



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0124258
(43) 공개일자 2014년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0041769

(22) 출원일자 2013년04월16일

심사청구일자 2013년04월16일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

이남숙

서울 서초구 바우피로7길 51, 105동 1204호 (우면동, 대림아파트)

(74) 대리인

유미특허법인

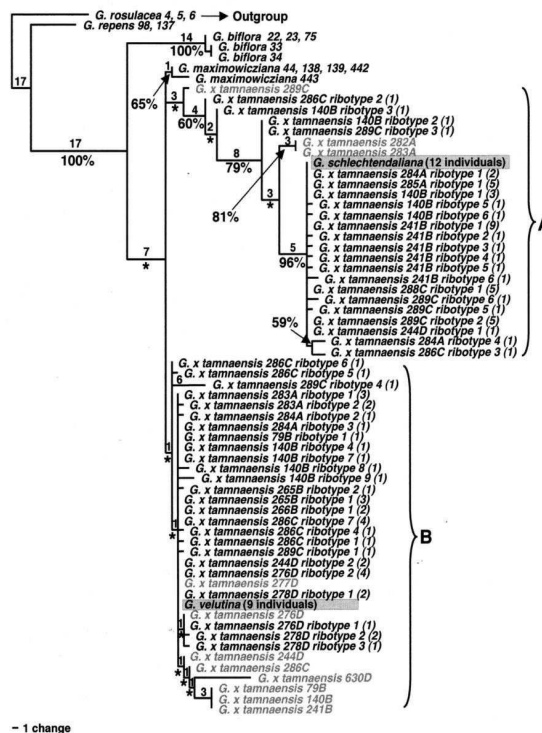
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 탐라사철란을 동정하는 방법, 동정용 조성물 및 키트

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는 탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*)을 동정하는 방법, 하나 이상의 염기의 다형성을 검출할 수 있는 체제를 포함하는 탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*) 동정용 조성물 및 키트에 대한 것이다.

대표도 - 도2



- 1 change

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0120100500200790

부처명 환경부

연구관리전문기관 한국환경산업기술원

연구사업명 차세대핵심환경기술개발사업

연구과제명 원예자원식물의유전자탐색기술및종자칩개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2009.03.01 ~ 2011.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

사철란 속 식물에서 추출한 핵DNA 시료에 대하여,

서열번호 1로 표시되는 ITS(Internal Transcribed Spacer) 영역 염기서열의 102번째 염기, 161번째 염기, 191번째 염기, 194번째 염기, 206번째 염기, 234번째 염기, 441번째 염기, 513번째 염기, 514번째 염기 및 643번째 염기로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는,

탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*)을 동정하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 206번째 염기, 441번째 염기 및 513번째 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는,

다음의 특징을 가지는 탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*) 형태형 A를 동정하는 것인 방법:

- (a) 잎의 색이 녹색임; 및
- (b) 잎맥이 하나의 뚜렷한 주맥과 불규칙한 그물맥의 패턴을 나타내나 전체적으로 사철란 잎에 더 가까움.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 102번째 염기에서 A 및 G 가 함께 확인되고, 206번째 염기에서 C 및 T 가 함께 확인되고, 441번째 염기에서 A 및 G 가 함께 확인되고, 및 513번째 염기에서 C 및 T 가 함께 확인되는 경우 탐라사철란 형태형 A인 것으로 동정하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 194번째 염기, 441번째 염기 및 643번째 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는,

다음의 특징을 가지는 탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*) 형태형 B를 동정하는 것인 방법:

- (a) 잎의 색이 황록색 또는 황자색임; 및
- (b) 잎맥이 하나의 뚜렷한 주맥, 규칙적인 측맥과 측맥들 사이의 그물맥으로 구성됨.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 102번째 염기에서 A 및 G 가 함께 확인되고, 194번째 염기에서 C 및 T 가 함께 확인되고, 441번째 염기에서 A 및 G 가 함께 확인되고, 및 643번째 염기에서 A 및 T 가 함께 확인되는 경우 탐라사철란 형태형 B인 것으로 동정하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 161번째 염기, 191번째 염기, 194번째 염기, 234번째 염기 및 643번째 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는,

다음의 특징을 가지는 탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*) 형태형 C를 동정하는 것인 방법:

- (a) 잎의 색이 황록색 또는 황자색임; 및
- (b) 잎맥이 뚜렷한 주맥과 소수의 규칙적 측맥 사이에 불규칙적인 그물맥의 패턴을 나타내나 사철란 잎에 가까운 형태임.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 161번째 염기에서 G 및 T 가 함께 확인되고, 191번째 염기에서 C 및 T 가 함께 확인되고, 194번째 염기에서 C 및 T 가 함께 확인되고, 234번째 염기에서 C 및 T 가 함께 확인되고, 및 643번째 염기에서 A 및 T 가 함께 확인되는 경우 탐라사철란 형태형 C인 것으로 동정하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 514번째 염기 또는 643번째 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는,

다음의 특징을 가지는 탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*) 형태형 D를 동정하는 것인 방법:

- (a) 잎의 색이 자녹색임; 및
- (b) 잎맥이 하나의 뚜렷한 주맥과 규칙적인 측맥과 측맥들 사이의 그물맥으로 구성되나 털사철란 잎에 더 가까운 형태임.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 514번째 염기에서 G 및 T 가 함께 확인되거나, 또는 643번째 염기에서 A 및 T 가 함께 확인되는 경우 탐라사철란 형태형 D인 것으로 동정하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 10

서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 161번째 염기, 191번째 염기, 194번째 염기, 206번째 염기, 234번째 염기, 441번째 염기, 513번째 염기 및 643번째 염기로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기의 다형성을 검출할 수 있는 제제를 포함하는,

탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*) 동정용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 206번째 염기, 441번째 염기 및 513번째 염기의 다형성을 검출할 수 있는 제제를 포함하는,

탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*) 형태형 A의 동정용 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 194번째 염기, 441번째 염기 및 643번째 염기의 다형성을 검출할 수 있는 제제를 포함하는,

탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*) 형태형 B의 동정용 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,

서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 161번째 염기, 191번째 염기, 194번째 염기, 234번째 염기 및 643번째 염기의 다형성을 검출할 수 있는 제제를 포함하는,

탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*) 형태형 C의 동정용 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서,

서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 514번째 염기 또는 643번째 염기의 다형성을 검출할 수 있는 제제를 포함하는,

탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*) 형태형 D의 동정용 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 염기를 검출할 수 있는 제제는 상기 염기를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브인 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 프라이머 또는 프로브는 서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 161번째 염기, 191번째 염기, 194번째 염기, 206번째 염기, 441번째 염기, 513번째 염기 및 643번째 염기로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기를 포함하는 10개 내지 100개의 연속적인 염기서열 또는 이에 상보적인 염기서열로 이루어진 것인 조성물.

청구항 17

제10항 내지 제16항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는,

탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*) 동정용 키트.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 핵내 ITS 부위의 염기 다형성에 근거한 탐라사철란의 신규 동정 기술에 관한 것으로, 보다 상세하게, 본 발명은 하나 이상의 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는 탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*)을 동정하는 방법, 하나 이상의 염기의 다형성을 검출할 수 있는 재제를 포함하는 탐라사철란 동정용 조성물 및 키트에 대한 것이다.

