



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월03일

(11) 등록번호 10-2051578

(24) 등록일자 2019년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6895 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2018.05)

C12Q 2600/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0118697

(22) 출원일자 2018년10월05일

심사청구일자 2018년10월05일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020150124615 A*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

충남대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

허윤강

대전광역시 유성구 계백로93번길 79-59(송정동)

송하영

대전광역시 유성구 죽동로 251, 303동 1701호(죽동, 푸르지오아파트)

이명진

대전광역시 서구 청사로 254, 101동 1405호(둔산동, 둥지아파트)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 6 항

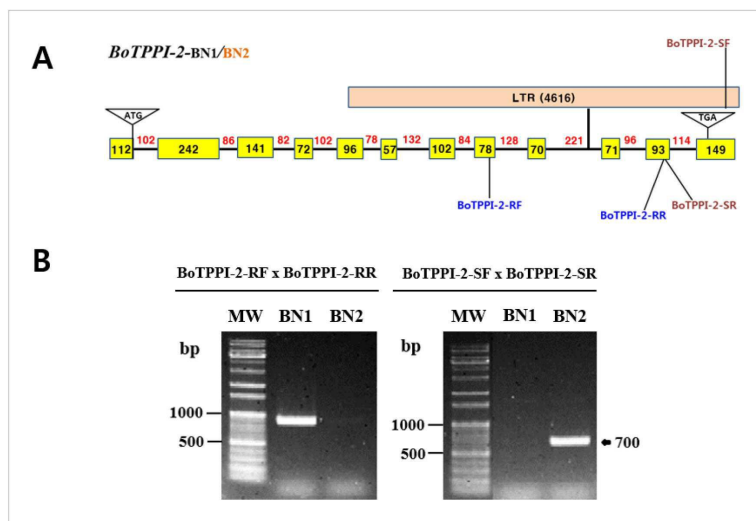
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 양배추 TPPI 유전자를 이용한 내서성 품종의 선별을 위한 특이 프라이머 세트 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 양배추 TPPI 유전자를 이용한 내서성 품종의 선별을 위한 특이 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 열 스트레스 저항성/민감성 품종을 구별할 수 있는 프라이머를 이용하면, 간단한 게놈 DNA PCR법을 통해서 양배추의 내서성 관련 형질을 양배추 육종 현장에서 어린 시기에 구별할 수 있다.

대표도 - 도12



(56) 선행기술조사문헌

GenBank accession No. XM_013753624
(2015.08.25.)*
Lahiri et al, J. Cell Physiol., 229(9),
pp.1245-1255, 2014.*
Nuccio et al, Nat. Biotechnol., 33(8),
pp.862-869, 2015.*
Virgilio et al, Eur. J. Biochem., 219,
pp.179-186, 1994.*
Wang et al, J. Plant. Physiol., 162(2),
pp.215-223, 2005.*
Qin et al, BMC Genomics, 2008, 9:432, 1-19
Dong et al, Genes Genom, 2014, 36:215-227
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	213007-05-2-SB620
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림수산식품기술평가원(IPET)
연구사업명	Golden Seed Project(GSP)
연구과제명	양배추 엽색, 숙기 및 중/아중 구분 관련 분자마커 개발
기 여 율	1/1
주관기관	충남대학교 산학협력단
연구기간	2017.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 16 및 17의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 및 서열번호 18 및 19의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 내서성 양배추 품종을 선별하기 위한 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 내서성 양배추 품종을 선별하기 위한 키트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 및 버퍼를 포함하는 것인 내서성 양배추 품종을 선별하기 위한 키트.

청구항 4

양배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 내서성 양배추 품종을 선별하기 위한 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질로 표지되어 있는 것인 내서성 양배추 품종을 선별하기 위한 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 증폭 단계의 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 내서성 양배추 품종을 선별하기 위한 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 양배추 *TPPI* 유전자를 이용한 내서성 품종의 선별을 위한 특이 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 트레할로스(trehalose)는 비환원2당류(non-reducing disaccharide)로서 박테리아, 곰팡이, 무척추 동물 및 식물 등 다양한 생물체에 존재하며, 에너지원과 각종 스트레스에 대항하는 삼투질 물질 또는 단백질과 막 보호제로 작용한다. 트레할로스의 화학적 성질은 탈수되는 효소, 단백질 및 지질막을 효과적으로 안정화시켜, 건조, 열 및 저온과 같은 다양한 환경스트레스에 대한 세포 및 생체구조물의 안정성을 가져오게 한다. 또한 트레할로스 및 그 중간대사물은 물질대사회로 및 식물생장의 신호분자로 작용하고, 공생과 해충저항성 등을 유발하는 잠재적인 신호전달물질로 작용한다.

[0003] 트레할로스의 합성은 진정세균에서는 3개의 다른 합성회로를 통하여 이루어지나, 식물을 포함한 진핵생물에서는 오직 하나의 TPS/TPP (trehalose phosphate synthase/trehalose phosphate phosphatase) 회로를 통해 이루어진다(Elbein et al., 2003 Glycobiology 13:17R-27R; Avoune et al., 2006 BMC Evol. Biol. 6:109-113). 따라서 식물의 트레할로스 합성은 2단계로 이루어진다: TPS 촉매로 UDPG (UDP-glucose)와 G6P (glucose-6-

phosphate)로부터 T6P (trehalose-6-phosphate)가 형성되는 단계와, TPP의 탈인산화반응으로 2당류인 트레할로스가 만들어지는 단계이다. 많은 수의 TPS 유전자와 TPP 유전자가 애기장대, 벼 및 다른 식물에 존재하는 것으로 보고되었다. 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에는 11개의 TPS 유전자가 존재하나, 오직 하나 *AtTPSI* 유전자만이 활성이 있는 TPS 효소를 암호화한다. TPP 유전자는 10개 (*TPPA~TPPJ*)가 4개의 염색체에 분포하며 생장과 발달에 따라 T6P와 트레할로스 양을 조절하며, 그 중에 *TPPI* 유전자는 잎원기, 생장점 및 뿌리에서 발현되며, 꽃기관에서는 발현이 되지 않아 조직특이적 발현을 보이는 것으로 알려졌다.

