모두 사용할 수 있고, 일 예로 프라이머를 이용한 PCR법, 프로브를 이용한 써던 블롯 또는 마이크로 어레이, 시퀀싱 또는 캐필라리(capillary)에 로딩하여 사이즈의 크기 등을 구별하는 방법을 모두 사용할 수 있다.
- [0070] 상기 프라이머 쌍은 서열번호 1의 1 내지 76번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 1의 136 내지 240 번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 리버스 프라이머 중에서 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 프라이머 쌍의 상기 염기서열 내에서 포워드 프라이머와 리버스 프라이머를 포함하는 경우 동형접합성 자성 계통에서는 가장 작은 크기의 PCR 산물만 생성되므로, 다른 유전자형 계통으로부터 쉽게 식별할 수 있다. 또한, 상기 프라이머 쌍이 상기 염기서열 내에 결합하는 포워드 프라이머 또는 리버스 프라이머와 결실영역, 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 결실영역의 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드, 에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고 뉴클레오티드를 프라이머를 쌍으로 포함하는 경우, 동형접합성 자성 계통 에서만 PCR 산물이 생성되지 않아, 다른 유전자형을 갖는 계통으로부터 쉽게 식별할 수 있다.
- [0071] 또한, 상기 프라이머 쌍 또는 프로브는 서열번호 3 내지 서열번호 12 중에서 선택된 염기서열에 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있다.
- [0072] 구체적으로 서열번호 3의 WFEJ 계통, 서열번호 4의 WJE F11 계통, 서열번호 5의 Gy14 계통, 서열번호 6의 WDSGD 계통 및 서열번호 7의 TH169 계통 중에서 선택된 염기서열에 상보적으로 결합할 수 있고, 바람직하게는 염기서열의 1 내지 76번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 포워드 프라이머 및 77번째 이후의 염기 중에서 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 프라이머 중에서 하나 이상을 포함하는 프라이머 쌍 일 수 있다. 상기 프라이머 쌍의 포워드 프라이머와 리버스 프라이머가 모두 염기서열에 결합할 수 있는 경우 동형접합성 계통에서는 가장 작은 크기의 PCR 산물만이 얻어지고, 상기 프라이머 쌍에서 서열번호 3 내지 7의 염기서열에 결합되는 프라이머와 BCAT 유전자 3'UTR의 결실 영역의 염기 중에서 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합하는 프라이머를 쌍으로 포함하여 PCR을 수행하는 경우 동형접합성 자성 계통에서는 PCR 산물이 생성되지 않아, 다른 유전자형을 가진 개체들과 쉽게 구분할 수 있다. 상기 결실 영역의 염기서열은 서열번호 2의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0073] 또한, 서열번호 7의 9930 계통, 서열번호 9의 TH118FLM 계통, 서열번호 10의 WMEJ 계통, 서열번호 11의 WNEF8 계통 및 서열번호 12의 B10 계통의 염기서열 중 선택된 염기서열에 상보적으로 결합할 수 있고, 바람직하게는 염기서열의 1 내지 76번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 프라이머 및/또는 136 내지 240 번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 프라이머를 쌍으로 포함할 수 있고, 상기 프라이머 쌍에 하나의 프라이머는 BCAT 유전자의 3'UTR에서 동형접합성 자성 계통에서 결실되는 부위, 구체적으로 서열번호 7 내지 12의 염기서열 중에서 선택된 어느 염기서열의 79 내지 134번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것 일 수 있다.
- [0074] 상기 프라이머 쌍 또는 프로브는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 자성 오이 특이적 결실부위에 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것 일 수 있고, 상기 특이적 결실부위는 일 예로 서열번호 2의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0075] 상기 자성 오이 특이적 결실의 검출은 오이의 유전자 시료를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의하여 증폭시키는 것 일 수 있다. 상기 PCR 산물의 크기는 프라이머의 종류, 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 상보적으로 결합하는 위치 등에 따라서 달라질 수 있으나, 공통적으로 단일 우성 F 유전자를 갖는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 일부 염기서열의 결실이 발생함을 공우성 마커로 하여 식별할 수 있다.

