



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0116646
(43) 공개일자 2022년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2600/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0019729

(22) 출원일자 2021년02월15일
심사청구일자 2021년02월15일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

허윤강

충청북도 영동군 용화면 여의로 342

안주영

대전광역시 유성구 궁동로2번길 55, 309호(궁동, 마이홈)

(74) 대리인

최규환

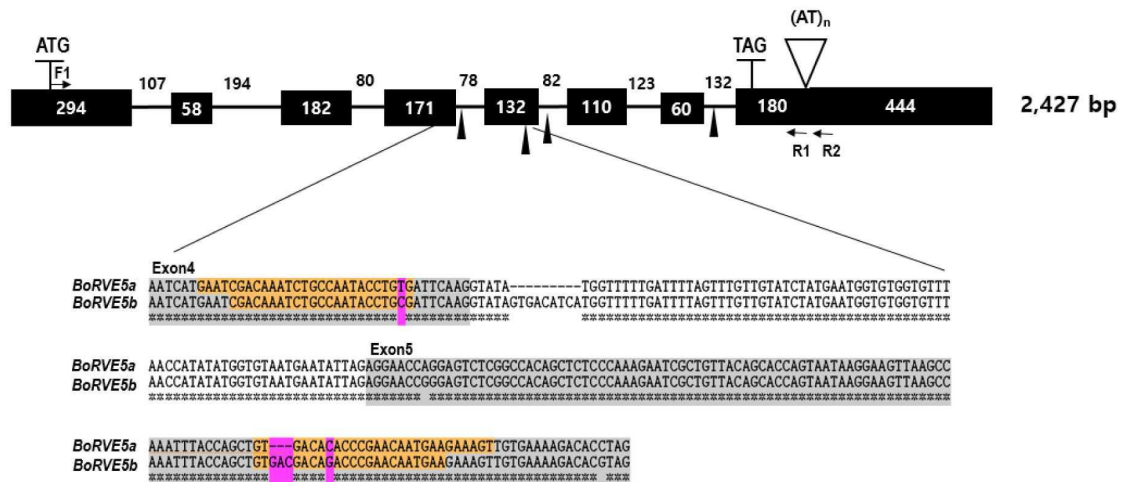
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 저온에서 안토시아닌 축적을 판별할 수 있는 양배추 유래 RVE5 유전자 기반 분자마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 저온에서 안토시아닌 축적을 판별할 수 있는 양배추 유래 RVE5 유전자 기반 분자마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 분자마커는 안토시아닌의 축적이 주로 일어나는 저온기에서도 안토시아닌의 축적 수준이 낮은 양배추와 안토시아닌 축적 수준이 높은 양배추 계통을 정확하게 판별할 수 있으므로, 저온기에서 양배추를 재배 및 수확하여도 안토시아닌 축적이 낮은 양배추를 육종하는데 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감할 수 있으며, 재배 농가 및 소비자에게도 고품질의 양배추 생산 및 공급을 가능하게 할 것으로 기대된다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545023765
과제번호	213007055SB620
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	GSP(Golden Seed Project)
연구과제명	양배추 엽색, 숙기 및 종/아종 구분 관련 분자마커 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5a* 유전자 단편; 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5b* 유전자 단편;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 단편을 유효성분으로 포함하는, 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하기 위한 마커 조성물.

청구항 2

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5a* 유전자 단편 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5b* 유전자 단편을 증폭하기 위한, 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하기 위한 프라이머 세트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 20 및 21의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 또는 서열번호 22 및 23의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트;인 것을 특징으로 하는 프라이머 세트.

청구항 4

제2항 또는 제3항의 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하기 위한 키트.

청구항 5

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

청구항 6

양배추 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제2항 또는 제3항의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하는 방법.

청구항 7

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 저온에서 안토시아닌 축적을 판별할 수 있는 양배추 유래 *RVE5* 유전자 기반 분자마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물의 색소(pigment)는 광합성에 관여하는 엽록소를 제외하고 3가지 계통(안토시아닌, 카로테노이드, 베타라인)이 존재하며 이 색소들이 수분을 위한 동물유인 및 종자 분산 등을 담당하며, 자외선이나 강한 가시광선에 의한 식물의 손상을 막아준다. 안토시아닌(anthocyanin)은 플라보노이드(flavonoid) 계통의 수용성 색소로

식물의 잎, 꽃 및 과실의 푸른색, 자주색 및 붉은색을 결정하며, 식물의 생장과 발달에도 중요한 역할을 한다. 안토시아닌은 꽃잎에서 곤충 등 화분매개자를 유혹하고, 열매 및 씨앗에서 종자의 분산을 도와 생태적 분포를 마련한다. 안토시아닌을 포함한 플라보노이드 화합물은 곤충 및 외부 스트레스에 대한 식물의 손상을 보호하는 기능을 하고(즉 생물학적 및 비생물학적 스트레스 저항성 부여), 특히 활성산소 등에 의한 손상을 막기 위해 항산화제로서의 기능을 한다. 안토시아닌은 사람에게도 항산화제로 작용하여 세포사멸을 감소시키고, 심혈관 질병, 암, 당뇨, 신경퇴화, 염증, 바이러스 감염 및 비만을 예방할 수 있어, 건강식품으로 각광을 받고 있다. 대사체공학을 통한 과실과 야채의 안토시아닌 함량의 질적 양적 증가는 중요하고 산업적 가치가 있는 연구방향이다.

[0003] 식물에서 안토시아닌의 축적은 합성과 분해에 의해 조절되고, 그 과정은 유전적 요인, 발달 및 환경요인에 의해 조절된다. 일반적으로 안토시아닌 축적은 안토시아닌 생합성 유전자 및 이를 조절하는 전사 인자의 발현 증가에 의해 일어나며, 관련 유전자의 돌연변이에 의해서도 안토시아닌 축적이 야기된다. 양배추의 *BoMYB2* 프로모터 변이에 의해 발현이 촉진되어 자색 콜리플라워(*Brassica oleracea* var. *botrytis*)가 만들어지고, 전사 억제자(transcription repressor)인 *BoMYBL2-1* 유전자의 발현이 결핍되어 자색 양배추가 만들어지기도 한다. 최근에는 안토시아닌 생합성 요소가 아닌 다른 유전자가 식물의 안토시아닌 축적과 관련이 있음이 밝혀지고 있다. *LBD37/LBD39*(LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 37-39) 유전자가 안토시아닌 합성 및 질소 반응과 관련이 있고, 생체 리듬과 관련이 있는 *RVE8/LCL5*(REVEILLE8/LHY/CCA1-LIKE5) 유전자가 안토시아닌 축적과 관련이 있으며, *LBD37L*(LBD transcription factors 37-like) 유전자도 양배추의 안토시아닌 축적과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

[0004] *RVE/LCL* 유전자는 생체시계를 조절하는 새로운 MYB 전사인자를 암호화한다. 최초로 발견된 유전자는 *EPRI*(EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE 1)/*RVE7*로 *CCA1*(CIRCAIDAN CLOCK ASSOCIATE 1)과 *LHY*(LATE ELONGATED HYPOCOTY)가 아주 유사하였으며, *CIRI*(CIRCADIAN 1)/*REV2* 유전자도 밝혀졌다. 현재 모델 식물인 애기장대에는 8개의 *RVE/LCL* 유전자가 있으며, 이들은 2개의 그룹으로 나뉜다. 하나의 그룹은 *RVE1*, *RVE2/CIR1*, *RVE7/EPRI*를 포함하고, 다른 그룹은 *RVE3/LCL3*, *RVE5/LCL4*, *RVE8/LCL5*, *RVE4/LCL1*, *RVE6/LCL2*를 포함한다. 이 중에 *RVE8*의 기능이 잘 알려져 있는데, *RVE8*은 Histone 3 acetylation의 조절과 안토시아닌 합성의 조절과 관련이 있다. *RVE8*와 이와 유사한 *RVE4* 및 *RVE6*는 생체시계의 조절을 촉진하지만, 다른 *RVE*는 생체시계와의 관련이 낮은 것으로 보고되고 있다. 안토시아닌 생합성 과정에서 *RVE8*은 안토시아닌 합성 억제자인 phytochrome-interacting factors PIF4와 PIF를 조절한다. 또한, *RVE8*은 안토시아닌 생합성 관련 유전자인 *CHS*(chalcone synthase), *ANS*(anthocyanidin synthase) 및 *UGT79B1*(UDP-sugar-dependent glycosyltransferase 79B1)의 프로모터에 결합하여 안토시아닌 합성을 촉진하는 반면, *RVE8*에 *LNKs*(NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED GENS)가 결합하면 안토시아닌 합성이 억제된다. 또한, 최근에는 적배(*Pyrus bretschneideri*)의 *RVE1*과 *RVE7*이 *PbDFR*과 *PbANS*의 프로모터에 결합하여 안토시아닌 합성을 촉진시킬 수 있음이 알려져 있으나, *RVE5*가 안토시아닌 합성과 관련이 있음을 보고한 연구는 없다.