[0004] 식물에서 트레할로스 양은 비교적 낮은 수준으로 존재하나, 환경스트레스를 받으면 함량이 증가한다. 따라서, 여러 식물에서 트레할로스 축적은 비생물학적 스트레스에 저항성을 주거나 생존을 개선하는 것으로 알려졌다. 애기장대 TPP 유전자는 다양한 비생물학적 스트레스에 반응하여 발현양상의 차이를 보인다. 그 중에서 *AtTPPI* 유전자 발현은 저온과 상처에 의해 발현이 유도되며, 염분과 건조에 의해서는 발현이 약하게 유도되나, 고온과 자외선(UV-B)에 의해서는 발현이 억제된다. TPP 유전자가 도입된 형질전환 식물체를 이용한 연구에서, 미생물 유전자를 도입하여 트레할로스 양을 증가시킨 형질전환식물체는 건조, 염 및 저온 내성을 보였으며, 곰팡이 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*) TPP 효소의 활성을 메틸화에 의해 증가시키면 온도 스트레스에 대한 저항성이 증가하였다. 벼 유래 TPP 유전자를 옥수수에 도입, 발현시켜 건조 내성과 생산성 증가를 확인한 바 있다(Nuccio et al., 2015 Nat. Biotechnol. 33:862-869). 이러한 결과들은 배추과 작물에서도 트레할로스가 스트레스와 관련이 있을 것으로 예측되나, 현재까지 실험적 보고는 전무한 형편이다.

[0005] 고온 또는 열 스트레스는 최적생장조건을 넘어선 온도를 의미하며, 유동화(fluidization), 활성산소종 생성 및 단백질 변성 등과 같은 메카니즘을 통하여 세포질 성분에 손상을 가져온다. 이러한 고온 스트레스는 식물의 전생애를 통해서 생장에 영향을 주며, 고온 스트레스 반응의 신호로 작용한다. 식물은 고온 스트레스에 대처하기 위하여 다양한 종류의 열충격 단백질 및 열충격관련 단백질을 만들고, 활성산소종을 생산한다. 또한 고온 스트레스 반응은 전사조절네트워크와 전사조절인자의 전사 후 조절을 포함하고, 고온 유도 전사반응과 스트레스 기억을 위하여 후성유전적 조절과 작은 RNA(small RNAs)종의 생산을 포함한다. 온도와 습도의 상승은 작물의 생장과 재배지역을 제한하기 때문에 중요한 환경요인이 되며, 고온스트레스 저항성 작물의 개발은 매우 중요한 과제이다.

[0006] 양배추 육종가의 관점에서 내서성(hot tolerant 또는 heat tolerant) 양배추는 고온과 고습도 조건하에서 정상적인 결구가 이루어져야하고, 무름병 등에 대한 저항성을 지녀야한다. 반면에 내서성이 없는 양배추는 조기성숙하는 성질이 있고, 조직이 연하며 결구력이 약하고 무름병 등에 대한 내성도 약하다. 이러한 내서성이 약한 양배추 계통은 주로 중국 및 유럽 등지에서 조생계 원형 양배추 품종을 만들기 위해 사용되고 있으며, 숙기가 빠르고 조직이 연하며, 고온 다습한 환경에서 재배하면 결구가 잘 이루어지지 않고 무름병 등에 잘 걸리나, 추대를 위한 저온요구도가 상대적으로 높아 봄에 추대가 잘 안되는 장점이 있다. 여름에 비닐하우스(고온 처리)에서 키운 양배추로부터 정상적인 결구력을 지니는 내혼계 양배추와 결구력이 현저히 떨어진 내혼계 양배추를 선택하여 분석한 결과 열충격 전사인자(heat shock factor, HSF)와 열충격 단백질(heat shock proteins)이 고온 저항성에 중요한 역할을 한다는 보고가 있었다(Park et al., 2013 Int. J. Mol. Sci. 14:11871-1194). 그러나 상기 보고에서는 유전자 발현을 조사하기 위한 양배추를 온도가 조절되고 광도가 아주 미약한(자연광과 비교해서) 식물생장기에서 키웠고, 아주 짧은 시간 (2 내지 4시간)동안 고온에 노출시켰으며, 습도는 고려하지 않았다.

[0007] 이에 본 발명자는 상기 양배추 재료를 제공한 동일한 회사인 아시아종묘(주)가 만든 내서성이 강한 내혼계 BN1과 내서성이 약한 BN2 및 그 1대 잡종(F1)과 2대잡종(F2)를 생장기 조건(조절된 환경)과 고온·고습조건하에서 기르면서 유전자 발현양상과 무름병 등을 조사하였다. 그리고 내서성 마커의 개발은 BN1과 BN2를 활용하여 수행하였다.

[0008] 한편, 한국등록특허 제1609309호에는 *BoHsp70* 유전자를 이용한 '내서성 양배추 품종의 선별을 위한 특이 프라이머 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1301922호에는 *BoHSP101* 유전자, *BoHSP90* 유전자 및 *BoHSFA1* 유전자를 이용한 '내서성 양배추 품종의 조기 선별을 위한 바이오 마커 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 양배추 *TPPI* 유전자를 이용한 내서성 품종의 선별을 위한 특이 프라이머 세트 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 내서성이 강한 양배추 내혼계 BN1과 내서