- [0076] 본 발명의 일 실시예에 따른 마커 DNA는 PCR 증폭이 아닌 통상적인 DNA-DNA 또는 DNA-RNA 혼성화를 통해서도 검출이 가능하다. 이 경우 써던 블롯 분석 또는 마이크로 어레이 혼성화를 통한 검출이 가능하며, 상기 혼성화를 위한 DNA 또는 RNA 프로브는 상기 오이 BCAT 유전자의 3'UTR 영역의 염기서열에서 결실부위의 염기서열 내에서 또는 상기 결실부위 염기서열과 인접한 비결실 영역의 염기서열을 일부 포함하도록 고안될 수 있고, 상기 결실 영역의 염기서열 내에서의 연속된 뉴클레오티드와 반응하도록 디자인 된 경우 동형접합성 자성 오이 계통의 시료에서는 혼성화 반응이 일어나지 않고, 다른 암꽃 유전자형을 가진 개체에서만 혼성화 반응이 일어날 것이다. 따라서 오이 BCAT 유전자의 3'UTR 영역을 공우성 마커로서 동형접합성 자성 계통을 식별하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0077] 상기 프라이머쌍이 서열번호 1의 보존부위 염기서열에만 결합, 바람직하게는 포워드 프라이머는 결실 영역보다 앞선 영역의 보존염기서열에 결합 및 리버스 프라이머는 결실 영역 보다 뒤 쪽 영역의 보존 염기서열에 결합하는 경우, 동형접합성 자성 계통의 경우 이형접합성 자성 계통 또는 자웅동주형 개체와 달리 가장 작은 크기의 PCR 산물만 나타나므로, PCR 산물의 크기 차이로 동형접합성 자성 오이 개체를 식별할 수 있다.
- [0078] 상기 프라이머 쌍 또는 프로브는 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 자성 오이 특이적 결실부위에 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것 일 수 있고, 상기 특이적 결실부위는 일 예로 서열번호 2의 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 특이적 결실부위에 결합할 수 있도록 프라이머를 설계하는 경우 DNA 시료에 문제가 있어서 증폭되지 않는 것인지 확인하기 위해, 상기 식별용 조성물은 기준 DNA를 증폭하기 위한 프라이머 쌍을 추가로 포함할 수 있다.
- [0079] 일 예로, 상기 프라이머 쌍 중 하나 또는 둘 모두가 결실부위 내에서 또는 결실부위와 인접부위를 걸치는 곳에서 선택하여 디자인 된 경우, 동형접합성 자성 오이 개체의 경우 PCR 산물 자체가 생성되지 않아. 이 경우 밴드 자체의 유무 만으로 동형접합성 자성 오이 개체를 식별할 수 있다.
- [0080] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어서, 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 리버스 프라이머로 이루어진 프라이머 쌍을 이용하여 상기 PCR을 수행하는 경우, PCR 산물이 크기가 216 bp 만 있는 경우 열성(*ff*) 유전자형을 갖는 자웅동주성 계통이었고, 가장 작은 크기의 160 bp만 있는 경우 우성(*FF*) 유전자형을 갖는 동형접합성 자성 계통, 그리고 216 bp 및 160 bp 크기 산물이 혼재하는 경우 *Ff* 유전자형을 갖는 이형접합성 자성 계통으로 식별하였다. 상기 오이 유전자형 식별 방법은 오이 암꽃 형성 조절 유전자의 유전자형을 식별할 수 있음을 확인 하였다.
- [0081] 상기 오이 유전자형 식별 방법은 오이 암꽃 형성 조절 유전자의 유전자형을 식별하는 것 일 수 있다.
- [0082] 상기 오이 유전자형 식별 방법에 있어서, 상기 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역은 오이 유전자형 식별용 키트를 이용하여 증폭될 수 있다.
- [0083] 본 발명에서 기재하지 않은 사항은 특별한 언급이 없는 한 상기 오이유전자형 식별용 조성물 및 유전자형 식별 방법의 기재에 따른다.
- [0085] 또한, 본 발명은 오이 BCAT 유전자의 3'UTR 영역을 검출할 수 있는 프라이머 쌍 및/또는 프로브를 이용하여 동형접합성 자성 오이 특이적 결실을 검출하는 단계를 포함하는 오이 모계 육종계통 선발 방법을 제공한다.
- [0086] 상기 오이 육종 계통 선발 방법은 PCR 산물의 크기를 분석하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0087] 상기 오이 육종 계통 선발 방법은 상기 PCR 산물의 크기에 따라 가장 작은 PCR 산물만을 나타내는 개체 또는 PCR 산물이나 혼성화 반응을 나타내지 않는 개체를 동형접합성 자성 계통으로 식별하여, 모계 육종계통으로 선발하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0088] 상기 오이 유전자형 식별 방법은 오이 암꽃 형성 조절 유전자의 유전자형을 식별하는 것 일 수 있다.
- [0089] 상기 프라이머 쌍은 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 1 내지 76번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 136 내지 240 번째 염기 중에서 선택된 연속되는 4 내지 50 nt의 뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 리버스 프라이머 중에서 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0090] 상기 프라이머 쌍은 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 포워드 프라이머 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 리버스 프라이머를 이용한 PCR 산물의 크기가 160bp만 있는 개체를 모계 육종 계통으로 선발하는 단계를 더

포함한다.

- [0091] 본 발명에서 기재하지 않은 사항은 특별한 언급이 없는 한 상기 오이유전자형 식별용 조성물 및 유전자형 식별 방법의 기재에 따른다.
- [0093] 또한, 본 발명은 상기 오이의 BCAT 유전자 3'UTR 영역에서 삽입-결실(InDel) 여부를 검출할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는 오이 유전자형 식별용 키트를 제공한다.
- [0094] 상기 키트와 관련하여 중복되는 내용의 상기의 기재에 따른다.
- [0095] 상기 키트는 DNA 중합효소 및 dNTP(dGTP, dCTP, dATP 및 dTTP)를 더 포함할 수 있다.
- [0096] 또한, 상기 키트는 혼성화 버퍼, 특정 표적 구역을 증폭시키기 위해 폴리머라제 및 폴리머라제에 의해 매개된 프라이머 연장에 최적화된 반응 버퍼에서 선택된 것을 하나 이상 더 포함 할 수 있고, 상기 키트는 필요에 따라, 결과를 평가하기 위한 대조군 샘플, DNA 증폭 시약, DNA 폴리머라제, 핵산 증폭 시약, 제한 효소, 완충액, 핵산 샘플링 디바이스, DNA 정제 디바이스, 테옥시뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드(예, 프로브 및 프라이머) 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0097] 또한, 이러한 키트의 사용에 있어서, 표지화된 프라이머(뉴클레오타이드)를 사용하여 분석 중 용이하게 동정할 수 있다. 상기에서 사용될 수 있는 표지의 예로서는 방사능 표지, 효소, 형광 화합물, 스트렙타비딘, 아비딘, 바이오틴, 자성 부분, 금속 결합 부분, 항원 또는 항체 부분 등이 있다.
- [0098] 본 발명에서 기재하지 않은 사항은 특별한 언급이 없는 한 상기 오이유전자형 식별용 조성물 및 유전자형 식별 방법의 기재에 따른다.
- [0100] 이하, 본 발명을 제조에 및 실험예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0102] **[실시예 1] 식물준비, 실험방법 및 재배조건**
- [0103] 1-1. 식물준비 및 재배조건
- [0104] 두 개의 오이 한국 자성계통(*Cucumis sativus* L., 이하 Gy 계통) 'WJE F10'와 'WJE F11' 그리고 자용동주 계통(이하, Mo 계통) 'WNE F8'을 교배하여 F₂ 분리 집단을 만드는데 사용하였다. 두 개의 F₂ 집단을 암꽃 형성 유전자 특이적 공우성 마커(co-dominant marker) 개발을 위한 PCR 분석에 사용하였다.
- [0105] 실험군으로, F₂ 집단은 'WJE F11(모계)' 와 'WNE F8(부계)'로부터 얻어진 160개의 개체들로 구성된 제 1 집단과 'WJE F10(모계)' 와 'WNE F8(부계)'로부터 얻어진 60개의 개체들로 구성된 제 2 집단을 실험에 이용하였다. 또한, 지역적 출처가 상이하고 성 발현 양상이 다양한 55개의 다양한 근교 계통(inbred lines)을 마커의 정확성을 입증하기 위하여 사용하였다(표 2).
- [0106] 모든 식물들은 2013년부터 2015년까지 세종대학교 온실 내 개별 포트에서 재배되었다.
- [0108] 1-2. DNA 추출 및 PCR 수행 방법
- [0109] 게놈 DNA(genomic DNA)는 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 Dellaporta et al. (1983)에 따라 각 식물체의 어린 잎으로부터 분리 및 추출하였다. 모든 DNA를 100 μ l의 멸균 증류수에 재현탁하였고, 1 x TAE 완충제(buffer)와 함께 1% 아가로스겔에서 전기영동 후에 농도를 체크하였으며, SYBR green으로 염색하였다.
- [0111] Gy 계통과 Mo 계통 사이에 삽입/결실 다형성에 근거하여 오이 암꽃 형성 조절 유전자에 대한 한 쌍의 특이적 프라이머를 디자인하여 사용하였고, 두 개의 F₂ 개체와 55개 오이 근교 계통에 대해서 상기 프라이머를 통해 유전

자형 분석 실험을 수행하였다.