배경기술

- [0002] 사철란속(*Goodyera*) 식물은 난초과(Orchidaceae)에 속하는 상록성 다년생 식물로, 전 세계적으로 아프리카를 제외한 북반구의 온대 및 열대 지역에서 약 40여종이 분포한다고 알려져 있다. 한국에서 보고된 사철란속 식물로는 사철란(*G. schlechtendaliana*), 털사철란(흰줄사철란, *G. velutina*), 붉은사철란(*G. biflora*), 섬사철란(*G. maximowicziana*), 애기사철란(*G. repens*), 로켓사철란(*G. rosulacea*) 및 탐라사철란(*G. x tamnaensis*)의 7종이 있으며, 주로 제주도, 남부지방, 및 울릉도에 분포하고 있는 것으로 알려져 있다.
- [0003] 한국의 사철란속 식물은 다양한 지형적 요소 및 기후로 인하여 종에 따라 꽃과 잎, 줄기의 형태적 특징이 다양하여, 관상용 등 원예적 가치가 매우 높고 보존 가치가 크다. 이 중, 최근 제주도에서 발견된 탐라사철란(*G. x tamnaensis*)은 종래에 알려진 사철란 속 식물 간의 자연잡종으로 추정되는데, 잎의 색과 잎맥의 무늬가 다양하여 관상용으로 매력적인 특징이 있으며, 제주 지역의 10여 군데에서 자생하는 한국 고유종으로서 희소성이 있어, 원예적 가치 및 보존 가치가 특히 크다.
- [0004] 그러나, 탐라사철란은 자연잡종으로 추정되기는 하나, 아직 탐라사철란의 유전자의 확보 및 이를 토대로 한 분자적 수준에 대한 연구가 전무하여 그 양친종이 어떤 식물인지 명확하게 규명되어 있지 않으며, 사철란(*G. schlechtendaliana*) 및 털사철란(*G. velutina*)과 같은 다른 한국산 사철란속 식물과 형태적 특징을 공유하는 부분도 많아, 형태적 특징만으로 탐라사철란을 정확하게 동정하는 데 한계가 있다.
- [0005] 따라서, 탐라사철란의 자원과 가치를 보존하고, 탐라사철란 고유의 관상적 가치를 활용하여 인위적 배양 및 재배를 위한 제반 기술을 확립하기 위해서, 탐라사철란을 분자적 수준에서 정확하게 동정할 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.
- [0006] 원예적 또는 약용적 가치가 높은 식물들의 아종 또는 품종을 명확히 동정하기 위한 기술은 이전부터 지속적으로 요구되어 왔다. 예를 들어, 국내특허공개 제10-2011-0114105호는 핵 내 리보솜 DNA의 염기서열 차이를 이용하여 일천궁, 중국천궁 및 토천궁을 식별하는 기술을 제공하고 있고, 국내특허등록 제10-1036812호는 표고 품정을 동정하기 위한 마커를 제공하고 있고, 국내특허등록 제10-1133104호는 분자유전학적 수준에서 산초나무 아종을 구별하는 기술을 제공하고 있으며, 국내특허등록 제10-0817429호는 엽록체 DNA 다형성의 차이를 이용하여 상추 품종을 구별하는 기술을 제공하고 있다.
- [0007] 그러나, 탐라사철란에 대해서는 유전자의 확보 및 이를 토대로 한 분자적 수준의 연구가 진행된 바 없으며, 사철란 및 털사철란과 같이 일부 형태적 특징을 공유하는 다른 사철란속 식물들과 비교하여 탐라사철란을 명확하게 동정할 수 있는 기술은 보고된 바 없다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 사철란 및 털사철란과 같이 일부 형태적 특성이 유사한 다른 사철란속 식물들과 비교하여 탐라사철란을 명확하게 동정할 수 있는 염기 다형성 마커를 새로이 규명하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 핵 내 ITS 부위의 염기 다형성에 근거한 탐라사철란의 신규 동정 기술을 제공하는 것을 목적으로 한

다.

[0010] 보다 상세하게, 본 발명의 목적은 사철란 속 식물의 핵DNA 시료로부터 하나 이상의 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는 탐라사철란을 동정하는 방법, 상기 염기의 다형성을 검출할 수 있는 재제를 포함하는 탐라사철란 동정용 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 더욱 상세하게, 본 발명의 목적은 서열번호 1로 표시되는 ITS(Internal Transcribed Spacer) 영역 염기서열의 102번째 염기, 161번째 염기, 191번째 염기, 194번째 염기, 206번째 염기, 234번째 염기, 441번째 염기, 513번째 염기, 514번째 염기 및 643번째 염기로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는 탐라사철란을 동정하는 방법, 동정용 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서,

[0013] 본 발명은 사철란속(*Goodyera*) 식물에서 추출한 핵DNA 시료에 대하여,

[0014] 서열번호 1로 표시되는 ITS(Internal Transcribed Spacer) 영역 염기서열의 102번째 염기, 161번째 염기, 191번째 염기, 194번째 염기, 206번째 염기, 234번째 염기, 441번째 염기, 513번째 염기, 514번째 염기 및 643번째 염기로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는, 탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*)을 동정하는 방법에 관한 것이다.

[0015] 사철란속(*Goodyera*) 식물은 난과(Orchidaceae)에 속하는 식물로 전 세계에 약 40여종이 분포하는 것으로 알려져 왔으며, 탐라사철란(*Goodyera x tamnaensis*)은 사철난속에 속하는 식물로 침엽수림과 낙엽수림이 혼생하는 지역에서 자라는 다소 소형의 상록성 자생종이다. 현재까지 보고된 탐라사철란의 형태적 특징으로는, 뿌리가 끈 모양으로 굵고 짧으며 줄기는 높이 10~20cm로 기부가 길게 옆으로 뻗으며 녹색이고, 잎은 3~4개가 호생하고 길이 약 1cm의 엽병이 줄기를 감싸고 중륵은 녹색을 띠며 그물무늬가 명료하고 6개의 세로줄이 있으며 뒷면은 자색을 띤다. 포는 길이 1.1~1.5cm로 4~6개가 직립하고 자방에 접하며 피침형 내지 좁은 피침형으로 끝이 날카롭게 뾰족하고 적색이다. 화경은 적색으로 직립하며 털이 있다. 꽃은 담홍색으로 8월 하순부터 9월 상순에 화경의 중부 위에 10여개가 길이 1~1.2cm의 수상화서로 달리고, 화경, 화병, 자방, 악편 등에 꼬불꼬불한 털이 있다.

[0016] 본 발명자들은, 형태학적 및 분자적 분석을 통해 탐라사철란이 털사철란과 사철란의 자연잡종임을 확인하였다. 또한, 탐라사철란의 형태학적 특징을 보다 면밀하게 관찰하여 탐라사철란을 잎맥의 모양과 잎의 색에 따라 4가지의 형태형으로 분류하였고, 상기 각 형태형마다 핵DNA의 ITS 부위의 염기 다형성에 차이가 있음을 알게 되었다. 이에, 탐라사철란의 4가지 형태형 각각에 나타나는 공통적인 염기 다형성 위치를 추출하여, 탐라사철란과 유사한 형태적 특징을 공유하는 양친종(털사철란과 사철란) 및 다른 사철란속 식물들과의 관계에서 탐라사철란을 동정할 수 있을 뿐만 아니라, 탐라사철란의 각 형태형까지 명확하게 구분할 수 있는 염기 다형성 마커를 발굴하게 되었다.

[0017] 본 발명에서 "ITS(Internal Transcribed Spacer)"는 핵 리보솜 DNA(nuclear ribosomal DNA)로부터 전사되거나 단백질로 발현되지는 않는 부위이다. ITS 염기서열은 식물, 균류, 곤충 등을 포함한 생물의 다양한 배열의 하위 분류군 수준의 계통을 추론하기 위해 이용되어 왔다. ITS 지역은 하위 분류군 수준에서 높은 정보를 가질 뿐만 아니라 피자식물의 보존된 염기서열 패턴과 높은 정렬성을 나타내는 것으로 알려져 있다. ITS 지역은 적은 크기의 프라이머들이 rRNA 유전자로부터 강하게 보존된 주변 염기서열을 나타내기 때문에 대부분의 피자식물에서 쉽게 증폭된다. 본 발명에서는 ITS 전체 지역 중에서 ITS-1 및 ITS-2를 포함하는 일부 영역을 대상으로 염기 다형성을 조사하였으며, 사철란속 각 개체의 ITS 영역 염기서열을 나타낸 서열번호 1 내지 서열번호 12는 모두 동일한 ITS 영역에 위치한 염기서열을 나타낸다.

[0018] 본 발명에서 "다형성(polymorphism)"이란 하나의 유전자 좌위(locus)에 두 가지 이상의 대립유전자(allele)가 존재하는 경우, 개체가 어떤 형태와 형질 등에 관해 다양성을 나타내는 상태를 말한다. 생물의 형태는 원래 같은 것처럼 보여도 완전히 일치하는 개체는 전혀 없기 때문에 상대적으로 현저한 차이가 있는 경우, 특히 많은 수의 개체에 대해 정량적으로 비교하여 불연속적인 변이를 나타내는 경우에 다형성(polymorphism)이라는 단어가 사용된다.