성이 약한 양배추 내흔계 BN2와, 상기 내흔계를 교배해서 얻은 F1, 상기 F1을 자가수분해서 얻은 F2 집단을 대상으로 내서성을 조사하고, BN1과 BN2로부터 트레할로스 합성관련 유전자 *BoTPPI* (*Brassica oleracea trehalose-6-phosphate phosphatase 1*)를 클로닝하여 *BoTPPI-2*(*Bo9g173440*) 유전자의 염기서열 차이를 찾아내었다. 특히 BN2 양배추의 유전자에는 4,616bp의 LTR (long terminal repeat)이 9번째 인트론에 삽입되어 있음을 발견하였고, 상기 LTR 서열의 삽입 외에는 BN1과 BN2의 DNA서열이 동일함을 확인하였다. 그러나 LTR 삽입결과 BN2에서는 *BoTPPI-2* 유전자가 발현되지 않는 것으로 확인되었고, 이 두 서열 차이를 이용하여 내서성에 강한 또는 약한 양배추를 판별하는 마커를 개발하였고, 183개의 양배추 계통을 대상으로 테스트한 결과, 본 발명의 마커는 내서성이 약한 양배추는 100% 선별할 수 있는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 16 및 17의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 서열번호 18 및 19의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 내서성 양배추 품종을 선별하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 내서성 양배추 품종 선별용 키트를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 이용한 내서성 양배추 품종을 선별하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 열 스트레스 저항성/민감성 양배추 품종을 구별할 수 있는 프라이머를 이용하면, 간단한 계놈 DNA PCR법을 통해서 양배추의 내서성 관련 형질을 양배추 육종 현장에서 어린 시기에 구별할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 양배추 재배기간 동안 유리온실 내의 주 평균 최저 및 최고 온도를 보여주는 그래프이다.
- 도 2는 양배추 유전집단의 형태 및 무름병 발병빈도를 조사한 결과로, A는 결국 전·후의 BN1(내서성이 강한 내흔계) 및 BN2(내서성이 약한 내흔계)의 모습이고, B는 BN1, BN2 및 그 잡종 F1 양배추의 무름병 발병 현황이며, C는 엽색을 근거로 유전집단 F2 개체의 구분한 모습이며(BN1에 가장 가까운 회록색을 지닌 개체들을 그룹A, BN2에 가장 가까운 진한 녹색을 그룹D로 분류), D는 F2 양배추 그룹의 무름병 발병현황이다.
- 도 3은 양배추 *TPPI* 유전자의 계통학적 위치를 보여준다.
- 도 4는 *BoTPPI-1* 유전자를 클로닝하기 위한 프라이머와 발현분석용 프라이머 위치(A)와 염기서열분석 후 BN1과 BN2 사이에 존재하는 SNP를 보여주는 그림(B)이다. 푸른색 프라이머는 RT-PCR용 프라이머를 의미.
- 도 5는 *BoTPPI-1*의 계놈 DNA 서열(A)과 두 서열의 비교 결과(B)이다.
- 도 6은 *BoTPPI-2* 유전자를 클로닝하기 위한 프라이머 위치(A)와 PCR 결과(B)이다.
- 도 7은 BN1 양배추의 *BoTPPI-2* 유전자의 전체서열로, 청색은 엑손 서열을 의미한다.
- 도 8은 BN2로부터 *BoTPPI-2* 유전자를 클로닝하기 위한 iPCR용 프라이머의 위치와 최종확인용 프라이머 위치(A) 및 BN1과 BN2의 *BoTPPI-2* 유전자의 비교(B) 결과이다.
- 도 9는 BN2 양배추 *BoTPPI-2*의 전체서열로, 청색은 엑손 서열을, 녹색 음영부분은 LTR 서열을 의미한다.
- 도 10은 BN2의 LTR 서열을 제외한 BN1과 BN2의 *BoTPPI-2* 서열의 비교 결과로, 음영부분이 엑손 서열이고, ATG와 TGA 서열을 표기하였다.
- 도 11은 Bo9g440-F 프라이머와 Bo9g430-R 프라이머 조합을 이용한 *BoTPPI-2* DNA의 증폭 결과이다. HCT: 조은종묘(주)에서 제공한 내흔계 양배추 시료.
- 도 12는 내서성 판별용 PCR 프라이머의 위치(A)와 PCR 마커로의 전환(B)을 보여주는 것으로, A의 청색은 BN1(내서성이 강한 양배추)을 증폭하는 프라이머이고 갈색은 BN2(내서성이 약한 양배추) *TPPI-2* 유전자를 구분하기 위한 프라이머이다.
- 도 13은 내서성 판별용 마커의 검증 결과로, 도 11에서 이용한 양배추 계통을 활용하였다.
- 도 14는 내서성 판별용 마커의 BN1 x BN2 유전집단을 이용한 검증 결과이다.

도 15는 *BoTPPI* 유전자 및 열충격 관련 유전자의 발현을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 16 및 17의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 서열번호 18 및 19의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 내서성 양배추 품종을 선별하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 제공한다.
- [0016] 상기 프라이머는 서열번호 16 및 17; 및 서열번호 18 및 19의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 또한, 상기 프라이머는 서열번호 16 및 17; 및 서열번호 18 및 19의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 따른 서열번호 16 및 17의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 내서성이 강한 양배추 품종을 선별할 수 있는 프라이머 세트이고, 서열번호 18 및 19의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 내서성이 약한 양배추 품종을 선별할 수 있는 프라이머 세트이다.
- [0018] 본 발명에 따른 상기 서열번호 16 및 17; 및 서열번호 18 및 19의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 각각 *BoTPPI-2*_BN1(도 7) 및 서열번호 *BoTPPI-2*_BN2(도 9)의 양배추 유래 *TPPI* (*trehalose-6-phosphate phosphatase*) 유전자를 표적하는 프라이머 세트이다(도 12A 참고).
- [0019] 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.
- [0020] 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.
- [0021] 본 발명은 또한, 상기 프라이머 세트를 포함하는 내서성 양배추 품종 선별용 키트를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 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.
- [0024] 본 발명은 또한,
- [0025] 양배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0026] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0027] 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 내서성 양배추 품종을 선별하기 위한 방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 방법은 양배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 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 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭시스템(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.

[0029] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 전술한 것과 같다.