[0112] 30.2 Kb 중복의 존재 또는 부존재를 확인하기 위하여 우성 마커 *Cs-ACSIG-pro*(*Cs-ACS1* 유전자 및 *Cs-BCAT* 유전자의 부분 사이에 중복의 중단점에 스페닝하는 마커)를 사용하여 분석을 하였다..

[0113] PCR 반응의 구체적인 조건은 하기와 같다.

[0114] 각 프라이머 5 pmol, DNA 20 ng 및 2x Premix solution Genet Bio[Prime Taq DNA Polymerase 1 unit/10 μ l, Tris-HCl(pH 9.0), PCR enhancer, (NH₄)₂SO₄, 4 mM MgCl₂, enzyme stabilizer, sediment, loading dye, 2.0 mM dNTPs mixture]를 포함하여 20 μ l으로 수행하였다. 증폭은 BIORAD T100™ Thermocycler(Hercules, CA, USA)에서 하기와 같이 수행되었다: 첫 번째 사이클은 94℃에서 3분, 다음은 94℃에서 30초, 54 내지 57℃에서 30초 및 72℃에서 1분 동안 35 사이클, 그리고 최종 사이클은 72℃에서 5분. 증폭된 절편들을 2% 아가로스젤에서 0.5 x TBE 완충제와 함께 전기영동 시킨 후 SYBR green으로 염색하였다.

[0115] 특이적 프라이머 *Cs-BCAT-F/Cs-BCAT-R*의 PCR 반응은 63℃에서 어닐링한 것을 제외하고는 상기와 같고, *Cs-ACSIG-pro*를 이용한 PCR 반응은 각 사이클 동안 2분 연장하고, 어닐링 온도가 57℃ 인 것을 제외하고 상기와 같다.

[시험예 1] 성 발현 평가에 따른 분류

[0118] 각각의 오이 식물체의 성 발현 형태는 6월 초부터 7월 말까지 주경(main stem)의 처음 25마디에서 피는 꽃의 성별을 기록하는 방법으로 평가하였다. 25개 마디 전체에서 암꽃만 발견되는 경우 자성(gynoecious, Gy)계통, 초기 3 ~ 5 마디에서 수꽃이 발생되고, 나머지 마디에서 암꽃이 발견되는 경우 불완전자성(subgynoecious, Sub-Gy) 계통, 암꽃과 수꽃이 교대로 25마디 전체에서 발견되는 경우 자웅동주성(monoecious, Mo) 계통으로 기록하였다.

[0119] 표현형에 따른 성 발현 평가 결과, 두 개의 F₂ 집단의 모계 'WJE F10' 및 'WJE F11'는 100% 암꽃(pistillate flower)를 나타내고, 일반적인 부계 'WNE F8'는 41%의 암꽃을 보여주는 반면에, 이들의 F1 교잡종은 모계와 동일하게 100% 암꽃을 나타냈다.

[0120] 상기 모계와 부계로부터 얻어진 제1 F₂ 집단은 160 개체, 제2 F₂ 집단은 60개체로 구성되었고, 상기와 동일한 방법으로 표현형을 평가하여, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0122]

그룹	개체수	모계 x 부계 (parents)	표현형 (Phenotype)	개체수
제1 F ₂	n =160	WJE F11 x WNE F8	자성(Gy)	119
			자웅동주성(Mo)	41
제2 F ₂	n = 60	WJE F10 x WNE F8	자성(Gy)	36
			자웅동주성(Mo)	24

[0124] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 제1 F₂ 그룹의 경우, 표현형에 따라 119개의 자성주, 41개의 자웅동주로 분류되었고, 제2 F₂ 그룹의 경우, 표현형에 따라 36개의 자성주와 24개의 자웅동주로 분류되었다. F₂ 집단의 표현형을 분석하면 3:1의 분리비($\chi^2 = 0.033$, $P = 0.855$)를 나타내고, 이는 오이에서 암꽃 생성을 조절하는 유전자가 우성 단일 인자라는 기존의 결과와 일치함을 알 수 있다.

표 2

[0126]

계통명	과실 타입 ^a	성표현형 ^b
SJ01	ASL	Mo
SJ02	ASL	Gy
SJ03	BAF	Gy
SJ04	BAF	Gy
SJ05	BAF	Gy
SJ06	BAP	Gy
SJ07	BAP	Gy
SJ08	EUR	Gy
SJ09	EUR	Gy
SJ10	CHS	Mo
SJ11	CHS	Gy
SJ12	CHS	Gy
SJ13	CHS	Mo
SJ14	CHS	Mo
SJ15	CHS	Sub-gy에서 Gy
SJ16	CHS	Mo
SJ17	CHS	Mo
SJ18	CHS	Mo
SJ19	CHS	Mo
SJ20	CHS	Mo
SJ21	CHS	Mo
SJ22	CHS	Sub-gy
SJ23	KCU	Sub-gy
SJ24	KCU	Mo
SJ25	KCU	Mo
SJ26	KCU	Mo
SJ27	KCU	Mo
SJ28	ORN	Mo
SJ29	ORN	Gy
SJ30	ORN	Gy
SJ31	ORN	Gy
SJ32	ORN	Mo
SJ33	ORN	Gy
SJ34	ORN	Mo
SJ35	ORN	Mo
SJ36	ORN	Mo
SJ37	ORN	Mo
SJ38	KSL	Mo
SJ39	KSL	Mo
SJ40	KSL	Mo
SJ41	KSL	Sub-gy에서 Gy
SJ42	KSL	Mo
SJ43	KSL	Sub-gy에서 Gy
SJ44	KSL	Mo
SJ45	KSL	Sub-gy에서 Gy
SJ46	KSL	Mo
SJ47	KSL	Gy
SJ48	KSL	Mo
SJ49	KSL	Mo
SJ50	KSL	Mo
SJ51	KSL	Sub-gy에서 Gy
SJ52	KSL	Mo
SJ53	KSL	Gy
SJ54	KSL	Gy
SJ55	KSL	Sub-gy에서 Gy

^a ASL: American slicer, BAF: Beith alpha open field, BAP: Beith alpha parthenocarpic, EUR: Long Dutch green, CHS: Chinese long green, KCU: Korean solid green, ORN: Oriental slicer, KSL: Korean slicer

^b Mo: 자웅동주성(monoecious, 부계) Gy: 자성(gynoecious, 모계), Sub-gy: 불완전 자성(subgynoecious), Sub-gy에서 Gy: 몇 년 동안 불완전 자성에서 자성으로 변한 개체

[0128] 또한, 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 55개의 근교 계통은 5년 간의 표현형 데이터에 따라, 17개의 자성주, 30개의 자웅동주 및 8개의 불완전 자성주로 분류하였다.