[0005] 본 발명자는 안토시아닌의 긍정적인 효과에도 불구하고, 양배추(특히 녹색양배추) 육종에서는 수확기에 잎에 안토시아닌이 축적되지 않는 품종이 중국을 비롯한 아시아 주요 국가에서 선호되고 있어서, 이를 판단할 수 있는 마커를 개발하고자 하였다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1680571호에 '저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 품종 판별용 SNP 마커 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1724372호에 '프로고이트린 저함량 양배추 선별용 SNP 마커 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 저온에서 안토시아닌 축적을 판별할 수 있는 양배추 유래 *RVE5* 유전자 기반 분자마커 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 저온에서 안토시아닌 축적 수준이 낮은 녹색 양배추(LAA, low anthocyanin accumulators), 안토시아닌 축적 수준이 높은 녹색 양배추(HAA, high anthocyanin accumulators) 및 자색 양배추의 계통에서 안토시아닌 축적과 관련된 *BoRVE5*(*Brassica oleracea* REVEILLE5) 유전자를 클로닝하여 분석한 결과, LAA 타입의 녹색 양배추에 존재하는 *BoRVE5a* 타입과 HAA 타입의 녹색 양배추 및 자색 양배추에 존재하는 *BoRVE5b* 타입 서열 간에 다양한 SNP 및 InDel 다형성이 존재함을 확인하였다. 또한, LAA 타입의 녹색 양배추는 *BoRVE5a* 유전자를 동형으로 가지고 있으며, HAA 타입의 녹색 양배추는

BoRVE5b 유전자를 동형으로 가지고 있거나 이형으로 가지고 있으며, 자색 양배추는 *BoRVE5b* 유전자를 동형으로 가지고 있음을 확인하였다. 또한, 상기 *BoRVE5a* 및 *BoRVE5b* 대립유전자 간의 다양한 SNP 및 InDel 중에서 아미노산 암호화에 영향을 주는 SNP 및 InDel 부위가 위치하는 유전자 일부 영역을 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 개발한 후, 상기 개발된 프라이머 세트를 이용하여 LAA 및 HAA 타입의 녹색 양배추와 적색 양배추를 대상으로 PCR을 수행한 결과, 본 발명의 프라이머 세트가 저온에서 안토시아닌 축적 수준이 높은 양배추와 안토시아닌 축적 수준이 낮은 양배추를 판별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoRVE5a* 유전자 단편; 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoRVE5b* 유전자 단편;으로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 단편을 유효성분으로 포함하는, 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하기 위한 마커 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoRVE5a* 유전자 단편 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoRVE5b* 유전자 단편을 증폭하기 위한, 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하기 위한 키트를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 양배추 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명의 분자마커는 안토시아닌의 축적이 주로 일어나는 저온에서 안토시아닌의 축적 수준이 낮은 양배추와 안토시아닌 축적 수준이 높은 양배추 계통을 정확하게 판별할 수 있으므로, 저온기에서 양배추를 재배 및 수확 하여도 안토시아닌 축적이 낮은 양배추를 육종하는데 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감할 수 있으며, 재배 농가 및 소비자에게도 고품질의 양배추 생산 및 공급을 가능하게 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 양배추 10계통(표 1)의 게놈 서열에서 AT-SSR(simple sequence repeat)이 존재하는 *BoRVE5* 3'-UTR 서열을 나타낸 도면이다. 노란색은 AT-SSR 영역을 나타내고, 녹색과 보라색은 AT-SSR 근처에서 발견된 SNP를 나타낸다.
- 도 2 내지 도 4는 양배추 10계통(표 1)의 *RVE5* 게놈 서열을 비교하여 나타낸 것으로, 엑손 영역은 회색으로 표시하였고, LAA 타입의 녹색 양배추에 존재하는 *BoRVE5a* 유전자 증폭용 프라이머 세트와 HAA 타입의 녹색 양배추와 자색 양배추에 존재하는 *BoRVE5b* 유전자 증폭용 프라이머 세트는 주황색으로 표시하였다.
- 도 5는 LAA 타입의 양배추에 존재하는 *BoRVE5a* 유전자 서열과 HAA 타입의 양배추에 존재하는 *BoRVE5b* 유전자 서열을 비교하여 LAA 타입 또는 HAA 타입을 구별할 수 있는 마커 위치를 나타낸 그림이다. 주황색: *BoRVE5a* 및 *BoRVE5b* 유전자 서열 간의 SNP 또는 InDel 부위를 증폭하기 위한 프라이머 세트 위치, 보라색: SNP 와 InDel (또는 GAC SSR) 위치.
- 도 6은 양배추 10계통(표 1)의 *BoRVE5* 염기서열(A)과 *BoRVE5* 아미노산 서열(B)을 이용한 계통수 분석 결과이다.
- 도 7A는 양배추 유래 *BoRVE*의 아미노산 서열과 애기장대 유래 *AtRVE*의 아미노산 서열을 이용한 계통수 분석 결과이고, 도 7B는 LAA 타입 양배추의 *BoRVE5a* 아미노산 서열과 HAA 타입 양배추의 *BoRVE5b* 아미노산 서열을 비교하여 나타낸 그림이다. 빨간색: *BoRVE5a*와 *BoRVE5b* 간의 아미노산 차이 표시. *: MYB 도메인에서 주요 아미노산 잔기 표시, *AtRVE1*(AT5G17300), *AtRVE4*(AT5G02840), *AtRVE5*(AT4G01280), *AtRVE8*(AT3G09600), *BoRVE1*(Bo3g012470), *BoRVE2*(Bo6g057640), *BoRVE3*(Bo5g002430), *BoRVE4*(Bo3g002070), *BoRVE5*(Bo9g003580), *BoRVE6*(Bo9g108370), *BoRVE7*(Bo5g025310), *BoRVE8*(Bo1g144410).
- 도 8은 정상 생장 온도(20~30℃) 또는 저온(1개월 이상 최저온도가 2~10℃)에서 배양된 LAA 타입(842, 2409, 2437, 09WH45, Golden Cross, Speed King) 또는 HAA 타입(154, 337, CT154, T-523, T-530)의 녹색 양배추와 자

색 양배추(7S4-51, 7S4-63)의 안토시아닌 함량을 측정하여 나타낸 결과이다.

도 9는 저온 처리된 LAA 타입(2409, Golden Cross) 또는 HAA 타입(T-523, T-530)의 녹색 양배추와 자색 양배추(7S4-51, 7S4-63)에서 *BoRVE5a* 및 *BoRVE5b* 유전자와 안토시아닌 합성 관련 유전자(*BoCHS*, *BoF3H*, *BoDFR*)의 발현 수준을 확인한 결과이다. *CHS*: chalcone synthase, *F3H*: flavanone 3-hydroxylase, *DFR*: dihydroflavonol 4-reductase.