[0030] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 내서성 양배추 품종을 선별하기 위한 방법은 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하며, 상기 증폭 단계 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 모세관 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 모세관 전기영동을 수행할 수 있다. 모세관 전기영동은 예를 들면, ABi Sequencer를 이용할 수 있다. 또한, 겔 전기영동을 수행할 수 있으며, 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0031] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 재료 및 방법

[0033] 1. 양배추 재료

[0034] 내서성 연구에 활용한 양배추 재료는 내서성이 강한 내혼계 BN1과 내서성이 약한 BN2 및 두 내혼계를 교배하여 얻은 F1 잡종(hybrid)과 F1을 자가수정하여 얻은 F2 집단을 아시아종묘(주)로부터 분양받아 사용하였다. 염기서열 검증과 염기서열 분석결과 정보를 활용하여 마커를 개발하였고, 그 마커를 검증하는데 활용한 재료는 여러 종묘회사로부터 분양받은 내혼계통과 F1 잡종 재배종 및 외국 종자회사에서 판매하고 있는 양배추 품종(표 1 내지 표 4)을 사용하였다. 게놈 DNA 및 RNA는 분양받은 배추 품종의 잎 시료로부터 추출하거나 종자를 받아시켜 유묘로부터 추출하였다.

표 1

내서성 마커 개발에 사용한 양배추 시료 및 마커 검증에 활용한 시료. 마커검증 결과를 맨 오른쪽에 표기하였음 (R = 저항성, S = 민감성, H = heterozygote)

Marker	Seed or tissue source	Name	Characteristics	Producer (Company)	Inbred (IB) or F1	Marker genotype
Development	Asia Seed Co.	BN1	Hot tolerant Inbred	Asia Seed Co	IB	R
		BN2	Hot Susceptible Inbred	Asia Seed Co	IB	S
		F1 of BN1 and BN2	F1 hybrid	Asia Seed Co	F1	H
		F2 population	Segregant population	Asia Seed Co	F2	R/H/S
Validation	Joен Seed Co	HCT-01	Hot tolerant, cold susceptible; for tropical, flat	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-02	Hot tolerant, cold susceptible; for tropical, flat	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-03	Hot tolerant, medium cold tolerant; for tropical, flat	Joен Seed Co	IB	S
		HCT-04	Hot tolerant, medium cold tolerant; for tropical, flat	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-05	Hot tolerant, cold tolerant; for tropical, flat	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-06	Hot susceptible, cold susceptible; early, round	Joен Seed Co	IB	S
		HCT-07	Hot susceptible, cold susceptible; early, round	Joен Seed Co	IB	S
		HCT-08	Hot susceptible, cold susceptible; early, round	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-09	Hot susceptible, cold susceptible; early, round	Joен Seed Co	IB	S
		HCT-10	Hot susceptible, cold susceptible; early, round	Joен Seed Co	IB	S
		HCT-11	Cold tolerance, medium hot tolerance; late, round	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-12	Coldtolerance, medium hot tolerance; late, round	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-13	Coldtolerance, medium hot tolerance; late, round	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-14	Coldtolerance, medium hot tolerance; late, round	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-15	Coldtolerance, medium hot tolerance; late, round	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-16	Coldtolerance, medium hot tolerance; oblate	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-17	Cold tolerance, MH hot tolerance; oblate	Joен Seed Co	IB	R
		HCT-18	Cold tolerance, medium hot tolerance; oblate	Joен Seed Co	IB	R
		Home Run	Small size, early maturity; deep green; round	Joен Seed Co	F1	H
		Rapido	Smallsize,earlymaturity; round	Joен Seed Co	F1	R
		JS246	MH hot and cold tolerance; oblate	Joен Seed Co	F1	R
		JS 342	Hot tolerance	Joен Seed Co	F1	R
		JS199	Hot tolerance	Joен Seed Co	F1	R
		JS107	Hot susceptible	Joен Seed Co	F1	H
		JS21 (= Home Run)	Hot susceptible	Joен Seed Co	F1	H
		JS-247	Cold tolerance, Hot tolerance (MH); oblate	Joен Seed Co	F1	R
		JS-257	Cold tolerance, Hot tolerance; oblate	Joен Seed Co	F1	R
		JS-267	Cold tolerance, Hot tolerance (MH); oblate	Joен Seed Co	F1	R
		CT-2	High humidity tolerance, round, soft tissue, 50d	Asia Seed Co	F1	H
		CT-6	Against Lucky Ball of Kaneko	Asia Seed Co	F1	H
		CT-8	Against Rare Ball of Kaneko	Asia Seed Co	F1	H
		CT-12	Against K-K Cross of Takii	Asia Seed Co	F1	R
		CT-14	Hottolerance,round, 55d, tough tissue	Asia Seed Co	F1	R
		CT-17	Hot tolerance, oblate, 65d, tough tissue	Asia Seed Co	F1	R
		CT-44	Hot and humidity tolerance, round, 55d, tough tissue	Asia Seed Co	F1	R