[0130] [시험예 2] 계놈 서열의 확보 및 분석

[0131] 4개의 Gy 계통(TH169, WDSGD, WFEJ 및 WJE F11)과 3개의 Mo 계통(TH118FLM, WMEJ 및 WNE F8)의 어린 잎에서 Genomic DNA를 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 분리하였다. 분리된 gDNA를 부분 절단(partial digest) 시킨 후 ~ 280 bp 사이즈의 단편을 삽입한 gDNA library를 제작하였다. 이들 library를 대상으로 illumina HiSeq 2000으로 pair-end sequencing(280 bp 단편을 양 말단에서 중간 부분으로 100 bp 정도 염기서열을 분석함)을 실시하였다. 시퀀싱(Sequencing) 후 생산된 염기서열은 illumine사의 SCS(sequencing control software)를 이용해서 base calling을 실시하였다. Base calling pipeline을 통해 생산된 염기서열(Raw paired-end reads)은 오이 표준 유전체 정보(Chinese long 육종계통 9930)를 reference로 해서 bowtie 2 소프트웨어를 활용해 reference mapping을 하였고, 오이 7개 염색체에 해당하는 physical map과 염기서열을 확보하여 비교 분석을 하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0132] 도 1에 나타난 바와 같이, Chinese long 근교 계통(inbred line) 9930, Gy14, WJE F11 및 WNE F8의 *Cs-BCAT* 유전자의 3'UTR 영역의 염기서열을 비교 분석한 결과 품종간 보존 염기서열 영역 외에 자성 계통 (Gy14 및 WJE F11)에서 56 bp 결손 영역이 나타나는 것을 확인하였고, 상기 *Cs-BCAT-F* 와 *Cs-BCAT-R* 프라이머 쌍이 *Cs-BCAT* 유전자의 3'UTR 영역에서 결손이 나타나는 영역을 포함하여 3'UTR 영역에 결합 및 증폭하는 것을 확인하였다..

[0134] [시험예 3] Gy 계통 및 Mo 계통 사이에 다형성 확인을 위한 염기서열 분석 및 암꽃 조절 인자에 연관된 공우성 마커(co-dominant marker)의 개발

[0135] 암꽃 조절인자에 의하여 *Cs-ACS1* 유전자의 여분의 카피인 *Cs-ACSIG* 가 인코드 되는데, 이것은 *Cs-ACS1* 와 *Cs-BCAT* 유전자의 재조합 및 유전자 중복에 의한 것으로 보이므로 Mibus and Tatlioglu 2004; Knopf and Trebitsh 2006), Zhang et al. 연구 결과에 의하면, *CS-ACSIG*와 관련된 중복 영역은 30.2 kb 이다.

[0137] 시험예 2에서 확보된 유전체 염기서열 및 종래 공개된 North American 육종 계통 'Gy14'(Gy 계통, <http://www.phytozome.net/cucumber.php#A>), Chinese long 육종 계통 '9930'(Mo 계통, Huang et al. 2009) 및 North-European Borszczagowski 재배종 'B10'(Mo 계통, Woycicki et al. 2011)을 포함해서 총 5개의 Gy 계통 유전체 서열, 5개의 Mo 계통 유전체 서열을 확보하였다. 이들 서열에서 *Cs-ACS1* 과 *Cs-BCAT* 유전자 서열을 포함하는 50 Kb 영역의 서열을 확보하고, 자성주 계통(Gy)과 자웅동주 계통(Mo)에서 발견되는 중복 영역을 중심으로 좌, 우 50kb에 해당하는 부분의 계놈 염기서열을 Genious Pro 7,1.3 서열분석 소프트웨어((Biomatters, Auckland, NZ)를 이용해서 Mo 와 Gy 계통 간의 염기서열 차이를 분석하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0138] 도 1에 나타난 바와 같이, 그 결과 결과는 최소 1bp에서 최대 76bp까지 범위에서 총 71의 삽입/결실 다형성을 나타내었다. 이 중에서 5개의 Gy계통 모두 BCAT 유전자의 3'UTR 영역에서 56 bp의 결실이 공통적으로 발견되었다.

[0139] 부모, F₁ 교잡종 및 F₂ 집단의 다형성 확인하고, 암꽃 형성 조절 유전자와 관련된 연관지도를 구축하기 위하여 상기 56bp 삽입/결실 변이에 대한 특이적 프라이머 한 쌍을 디자인 하였다. 프라이머는 하기 표 3에 나타난 바와 같다.

표 3

Marker	Marker type	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	PCR 산물 크기(bp)
<i>Cs-BCAT</i>	공우성	CATTGTGTGAATGAAGACAAG	CTTCAACGCAAAACCTTCATC	216/160
<i>Cs-ACSIG-pro</i>	우성	TCATCCACTGCCACAAGTCGTT	GATGCCGTTGGGATTAGAAGTC	1678

상기 프라이머 쌍 *Cs-BCAT-F/Cs-BCAT-R*을 이용하여 부모 및 F₁ 교잡종에 대해 다형성을 분석하여, 그 결과를 도 2a에 나타내었다.

상기 도 2a에 나타난 바와 같이, PCR 절편은 부모 사이에 다형성을 보여주는데, 부계(M, 자웅동주)에서는 약 216 bp의 밴드, 모계(G, 자성주)에서는 160bp의 밴드가 나타났고, F₁ 교잡종에서는 216bp와 160 bp의 밴드가 둘 다 나타났다. 이러한 결과는 160 bp 밴드는 동형접합성 우성 유전자형(*FF*)를 나타내고, 216 bp 밴드는 동형접합성 열성 유전자형(*ff*)를 나타내며, 이형접합성(*Ff*)인 경우 상기 두 밴드 모두 나타나는 것을 의미한다.

또한, WJE F11 와 WNE F8로부터 만들어진 제 1 F₂ 집단(*n*=160) 및 WJE F10 와 WNE F8로부터 만들어진 제 2 F₂ 집단(*n* =60)에 대해서 프라이머 쌍 *Cs-BCAT-F/Cs-BCAT-R*를 이용하여 분석을 실시하고, 그 결과를 표 4 및 도 2a에 나타내었다.