도 10은 아침(6 AM), 낮(2 PM) 또는 밤(10 PM) 시간대에 LAA 타입의 녹색 양배추(842)와 HAA 타입의 녹색 양배추(337)에서 *BoRVE5a* 및 *BoRVE5b* 유전자와 안토시아닌 합성 관련 유전자(*BoCHS*, *BoF3H*, *BoDFR*)의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 11 및 도 12는 *BoRVE5a* 및 *BoRVE5b* 유전자 서열 간의 SNP 또는 InDel 부위를 증폭시키기 위한 프라이머 세트(표 5)를 이용하여 LAA 타입 또는 HAA 타입의 녹색 양배추와 자색 양배추를 대상으로 PCR을 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5a* 유전자 단편; 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5b* 유전자 단편;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 단편을 유효성분으로 포함하는, 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하기 위한 마커 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 마커 조성물에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5a* 유전자 단편 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5b* 유전자 단편은, 저온에서 안토시아닌 축적 수준이 낮은 녹색 양배추(LAA 타입, low anthocyanin accumulator) 계통과 안토시아닌 축적 수준이 높은 녹색 양배추(HAA 타입, high anthocyanin accumulator) 계통 및 자색 양배추 계통을 염기서열을 비교하여, 각 계통 간의 *RVE5*(*REVEILLE5*) 유전자 내 엑손 4번 및 5번에 존재하는 SNP(single nucleotide polymorphism) 또는 InDel(insertion and deletion) 다형성을 포함하고 있는 유전자 단편을 말한다.
- [0016] 구체적으로, 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자 단편은 저온에서 안토시아닌 축적 수준이 낮은 양배추 계통의 *RVE5* 유전자 내 엑손 4번 및 5번에 존재하는 SNP(single nucleotide polymorphism) 또는 InDel(insertion and deletion) 다형성을 포함하고 있는 *BoREV5a* 유전자 단편으로(도 5 참고), 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 *BoREV5a* 유전자 단편을 포함하는 마커 조성물을 이용하면 저온에서 안토시아닌 축적 수준이 낮은 양배추 계통을 판별할 수 있다.
- [0017] 또한, 상기 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 유전자 단편은 저온에서 안토시아닌 축적 수준이 높은 양배추 계통과 자색 양배추의 *RVE5* 유전자 내 엑손 4번 및 5번에 존재하는 SNP 또는 InDel 다형성을 포함하고 있는 *BoREV5b* 유전자 단편으로(도 5 참고), 상기 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 *BoREV5b* 유전자 단편을 포함하는 마커 조성물을 이용하면 저온에서 안토시아닌 축적 수준이 높은 양배추 계통을 판별할 수 있다.
- [0018] 상기 유전자 단편은 RNA, DNA 및 cDNA를 모두 포함하며, 바람직하게는 DNA를 말한다.
- [0019] 본 발명의 마커 조성물에 있어서, 상기 저온은 1개월 이상 최저온도가 2~10℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 마커 조성물에 있어서, 상기 저온에서 안토시아닌 축적 수준이 낮은 양배추는 약 2~12 mg/100g FW 함량의 안토시아닌을 포함하는 것일 수 있고, 저온에서 안토시아닌 축적 수준이 높은 양배추는 약 18~78 mg/100g FW 함량의 안토시아닌을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한되지 않으며, 저온 조건에서 식물체 내 안토시아닌 함량이 증가하는 점으로 보아(Photochemistry and Photobiology, 199, 70(1), 1-9), 저온 처리 후 양배추 내 안토시아닌 함량이 저온 처리하기 전과 비슷하거나 상대적으로 적으면 안토시아닌 저함량 양배추, 저온 처리 후 양배추 내 안토시아닌 함량이 저온 처리 전보다 상대적으로 많으면 안토시아닌 고함량 양배추로 정하는 것이 바람직하다.
- [0021] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5a* 유전자 단편 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5b* 유전자 단편을 증폭하기 위한, 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 프라이머 세트에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5a* 유전자 단편을 증폭하기 위한 프라이머 세트는 서열번호 20 및 21의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세

트이고, 상기 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 양배추 유래 *BoREV5b* 유전자 단편을 증폭하기 위한 프라이머 세트는 서열번호 22 및 23의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0023] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라 서열번호 20 내지 23의 서열 내의 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 20의 프라이머(27개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 20의 서열 내의 24개 이상, 25개 이상, 26개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 20 내지 서열번호 23의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다. 상기 서열번호 중 짝수 번호의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 정방향 프라이머이며, 홀수 번호의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 역방향 프라이머이다.
- [0024] 본 발명에 따른 서열번호 20 내지 23의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 2개의 프라이머 세트는 저온 처리된 양배추 중에서 안토시아닌 함량이 낮은 양배추 계통(LAA 타입)과 안토시아닌 함량이 높은 양배추 계통(HAA 타입)의 *RVE5* 유전자 내 엑손 4번 및 5번에 존재하는 SNP 또는 InDel 다형성을 확인할 수 있는 프라이머 세트로, 상기 2개의 프라이머 세트를 동시에 이용하면 각 프라이머 세트별 결과들을 조합하여 LAA 타입의 녹색 양배추 계통과 HAA 타입의 녹색 양배추 및 자색 양배추를 효율적으로 판별할 수 있다.
- [0025] 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.
- [0026] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명은 또한, 상기 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하기 위한 키트를 제공한다.
- [0028] 본 발명의 키트에 있어서, 상기 프라이머 세트 및 양배추는 전술한 바와 같다.
- [0029] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 키트는 또한 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, 역전사 완충액 및 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.
- [0031] 본 발명은 또한,
- [0032] 양배추 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0033] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0034] 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하는 방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 프라이머 세트 및 양배추계통은 전술한 바와 같다.
- [0036] 본 발명의 방법은 양배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 양배추 시료는 이에 한정되지 않으나, 양배추 식물체의 잎, 줄기, 뿌리 혹은 이들이 건조된 형태로 가공된 산물일 수 있다. 상기 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 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR), 리가아제 연쇄반응

(ligase chain reaction), 핵산 서열 기제 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기제 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.

[0037] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 저온에서 양배추의 안토시아닌 축적을 판별하는 방법은 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하며, 상기 증폭 단계 산물의 검출은 겔 전기영동, HRM(high resolution melting) 분석, 형광 측정, 모세관 전기영동, DNA 칩, 방사성 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, HRM 분석 기술을 수행할 수 있으며, HRM 분석 기술은 핵산 서열에서의 변이를 확인하기 위해 사용된 상대적으로 새로운 포스트 PCR 분석 방법이다. 이 방법은 PCR 해리곡선에서 작은 차이를 감지하는 것을 기초로 한다. 이것은 PCR 기기와 연결되어 사용된 염료를 갖는 dsDNA의 온도에 따른 해리 정도의 차이를 HRM 분석을 위해, 특이적으로 고안된 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고 처리한다. 또한, 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 모세관 전기영동을 수행할 수 있다. 모세관 전기영동은 예를 들면, ABI Sequencer를 이용할 수 있다.

[0039] 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 FAM, HEX, VIC, JOE, ROX, TAMRA, Cy3 또는 Cy5를 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 ³²P 또는 ³⁵S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체 섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 양배추 계통 DNA 존재하에, 본 발명의 서열번호 20 및 21의 프라이머 세트 또는 서열번호 22 및 23의 프라이머 세트로 PCR을 수행한 후 겔 전기영동을 통해 밴드 형태로 검출하여 이들 밴드의 존재를 확인함으로써, 해당 양배추 시료가 저온 재배 조건에서 안토시아닌 축적 수준이 높고 낮음을 판별할 수 있는 *BoREV5a* 또는 *BoREV5b* 유전자의 존재 유무를 확인할 수 있다.