표 2

Marker	Seed or tissue source	Name	Characteristics	Producer (Company)	Inbred (IB) or F1	Marker genotype
Validation	Asia Seed Co.	CT-55	Hot tolerance, round, 58d, tough tissue	Asia Seed Co	F1	H
		CT-75	Hot and humidity tolerance, round, 55d, tough tissue	Asia Seed Co	F1	H
		CT-120	Against Saint of Seminis	Asia Seed Co	F1	H
		CT-161	Against K-K Cross of Takii	Asia Seed Co	F1	R
		CT-163	Againt Golden Cross of Takii	Asia Seed Co	F1	S
		CT-169	Against Indu of Seminis	Asia Seed Co	F1	H
		CT-257		Asia Seed Co	F1	R
		CT-254		Asia Seed Co	F1	R
		CT-212		Asia Seed Co	F1	R
		CT-309		Asia Seed Co	F1	R
		CT-410	Againt Green Nova of Takii	Asia Seed Co	F1	R
		CT-415	Hot tolerance, oblate, 70d, tough tissue	Asia Seed Co	F1	R
		CT-418	Against Green Nova of Takii	Asia Seed Co	F1	H
		CT-604	Hot tolerance, round, 57d, tough tissue	Asia Seed Co	F1	R
		CT-605	Hot tolerance, round, 58d, tough tissue	Asia Seed Co	F1	R
		401	Hot tolerance	Asia Seed Co	IB	R
		RK	Hot tolerance	Asia Seed Co	IB	R
		HO	Hot tolerance	Asia Seed Co	IB	R
		EB	Hot susceptible	Asia Seed Co	IB	S
		Speed King	Maturity 45d, round, soft tissue		F1	R
		Express Ball	Maturity 50d, round, soft tissue		F1	H
		Asia Express	Maturity 55d, round, soft tissue		F1	H
		Super Express	Maturity 55d, round , tough tissue, hot tolerance		F1	R
		Base Ball	Maturity 58d, round, tough tissue, hot tolerance		F1	R
		Descent	Maturity 60d, round, tough tisse, hot tolerance		F1	H
		Mart Ball	Maturity 65d, round, tough tissue		F1	H
		Infinite	Maturity 70d, round, tough tissue		F1	R
		Cabsong	Maturity 80d, round, tough tissue		F1	H
		DaeBakNa	Early maturity, flat, tough tissue	Asia Seed Co	F1	R
		YR Honam	Medium-late maturity, Cold resistance, flat, 80d, tough tissue		F1	R
		Green Hot	Late maturity, flat, 809d, tough tissue, hot tolerance		F1	R
		Winstar	Late maturity(90d), flat, tough tissue, cold tolerance		F1	R
		Winstom	Late maturity(100d), flat, tough tolerance, cold tolerance	Asia Seed Co	F1	R
		YR Hereo			F1	R
		Kokoma	Round, 45-50d, soft tissue	Asia Seed Co	F1	H
		BN830	Round, 55d, soft tisse	Asia Seed Co	F1	R
		CT-161	Round, 55d, tough tissue	Asia Seed Co	F1	H
		Laurent	Round, 560d, touch tissue, hot tolerance		F1	R
		Jackpot	Flat, 65d, soft tissue		F1	R
		Chosunpaldo	Flat, 80d, tough tissue	Asia Seed Co	F1	R
Dongbu Farmhannong	CACM7501	Grey green (Europ. process)	Dongbu Farmhannong	F1	R	
	CACM4034	Green: early, round: for Europe and China	Dongbu Farmhannong	F1	H	
	CACM5013	Hot tolerance, Humidity tolerance, India culture	Dongbu Farmhannong	F1	H	

[0036]

표 3

Marker	Seed or tissue source	Name	Characteristics	Producer (Company)	Inbred (IB) or F1	Marker genotype
Validation	Takii	Passion	Hot tolerance (very strong)	Takii Seed	F1	R
		T-523	Hot tolerance	Takii Seed	F1	R
		T-530	Hot tolerance	Takii Seed	F1	R
		T-593	Hot tolerance	Takii Seed	F1	R
		Golden Cross	Round	Takii Seed	F1	H
		Green Coronet	South-East cultivar	Takii Seed	F1	R
		Green Nova	Vietnam cultivar	Takii Seed	F1	R
		K-K-cross	South-East cultivar	Takii Seed	F1	R
		Ogane	Early maturity, Split resistance	Takii (Koregon) Seed	F1	R
		YR Hogeol	Medium maturity	Takii Seed (Koregon)	F1	R
	Sakata	Green Helmet	Vietnam cultivar, early	Sakata	F1	R
		Charmant	South-East cultivar	Sakata	F1	R
		Scorpio	South-East cultivar	Sakata	F1	R
		Saint	Grey green, Parkistan	Sakata	F1	S
		AHas70	Hot tolerance	Sakata	F1	R
	Bezo	Matzmo	Deep green	Bezo Seed Co	F1	R
	Nozaki	Harutama	Medium-late maturity, Hot and humid tolerance	Nozaki	F1	R
	Kaneko	Lucky Ball	South-East cultivar	Kaneko	F1	H
		Tongtori	Medium-early maturity	Kaneko	F1	R
	Seminis	Daewool	Medium maturity	Seminis	F1	R
		Indu	South-East cultivar	Seminis	F1	R
		Tropic Sun plus	Hot tolerance; Bangladesh leading cultivar	Seminis	F1	R
	Suncheon Natl U	NP-J-4	Very early maturity	Japan cultivar	F1	R
		NP-J-27	Medium-early maturity		F1	R
		NP-J-28	Medium-late maturity		F1	R
		NP-J-31	Early maturity		F1	R
		NP-J-34	Early maturity		F1	R
		NP-J-38	Earlymaturity (Purple cabbage)		F1	R
		NP-J-51	Early maturity		F1	R
		NP-J-90	Medium-early maturity		F1	R
		NP-J-93	Early maturity		F1	R
		NP-J-110	Medium maturity		F1	R
		NP-J-117	Early maturity		F1	R
		NP-J-135	Medium-early maturity		F1	R
		NP-J-149	Very early maturity		F1	R
		NP-J-150	Very early maturity		F1	R
		NP-J-152	Early maturity		F1	R
		NP-J-156	Mediummaturity (Purple cabbage)		F1	R
		NP-J-161	Medium-early maturity		F1	R
		NP-J-162	Medium-early maturity		F1	R
		NP-J-172	Medium-early maturity		F1	R
		NP-J-173	Medium-early maturity		F1	R
		NP-J-189	Early maturity		F1	R
		NP-J-191	Medium maturity		F1	R
		NP-J-198	Early maturity		F1	R
		NP-J-199	Early maturity		F1	R
		NP-J-200	Early maturity		F1	R
		NP-J-216	Early maturity		F1	R
		NP-J-218	Early maturity		F1	R
		NP-J-219	Early maturity, hot tolerance		F1	R
		NP-J-3	Late maturity, cold tolerance		F1	R
		NP-J-35	Late maturity		F1	R
		NP-J-36	Late maturity		F1	R
		NP-J-39	Late maturity		F1	R
		NP-J-40	Medium-late maturity		F1	R
		NP-J-43	Medium maturity		F1	R
		NP-J-44	Medium-late maturity		F1	R
		NP-J-46	Medium-late maturity		F1	R
		NP-J-59	Medium maturity		F1	R
		NP-J-67	Medium maturity		F1	R