표 4

그룹	parents	표현형	개체수			개체수
			160 bp	Two bands	216 bp	
제1 F ₂ (<i>n</i> =160)	WJE F11 x WNE F8	Gy	40	79	0	119
		Mo	0	0	41	41
제2 F ₂ (<i>n</i> = 60)	WJE F10 x WNE F8	Gy	12	24	0	36
		Mo	0	0	24	24

또한, 상기 표 4 및 도 2a에 나타난 바와 같이, 프라이머 쌍 *Cs-BCAT-F/Cs-BCAT-R*를 이용하여, F₂ 집단을 분석한 경우에도 동일한 밴드 패턴이 유지되었다. 제1 F₂ 집단 분석결과 41개의 자웅동주 개체(monoecious individual) 모두 216 bp 밴드를 보였고, 119개의 자성주 개체(gynoecious individual) 중, 40개의 개체만이 160 bp를 나타냈고, 79개 개체는 160 bp와 216 bp 밴드를 모두 나타냈다.

WJE F10과 WNE F8로부터 만들어진 F₂ 집단(*n*=60)에서, 24개의 자웅동주 개체들(monoecious individual)모두 216 bp 밴드를 보인 반면, 였고, 36개의 자성주 개체(gynoecious individual) 중에서 12개의 식물체만 160 bp 밴드를 보였고, 24개 식물체는 160 bp와 216 bp 두 가지 밴드를 모두 나타냈다.

이러한 결과는 *Cs-BCAT-F/Cs-BCAT-R* 프라이머 쌍에 의하여 증폭된 PCR 절편이 암꽃형질(gynoecious) 대립 유전자 및 수꽃형질(monoecious) 대립 유전자에 대한 공우성 분자 마커로 작용하는 암꽃조절 유전자와 유전적으로 매우 가깝다는 것을 의미한다.

[시험예 4] 근교 계통에서 다형성 확인을 위한 염기서열 분석

공우성 마커의 정확성을 더 확인하기 위하여, 다른 기원으로부터 다른 성 표현형을 가지는 55개의 근교 계통에 대하여 시험을 하였다. 그 결과는 하기 표 5 및 도 2b에 나타내었다.

[0156] 하기 표 5에 나타난 바와 같이, 그 들 중 28개 계통(accession)은 160 bp 밴드를 나타내었으나, 5년간의 표현형 데이터에 따르면, 표현형에 따른 암꽃 성질을 나타내는 개체는 17개뿐이었고, 6개 개체는 불완전자성에서 자성으로 변하는 성질을 보였으며, 5개 개체는 수꽃형질의 표현형을 나타냈다.

[0157] 그에 반해, 216 bp 밴드를 나타내는 27개 개체 중에서 25개 개체는 수꽃형질(자웅동주)을 나타냈고, 2개 개체는 불완전자성 표현형을 나타냈다.

표 5

[0159]

계통명	과실 타입 ^a	성표현형 ^b	<i>Cs-BCAT-F/Cs-BCAT-R</i> 증폭 결과물	<i>Cs-ACS1G-pro</i> 증폭 여부 ^c
SJ01*	ASL	Mo	160 bp	-
SJ02	ASL	Gy	160 bp	+
SJ03	BAF	Gy	160 bp	+
SJ04	BAF	Gy	160 bp	+
SJ05	BAF	Gy	160 bp	+
SJ06	BAP	Gy	160 bp	+
SJ07	BAP	Gy	160 bp	+
SJ08	EUR	Gy	160 bp	+
SJ09	EUR	Gy	160 bp	+
SJ10	CHS	Mo	216 bp	-
SJ11	CHS	Gy	160 bp	+
SJ12	CHS	Gy	160 bp	+
SJ13	CHS	Mo	216 bp	-
SJ14	CHS	Mo	216 bp	-
SJ15	CHS	Sub-gy에서 Gy	160 bp	+
SJ16	CHS	Mo	216 bp	-
SJ17	CHS	Mo	216 bp	-
SJ18	CHS	Mo	216 bp	-
SJ19	CHS	Mo	216 bp	-
SJ20	CHS	Mo	216 bp	-
SJ21	CHS	Mo	216 bp	-
SJ22	CHS	Sub-gy	216 bp	-
SJ23	KCU	Sub-gy	216 bp	-
SJ24	KCU	Mo	216 bp	-
SJ25	KCU	Mo	216 bp	-
SJ26	KCU	Mo	216 bp	-
SJ27*	KCU	Mo	160 bp	-
SJ28*	ORN	Mo	160 bp	-
SJ29	ORN	Gy	160 bp	+
SJ30	ORN	Gy	160 bp	+
SJ31	ORN	Gy	160 bp	+
SJ32*	ORN	Mo	160 bp	-
SJ33	ORN	Gy	160 bp	+
SJ34	ORN	Mo	216 bp	-
SJ35	ORN	Mo	216 bp	-
SJ36*	ORN	Mo	160 bp	-
SJ37	ORN	Mo	216 bp	-
SJ38	KSL	Mo	216 bp	-
SJ39	KSL	Mo	216 bp	-
SJ40	KSL	Mo	216 bp	-
SJ41	KSL	Sub-gy에서 Gy	160 bp	+
SJ42	KSL	Mo	216 bp	-
SJ43	KSL	Sub-gy에서 Gy	160 bp	+
SJ44	KSL	Mo	216 bp	-
SJ45	KSL	Sub-gy에서 Gy	160 bp	+

SJ46	KSL	Mo	216 bp	-
SJ47	KSL	Gy	160 bp	+
SJ48	KSL	Mo	216 bp	-
SJ49	KSL	Mo	216 bp	-
SJ50	KSL	Mo	216 bp	-
SJ51	KSL	Sub-gy에서 Gy	160 bp	+
SJ52	KSL	Mo	216 bp	-
SJ53	KSL	Gy	160 bp	+
SJ54	KSL	Gy	160 bp	+
SJ55	KSL	Sub-gy에서 Gy	160 bp	+

^a ASL: American slicer, BAF: Beith alpha open field, BAP: Beith alpha parthenocarpic, EUR: Long Dutch green, CHS: Chinese long green, KCU: Korean solid green, ORN: Oriental slicer, KSL: Korean slicer

^b Mo: 자웅동주성(monoecious, 부계) Gy: 자성(gynoecious, 모계), Sub-gy: 불완전 자성(subgynoecious), Sub-gy에서 Gy: 몇 년 동안 불완전 자성에서 자성으로 변한 개체

^c + 는 *Cs-ACSIG-pro* marker에 의해 증폭 산물이 존재, '-' 는 상기 증폭산물이 존재하지 않음을 의미함.

* 성 표현형과 *Cs-BCAT-F/Cs-BCAT-R*의한 유전형에 차이가 있는 개체를 나타냄.

[0161] 그러므로, 상기 공우성 마커는 90% 의 정확도와 5개 개체에서 공우성 마커의 결과로는 동형접합성 자성주 유전형을 나타냈으나, 표현형으로는 자웅동주(수꽃 형질)을 나타내어 10%의 부정확성을 나타냈다. 따라서 상기 결과를 통해서 이러한 유전자원(Germplasm) 내에서 56 bp의 결실은 암꽃 형성 조절 유전자를 정의하는 30.2 kb 중복 영역의 앞 또는 뒤에서 진화의 과정 동안 발생할 것이라 추측하였다.