[0041] 본 발명의 방법을 보다 구체적으로, 저온 처리된 녹색 양배추 또는 자색 양배추를 대상으로 서열번호 20 및 21의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 경우, *BoREV5a* 유전자에 대해 214 bp의 단일 밴드(동형접합체)를 나타내면 안토시아닌 저함량 양배추 계통(LAA 타입의 녹색 양배추)으로 판별할 수 있고, 서열번호 22 및 23의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하여 *BoREV5b* 유전자에 대해 235 bp의 단일 밴드(동형접합체)를 나타내면 안토시아닌 고함량 양배추 계통(HAA 타입의 녹색 양배추 또는 자색 양배추)으로 판별할 수 있으며, 상기 서열번호 20 및 21의 프라이머 세트와 서열번호 22 및 23의 프라이머 세트를 모두 이용하여 PCR을 수행하여 214 bp 및 235 bp의 2개의 밴드(*BoREV5a/BoREV5b*, 이형접합체)를 나타내면 안토시아닌 고함량 양배추 계통(HAA 타입의 녹색 양배추)으로 판별할 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 재료 및 방법

[0046] 1. 식물재료와 생육조건

[0047] 유전자 서열분석에 이용한 녹색 양배추와 자색 양배추(*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba* and - f. *rubra*) 종자는 아시아종묘(주) 생명공학육종연구소(경기도 이천시)와 한국종묘(주)(경기도 평택시)에서 제공받아 사용하였다. 녹색 양배추 내혼계 4종(154, 2409, 2437 및 09WH45)과 자(적)색 양배추 내혼계 4종(7S5-51, 7S5-63, B90 및 B98)의 특성은 하기 표 1에 정리하였다. 마커 검증을 위해 사용한 양배추 재료는 하기 표 2에 정리하였으며, 국내종자회사 및 순천대학교 GSP 원예종자사업단으로부터 제공받았다. 일부 종자는 발아시켜 식

물생장기에서 배양하였으며, 생장 기온 22℃, 16시간(광)/8시간(암), 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 조건을 유지하였다. 내
혼계 337과 842 종자는 페트리 디쉬에 암발아시켜 3일간 유지한 것을 이용하였다.

표 1

본 발명에 사용된 양배추 목록

Genotype ID	Characteristic	Genetic status	Seed source
2437	Low anthocyanin accumulation (LAA) at LT	Inbred line	Asia Seed Co.
09WH45			
2409			
842			
154	High anthocyanin accumulation (HAA) at LT		
337			
7S4-51	Purple/red cabbage		
7S4-63			
B90	pale purple color		Hankook Seed Co.
B98	deep purple color		

[0048]

표 2

본 발명에 사용된 양배추 목록

Leaf color	<i>BoLBD37L</i> genotype	Source (SeedCo.)	Variety or line name	Total number
Green	Homozygous <i>BoRVE5a</i>	Asia	Asia Express, Base Ball, BN-9354, Cabsong, CT-55, CT-75, CT-44, CT-120, CT-150, CT-163, Decent, Express Ball, Infinite, Laurent, Speed King, Super Express, 09WH45(IR), 842(IR), 2409(IR), 2437(IR),	24
		Joen	Home Run,	
		Sakata	Saint, Scorpio,	
		Takii	Golden Cross,	
	Heterozygous	Asia	CT-8, CT-415, CT-622, CT-605, Grand Mart	9
		Joen	Rapido	
		Sakata	Charmant	
		Seminis	Indu	
		Takii	Green Nova,	
	Homozygous <i>BoRVE5b</i>	Asia	Asia Ball, Chosunpaldo, CT-6, CT-12, CT-16, CT-17, CT-120, CT-142, CT-163, CT-410, CT-418, Daebakna, Jackpot, Mart Ball, 154(IR), 337(IR),	25
		Joen	JS-246,	
		Kaneko	Lucky Ball	
		Sakata	Ahas70, Green Helmet,	
		Seminis	Tropic Sun	
		Takii	Green Coronet, KT-Cross, T-523, T-530	
Purple	Homozygous <i>BoRVE5b</i>	Asia	7S4-51 (IR), 7S4-63 (IR)	59
		Bejo	Autoro, Integro, Primero, Ranchero	
		Hankook	A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, A-7, A-8, A-9, A-10, A-11, A-12, A-13, A-14, A-15, A-16, A-19, A-20, A-21, A-22, A-24, B90, B98, DP60, HK-014, HK-016, HK-017, HK-018, HK-020, HK-032, HK-034, HK-058, HK-069, HK-075, 78, 80, 82, 84, 98, 99, 102, 116, 128, 141, 146	
		Japan Market	JP-J-38, NP-J-71 (medium early), NP-J-126	
		Nick-Zwaan	Rondale	
		Takii	Junsaeng Rubia	
		US market	Purple A, Purple B	
		Sakata	Varna	

[0049]

[0051]

2. *BoRVE5* 유전자 서열 분석

[0052] DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 상기 표 1의 양배추 10계통의 게놈 DNA를 추출하였다. 3'-UTR 부분에 존재하는 AT-repeat(AT SSR, simple sequence repeats) 부분은 하기 표 3의 프라이머 세트(서열번호 3 및 4)로 증폭하였고, 단편의 길이는 101~121 bp였다(도 1). 이 서열을 이용하여 이 유전자의 본체가 *BoRVE5*일 것이라는 것을 NCBI Blast 분석을 통해 확인하였고, 전체 유전자를 클로닝하기 위한 프라이머 제작을 위해 NCBI website와 *B. oleracea* genome databases(http://plants.ensembl.org/Brassica_oleracea/Info/Index)를 탐색하여 하기 표 3의 프라이머 세트(서열번호 5 및 6 또는 서열번호 5 및 7)를 결정하였다.

표 3

본 발명에 사용된 프라이머 정보

Use	Classification	Forward primer		Reverse primer	
		Name	Sequence (5'→3') (서열번호)	Name	Sequence (5'→3') (서열번호)
Cloning	3'-UTR	SSR-F	TGGTTTGTCTATTTTGCTAATA (3)	SSR-R	ACATTGTCCTTATCAACATATC (4)
	Genomic DNA	BoRVE5-F1	ATGGTGTGCTAAACGCTAGACC (5)	BoRVE5-R1	ACAAAATAGGACAAACCACTGCGCTT (6)
				BoRVE5-R2	CAGCGATTCTTTGGGAGAGCTGTG (7)

[0053]

[0055] PCR은 94℃에서 5분 변성한 후 94℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 2분의 사이클을 30회 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 7분 합성하였다. PCR 산물은 1% 아가로오스 겔에 전기영동하였고, LaboPass Gel Extraction Kit(COSMOGENETECH, 한국)를 이용하여 DNA를 정제하였다. 정제한 DNA는 T&A cloning vector(RBC, 대만)에 삽입하여 대장균 DH5 α에 형질전환하였다. 대장균으로부터 플라스미드 DNA는 LaBoPass Plasmid Mini Kit(COSMOGENETECH)를 이용하여 분리하였고, 염기서열 분석은 마크로젠(한국)에 의뢰하였다. PCR 반응과 염기서열 분석 과정에서 일어날 수 있는 에러를 피하고, 복수의 유전자가 존재함을 찾아내기 위해 적어도 10개 이상의 클론을 분석하였다. 상기로부터 얻은 서열의 비교는 multiple sequence alignment program CLUSTAL Omega(EMBL-EBI, 영국)을 이용하여 수행하였다.

[0057] 3. *BoRVE5* 유전자와 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 발현 분석

[0058] Total RNA는 잎 시료(표 1 및 표 2)와 TRIzol Reagent(Thermo Scientific, 미국)를 이용하여 분리하였고, RQ1 RNase-free DNase(Promega, 미국)를 65℃에서 10분간 처리하여 DNA를 제거하였다. cDNA의 첫번째 가닥은 oligo dT 프라이머를 이용하여 Revertra Ace Kit(TOYOBO, 일본)로 합성하였고, 이를 이용하여 발현 분석을 수행하였으며, 이 때 사용한 프라이머 정보는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

본 발명에 사용된 프라이머 정보

Use	Classification	Forward primer		Reverse primer	
		Name	Sequence (5'→3') (서열번호)	Name	Sequence (5'→3') (서열번호)
Expression	<i>BoRVE5a</i>	BoRVE5a-F	CCTGTGATTCAAGAGGAACAGGA (8)	BoRVE5a-R	CACAACTTTCTTATTGTTGGGTGTG (9)
	<i>BoRVE5b</i>	BoRVE5b-F	AATACCTGCGATTCAAGAGGAACCG (10)	BoRVE5b-R	AATTTTCTTATTGTTGGGTGTGTCG (11)
	<i>BoCHS</i>	BoCHS-F	GTTCAAGAGGTGCAAGTTTCGG (12)	BoCHS-R	ACAACTTCTGCTCTCAACTGCG (13)
	<i>BoF3H</i>	BoF3H-F	AGTATACGTGGCTTCTTGACACGG (14)	BoF3H-R	ACGAARGGGACAAAGCCACG (15)
	<i>BoDFR</i>	BoDFR-F	TCCCACGAATGAGAACATGA (16)	BoDFR-R	CACCGTCAACCCAGGAAAA (17)
	<i>BoACT2</i>	BoACT2-F	TGCCAATCTACGAGGGTTTC (18)	BoACT2-R	AGCTTCTCTGATGCTCTCAC (19)

[0059]

[0061] qRT-PCR은 SYBR Green Realtime Master Mix(TOYOBO)를 이용하여 MiniOpticon system(Bio-Rad, 미국)으로 분석하였으며, PCR은 95℃에서 10분간 변성한 후 94℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 30초 사이클을 40회 반복하였으며, 각

사이클의 마지막 단계에서 형광값을 측정하였다. 모든 분석은 3반복으로 이루어졌으며 표적유전자의 전사체 값은 *BoActin2* 유전자에 대한 상대값으로 정량화하였고, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (Methods., 2001, 25(4), 402-408)로 분석하였다.