[0037]

표 4

Marker	Seed or tissue source	Name	Characteristics	Producer (Company)	Inbred (IB) or F1	Marker genotype	
Validation	Suncheon Natl U	NP-J-74	Medium-late maturity		F1	R	
		NP-J-84	Late maturity		F1	R	
		NP-J-85	Medium-early maturity		F1	R	
		NP-J-89	Medium-late maturity		F1	R	
		NP-J-91	Late maturity		F1	R	
		NP-J-92	Late maturity		F1	R	
		NP-J-111	Medium maturity		F1	R	
		NP-J-118	Medium maturity		F1	R	
		NP-J-119	Medium-late maturity		F1	R	
		NP-J-126	Medium-early maturity(Purple cabbage)		F1	R	
		NP-J-127	Medium-early maturity(Purple cabbage)		F1	R	
		NP-J-139	Mediummaturity (Purple cabbage)		F1	R	
		NP-J-140	Late maturity		F1	R	
		NP-J-159	Medium-early maturity		F1	R	
		NP-J-175	Late maturity		F1	R	
		NP-J-176	Late maturity		F1	R	
		NP-J-177	Medium-late maturity		F1	R	
		NP-J-192	Late maturity		F1	R	
		NP-J-195	Medium maturity		F1	R	
		NP-J-203	Medium maturity, cold tolerance		F1	R	
		NP-J-2	Late maturity, hot and cold tolerance		F1	R	
		NP-J-16	Late maturity		F1	R	
		NP-J-64	Earlymaturity (Purple cabbage)		F1	R	
		NP-J-71	Medium-early maturity(Purple cabbage)		F1	R	
		NP-J-109	Medium-early maturity		F1	R	
		NP-J-116	Medium-early maturity		F1	R	
		NP-J-154	Medium-early maturity		F1	R	
		NP-J-193	Late maturity		F1	R	
		NP-J-209	Very early maturity		F1	R	
		Alaska cultivars	Early Copenhagen Market	Early maturity	Denali Seed Co. MI, USA	F1	R
			Golden Acre	Midseason maturity	Denali Seed Co. MI, USA	F1	S
			Early Jersey Wakefield	Main Season maturity	Denali Seed Co. MI, USA	F1	R
O-S cross Hybrid Alaska's Giant	Late maturity		Denali Seed Co. MI, USA	F1	R		
Giant cabbage	?		Local Seed	F1	R		
Northern Giant cabbage	?		P&P Seed Co. NY, USA	F1	R		
Red Express	Early maturity		Denali Seed Co. MI, USA	F1	R		
China markert	NP-C-1 (Chunchumi)	Strong green, crisp, black rot resistance	Takii Seed	F1	H		
	NP-C-2 (Beiganzhong Gan No. 21)	Dark green, crisp, bolting resistance, tipburn resistance, spring cultivar in northern China	XingTai city, North Institute	F1	H		
	NP-C-3 (Zhong Gan No. 11)	Dark green, spring cultivar in northern China	Institute of Vegetables and Flowers, CAAS	F1	R		
	NP-C-4 (Zhong Gan No. 15)	Dark green, crisp, bolting resistance, tipburn resistance, spring cultivar in northern China	Institute of Vegetables and Flowers, CAAS	F1	S		
	NP-C-5 (Zhong Gan No. 21)	Dark green, crisp, bolting resistance, tipburn resistance, spring cultivar in northern China	Institute of Vegetables and Flowers, CAAS	F1	R		
	NP-C-6 (Zhong Gan No. 23)	Green, crisp, bolting resistance, tipburn resistance, spring cultivar in northern Chinas	Institute of Vegetables and Flowers, CAAS	F1	H		
	NP-C-7 (Best 8398)	Green, crisp, bolting resistance, tipburn resistance, spring cultivar in northern Chinas	Institute of Vegetables and Flowers, CAAS	F1	H		
	NP-C-8 (Best 8132)	Green, crisp, spring cultivar in northern Chinas	Be i j i n g X i n F e n g s h e n g d i A g r i c u l t u r a l Technology Co.	F1	H		
	NP-C-9 (Zhongganshiyi)	Dark green, crisp, bolting resistance, tipburn resistance, spring cultivar in northern China	Shengchanshang Yuyan Seed	F1	R		

[0038]

[0039]

2. 게놈 DNA 추출, 유전자 클로닝 및 염기서열 분석

[0040]

2-1) 표적유전자의 선발

[0041]

애기장대 trehalose-6-phosphatase I (*AtTPPI*) 유전자는 *AT5G10100* 위치를 나타내며, 양배추 게놈에는 *AtTPPI* 에 해당하는 2개의 상동유전자가 존재한다. EnsemblePlants (http://plants.ensembl.org/Brassica_oleracea/Info/Index)에서는 *Bo3g005430*과 *Bo9g173440*이, BRAD (<http://brassicadb.org/brad/>)에서는 *Bo1008761*과 *Bo1043695*이 *TPPI* 유전자로 검색되어 *Bo3g005430*(= *Bo1008761*)을 *BoTPPI-1*으로, *Bo9g173440*(= *Bo1043695*)을 *BoTPPI-2*로 명명하였다. 양배추 BN1과 BN2를 가지고, 고온처리 후 RNA Seq.을 수행하여 분석한 결과, *BoTPPI-1*은 모든 조건에서 거의 발현이 되지 않았으며 발현양도 양배추 두 계통간 차이를 보이지 않았으나, *BoTPPI-2*는 BN1에서는 발현이 높았으나 BN2에서는 발현이 낮은 것으로 확인되었다(결과 미첨부). 따라서 *BoTPPI-2*를 내서성 마커 개발의 표적유전자로 선정하였으나, *BoTPPI-1*의 다양성(polymorphism)도 존재하는지 여부를 알아보았다.