[0163] [시험예 4] 30.2 kb 중복의 존재 또는 부존재의 검출

[0164] 은 암꽃 조절인자와 연관된 6번 염색체 상의 *Cs-ACSI*와 *Cs-BCAT* 유전자에서 30.2 kb 중복 서열의 존재 또는 부존재와 동형접합성 자성주(gynoecy) 사이의 관계를 증명하기 위하여, 두 개의 F₂ 분리집단(segregating population)과 추가적인 55개의 오이 계통(accession)을 이용하여 PCR 분석을 하였다. 프라이머는 *Cs-ACSI*과 *Cs-BCAT* 유전자의 일부 사이에 중복(duplication)의 정지지점을 스패닝 하는 *Cs-ACSIG-pro*를 사용하였다. 상기 PCR 분석의 결과를 도 3, 상기 표 5 및 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0165]

Population	Phenotype	Number of individuals		Total
		^a +	-	
제 1 F ₂ (n =160)	Gynoecious	119	0	119
	Monoecious	0	41	41
제 2 F ₂ (n =60)	Gynoecious	36	0	36
	Monoecious	0	24	24

+ 는 *Cs-ACSIG-pro* marker에 의해 증폭 산물이 존재, '-'는 상기 증폭산물이 존재하지 않음을 의미함.

[0167] 도 3 및 표 6에 나타낸 바와 같이, F₂ 개체(n = 160) 중에서, 160개 개체 모두 성 표현형과 중복의 존/부 사이에서 일관적인 결과를 보였다. 다른 F₂ 개체(n = 60)에 있어서도, 모든 개체에서 성 표현형과 중복과의 관계는 완벽하게 일치하였다.

[0168] 또한, 상기 도 5에 나타낸 바와 같이, 55개의 오이 계통(accession)에 있어서도 자성 및 자웅동주성 표현형과 중복의 존재 또는 부존재가 완벽하게 일치하였다.

[0169] 그러나 표 5에 나타난 바와 같이, 6개 계통(SJ15, SJ41, SJ43, SJ45, SJ51 및 SJ55)에서 몇 년간 불완전자성 표현형을 보였으므로, 불완전자성에서 자성 표현형으로 넘어가는 것으로 표시하였다(SubCy 에서 Gy). 두 개의 계통(SJ22와 SJ23)은 불완전 자성 표현형을 나타내었지만, 중복은 있거나 존재하지 않았다. 이러한 결과는 표현형과 중복의 존재 또는 부존재를 검출할 수 있는 *Cs-ACSIG-pro* 마커가 암꽃 형성 조절 유전자와 유전적으로나 물리적으로 매우 가까운 위치에 존재(co-segregate)한다는 것을 의미한다.

[0171] [시험예 5] 암꽃 형성 유전자특이적 우성 및 공우성 마커의 비교

[0172] 두 개의 F₂ 집단과 55개 다양한 오이 계통(accession)에 대해서 30.2 kb 중복과 암꽃 형성 유전자 특이적 공우성 마커에서 삽입/결실 다형성(polymorphism) 사이의 연관을 확인하는 실험을 실시하였다. 그 결과를 표 5 및 표 7에 나타내었다.

표 7

[0174]

Population	Marker	<i>Cs-BCAT</i> 에서 분리(segregation)						총개체수
		GG ^a		GM		MM		
		+ ^b	-	+	-	+	-	
F ₂ (n = 160)	<i>Cs-ACSIG-pro</i>	40	0	79	0	0	41	160
F ₂ (n = 60)	<i>Cs-ACSIG-pro</i>	12	0	24	0	0	24	60
^a GG, GM 및 MM는 각각 <i>Cs-BCAT</i> 에서 동형접합성 자성 DNA, 이형접합성 자성 DNA 및 동형접합성 자용동주성 DNA를 나타낸다.								
^b + 및 - 는 각각 <i>Cs-ACSIG-pro</i> 마커에 의한 중복 DNA 밴드의 존(+)/부(-)를 나타낸다.								

[0176] 상기 표 7에 나타난 바와 같이, 두 개의 F₂ 집 집단에서 공우성 마커 *Cs-BCAT*는 중복 영역의 존부를 검출하는 *Cs-ACSIG-pro*와 유전적으로나 물리적으로 완전히 연관되어 있었다; 중복의 존재는 동형접합성 또는 이형접합성 자성에 해당하고, 중복 영역이 없는 것은 공우성 마커에서 동형접합성 자용동주성과 대응하였다.

[0177] 반면에, 표 5에 나타난 바와 같이, 55개의 오이 계통(accession) 중에서 50개의 개체에서만 공우성 마커와 *Cs-ACSIG-pro* 사이에 연관성이 존재하였고, 5개 개체는 공우성 마커에 의하는 경우 동형접합성 자성 유전형(homozygous gynoeceious genotype)을 나타냈으나, 중복이 발생하지 않았다.

[0178] 이러한 결과는 일부 계통(accession)에서 공우성 마커 유전형과 성 표현형 사이에 불일치를 보이기는 하였으나, 암꽃 형성 유전자 특이적 공우성 마커는 성 표현형(sexual phenotype)과 유전적으로 물리적으로 가깝게 연관되어 있다는 것을 보여준다. 특히, *Cs-ACSIG-pro* 마커가 유전자원 계통(germplasm accessions)과 F₂ 집단 모두에서 성 표현형과 가깝게 연관(co-segrate)되어 있음에도 불구하고, *Cs-ACSIG-pro* 마커는 오직 자용동주 개체와 자성 계통의 구분만 할 수 있고, F₂ 분리집단에서 동형접합성 자성과 이형접합성 자성을 구분할 수 없으나, 본 발명에 따른 *Cs-BCAT* 마커는 F₂ 분리집단에서 동형접합성 자성 계통인지 이형접합성 자성 계통인지 성공적으로 구분할 수 있고, 따라서 이는 오이 육종 프로그램에서 선발 마커로 사용될 수 있다.