- [0019] 본 발명에서 탐라사철란이 털사철란 및 사철란의 자연잡종임이 분자적 수준에서 명확히 규명되었으며, 잡종의 특성상, 탐라사철란 핵DNA의 특정 위치의 염기에서 털사철란 및 사철란의 특징적 염기가 동시에 나타나는 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 발명에서는 털사철란, 사철란 및 탐라사철란의 염기 다형성이 나타나는 부위를 토대로 하여 탐라사철란을 동정할 수 있는 정보를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 "동정"이란, 불명확한 개체를 생화학적, 형태적, 화학적 또는 분자생물학적 특성을 이용하여 분류학상의 위치 및 종명을 확인하는 것을 의미한다. 바람직하게, 본 발명에서 동정이란, 탐라사철란을 다른 사철란속 식물들과 식별하는 것의 의미하며, 보다 바람직하게는 양친종과의 관계에서 탐라사철란을 식별하는 것을 의미하여, 더욱 바람직하게는 탐라사철란의 4가지 형태형 (A, B, C, D)를 식별하는 것을 의미할 수 있다.
- [0021] 하나의 바람직한 양태로서, 탐라사철란 형태형 A를 동정하는 방법을 제공한다.
- [0022] 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 206번째 염기, 441번째 염기 및 513번째 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는, 다음의 특징을 가지는 탐라사철란 형태형 A를 동정하는 방법에 관한 것이다:
- [0023] (a) 잎의 색이 녹색임; 및
- [0024] (b) 잎맥이 하나의 뚜렷한 주맥과 불규칙한 그물맥의 패턴을 나타내나 전체적으로 사철란 잎에 더 가까움.
- [0025] 본 발명자들의 연구 결과, 탐라사철란 A 형태형은 사철란과 가장 유사한 형태적 특징을 나타내므로, 종종 사철란과 구분되기 어렵다. 따라서, 본 발명은 사철란과 탐라사철란의 A 형태형을 식별하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0026] 보다 바람직하게, 본 발명은 상기 102번째 염기에서 A 및 G가 함께 확인되고, 206번째 염기에서 C 및 T가 함께 확인되고, 441번째 염기에서 A 및 G가 함께 확인되고, 및 513번째 염기에서 C 및 T가 함께 확인되는 경우 탐라사철란 형태형 A인 것으로 동정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0027] 또 하나의 바람직한 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 194번째 염기, 441번째 염기 및 643번째 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는, 다음의 특징을 가지는 탐라사철란 형태형 B를 동정하는 방법에 관한 것이다:
- [0028] (a) 잎의 색이 황록색 또는 황자색임; 및
- [0029] (b) 잎맥이 하나의 뚜렷한 주맥, 규칙적인 측맥과 측맥들 사이의 그물맥으로 구성됨.
- [0030] 보다 바람직하게, 본 발명은 상기 102번째 염기에서 A 및 G가 함께 확인되고, 194번째 염기에서 C 및 T가 함께 확인되고, 441번째 염기에서 A 및 G가 함께 확인되고, 및 643번째 염기에서 A 및 T가 함께 확인되는 경우 탐라사철란 형태형 B인 것으로 동정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0031] 또 하나의 바람직한 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 161번째 염기, 191번째 염기, 194번째 염기, 234번째 염기 및 643번째 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는, 다음의 특징을 가지는 탐라사철란 형태형 C를 동정하는 방법에 관한 것이다:
- [0032] (a) 잎의 색이 황록색 또는 황자색임; 및
- [0033] (b) 잎맥이 뚜렷한 주맥과 소수의 규칙적 측맥 사이에 불규칙적인 그물맥의 패턴을 나타내나 사철란 잎에 가까운 형태임.
- [0034] 보다 바람직하게, 본 발명은 상기 161번째 염기에서 G 및 T가 함께 확인되고, 191번째 염기에서 C 및 T가 함께 확인되고, 194번째 염기에서 C 및 T가 함께 확인되고, 234번째 염기에서 C 및 T가 함께 확인되고, 및 643번째 염기에서 A 및 T가 함께 확인되는 경우 탐라사철란 형태형 C인 것으로 동정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0035] 또 하나의 바람직한 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 514번째 염기 또는 643번째 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는, 다음의 특징을 가지는 탐라사철란 형태형 D를 동정하는 방법에 관한 것이다:
- [0036] (a) 잎의 색이 자녹색임; 및

- [0037] (b) 잎맥이 하나의 뚜렷한 주맥과 규칙적인 측맥과 측맥들 사이의 그물맥으로 구성되나 털사철란 잎에 더 가까운 형태임.
- [0038] 보다 바람직하게, 본 발명은 상기 514번째 염기에서 G 및 T 가 함께 확인되거나, 또는 643번째 염기에서 A 및 T 가 함께 확인되는 경우 탐라사철란 형태형 D인 것으로 동정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 구체적인 실시 예에서는, 본 발명에서는 제주도에서 사철란 12 개체, 털사철란 9 개체, 붉은사철란 5 개체, 섬사철란 5 개체, 탐라사철란 17 개체, 강원도에서 애기사철란 2 개체, 및 서울에서 로켓사철란 3 개체의 표본을 채집하여 이들로부터 추출된 핵DNA 시료로부터 ITS 부위 염기 번이를 조사하여 염기 다형성 마커를 발굴 하였으며, 탐라사철란의 4가지 형태형으로 분류된 개체들 중, 이들 몇몇 개체의 염기서열을 대표적으로 서열목록에 기재하였다.
- [0040] 보다 상세하게, 본원의 서열번호 1, 2는 각각 탐라사철란 형태형 A 에 포함되는 탐라사철란 A282 및 A283 개체의 ITS 부위를 나타내었고, 서열번호 3, 4는 각각 탐라사철란 형태형 B 에 포함되는 탐라사철란 B140 및 B241 개체의 ITS 부위를 나타내었고, 서열번호 5, 6은 각각 탐라사철란 형태형 C 에 포함되는 탐라사철란 C286 및 C289 개체의 ITS 부위를 나타내었고, 서열번호 7~10는 각각 탐라사철란 형태형 D 에 포함되는 탐라사철란 D244, D276, D277, 및 D630 개체의 ITS 부위를 나타내었다.
- [0041] 아울러, 서열번호 11은 사철란의 ITS 부위를, 서열번호 12는 털사철란의 ITS 부위를 나타내었다.
- [0042] 본 명세서 전체를 걸쳐, 본 발명이 제공하는 다형성 마커 염기의 위치(번호)를 표시할 때 편의상 서열번호 1을 기준으로 염기 위치를 나타내었지만, 상기 서열번호 1 내지 12은 모두 동일한 ITS 영역을 나타내기 때문에, 서열번호 2 내지 11 중 어느 것을 기준으로 다형성 염기의 위치를 확인해도 무방하다.
- [0043] 본 발명은 또한, 상기와 같은 염기 다형성을 검출할 수 있는 제제를 포함하는 탐라사철란 동정용 조성물 및 동정용 키트를 제공한다.
- [0044] 하나의 바람직한 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 161번째 염기, 191번째 염기, 194번째 염기, 206번째 염기, 234번째 염기, 441번째 염기, 513번째 염기, 514번째 염기 및 643번째 염기로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기의 다형성을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 탐라사철란 동정용 조성물에 관한 것이다.
- [0045] 보다 바람직한 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 206번째 염기, 441번째 염기 및 513번째 염기의 다형성을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 탐라사철란 형태형 A의 동정용 조성물에 관한 것이다.
- [0046] 또 하나의 보다 바람직한 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 194번째 염기, 441번째 염기 및 643번째 염기의 다형성을 확인하는 단계를 포함하는, 탐라사철란 형태형 B의 동정용 조성물에 관한 것이다.
- [0047] 보다 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 161번째 염기, 191번째 염기, 194번째 염기, 234번째 염기 및 643번째 염기의 다형성을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 탐라사철란 형태형 C의 동정용 조성물에 관한 것이다.
- [0048] 또 하나의 보다 바람직한 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 514번째 염기 또는 643번째 염기의 다형성을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 탐라사철란 형태형 D의 동정용 조성물에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명에서 상기 염기 다형성을 검출할 수 있는 제제는 상기 특정 위치의 염기를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브인 것이 바람직하다.
- [0050] 본 발명에서 "프라이머(primer)" 는 작동인자에 의해 결정된 혼성화 조건 또는 반응조건에서 특이적으로 표적 DNA 서열과 결합하는데 충분한 길이의 뉴클레오티드를 말한다. 이러한 길이는 선택되는 탐지 방법에 충분한 길이일 수 있다. 일반적으로 11개 이상 뉴클레오티드 길이, 18개이상 뉴클레오티드 길이, 및 22개 이상 뉴클레오티드 길이를 사용할 수 있다. 본 발명에서는 서열번호 1을 포함하는 ITS 영역 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머를 이용하여 상기 표적 부위를 증폭시킬 수 있으며, 서열 증폭 및 서열 확인 결과 원하는 염기 다형성이 나타났는지 여부를 통하여 탐라사철란을 동정할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 용어, "프로브(probe)" 란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백

염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 서열번호 1을 포함하는 ITS 영역 서열에 특이적으로 결합하는 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 탐라사철란을 동정할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0052] 이러한 프라이머와 프로브는 고도로 엄격한 혼성화 조건하에서 표적서열과 특이적으로 혼성화할 수 있다. 본 발명의 양태에 따르는 프라이머는 표적 서열과 인접한 뉴클레오타이드와 DNA 서열 유사성을 지닐 수 있지만, 표적 DNA 서열과 상이하더라도 표적 DNA서열과 혼성화 할 수 있는 능력을 보유하고 있는 프로브가 통상적인 방법에 의해 고안될 수 있다.