[0042] 2-2) 게놈 DNA 추출

[0043] 채취한 양배추 잎을 액체질소와 막자사발을 이용하여 곱게 간 후, DNA Plant Mini kit (Quagen, Germany)를 이용하여 추출하고, 전기영동과 분광광도계를 이용하여 농도와 순도를 결정하였다.

[0044] 2-3) 유전자 클로닝

[0045] BN1 양배추의 *BoTPPI-2* 클로닝과 서열 분석

[0046] BN1 양배추로부터 *BoTPPI-2*(*Bo9g173440* = *Bo1043695*) 유전자를 클로닝하기 위해 기존의 공개된 양배추 유전체 서열 데이터 (<http://brassicadb.org/brad/> 또는 http://plants.ensembl.org/Brassica_oleracea/Info/Index)를 참고하여 전장의 *BoTPPI-2* 유전자를 증폭시킬수 있는 정방향 프라이머 Bo9g-440-F와 역방향 프라이머 Bo9g-440-R를 제작하여 사용하였다. BN1 및 BN2 양배추의 분말 시료로부터 추출한 게놈 DNA를 주형으로하여 Ex Taq (Takara, Japan)을 사용해 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 94℃에서 5분 처리 후, 94℃ 30초, 62℃ 30초, 68℃ 2분을 35회 반복한 뒤, 68℃, 7분간 처리하는 조건으로 수행하였다. PCR 종료 후 반응액을 1% 아가로즈 겔에 전기영동하였고 해당되는 DNA 밴드를 잘라내어 LaboPass Gel Extraction kit (COSMOGENETECH, Korea)를 사용하여 아가로즈 겔로부터 DNA를 정제하였다. 분리·정제된 DNA는 T&A Cloning 벡터 (RBC, Taiwan)에 삽입하고 DH5α 대장균에 형질전환하였다. 제조합 플라스미드는 형질전환된 대장균으로부터 LaBoPass Plasmid Mini kit (COSMOGENETECH)를 이용하여 플라스미드 DNA를 추출하였다. 이때, 염기서열의 오류(PCR 오류 및 염기서열 분석 오류 등)를 방지하고 정확한 서열정보를 얻기 위해 10개 이상의 클론을 분석대상으로 하여 서열분석을 수행하였다 (Macrogen, Korea). 이를 통해 BN1 양배추의 *BoTPPI-2* 전장 유전자를 암호화하고 있는 게놈 DNA 서열 (2,509bp) 정보를 확보하였다.

[0047] BN2 양배추의 *BoTPPI-2* 클로닝과 서열 분석

[0048] BN2 양배추로부터 *BoTPPI-2* 유전자를 클로닝하기 위해, BN1 양배추로부터 *BoTPPI-2* 유전자를 클로닝하기 위해 사용했던 프라이머(Bo9g-440-F 및 Bo9g-440-R)를 이용하여 PCR을 수행하였을 경우, 증폭 산물이 확인되지 않았다. 내부 프라이머 세트 (Bo9g-440-F x Bo9g-440-R2, Bo9g-440-F x Bo9g-440-R3)를 이용하였을 경우는 모두 증폭되었으므로, BN1 양배추의 *BoTPPI-2* 전장 유전자에서 뒷부분의 DNA가 결실되었거나 삽입이 일어나 증폭이 불가능한 것으로 예측되었다. 따라서 BN1 양배추의 *BoTPPI-2* 염기서열과 동일한 부분과 양배추 9번 염색체 상에 *BoTPPI-2*(*Bo9g173440*)에 인접한 유전자인 *Bo9g173430* (glutathione S-transferase DHAR3)의 앞부분 서열을 이용하여 inverse PCR(iPCR)과 *BoTPPI-2*의 공통 염기서열을 이용한 iPCR을 수행하여 염기서열을 얻었다.

[0049] 우선 BN2 양배추 *TPPI-2* 유전자(*BoTPPI-2*_{BN2})의 서열 중에서 BN1 양배추의 *BoTPPI-2* 서열과 일치하는 부분을 확인하기 위해 *BoTPPI-2*_{BN1} 서열의 내부 3곳의 서열을 참고로 제작된 역방향 프라이머를 이용하여 게놈 DNA를 PCR을 수행하였다. 정방향 프라이머 Bo9g440-F와 3개의 역방향 프라이머 Bo9g440-R1, Bo9g440-R2 및 Bo9g440-R3를 세트로 이용하여 PCR 수행하였다. 그 결과 Bo9g440-F x Bo9g440-R2 조합 및 Bo9g440-F x Bo9g440-R3 조합에서는 예상되는 크기의 DNA가 증폭되었으나, Bo9g440-F x Bo9g440-R1 조합에서는 증폭되지 않았다. 따라서 BN2 게놈 DNA로부터 Bo9g440-F x Bo9g440-R3 조합의 증폭산물을 분리·정제하여 염기서열(1,769bp)을 확보하였다. 확보한 염기서열 정보와 알려진 *Bo9g173430* 서열을 이용하여 미지의 서열을 다음과 같이 분석하였다. 확보한 *BoTPPI-2*_{BN2} 서열의 3' 방향 말단 부분 서열을 참고하여 유전자 특이적 프라이머 2 종류 (iPCR-F1, iPCR-F2)를 제작하였고, 이들 프라이머와 Universal GenomeWalker™ 2.0 (Clontech, MountainView, CA, USA)을 이용하여 iPCR을 진행하였다. BN2 양배추의 gDNA를 4 종류의 제한효소 (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI*)로 절단하여 4개의 라이브러리를 제작한 후 제조사의 프로토콜에 제시된 방법에 따라 절단된 gDNA에 GenomeWalker Adaptors를 라이게이션한 것을 주형으로 사용하였다. 정방향 iPCR-F1 프라이머와 adaptor 서열을 기반으로 제작된 역방향 프라이머(AP1)를 사용하여 1차 PCR 수행을 통해 *EcoRV* 절단 라이브러리와 *PvuII* 절단 라이브러리에서 1차 증폭 산물을 얻었다. 정확도를 높이기 위해 1차 증폭 산물을 다시 주형으로 하여, iPCR-F2와 adaptor 서열을 기반으로 제작된 역방향 프라이머(AP2)를 이용하여 2차 PCR을 수행하여 *EcoRV* 절단 라이브러리에서 증폭된 약 1.19kb의 밴드를 클로닝하여 해당서열(1.175kb)을 분석하였다. 계속하여 추가 연장 서열의 정보를 얻기위하여 1.175kb의 분석된 서열 중 3' 방향 말단 서열을 참고하여 정방향 프라이머 iPCR-F3을 제작하였다. 앞서 제작한 *PvuII* 라이브러리를 주형으로 하여 iPCR-F3 x AP2 프라이머 세트의 조합으로 약 2,200bp 크기의 특이적 증폭 산물을 얻었고, 이것을 클로닝하여 2,222bp의 염기서열을 확보하였다. 이 서열의 3' 말단 부분 서열을 참고하여 iPCR-F4 프라이머를 제작하였고, 인접한 유전자 *Bo9g173430*의 5' 방향 전반부의 서열을 참고하여 Bo9g-430-R프라이머를 제작하여 BN2 양배추 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 수행하였다. 이를 통해 약 3,200bp의 증폭산물을 얻었고