도면

도면1

```

WFEJ      : TATTTTAAATACATTGTGTGAATGAAGACAAGAAAATAAGTACTTAACAAAAAGATTGA
WJEF11    : TATTTTAAATACATTGTGTGAATGAAGACAAGAAAATAAGTACTTAACAAAAAGATTGA
Gy14      : TATTTTAAATACATTGTGTGAATGAAGACAAGAAAATAAGTACTTAACAAAAAGATTGA
WDSGD     : TATTTTAAATACATTGTGTGAATGAAGACAAGAAAATAAGTACTTAACAAAAAGATTGA
TH169     : TATTTTAAATACATTGTGTGAATGAAGACAAGAAAATAAGTACTTAACAAAAAGATTGA
9930      : TATTTTAAATACATTGTGTGAATGAAGACAAGAAAATAAGTACTTAACAAAAAGATTGA
TH118FLM : TATTTTAAATACATTGTGTGAATGAAGACAAGAAAATAAGTACTTAACAAAAAGATTGA
WMEJ      : TATTTTAAATACATTGTGTGAATGAAGACAAGAAAATAAGTACTTAACAAAAAGATTGA
WNEF8     : TATTTTAAATACATTGTGTGAATGAAGACAAGAAAATAAGTACTTAACAAAAAGATTGA
B10       : TATTTTAAATACATTGTGTGAATGAAGACAAGAAAATAAGTACTTAACAAAAAGATTGA
*****

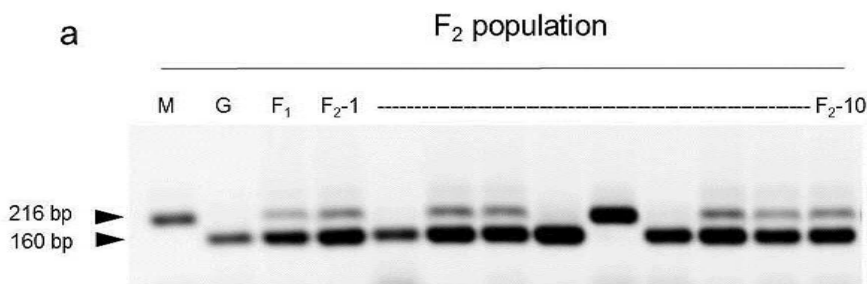
WFEJ      : AATTAAGATGTAATA-----
WJEF11    : AATTAAGATGTAATA-----
Gy14      : AATTAAGATGTAATA-----
WDSGD     : AATTAAGATGTAATA-----
TH169     : AATTAAGATGTAATA-----
9930      : AATTAAGATGTAATA--TTGAAATCGAAACAGAAAAATAAATGTTAATAGTAAATTTTAA
TH118FLM : AATTAAGATGTAATA--TTGAAATCGAAACAGAAAAATAAATGTTAATAGTAAATTTTAA
WMEJ      : AATTAAGATGTAATA--GAAATCGAAACAGAAAAATAAATGTTAATAGTAAATTTTAA
WNEF8     : AATTAAGATGTAATA--GAAATCGAAACAGAAAAATAAATGTTAATAGTAAATTTTAA
B10       : AATTAAGATGTAATA--TTGAAATCGAAACAGAAAAATAAATGTTAATAGTAAATTT-AA
*****

WFEJ      : -----GAAACTGAATTAAAAATTAACCTTAAAAATTTTAAAAAGTCGTGAATT
WJEF11    : -----GAAACTGAATTAAAAATTAACCTTAAAAATTTTAAAAAGTCGTGAATT
Gy14      : -----GAAACTGAATTAAAAATTAACCTTAAAAATTTTAAAAAGTCGTGAATT
WDSGD     : -----GAAACTGAATTAAAAATTAACCTTAAAAATTTTAAAAAGTCGTGAATT
TH169     : -----GAAACTGAATTAAAAATTAACCTTAAAAATTTTAAAAAGTCGTGAATT
9930      : TATTTTAAACCTAA--GAAACTGAATTAAAAATTAACCTTAAAAATTTTAAAAAGTCGTGAATT
TH118FLM : TATTTTAAACCTAA--GAAACTGAATTAAAAATTAACCTTAAAAATTTTAAAAAGTCGTGAATT
WMEJ      : TATTTTAAACCTAA--GAAACTGAATTAAAAATTAACCTTAAAAATTTTAAAAAGTCGTGAATT
WNEF8     : TATTTTAAACCTAA--GAAACTGAATTAAAAATTAACCTTAAAAATTTTAAAAAGTCGTGAATT
B10       : TATTTTAAACCTAA--GAAACTGAATTAAAAATTAACCTTAAAAATTTTAAAAAGTCGTGAATT
*****

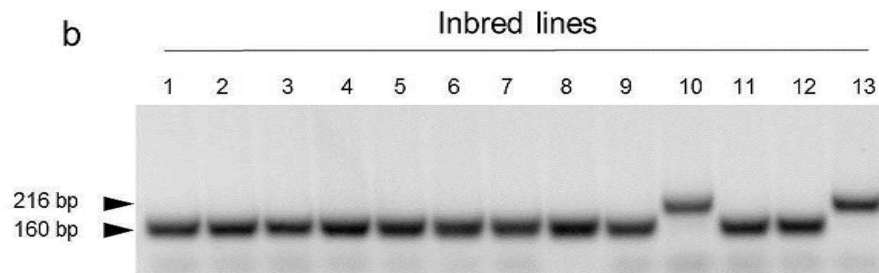
WFEJ      : AAATAGAACTAGATTCAAAATTAATAAGATGAAGGTTTTCGCTTGAAGTATAATTTTTT
WJEF11    : AAATAGAACTAGATTCAAAATTAATAAGATGAAGGTTTTCGCTTGAAGTATAATTTTTT
Gy14      : AAATAGAACTAGATTCAAAATTAATAAGATGAAGGTTTTCGCTTGAAGTATAATTTTTT
WDSGD     : AAATAGAACTAGATTCAAAATTAATAAGATGAAGGTTTTCGCTTGAAGTATAATTTTTT
TH169     : AAATAGAACTAGATTCAAAATTAATAAGATGAAGGTTTTCGCTTGAAGTATAATTTTTT
9930      : AAATAGAACTAGATTCAAAATTAATAAGATGAAGGTTTTCGCTTGAAGTATAATTTTTT
TH118FLM : AAATAGAACTAGATTCAAAATTAATAAGATGAAGGTTTTCGCTTGAAGTATAATTTTTT
WMEJ      : AAATAGAACTAGATTCAAAATTAATAAGATGAAGGTTTTCGCTTGAAGTATAATTTTTT
WNEF8     : AAATAGAACTAGATTCAAAATTAATAAGATGAAGGTTTTCGCTTGAAGTATAATTTTTT
B10       : AAATAGAACTAGATTCAAAATTAATAAGATGAAGGTTTTCGCTTGAAGTATAATTTTTT
*****