4. 안토시아닌 추출과 정량

안토시아닌 함량을 측정하기 위해 잎 분말 0.3 g에 1% HCl-메탄올(v/v) 1 ml을 가하고 잘 섞어가면서 24시간 동안 암상태에서 반응시킨 후 13,000 xg 조건으로 원심분리하여 상층액을 취해 530, 620 및 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상대적인 안토시아닌 함량은 다음 식에 의해 구하였다. A_{530} , A_{620} , 및 A_{650} 은 흡광도 값을 의미한다.

상대적인 안토시아닌 함량 = $(A_{530} - A_{620}) - 0.1(A_{650} - A_{620})$

전체 안토시아닌 함량(mg anthocyanin/100 g fresh weight)은 대조 시료인 cyanidin-3-glucoside를 근거로 다음 식에 의해 계산하였다. MW는 cyanidin-3-glucoside (449.2 g/mol)의 분자량, DF는 희석배율을 그리고 $\varnothing$ 은 큐벳의 지름(1 cm)을 뜻한다.

전체 안토시아닌 함량 = 상대적인 안토시아닌 함량 $\times$ MW $\times$ DF $\times$ 1000 $\times$ $\varnothing$

5. 마커의 검증

BoRVE5a(LAAs, 저온에서 안토시아닌 축적이 낮은 유전자형)와 *BoRVE5b*(HAAs, 저온에서 안토시아닌 축적이 높은 유전자형)를 구별하기 위하여, 엑손 4번과 엑손 5번에 존재하는 유전적 다형성을 기반으로 각 유전자 특이 프라이머를 제작하였다(표 5). PCR을 위해 게놈 10 ng, 정방향 및 역방향 프라이머 각 10 pmol, 5X PCR Master Mix (Elpisbiotech, 한국)를 20 μ l로 맞추었으며, 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성한 후 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초를 28회 반복하고 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. 게놈 DNA의 존재는 *BoActin 2*의 증폭 여부로 판단하였고, PCR 산물은 1.2% 아가로오스 겔로 전기영동하여 확인하였다.

표 5

본 발명에 사용된 프라이머 정보

Use	Classification	Forward primer		Reverse primer	
		Name	Sequence (5'→3') (서열번호)	Name	Sequence (5'→3') (서열번호)
Marker	<i>BoRVE5a</i>	BoRVE5a-F	GAATCGACAAATCTGCCAATACCTGTG (20)	BoRVE5a-R	ACAACCTTCTTCATTGTTGGGGTGTG (21)
	<i>BoRVE5b</i>	BoRVE5b-F	CGACAAATCTGCCAATACCTGCG (22)	BoRVE5b-R	CAACTTCTTCATTGTTGGGGTGTGC (23)

6. 통계분석

안토시아닌 함량과 유전자 발현 수준은 one-way analysis of variance (ANOVA)와 Tukey's pair-wise comparisons in Minitab v.17(Minitab Inc., 미국)을 이용하여 통계분석을 수행하였고, 모든 데이터는 시료 3 반복을 하여 평균과 표준편차로 표기하였다.

실시예 1. 안토시아닌 축적과 *BoRVE5* 유전자의 관련성 연구

아시아종묘 유래 8계통의 양배추를 이용한 RNA_seq 분석을 통해 안토시아닌 축적과 AT-SSR의 길이가 역으로 상관된 유전자를 발굴하였고, 이 부위는 애기장대의 *RVE5*(AtRVE5, AT4G01280) 유전자와 상동성이 있는 양배추 유전자의 3'-UTR(untranslated region)임을 알 수 있었다(표 1 및 도 1). AT-반복은 9~19(AT9~19)로 다양하였고, 안토시아닌 축적 수준이 높은 양배추는 짧은 반복횟수를 지니고 있었다. 이 유전자의 이름을 *BoRVE5*로 명명하였고, 여러 양배추 계통으로부터 클로닝하여 분석하기로 하였다.

[0079] **실시예 2. *BoRVE5* 유전자의 클로닝과 서열 분석**

[0080] *BoRVE5* 유전자를 클로닝하기 위해 상기 표 3의 프라이머 조합(서열번호 5 및 6 또는 서열번호 5 및 7)으로 PCR을 수행하여 전체 유전자 서열을 얻었다. 유전자는 저온에서 안토시아닌 축적이 낮은 양배추 4계통(LAAs; 842, 2409, 2437, 09WH45)과 안토시아닌 축적이 높은 양배추 2계통(HAAs; 154, 337) 및 자색양배추 4계통(7S4-51, 7S4-63, B90, B90)의 총 10계통이었으며, ATG 개시코돈부터 AT-SSR 이후 30 뉴클레오타이드까지 길이가 평균 1913 bp(1899~1947 bp)이었으며, 8개의 엑손과 8개의 인트론으로 구성되어 있었고, 다수의 InDel과 SNP가 존재하였다(도 2 내지 도 4). 안토시아닌 축적이 낮은 양배추와 안토시아닌 축적이 높은 양배추를 구별할 수 있는 SNP 또는 InDel 다형성이 여러개 존재하였고(도 5), 안토시아닌 축적 수준에 따라 대조되는 유전자를 다음과 같이 명명하였다: LAA 양배추에 존재하는 유전자는 *BoRVE5a*, HAA 양배추 및 자색 양배추에 존재하는 유전자는 *BoRVE5b*.

[0081] 또한, 양배추 10계통(표 1)의 *BoRVE5* 염기서열을 이용하여 계통 분석을 수행한 경우 자색 양배추인 B90 계통이 LAA 타입의 양배추와 그룹화되었으나, *BoRVE5* 아미노산 서열을 이용하여 계통 분석을 수행한 경우에는 자색 양배추인 B90 계통이 자색 양배추와 그룹화된 것을 확인하였다(도 6). 이를 통해, LAA 타입과 HAA 타입 양배추 간의 많은 다형성이 인트론에 존재하며, 이는 안토시아닌 축적 형질과 큰 연관이 없을 것으로 예상되었다.

[0083] **실시예 3. *BoRVE5* 아미노산 구성 분석**

[0084] *BoRVE5*의 다양성과 기능을 유추하기 위하여 8개의 양배추 유래 *BoRVE*와 4개의 애기장대 유래 *AtRVE*의 아미노산 서열을 근거로 계통수를 작성하였다. 그 결과, 도 7A에 나타난 바와 같이 3개의 클레이드(clade)로 나타났는데, 그 중 하나는 생체 시계와 안토시아닌 축적과 관련이 있는 RVE4와 RVE8로 이루어져 있고, 다른 하나는 기능이 잘 알려지지 않은 REV3, RVE5 및 RVE6으로 이루어져 있으며, 나머지 하나는 RVE1, RVE2 및 RVE7로 이루어져 있었다. 이를 통해, 애기장대에서 밝혀진 REV 기능이 양배추의 RVE 기능과 유사할 것으로 예상되었다.