[0053] 더욱 구체적으로 본 발명의 상기 프라이머 또는 프로브는 서열번호 1로 표시되는 ITS 영역 염기서열의 102번째 염기, 161번째 염기, 191번째 염기, 194번째 염기, 206번째 염기, 234번째 염기, 441번째 염기, 513번째 염기, 514번째 염기 및 643번째 염기로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기를 포함하는 10개 내지 100개의 연속적인 염기서열 또는 이에 상보적인 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명에서 "동정용 키트"는 본 발명의 방법 양태를 수행하기 위하여, 보다 상세하게는 생물학적 샘플 중 탐라사철란을 확인하기 위한 시약 세트를 지칭한다. 본 발명의 키트는 식물성 재료 또는 식물성 재료를 포함하거나 또는 PCR에 사용될 효소, PCR을 검출할 수 있는 수단, 및/또는 dNTP 및 사용설명서를 포함할 수 있고, PCR 산물의 증폭여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성성분 또는 공지된 품종에 대한 동정 기준표들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다. 상기 식물성 재료는 식물로부터 수득하거나 이로부터 유래되는 재료를 지칭한다.

[0055] 본 발명에서 상기 염기 다형성 마커는, 이에 한정되는 것은 아니지만, 일반 PCR, 실시간 PCR, 역전사 PCR (RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR (Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR) 등의 증폭 수단 및 서열 확인을 통하여 검출될 수 있다.

발명의 효과

[0056] 본 발명에 의한 동정 방법, 동정하기 위한 조성물 및 키트를 이용하여 탐라사철란을 신속하고 정확하게 구별할 수 있다. 본 발명의 동정 기술을 이용하여, 탐라사철란의 자원과 가치를 보존하고, 탐라사철란 고유의 관상적 가치를 활용하여 인위적 배양 및 재배를 위한 재배 기술을 확립할 수 있으며, 나아가 난과 식물자원보전 및 다양성 유지를 위한 체계적 관리시스템을 구축할 수 있는 기반을 마련할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 사철란, 털사철란 및 탐라사철란은 4가지 형태형(A, B, C, D)의 형태학적 모습을 나타내었다.

도 2는 ITS 영역의 염기서열을 이용한 최대절약분석(maximum parsimony, MP)에서 얻어진 최대절약 계통도(most parsimonious tree, MP 계통도)를 나타낸다.

도 3은 3개의 비암호화(noncoding) cpDNA 서열(*trnH-psbA*, *trnS-trnG*, *trnL* 인트론)을 기반으로 얻어진 MP계통도(most parsimonious tree)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하, 본 발명을 실시 예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시 예에 의해서만 한정되는 것은 아니다.

[0059]

[0060] 실시예 1: 식물 재료의 준비

[0061] 제주도 지역에서 사철란(*G. schlechtendaliana*) 12 개체, 털사철란(*G. velutina*) 9 개체, 붉은사철란(*G. biflora*) 5 개체, 섬사철란(*G. maximowicziana*) 5 개체, 및 탐라사철란(*G. x tamnaensis*) 17 개체, 강원도지역

에서 애기사철란(*G. repens*) 2 개체, 서울지역에서 로젯사철란(*G. rosulacea*) 3 개체의 표본을 채집하여 본 발명의 연구에 사용하였다.

실시예 2. 형태학적 분석 및 DNA 분석 방법

형태학 및 DNA분석에 사용한 식물 재료들 및 유전자등록번호(GenBank accession number)는 부록1에 기재되어 있고, 모든 표본들은 이화여자대학교 식물표본실(EWH)에 보관되어 있다. 3개의 분류군에서 14개의 형태학적 특징들을 관찰하고 측정하였다. DNA의 재료로 사용된 잎은 모든 형태학적 및 서식지의 다양성을 포함하는 개체군으로부터 수집하였다. 한국산 사철란속(*Goodyera*)에 속하는 총 6개의 종과 교배종(hybrid)로 추정되는 탐라사철란을 표본으로 사용하였다. 한국산 사철란속에 속하는 종들 중 하나인 로젯사철란(*G. rosulacea*)은 외집단(outgroup)으로 사용하였다. 핵의 내부전사지역(ITS) 계통연구를 위해 탐라사철란의 17개 식물체로부터 직접적인 서열(11 accessions)과 클로닝된 서열(14 accessions)을 포함하여 한국산 사철란속 식물 7종으로부터 총 67 accessions을 분석하였다. 몇 가지 기술적 어려움이 있기 때문에, 탐라사철란의 몇몇 개체(277, 282, 630)는 클로닝 되지 않았고, 몇몇 개체(265, 266, 284, 285, 278, 288)는 다른 리보타입(ribotype)을 가지고 있기 때문에 PCR 결과물로부터 직접적인 서열을 얻을 수 없었다. cpDNA의 계통연구를 위해 탐라사철란의 10개 개체를 포함하여 총 36 accessions 모두를 분석하였고, 세 개의 cpDNA 비암호화 지역(noncoding region), 즉 *trnH-psbA*, *trnS-trnG*, 및 *trnL*인트론을 분석하였다.

전체 게놈 DNA를 DNeasy plant mini kit(Qiagen Inc., Valencia, California)를 이용하여 추출하였다. 증폭 및 염기서열결정(sequencing)반응에 쓰이는 프라이머(primer)는, 내부전사지역(ITS region)의 ITS4, ITS5, ITS2 및 ITS3; *trnH-psbA* intergenic spacer의 trnHR 및 psbA; *trnS-trnG* intergenic spacer의 trnS(GCU)와 trnG(UCC); 및 *trnL*(UAA) 인트론 지역의 c, d 를 사용하였으며(표 1), 하기 표 2에 기재된 조건에서 PCR을 실시하였다.

표 1

	프라이머 서열	서열번호
psbAF	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT C	13
trnHR	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	14
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	15
ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	16
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	17
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	18
trnS(GCU)	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC	19
trnG(UCC)	TTA CCA CTA AAC TAT ACC C	20
trnH	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	21
psbA	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT C	22
trn c	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	23
trn d	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	24

표 2

Denaturation	94℃, 1분	36 cycles
Annealing	54℃, 1분	
Extension	72℃, 1분	

PCR을 수행하여 얻어진 결과물들은 QIAquick PCR purification Kit(Qiagen)을 이용하여 정제하였다.

양친종으로 추정되는 식물에 2개의 리보타입(ribotype)이 존재하는지 여부를 확인하기 위하여, 탐라사철란의 nrDNA의 내부전사지역(ITS)의 PCR 결과물들을 pGEM-T Easy Vector System II (Promega, Madison, Wisconsin)을 사용하여 클로닝하였다. 형질전환된 세포들을 항생제 암피실린(ampicillin)이 포함된 LB-agar 배지에 도말하였으며, 이로부터 탐라사철란의 85개 흰색 콜로니(colony)가 나타났다 (A형태 15, B형태 32, C형태 25, D형태

13). 나타난 콜로니들로부터 클로닝되어 들어간 DNA의 사이즈가 맞는지 여부를 PCR을 이용하여 확인하고, 스크리닝(screening)하였다.

[0069] 정제된 PCR 결과물에 대해 Big Dye Terminator cycle sequencing reagent를 이용하여 염기서열결정(sequencing)반응을 진행하였다. 염기서열결정반응에 사용한 프라이머는 증폭에 사용한 프라이머와 동일하다. Sequencher version 4.2.2 를 이용하여 서열 조각을 모아서 편집하였다. Clustal X 프로그램을 사용하여 내부전사지역(ITS)와 cpDNA 지역을 각각 정렬하였다. 상기로부터 얻어진 ITS와 combined cpDNA의 결과를 최대절약분석(maximum parsimony, MP) 하고, gap을 missing data로 처리하였으며, 다음 분석에서 gap은 binary character로 처리하였다. 분석방법으로는 Heuristic MP search를 하였는데, tree-bisection-reconnection(TBR) branch swapping을 선택하여 분류군의 random stepwise addition과 함께 1,000회 반복하여 multiple tree를 작성하였다. 부트스트랩 값(bootstrap value)은 TBR branch swapping과 simple stepwise addition을 이용하여 5,000회 반복 분석한 후 계산하였다. 또한 모델테스트 3.7에서 수행된 likelihood ratio test에 기반하여 선택된 모델과 maximum likelihood(ML) 분석을 실시하였다. 모델 파라미터는 PAUP와 Heuristic search를 이용하여 수행되었다.