```

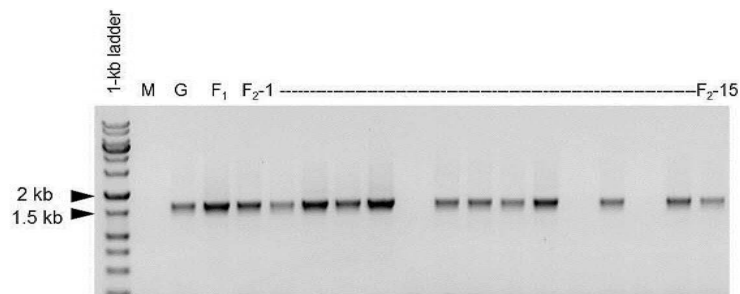
도면2a



도면2b



도면3



도면4

56bp - BCAT gene 결실부위 염기서열

GAAATCGAAACAGAAAAATAAATGTTAATAGTAAATTT
TTAATATTTTAAAACCTA

서열 목록

- <110> INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION OF SEJONG UNIVERSITY
- <120> COMPOSITION FOR IDENTIFYING CUCUMBER GENOTYPE AND METHOD USING THESAME
- <130> DP-2015-052_P15U10C0343
- <160> 14
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 240
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Cucumis sativus L.
- <400> 1

tatttttaat acattgtgtg aatgaagaca agaaaataag tacttaacaa aaaagattga

60

aattaagatg taaatannnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	120
nnnnnnnnnn nnnnnnaaact gaattaaaat taaacttnaa aattttaaaa gtngtgaatt	180
aaatagaaac tagattcana attaaaaaga tgaaggtttt gcgttgaagt ataatttttt	240
	240
<210> 2	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Cucumis sativus L.	
<400> 2	
gaaatcgaaa cagaaaaata aatgttaata gttaaatttt aatatittta aaccta	56
<210> 3	
<211> 182	
<212> DNA	
<213> Cucumis sativus L.	
<400>	
> 3	
tatttttaac acattgtgtg aatgaagaca agaaaataag tacttaacaa aaaagattga	60
aattaagatg taaatagaaa ctgaattaaa attaaactta aaaattttta aagtcgtgaa	120
ttaaatagaa actagattca aaattaaaaa gatgaaggtt ttgcgttgaa gtataatttt	180
tt	182
<210> 4	
<211> 182	
<212> DNA	
<213> Cucumis sativus L.	
<400> 4	
tatttttaac acattgtgtg aatgaagaca agaaaataag tacttaacaa aaaagattga	60
aattaagatg taaatagaaa ctgaattaaa attaaactta aaaattttta aagtcgtgaa	120
ttaaatagaa actagattca aaattaaaaa gatgaaggtt ttgcgttgaa gtataatttt	180
tt	182
<210> 5	
<211> 182	
<212> DNA	

<213> Cucumis sativus L.
 <400> 5
 tatttttaac acattgtgtg aatgaagaca agaaaataag tacttaacaa aaaagattga 60
 aattaagatg taaatagaaa ctgaattaaa attaaactta aaaattttta aagtcgtgaa 120
 ttaaataagaa actagattca aaattaaaaa gatgaagggtt ttgcgttgaa gtataatttt 180
 tt 182

<210> 6
 <211> 182
 <212> DNA
 <213> Cucumis sativus L.
 <400> 6
 tatttttaac acattgtgtg aatgaagaca agaaaataag tacttaacaa aaaagattga 60
 aattaagatg taaatagaaa ctgaattaaa attaaactta aaaattttta aagtcgtgaa 120
 ttaaataagaa actagattca aaattaaaaa gatgaagggtt ttgcgttgaa gtataatttt 180
 tt 182

<210> 7
 <211> 182
 <212> DNA
 <213> Cucumis sativus L.
 <400> 7
 tatttttaac acattgtgtg aatgaagaca agaaaataag tacttaacaa aaaagattga 60
 aattaagatg taaatagaaa ctgaattaaa attaaactta aaaattttta aagtcgtgaa 120
 ttaaataagaa actagattca aaattaaaaa gatgaagggtt ttgcgttgaa gtataatttt 180
 tt 182

<210> 8
 <211> 240
 <212> DNA
 <213> Cucumis sativus L.
 <400> 8
 tatttttaac acattgtgtg aatgaagaca agaaaataag tacttaacaa aaaagattga 60
 aattaagatg taaatattga aatcgaaaca gaaaaataaa tgttaatagt aaatttttaa 120
 tatttttaaaa cctaaaaact gaattaaaat taaacttaaa aatttttaaaa gtcgtgaatt 180

aaatagaaac tagattcaaa attaaaaaga tgaaggtttt gcgttgaagt ataatttttt 240

240

<210> 9

<211> 240

<212> DNA

<213> Cucumis sativus L.

<400> 9

tatttttaac acattgtgtg aatgaagaca agaaaataag tacttaacaa aaaagattga 60

aattaagatg taaatattga aatcgaaaca gaaaaataaa tgttaatagt aaatttttaa 120

tattttaaaa cctaaaaact gaattaaaat taaacttaaa aattttaaaa gtcgtgaatt 180

aaatagaaac tagattcaaa attaaaaaga tgaaggtttt gcgttgaagt ataatttttt 240

240

<210> 10

<211> 238

<212> DNA

<213> Cucumis sativus L.

<400> 10

tatttttaac acattgtgtg aatgaagaca agaaaataag tacttaacaa aaaagattga 60

aattaagatg taaatagaaa tcgaaacaga aaaataaatg ttaatagtaa atttttaata 120

tttttaaaacc taaaaactga attaaaatta aacttgaaaa ttttaaaagt ggtgaattaa 180

atagaaacta gattcaaaat taaaaagatg aaggttttgc gttgaagtat aatttttt 238

<210> 11

<211> 238

<

212> DNA

<213> Cucumis sativus L.

<400> 11

tatttttaac acattgtgtg aatgaagaca agaaaataag tacttaacaa aaaagattga 60

aattaagatg taaatagaaa tcgaaacaga aaaataaatg ttaatagtaa atttttaata 120

tttttaaaacc taaaaactga attaaaatta aacttgaaaa ttttaaaagt ggtgaattaa 180

atagaaacta gattcacaat taaaaagatg aaggttttgc gttgaagtat aatttttt 238

<210> 12

<211> 239

<212> DNA

<213> Cucumis sativus L.

<400> 12

tatttttaat acattgtgtg aatgaagaca agaaaataag tacttaacaa aaaagattga 60

aattaagatg taaatattga aatcgaaaca gaaaaataaa tgttaatagt aaattttaat 120

attttaaaac ctaaaaactg aattaaaatt aaacttaaaa attttaaaag tcgtgaatta 180

aatagaaact agattcaaaa ttaaaaagat gaaggttttg cgttgaagta taatttttt 239

<210> 13

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

cattgtgtga atgaa 15

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

cttcaacgca aaaccttca 19