[0085] 또한, 양배추에서 클로닝한 유전자 서열을 이용한 아미노산 서열을 나열한 결과, *BoRVE5a*와 *BoRVE5b* 아미노산 서열 간에 아미노산 차이를 보이는 부분이 있었으나, MYB 단백질의 주요 도메인인 MYB 도메인과 LCL 도메인에는 차이가 없었다(도 7B). 이를 통해 *BoRVE5a*와 *BoRVE5b* 단백질 기능에 큰 차이는 없을 것으로 예상되었다.

[0087] **실시예 4. 저온 처리에 의한 양배추의 안토시아닌 축적 패턴 분석**

[0088] 저온에서 안토시아닌 축적 형질을 판단하기 위하여, LAA 타입(842, 2409, 2437, 09WH45, Golden Cross, Speed King) 또는 HAA 타입(154, 337, CT154, T-523, T-530)의 녹색 양배추와 자색 양배추(7S4-51, 7S4-63)를 정상 생장 온도(CK: 20~30℃)에서 자란 양배추와 저온에서 1개월 자란 양배추(*Agronomy*, 2020, 10, 602, Song et al. 참고)의 안토시아닌 축적을 측정하여 비교하였다.

[0089] 그 결과, 정상 생장 온도(CK) 조건보다 저온(LT) 조건에서 생장시킨 양배추의 안토시아닌 함량이 증가하였고, 특히 LAA 타입의 녹색 양배추보다 HAA 타입의 녹색 양배추와 자색 양배추에서 안토시아닌 축적 수준이 정상 생장 온도보다 저온에서 현저히 증가한 것을 확인하였다(도 8).

[0091] **실시예 5. 안토시아닌 합성과 *BoRVE5* 대립유전자의 관계 분석**

[0092] 저온 처리된 LAA 타입(2409, Golden Cross) 또는 HAA 타입(T-523, T-530)의 녹색 양배추와 자색 양배추(7S4-51, 7S4-63)에서 *BoRVE5a* 및 *BoRVE5b*의 발현 수준을 확인한 결과, *BoRVE5a* 유전자는 LAA 타입의 녹색 양배추에서만 발현되고 HAA 타입의 녹색 양배추와 자색 양배추에서는 매우 낮은 수준으로 발현되었다. 반면, *BoRVE5b* 유전자는 LAA 타입의 녹색 양배추에서 거의 발현되지 않고, HAA 타입의 녹색 양배추와 자색 양배추에서 발현 수준이 현저히 증가한 것을 확인하였다. 이러한 발현 양상은 안토시아닌 합성의 핵심 유전자인 *BoDFR*의 발현 양상과 유사하였다(도 9).

[0093] 또한, *BoRVE5* 발현과 생체리듬과의 연관성을 조사하기 위해, LAA 타입의 녹색 양배추(842)와 HAA 타입의 녹색 양배추(337)에서 *BoRVE5a* 및 *BoRVE5b* 유전자와 안토시아닌 합성 관련 유전자(*BoCHS*, *BoF3H*, *BoDFR*)의 발현을 아침(6AM), 낮(2PM) 또는 밤(10PM) 시간대에 분석한 결과, *BoRVE5a* 및 *BoRVE5b* 유전자는 특정 시간대에 관계없이 LAA 타입의 양배추에서는 *BoRVE5a*의 발현 수준이 높고, HAA 타입의 양배추에서는 *BoRVE5b* 유전자와 안토시아

닌 합성 관련 유전자의 발현 수준이 높은 것을 확인하였다(도 10). 이를 통해, 본 발명의 안토시아닌 축적 수준과 연관된 *BoRVE5a* 및 *BoRVE5b* 유전자는 생체리듬과 연관성이 없음을 알 수 있었다.

실시예 6. 분자마커 개발과 검증 - 저온에서 안토시아닌 축적이 낮은 양배추(LAA)와 높은 양배추(HAA) 구별

*BoRVE5a*와 *BoRVE5b* 유전자의 엑손 4번 및 5번에 유전적 다형성이 존재하였고, 아미노산 암호화를 변화시키는 SNP와 InDel에 기반한 프라이머를 제작한 후(표 5) PCR을 수행하여 범용 여부를 검증하였다.

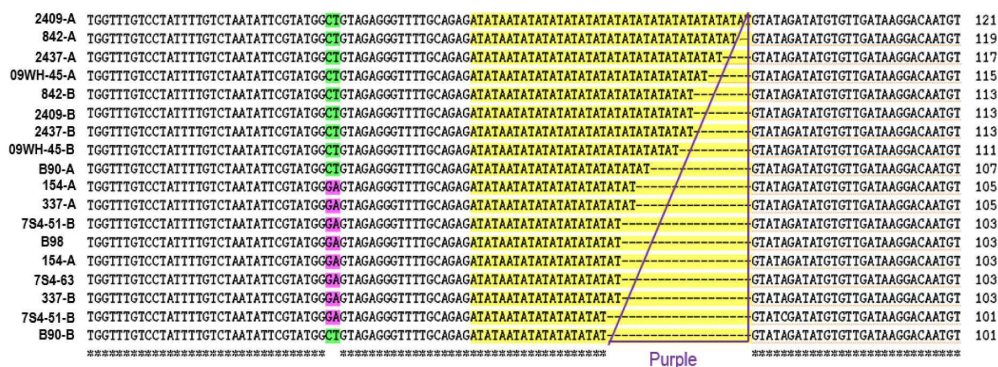
그 결과, *BoRVE5a* 유전자는 오직 LAA 타입의 녹색 양배추(2437, 09WH45, 2409, 842)에서만 검출되었고, *BoRVE5b* 유전자는 HAA 타입의 녹색 양배추(154, 337)와 자색 양배추(7S4-63, 7S4-51)에서만 검출되었으며(도 11A), HAA 타입 중에서 CT-415는 이형으로 검출된 것을 확인하였다(도 11B). 이를 통해, *BoRVE5a* 유전자가 동형일 경우 LAA 타입의 양배추이고, *BoRVE5b* 유전자가 동형 또는 이형일 경우 HAA 타입의 양배추로 판별할 수 있음을 알 수 있었다.

또한, 녹색 양배추 47계통과 자색 양배추 57계통(표 2)을 대상으로 확대 수행한 결과, LAA 타입의 녹색 양배추에서는 *BoRVE5a* 동형이고, HAA 타입의 녹색 양배추에서는 *BoRVE5b* 동형이거나 이형일 것이라는 결론을 내렸으며, 자색 또는 적색 양배추는 *BoRVE5b*를 동형으로 가지고 있음을 알 수 있었다(도 12).

이를 통해, 본 발명의 *BoRVE5a* 및 *BoRVE5b* 유전자간의 InDel 또는 SNP 다형성을 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트
를 이용하면 저온 처리된 녹색 양배추를 대상으로 안토시아닌 축적 정도를 정확하게 판단할 수 있을 것으로
사료되었다.

도면

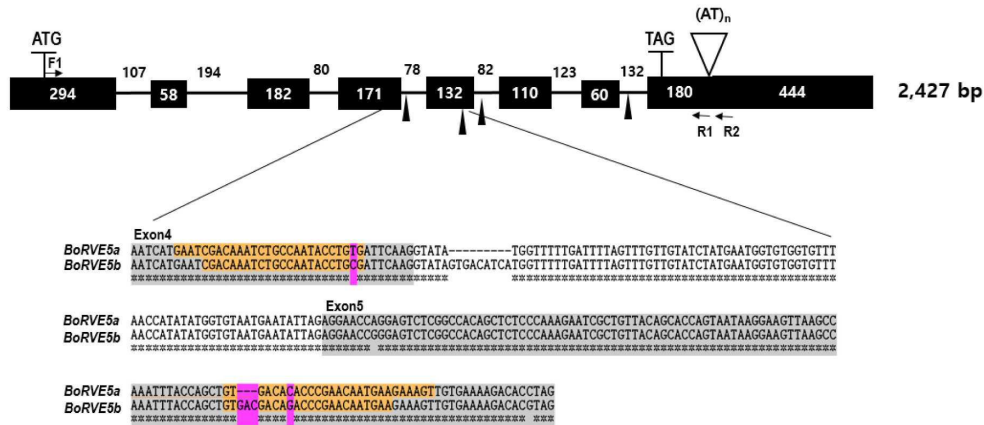
도면1



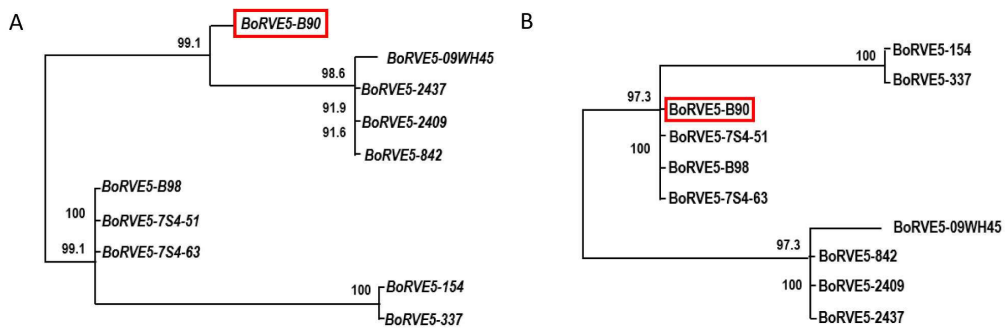
도면2

[illegible]