[0070] 실험결과

[0071] 1. 형태학적 분석 결과

[0072] 탐라사철란과 이의 양친종일 것으로 추정되는 사철란(*G. schlechtendaliana*) 및 털사철란(*G. velutina*)을 도 1에 나타내었으며, 이들의 형태학적인 특징을 비교한 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

특징	사철란	탐라사철란	털사철란
잎의 색	녹색	녹색(A), 황자색(B,C), 자녹색(D)	어두운 자녹색, 녹색
주맥	흐림	진함	진함
측맥	불규칙적	규칙적	숨겨짐(규칙적)
그물맥	존재	존재	없음
잎의 수	2-3	3-4	4-5
잎모양	타원형	창모양	달걀모양
잎의길이(cm)	1.4-4.0	2.0-4.0	2.0-4.0
잎의넓이(cm)	1.1-1.8	1.0-2.3	1.0-2.5
꽃줄기길이(cm)	10-20	10-20	8-15
꽃줄기털길이(mm)	0.3-0.4	0.1	0.1
꽃의 수	7-12	9-10	6-12
꽃의 색	열은 분홍빛이 있는 흰색	밝은분홍	열은분홍(하얀색)
꽃의크기(cm)	0.7-1.0	1.1-1.5	0.5-1.0
씨방	0.8-1.0	0.5-0.7	0.5-0.8

[0074] 일반적으로 탐라사철란은 양친 사이의 중간적인 특징을 나타내는데, 예를 들면, 그물맥이 있는 황자색 또는 자녹색의 잎이 있으며 하나의 식물당 3개 내지 4개의 잎이 있는 것으로 관찰되었다. 또한, 하나의 화경에 9개 내지 10개의 꽃이 피고, 꽃은 담홍색이었다. 탐라사철란은 사철란의 특징을 나타내기도 하는데, 예를 들면, 그물맥의 무늬가 있는 잎, 잎의 모양, 화경의 길이가 사철란과 공통적으로 나타나는 특징인 것으로 관찰되었다. 또한 탐라사철란은 털사철란과 유사한 특징을 나타내기도 하는데, 예를 들면, 잎의 진한 주맥과 규칙적인 측맥, 잎의 크기, 꽃의 색깔, 자방의 길이, 화경에 있는 털의 길이가 털사철란과 공통적으로 나타나는 특징인 것으로 관찰되었다. 그러나 탐라사철란의 꽃의 포엽의 길이는 두 양친종 보다 길이가 더 길다는 점에 차이가 있었다. 또한, 형태학적 분석 결과를 토대로 하여 탐라사철란은 잎맥과 잎 색에 따라 4개의 형태형으로 분류할 수 있었다. A 형태형은 사철란과 가장 비슷하여, 사철란과 구분하기 어려운 경우가 많았다. C 형태형 역시 사철란과 유사하나, 측맥이 덜 규칙적이었다. 탐라사철란의 B, D 형태형은 하나의 뚜렷한 주맥과 규칙적인 측맥이 정교한 무늬를 이루고 있으나, D 형태형은 자녹색 잎을 나타낸다는 점에서 털사철란에 더 유사하였다.

[0075] 2. 분자적 분석 결과 : NrITS 분석

[0076] 내부전사지역-1(ITS-1)의 길이는 238-240bp 정도이며, 5.8S의 길이는 163bp, 내부전사지역-2(ITS-2)의 길이는 290-292bp였다. 정렬된 697개의 염기들 중에서 588개가(83.4%) 일치하였고, 57개는(8.2%) 절약분석상의 정보가 거의 없었으며, 52개(7.5%)는 계통학적 정보를 나타내었다. 전체 내부전사지역(ITS) 서열을 최대절약분석(maximum parsimony, MP)한 결과, 154의 tree length(TL), 0.77의 일치지수(consistency index, CI, 비정보 부분 제외하면 0.62), 0.95의 보존지수(retention index, RI)를 가지는 29,110 엮피계통도(most parsimonious tree)를 도출하였다. 도 2에 29,100 엮피계통도(most parsimonious tree)중 하나를 나타내었다. 전반적으로, branch 들은 짧은 branch length 와 관련되어 약하게 지지됨을 볼 수 있었다. 탐라사철란의 직접적인 또는 클로닝된 서열들 모두, 사철란의 12개 개체를 포함하는 A 그룹과 털사철란의 9개 개체를 포함하는 B 그룹으로 클러스터를 형성하였다. 사철란과 털사철란 내에서는 반복되는 내부전사지역(ITS) 형태의 변이가 없었으며, 또한 다형성 지역도 발견할 수 없었다.

[0077] 모델테스트를 통해 ITS 결과 및 ML분석에 대해 가장 알맞은 모델로서 선정된 TVM+I+G를 이용하여 23개의 동일한 tree를 발견하였다. 이 tree들이 짧은 branch length 를 가지는 것에 대해서는 잘 해결하지 못했으나, *G. biflora*의 위치를 제외한 엮피계통도(most parsimonious tree) 중 하나와 비슷함을 알 수 있었다 (도 2).

[0078] 또한, 내부전사지역 서열(ITS sequence)을 전기영동상(electropherogram)의 피크(peak)와 겹쳐봄으로써 다형성을 추정하였으며, 이로부터 탐라사철란의 18개의 뉴클레오티드(nucleotide) 부위에서 다형성이 나타났다 (표 4).

표 4

[0079]

분류군	base type	55	56	79	88	102	161	191	194	206	234	434	441	465	513	514	515	530	643
S		A	A	G	A	G	T	C	C	T	C	T	G	A	T	G	A	A	A
T	A282					R				Y		D	R	R	Y	D	R	R	
T	A283	R	R	R	S	R				Y			R		Y				
T	B140					R			Y				R						M
T	B241					R			Y				R						M
T	C286						D	Y	Y		Y					D	R		M
T	C289						D	Y	Y		Y								M
T	D244						D		Y					R					M
T	D276															D			
T	D277															D			M
T	D630																		M
V		G	G	A	C	A	G	T	T	C	T	G	A	G	C	T	G	G	T

[0080] ** 분류군 S는 사철란, T는 탐라사철란, V는 털사철란을 나타냄

[0081] ** type, base: type은 탐라사철란의 염기의 변이에 의한 유형 (A=사철란에 가까움, D=털사철란에 가까움)을 나타내고, base는 염기위치를 나타냄

[0082] ** Y 는 C/T, R은 A/G, D는 G/T, M은 A/T, S는 C/A를 나타냄

[0083] **type 옆의 숫자는 개체에 부여한 임의의 숫자임

[0084] 다형성 분석 결과, 18개의 다형성 부위 중, 탐라사철란 A 형태형의 경우 102(R), 206(Y), 441(R) 및 513(Y) 위치에서 공동의 중 특유의 염기를 공유하였고, 탐라사철란 B 형태형의 경우 102 (R), 194(Y), 441(R) 및 643(M) 위치에서 공동의 중 특유의 염기를 공유하였으며, 탐라사철란 C 형태형의 경우 161(D), 191(Y), 194(Y), 234(Y), 643(M) 위치에서 공동의 중 특유의 염기를 공유하였고, 탐라사철란 D 형태형의 경우 514(D) 또는 643(M) 위치에서 공동의 중 특유의 염기를 공유하는 것으로 분석되었다. 다른 종들(즉, *G. velutina*, *G.*

schlechtendalia, *G. biflora*, *G. maximowicziana*, *G. repens* 및 *G. rosulacea*)에는 다형성 부위가 없었음을 생각해볼 때, 본 발명에서 확인한 탐라사철란의 다형성 뉴클레오티드(nucleotide) 부위는 탐라사철란이 잡종임을 뒷받침하는 것이다.

[0085] 3. 분자적 분석 결과 : Combined cpDNA 분석

[0086] 사철란의 1,839bp로부터 애기사철란(*G. repens*)의 1,651bp까지의 범위에 있는 36 accession에 대하여 *trnH-psbA*, *trnS-trnG*, *trnL* 인트론의 조합된 염기서열(sequence)을 조사하였다. 이 서열들을 다중정렬하여 1,887개의 위치에서 결과를 보았다. 정렬된 위치를 볼 때, 1,743개(92.4%) 부위가 일정했고, 3개(0.16%) 부위는 절약분석상의 정보가 거의 없었고, 141개 부위(7.47%)가 형태학적 정보를 나타내었다. 최대절약분석(maximum parsimony, MP)하여 157의 tree length(TL), 0.94의 일치지수(consistency index, CI, 비정보 부분은 제외), 0.99의 보존지수(retention index, RI)를 가지는 9개의 엮피계통도(most parsimonious tree)를 발견하였다. 도 3에 9 엮피계통도(most parsimonious tree) 중 하나를 나타내었다. 엮피계통도(MP tree)는 엄밀히 일치된 tree에서 단 하나의 branch만 붕괴될 뿐 잘 분석되었다. 12곳의 명확한 indel (insertion and deletion, 삽입 또는 삭제)을 포함하는 Combined cpDNA 서열을 최대절약분석(MP)하여 171의 tree length(TL), 0.94의 일치지수(consistency index, CI, 비정보 부분은 제외), 0.99의 보존지수(retention index, RI)를 가지는 9개의 엮피계통도(most parsimonious tree)를 도출하였다. 9개의 엮피계통도(most parsimonious tree)는 gap이 missing data로 처리된 것과 동일하였다. 모델테스트를 통해 Combined cpDNA 서열에 가장 알맞은 모델로서 선정된 K81uf+G를 이용하여 ML분석을 하였고, 이후 분석을 통해 하나의 tree를 발견하였다(-ln=3,498.5625). 이 ML tree는 도 3의 MP tree와 동일하다. cpDNA tree에서, 탐라사철란의 3가지 형태형(A,B,C)과 사철란이 28 치환과 100% 부트스트랩 값(bootstrap value)으로서 단일계통의 그룹을 형성하였으나, 탐라사철란과 사철란의 D 형태는 6 치환과 98% 부트스트랩 값(bootstrap value)으로 단일계통의 그룹을 형성하였다. 탐라사철란의 5개체(79, 140, 241, 286, 289)와 사철란에서 일치하는 haplotype은 하나가 발견되었다. 탐라사철란의 5개 개체 중 286번은 15bp가 결실되었다. 탐라사철란의 두 개체(282, 283번)는 두 개체 내에서 하나의 염기쌍이 치환된 분계도(clade)(A to C)와 다른 haplotype을 갖는다. 사철란과 달리, 털사철란은 더 다양한 haplotype을 나타내며, 이 중에서는 4개의 haplotype을 발견하였다. 탐라사철란의 두 개체(282, 283)는 털사철란의 270, 271, 290개체와 동일한 haplotype을 가지는 반면, 244번 개체는 털사철란의 30, 269 개체와 동일한 haplotype을 갖는다. cpDNA tree로부터 제시된 한국산 사철란속에 속하는 종 사이의 계통발생 관계에 관하여, 붉은사철란은 털사철란 및 섬사철란과 자매관계이며, 상기 섬사철란은 털사철란과 붉은사철란의 분계조 (clade)와 자매관계이다. 사철란은 상기 3종에서 분기되었으며, 이들 4종(사철란, 섬사철란, 붉은사철란, 털사철란)을 포함하는 분계조 (clade)는 애기사철란과 로젯사철란으로부터 분기되었다.

[0087] 한편, 표 5는 탐라사철란의 모계부모를 결정하기 위한 cpDNA에서의 뉴클레오티드 부위를 나타낸다. 각 열의 숫자들은 4가지 형태의 탐라사철란이 부모군의 특정 뉴클레오티드를 공유하는 염기위치를 의미하며, 그 아래 칸에서의 값은 각 염기에서 배제되는 것을 나타내었다: 1(TATAG), 2(TATAGGTATAG), 3(GAGTATAGGTATAGTCTTTATAGTATACTAA), 4(TACAAAA), 5(TAG), 6(GCGA), 7(ATCACA), 8(TTT). 이에 의하면, 탐라사철란의 형태형 A, B, C는 사철란의 cpDNA 서열과 동일하였으며, 이는 사철란이 탐라사철란의 형태형 A, B, C의 모계 부모임을 나타낸다. 또한, 탐라사철란 형태형 D는 털사철란의 cpDNA 서열과 동일하였으며, 이는 사철란이 탐라사철란 형태형 D의 모계 부모임을 나타낸다.

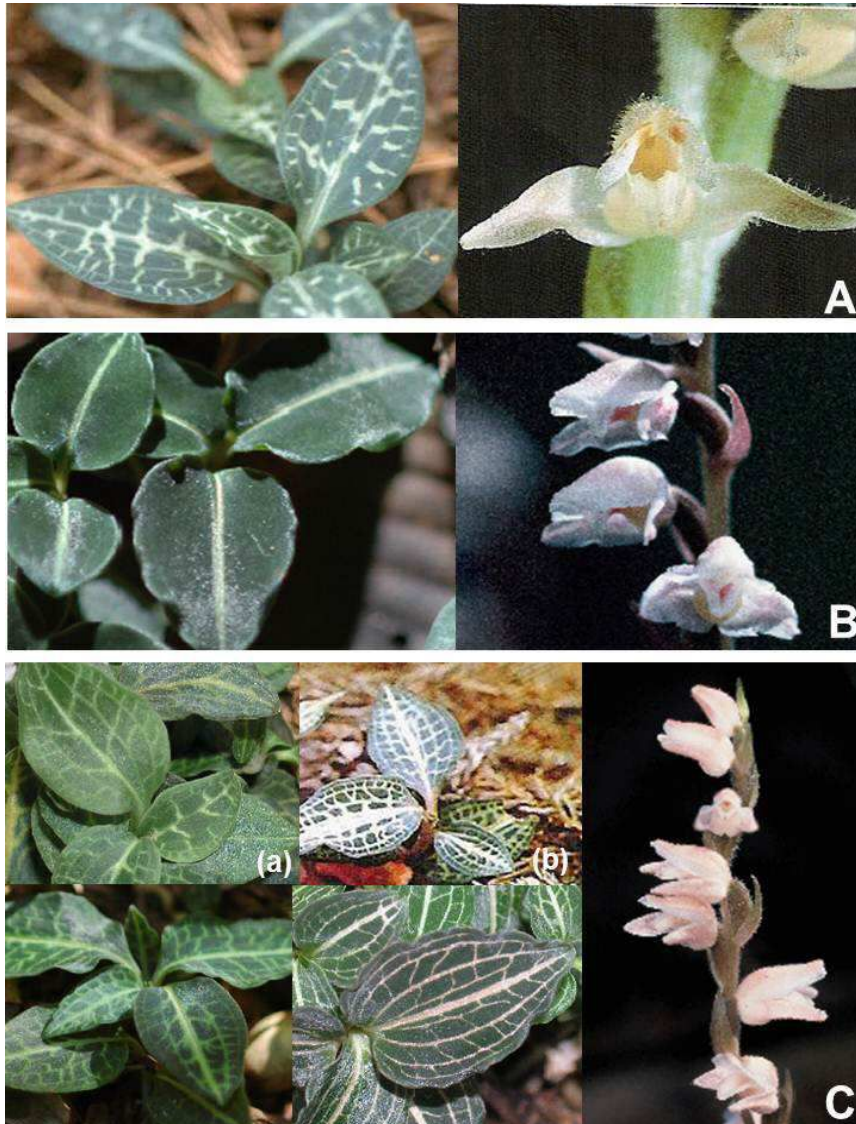
5 5

	<i>trnH-psbA</i>												<i>trnS-trnG</i>												<i>trnL</i>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Taxa	1	1	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	9	9	9	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1</

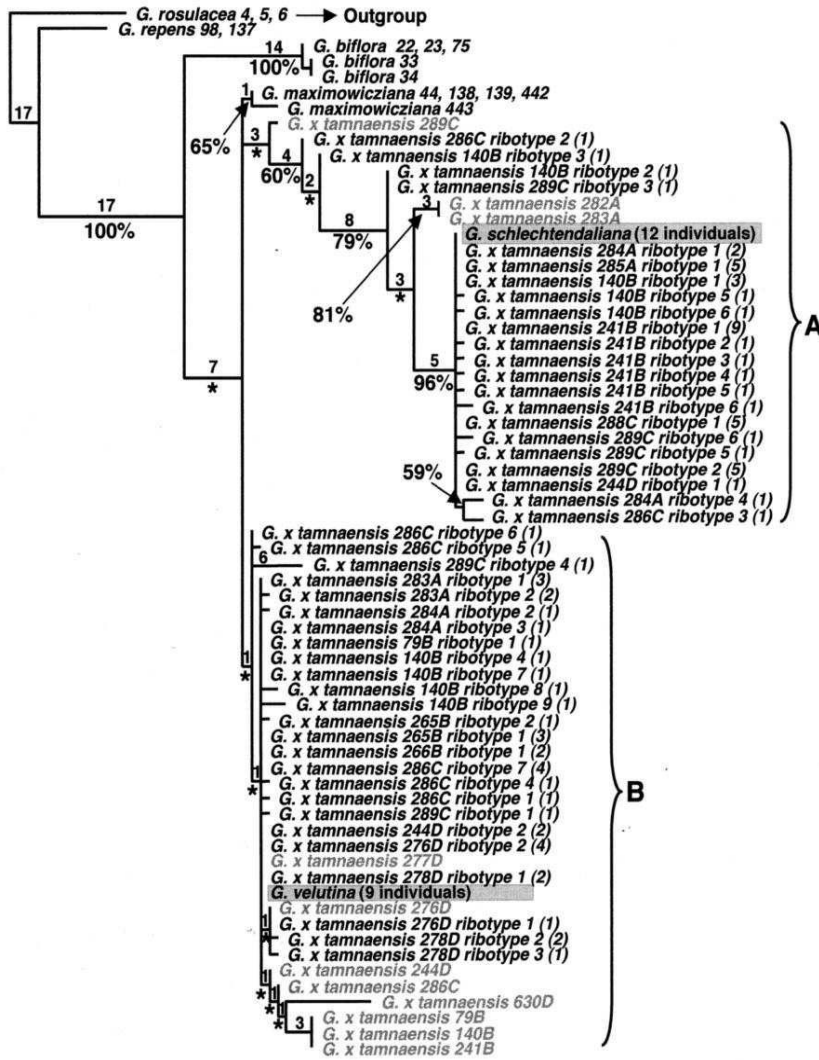
[0088]