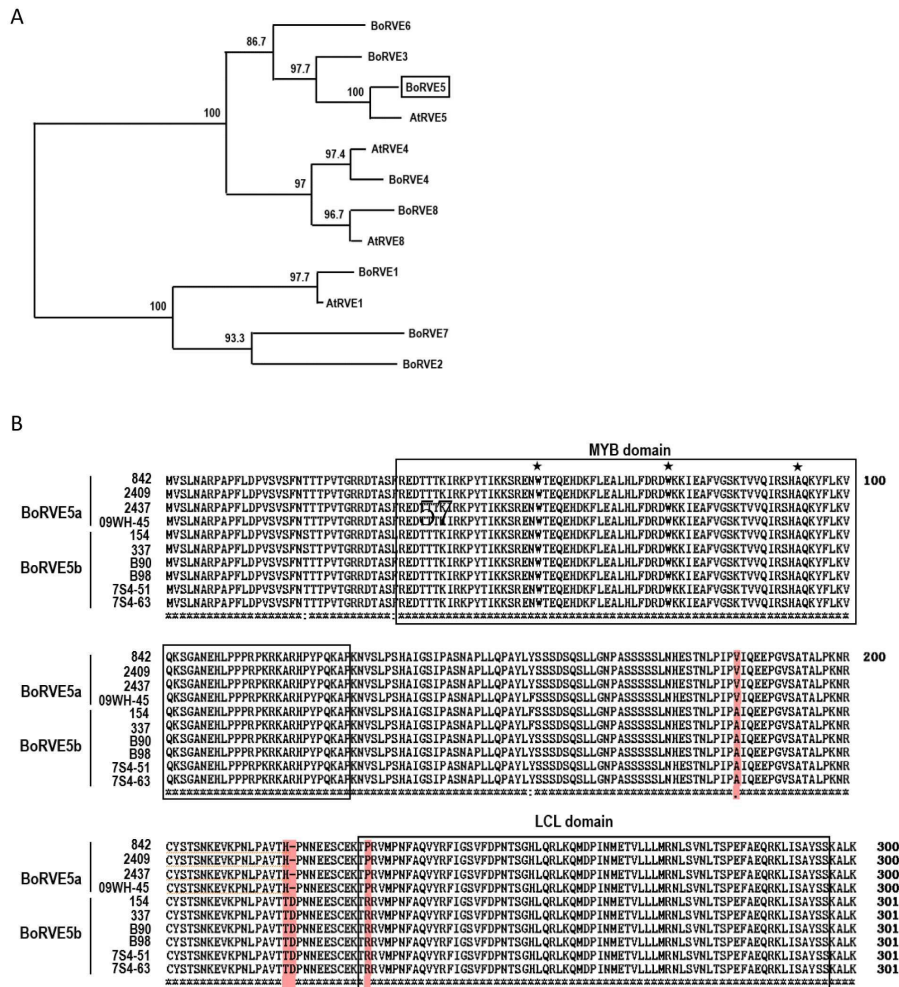
도면5



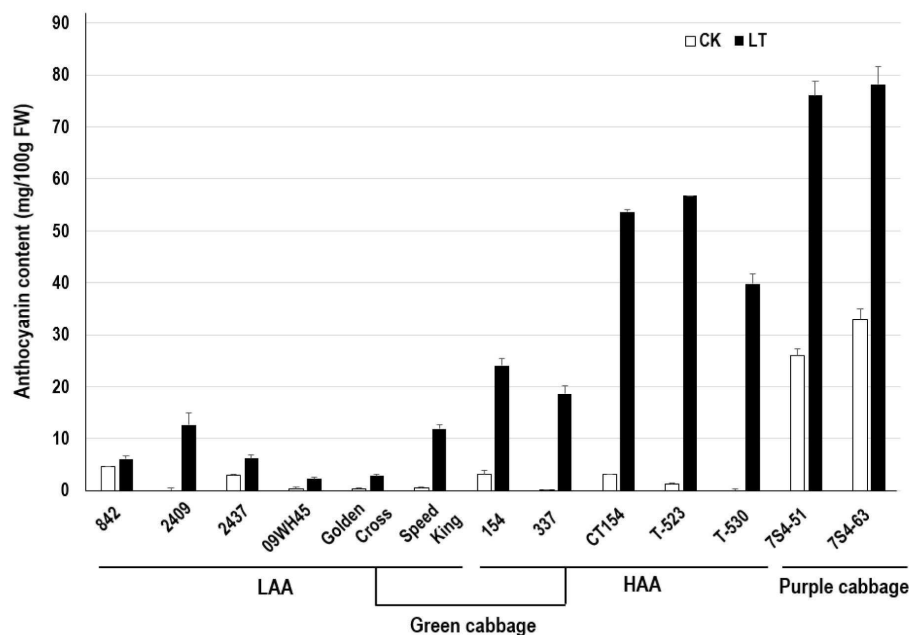
도면6



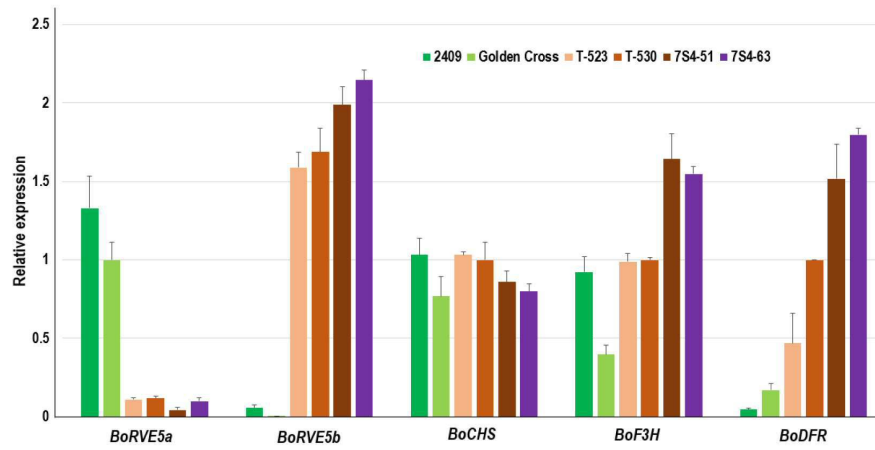
도면7



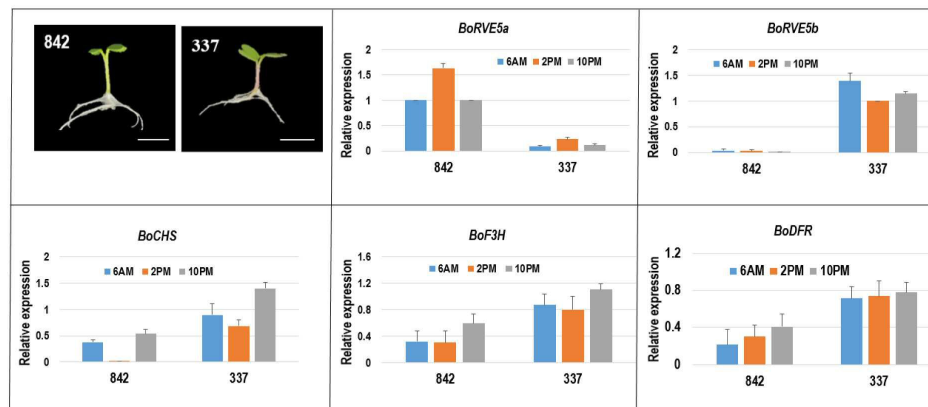
도면8



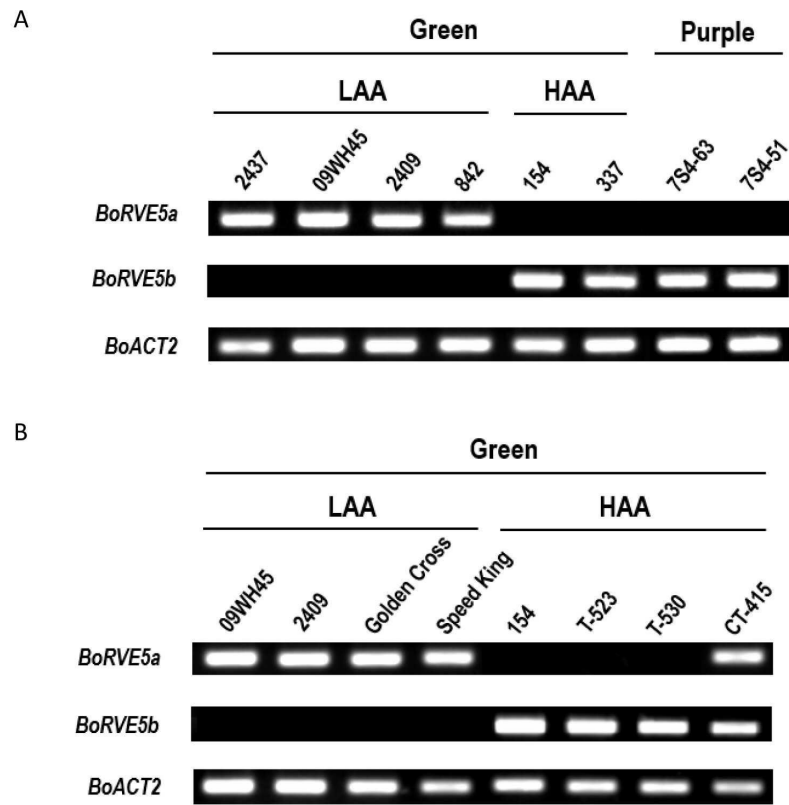
도면9



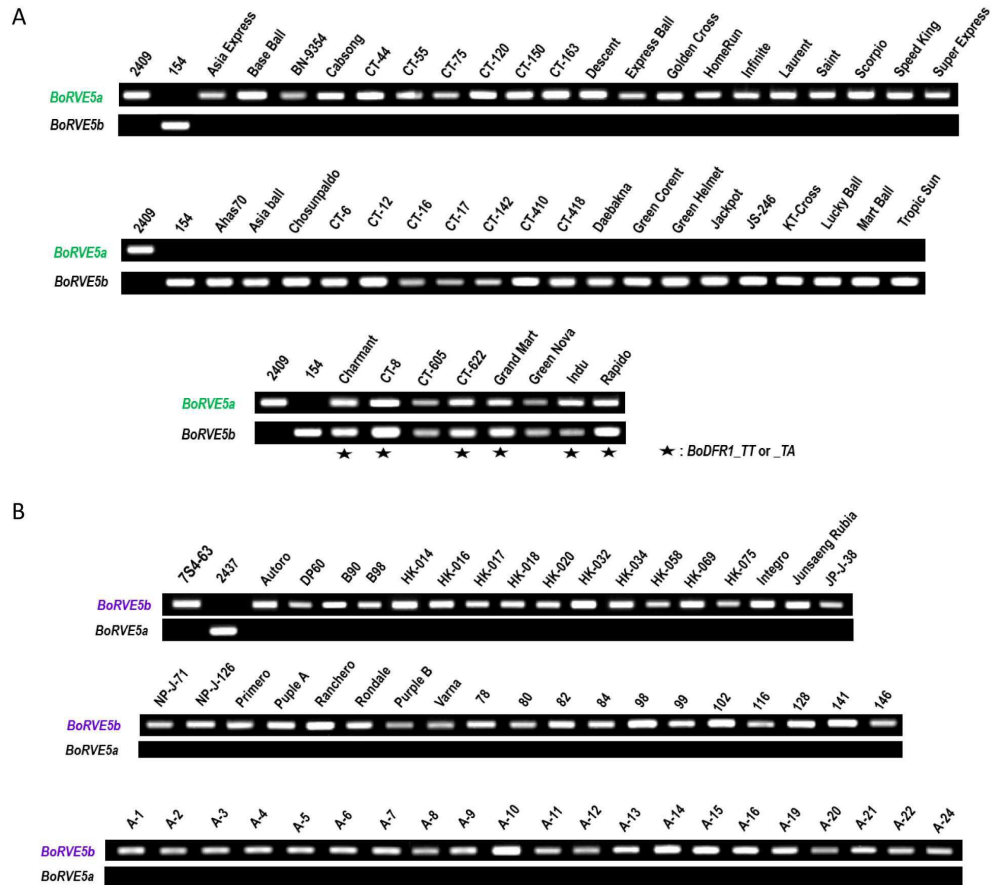
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Molecular marker based on RVE5 gene from cabbage for discriminating anthocyanin deposition at low temperature and uses thereof
- <130> PN20364
- <160> 23
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 248
- <212> DNA
- <213> Brassica oleracea
- <400> 1

aatcatgaat cgacaaatct gccaaatcct gtgattcaag gtatatgggtt ttgtatttta 60

gtttgttgta tctatgaatg gtgtgggtgtt taaccatata tgggtgaatg aatattagag 120

gaaccaggag tctcgccac agctctccca aagaatcgct gttacagcac cagtaataag	180
gaagttaagc caaatattacc agctgtgaca caccgaaca atgaagaaag ttgtgaaaag	240
acacctag	248
<210> 2	
<211> 260	
<212> DNA	
<213> Brassica oleracea	
<400> 2	
aatcatgaat cgacaaatct gccaatacct gcgattcaag gtatagtgac atcatggttt	60
ttgatttttag ttgtttgtat ctatgaatgg tgtggtgttt aaccatatat ggtgtaatga	120
atattagagg aaccgggagt ctcgccaca gctctcccaa agaatcgctg ttacagcacc	180
agtaataagg aagttaagcc aaatttacca gctgtgacga cagacccgaa caatgaagaa	240
agttgtgaaa agacacgtag	260
<210> 3	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
tggtttgtcc tattttgtct aata	24
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
acattgtcct tatcaacaca tate	24
<210> 5	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	

atggtgtcgc taaacgctag acc	23
<210> 6	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
acaaaatagg acaaaccact gcgctt	26
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 7	
cagcgattct ttgggagagc tgtg	24
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 8	
cctgtgattc aagaggaacc agga	24
<210> 9	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 9	
cacaactttc ttcattgttc ggggtgtg	27
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400>	10	
aatacctgcg attcaagagg aaccg		25
<210>	11	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
aactttcttc attgttcggg tctgtcg		27
<210>	12	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
gttcacaagg agtgaagtt tcgg		24
<210>	13	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	
acaaacttc tggtctcaac ctgc		24
<210>	14	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	14	
agtatacgtg gcttcttgac acgg		24
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	15	
acgaarggga	caaagccacg	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	16	
tcccacgaat	gagaacatga	20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	17	
caccgtcaac	cctaggaaaa	20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	18	
tgccaatcta	cgagggtttc	20
<210>	19	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	19	
agcttctcct	tgatgtctct cac	23
<210>	20	

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 gaatcgacaa atctgccaat acctgtg 27
 <210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 acaactttct tcattgttcg ggtgtg 26
 <210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 cgacaaatct gccaatacct gcg 23
 <210> 23
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 23
 caactttctt cattgttcgg gtctgtc 27