도면

도면1

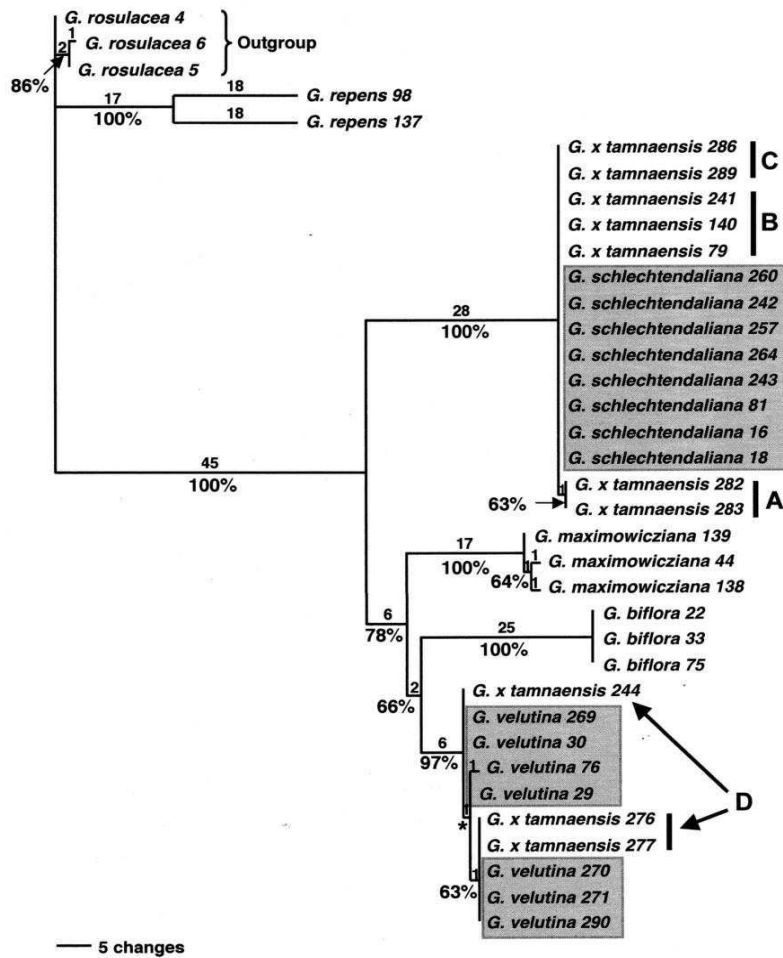


도면2



- 1 change

도면3



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> A method, composition, and kit for the identification of *Goodyera* x *tamnaensis*
- <130> DPP20130761KR
- <160> 24
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 698
- <212> DNA
- <213> *Goodyera* x *tamnaensis*_282A
- <220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> r is a/g; y is c/t; d is g/t; m is a/t; s is c/a; and n is absent

<400> 1

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcggttga cggcgatcgc 60

tgtctataaa caccatccat ctattgtccc ttcttgatcg grgctacaat gaaaagatgg 120

aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa ttaigtctga ttanngcatc 180

gatggctant ccgcaaaaag cccggygggg ttagcggatt gctgtgttg cticctaagt 240

attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcat cgatgaagag cgcagcgaaa 300

tgcgatacgt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg 360

cgcccagggc caattggcta agggcacgtc cgcctgggcg tcaagcatta cgtcgttca 420

ttcgacacca attdccaat rttgtgttnn gcggtgccgg tttgratgag gagagtggcc 480

cttcgcgcac acttgtgcga cgggttgaag aaydrtttgc tttctctgr ccatgttttg 540

ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg ccacacgtat catctcattg tctcaggag 600

gatattgtga cacattcgtg gcagatcacc cgatacatgt cgaagggtggc gccatgaaat 660

gcgaccccag gatgggcggg atgacccgct gagtttaa 698

<210> 2

<211> 698

<212> DNA

<213> Goodyera x tamnaensis_283A

<220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> r is a/g; y is c/t; d is g/t; m is a/t; s is c/a; and n is absent

<400> 2

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcrrttga cggcgatcgc 60

tgtctatara caccatccat ctattgtscg ttcttgatcg grgctacaat gaaaagatgg 120

aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa ttaigtctga ttanngcatc 180

gatggctant ccgcaaaaag cccggygggg ttagcggatt gctgtgttg cticctaagt 240

attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcat cgatgaagag cgcagcgaaa 300

tgcgatacgt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg 360

cgcccagggc caattggcta agggcacgtc cgcctgggcg tcaagcatta cgtcgttca 420

ttcgacacca attdccaat rttgtgttnn gcggtgccgg tttgaatgag gagagtggcc 480

cttcgcgcac acttgtgcga cgggttgaag aaygatttgc tttcctctga ccatgttttg 540
ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg cccacgctat catctcattg tctcgaggag 600
gatatgtgta cacattcgtg gcagatcacc cgatacatgt cgaagggtggc gccatgaaat 660
gcgacccag gatgggcggg atgacccgct gagtttaa 698

<210> 3

<211> 698

<212> DNA

<213> Goodyera x tamnaensis_140B

<220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> r is a/g; y is c/t; d is g/t; m is a/t; s is c/a; and n is absent

<400> 3

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcggttga cggcgattgc 60
tgtctataaa caccatccat ctattgtccc ttcttgattg grgctacaat gaaaagatgg 120
aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa ttatgctgca ttanngcatc 180
gatggctant tcgyaaaaag cccggcgggg ttagcggatt gctgttgttg cttcctaagt 240
attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcac cgatgaagag cgcagcgaaa 300
tgcgatacgt ggigtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg 360

cgcccagggc caattggcta agggcacgtc cgcttgggcg tcaagcatta cgtcgttca 420
ttcgacacca attgcccaat rttgtgtttn gcggtgccgg tttgaatgcg gagagtggcc 480
cttcgcgcac acttgtgcga cgggttgaag aactgtttgc tttcctctgg ccatgttttg 540
ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg cccacgctat catctcattg tctcgaggag 600
gatatgtgta cacattcgtg gctgatcacc cgataaatgt cgmagggtggc gccatgaaat 660
gcgacccag gatgggcggg atgacccgct gagtttaa 698

<210> 4

<211> 698

<212> DNA

<213> Goodyera x tamnaensis_241B

<220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> r is a/g; y is c/t; d is g/t; m is a/t; s is c/a; and n is absent

<400> 4

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcggttga cggcgattgc 60
tgtctataaa caccatccat ctattgtccc ttcttgattg grgctacaat gaaaagatgg 120
aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa ttatgctgca ttanngcatc 180
gatggctant tcgyaaaaag cccggcgggg ttagcggatt gctgttgttg cticctaagt 240
attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcac cgatgaagag cgcagcgaaa 300

tgcgatacgt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg 360
cgcccagggc caattggcta agggcacgtc cgcttggcg tcaagcatta cgtcgttca 420
ttcgacacca attgccaat rttgtgttn gcggtgccgg tttgaatgcg gagagtggcc 480
cttcgcgcac acttgtgca cgggttgaag aactgtttgc tttcctctgg ccatgttttg 540
ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg ccacgctat catctcattg tctcaggag 600
gatatgtgta cacattcgtg gctgacacc cgataaatgt cgmaggtggc gccatgaaat 660
gcgaccccag gatgggcggg atgacccgct gagtttaa 698

<210> 5

<211> 698

<212> DNA

<213> Goodyera x tamnaensis_286C

<220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> r is a/g; y is c/t; d is g/t; m is a/t; s is c/a; and n is absent

<400> 5

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcggttga cggcgattgc 60
tgtctataaa caccatccat ctattgtccc ttcttgattg gagctacaat gaaaagatgg 120
aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa dtatgctgca ttanngcatc 180
gatggctant ycyaaaaag cccggcgggg ttagcggatt gctgttgttg ctttyctaagt 240

attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcac cgatgaagag cgcagcgaaa 300
tgcgatacgt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg 360
cgcccagggc caattggcta agggcacgtc cgcttggcg tcaagcatta cgtcgttca 420
ttcgacacca attgccaat atttgtttn gcggtgccgg tttggatgcg gagagtggcc 480
cttcgcgcac acttgtgca cgggttgaag aacdrtttgc tttcctctgg caatgttttg 540
ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg ccacgctat catctcattg tctcaggag 600
gatatgtgta cacattcgtg gctgacacc cgataaatgt cgmaggtggc gccatgaaat 660

gcgaccccag gatgggcggg atgacccgct gagtttaa 698

<210> 6

<211> 698

<212> DNA

<213> Goodyera x tamnaensis_289C

<220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> r is a/g; y is c/t; d is g/t; m is a/t; s is c/a; and n is absent

<400> 6

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcggttga cggcgattgc 60

tgtctataaa caccatccat ctattgtccc ttcttgattg gagctacaat gaaaagatgg 120

aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa dtatgctgca ttanngcatc 180

gatggctant ycgysaaaag cccggcgggg ttagcggatt gctgttgttg cttyctaagt 240

attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcat cgatgaagag cgcagcgaaa 300

tcgatacgt ggigtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg 360

cggccgaggc caattggcta agggcacgtc cgcttgggcg tcaagcatta cgtcgttca 420

ttcgacacca attgccaat attgtgtttn gcggtgccgg ttggatgcg gagagtggcc 480

cttcgcgcac acttgtgca cgggttgaag aatgatttgc tttcctctgg caatgttttg 540

ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg ccacgctat catctcattg tctcaggag 600

gatatgtgta cacattcgtg gctgacacc cgataaatgt cgmagggtggc gccatgaaat 660

gcgaccccag gatgggcggg atgacccgct gagtttaa 698

<210> 7

<211> 698

<212> DNA

<213> Goodyera x tamnaensis_244D

<220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> r is a/g; y is c/t; d is g/t; m is a/t; s is c/a; and n is absent

<400> 7

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcggttga cggcgattgc 60

tgtctataaa caccatccat ctattgtccc ttcttgattg gagctacaat gaaaagatgg 120

aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa dtatgctgca ttanngcatc 180

gatggctant tcgyaaaaag cccggcgggg ttagcggatt gctgttgttg ctttctaagt 240
attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcac cgatgaagag cgcagcgaaa 300
tgcgatacgt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg 360
cgcccagggc caattggcta agggcacgtc cgcttggcg tcaagcatta cgtcgcttca 420
ttcgacacca attgcccaat attgtgtttn gcggtgccgg tttgratgag gagagtggcc 480
cttcgcgcac acttgtgcga cgggttgaag aactgtttgc tttcctctgg caatgttttg 540

ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg cccacgctat catctcattg tctcaggag 600
gatatgtgta cacattcgtg gctgacacc cgataaatgt cgmaggtggc gccatgaaat 660
gcgaccccag gatgggcggg atgacccgct gagtttaa 698

<210> 8

<211> 698

<212> DNA

<213> Goodyera x tamnaensis_276D

<220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> r is a/g; y is c/t; d is g/t; m is a/t; s is c/a; and n is absent

<400> 8

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcggttga cggcgattgc 60

tgtctataaa caccatccat ctattgtccc ttcttgattg gagctacaat gaaaagatgg 120
aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa gtatgctgca ttanngcatc 180
gatggctant tcgtaaaaa cccggcgggg ttagcggatt gctgttgttg ctttctaagt 240
attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcac cgatgaagag cgcagcgaaa 300
tgcgatacgt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg 360
cgcccagggc caattggcta agggcacgtc cgcttggcg tcaagcatta cgtcgcttca 420
ttcgacacca attgcccaat attgtgtttn gcggtgccgg tttggatgag gagagtggcc 480

cttcgcgcac acttgtgcga cgggttgaag aacdgtttgc tttcctctgg caatgttttg 540
ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg cccacgctat catctcattg tctcaggag 600
gatatgtgta cacattcgtg gctgacacc cgataaatgt cgtaggtggc gccatgaaat 660
gcgaccccag gatgggcggg atgacccgct gagtttaa 698

<210> 9

<211> 698

<212> DNA

<213> Goodyera x tamnaensis_277D

<220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> r is a/g; y is c/t; d is g/t; m is a/t; s is c/a; and n is absent

<400> 9

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcggttga cggcgattgc	60
tgtctataaa caccatccat ctattgtccc ttcttgattg gagctacaat gaaaagatgg	120
aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa gtatgctgca ttanngcatc	180
gatggctant tcgtaaaaag cccggcgggg ttagcggatt gctgttggtg ctttctaagt	240
attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcat cgatgaagag cgcagcgaaa	300
tgcgatacgt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg	360
cgcccagaggc caattggcta agggcacgtc cgcctgggcg tcaagcatta cgtcgcttca	420

ttcgacacca attgcccaat attgtgtttn gcggtgccgg tttggatgcg gagagtggcc	480
cttcgcgcac acttgtgcga cgggttgaag aacdgtttgc tttcctctgg caatgttttg	540
ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg cccacgctat catctcattg tctcgaggag	600
gatatgtgta cacattcgtg gctgatcacc cgataaatgt cgtaggtggc gccatgaaat	660
gcgaccccag gatgggcggg atgacccgct gagtttaa	698

<210> 10

<211> 698

<212> DNA

<213> Goodyera x tamnaensis_630D

<220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> r is a/g; y is c/t; d is g/t; m is a/t; s is c/a; and n is absent

<400> 10

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcggttga cggcgattgc	60
tgtctataaa caccatccat ctattgtccc ttcttgattg gagctacaat gaaaagatgg	120
aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa gtatgctgca ttanngcatc	180
gatggctant ccgtaaaaag cccggcgggg ttagcggatt gctgttggtg cttcctaagt	240
attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcat cgatgaagag cgcagcgaaa	300
tgcgatacgt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg	360

cgcccaggcg caattggcta agggcacgtc cgctggggcg tcaagcatta cgtcgcttca 420
 ttcgacacca attgcccaat gttgtgttn gcggggccgg tttggatgcg gagagtggcc 480
 cttcgcgcac acttgggcaa cgggttgaag aactgtttgc tttcctctgg caatgttttg 540
 ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg ccacacgtat catctcattg tctcgagaag 600
 gatatgtgta cacattcttg gctgacacc caataaatgt cgmagggtggc gccttgaaat 660
 gcaacccag gatgggcggg atgacccgct aagtttaa 698

<210> 11

<211> 698

<212> DNA

<213> Goodyera.schlechtendaliana

<220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> n is absent

<400> 11

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcaattga cggcgatcgc 60
 tgtctataga caccatccat ctattgtacc ttcttcacg gggctacaat gaaaagatgg 120
 aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa ttatgctgca ttanngcatc 180
 gatggctant ccgcaaaaag cccggtgggg ttagcggagt gctgttgttg cttcataagt 240
 attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcac cgatgaagag cgcagcgaaa 300

tcgatacgt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg 360
 cgcccaggcg caattggcta agggcacgtc cgctggggcg tcaagcatta cgtcgcttca 420
 ttcgacacca atttcccaat gttgtgttnn gcgggtgccg tttgaatgcg gagagtggcc 480
 cttcgcgcac acttgtgcga cgggttgaag aatgatttgc tttcctctga ccatgttttg 540
 ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg ccacacgtat catctcattg tctcgaggag 600
 gatatgtgta cacattcgtg gcagatcacc cgatacatgt cgaagggtggc gccttgaaat 660
 gcgacccag gatgggcggg atgacccgct gagtttaa 698

<210> 12

<211> 698

<212> DNA

<213> Goodyera velutina

<220><221> unsure

<222> (1)..(698)

<223> n is absent

<400> 12

tcgagaccct aaaaggattg gatgactttt gacaacacgt gagcggttga cggcgattgc 60

tgtctataaa caccatccat ctattgtccc ttcttgattg gagctacaat gaaaagatgg 120

aaggaaaaan taanctcggg cgcagttatg tgccaaggaa gtatgctgca ttanngcatc 180

gatggctant tcgtaaaaag cccggcgggg ttagcggatt gctgttgttg ctttctaagt 240

attgtatgac tctcggcaat ggatatcttg gctcttgcac cgatgaagag cgcagcgaac 300

tgcgatacgt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtttttga acgcaagttg 360

cgcccagaggc caattggcta agggcacgtc cgcctgggcg tcaagcatta cgtcgttca 420

ttcgacacca attgcccaat atttgttttn gcggtgccgg tttggatgca gagagtggcc 480

cttcgcgcac acttgtgcga cgggttgaag aactgtttgc tttcctctgg caatgttttg 540

ataaaggggt ggatgtatgc tgccatttgg cccacgctat catctcattg tctcaggag 600

gatatgtgta cacattcgtg gctgatcacc cgataaatgt cgtaggtggc gccatgaaat 660

gcgacccag gatgggcggg atgaccgct gagtttaa 698

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> psbAF primer

<400> 13

cgcgcatggt ggattcaca tc 22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trnHR primer

<400> 14

gttatgcatg aacgtaatgc tc 22

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITS4 primer

<400>	15	
tcctccgctt attgatatgc		20
<210>	16	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ITS5 primer	
<400>	16	
ggaagtaaaa gtcgtaacaa gg		22
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ITS2 primer	
<400>	17	
gctgcgttct tcatcgatgc		20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ITS3 primer	
<400>	18	
gcatcgatga agaacgcagc		20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	trnS(GCU) primer	
<400>	19	
gccgcttttag tccactcagc		20
<210>	20	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> trnG(UCC) primer
 <400> 20

ttaccactaa actataccc

19

<210> 21
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> trnH primer
 <400> 21

gttatgcatg aacgtaatgc tc

22

<210> 22
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> psbA primer
 <400> 22

cgcgcatggt ggattcaca tc

22

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> trn c primer
 <400> 23

cgaaatcggt agacgctacg

20

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> trn d primer
 <400> 24

ggggatagag ggacttgaac

20