이를 클로닝하여 염기서열 분석을 통해 3,205bp의 서열정보를 밝혔다. 각각의 서열분석과 비교를 통하여 iPCR-F2 프라이머 이후의 서열을 완성하였다.

[0050] 상기에서 완성한 서열을 검증하기 위하여 Bo9g440-F 프라이머와 Bo9g440-R, Bo9g440-R1 프라이머로 게놈 DNA PCR를 수행하였다. 그 결과, BN1은 2.4kbp의 서열이었고, BN2은 7.7kbp 서열을 증폭하여 상기 염기서열이 올바른 것을 확인하였다. 유전자 클로닝과 마커 검증에 사용한 프라이머 정보는 하기와 같다.

표 5

유전자 클로닝과 마커 개발에 활용한 프라이머 정보

Use	Primer name	Sequence	Remarks	서열번호
<i>BoTPPI-1</i> (Bo3G005430) cloning	Bo3g-F	5'-TGCAGAGCTTCTTCTCTACTCATCC-3'	Forward	1
	Bo3g-R	5'-CCTCTTCACACWCYTGCGTCA-3'	Reverse	2
<i>BoTPPI-2</i> (Bo9g17440) cloning	Bo9g440-F	5'-TCCTCATCTTCATCCACTCCATCTC-3'	Forward	3
	Bo9g440-R	5'-TCTACAACGTTCCATGAAAGGTTAGCCA-3'		4
	Bo9g440-F1	5'-CTCAGITTAACCTTGATTCAAGTACTAATT-3'	Forward	5
	Bo9g440-F2	5'-ACAAATATACCTGTCGTCTTCAAT-3'	Forward	6
	Bo9g440-F3	5'-GAGTCACTTGGTGAGTGCTCA-3'	Forward	7
	Bo9g440-R1	5'-CTTCATATTCTTGGTGCAATTTGTTCCA-3'	Reverse	8
	Bo9g440-R2	5'-ATTGAAGAGCACGACAGGTATATTGT-3'	Reverse	9
	Bo9g440-R3	5'-TGAGCACTACCAAGTGACTC-3'	Reverse	10
iPCR for BN2	iPCR-F1	5'-CGACAAATATACTTGCTGCTCTTCA-3'	Forward	11
	iPCR-F2	5'-GTATGACATGACGTTCTCTCATTGAC-3'	Forward	12
	iPCR-F3	5'-CAAGCCATCTGGTTACAAGAACTTCTA-3'	Forward	13
	iPCR-F4	5'-CTAAACTTATCAAACGCTTCTCCCTTC-3'	Forward	14
	Bo9g-430-R	5'-ACCGCTTGATAAATCCGACGTG-3'	Reverse	15
Marker validation	BoTPPI-2-RF	5'-TCATAGTAGAAAACAGAAAGTTACCG-3'	Forward	16
	BoTPPI-2-RR	5'-GACGGATCTTGACAGAGAATACGAA-3'	Reverse	17
	BoTPPI-2-SF	5'-GGCACTTGATCGAGGATGAT-3'	Forward	18
	BoTPPI-2-SR	5'-ATCTTGACAGAGAATACGAAGCATCT-3'	Reverse	19
Control (BoI030974/Bo5g117040)	BoACT2-F	5'-TGCCAATCTACGAGGGTTTC-3'	Forward	20
	BoACT2-R	5'-TCTCGATGGAAGAGCTGGTT-3'	Reverse	21

[0051]

[0052] 3. 마커 개발과 검증

[0053] DNeasy plant mini kit (Qiagen, USA)를 사용해 게놈 DNA를 추출하여 20ng을 주형으로 사용하였으며 PCR 반응 조건은 다음과 같이 각기 달리 수행하였다. PCR에 활용한 서열이름, 번호 및 염기서열 정보는 표 5에 요약되었다. 모든 PCR산물들은 1% 아가로스 젤에 전기영동하고 사진을 찍어 분석하였다.

[0054] 3-1) 내서성 강(BN1 type) 선발조건 확립

[0055] 게놈 DNA 20ng, 정방향 프라이머 BoTPPI-2-RF(10 pmol/μl)과 역방향 프라이머 BoTPPI-2-RR(10 pmol/μl)를 각각을 1μl, 5X PCR Master mix (Elpisbiotech, Korea) 4μl를 첨가하고 최종 반응 볼륨을 20μl가 되도록 멸균수를 첨가한 뒤 반응하였다. PCR 반응은 94℃에서 5분 처리 후, 94℃ 30초, 62℃ 30초, 72℃ 30초를 30회 반복한 뒤 72℃ 5분 처리하는 조건으로 수행하였다.

[0056] 3-2) 내서성 약(BN2 type) 선발조건 확립

[0057] 게놈 DNA 20ng, 정방향 프라이머 BoTPPI-2-SF(10 pmol/μl)과 역방향 프라이머 BoTPPI-2-SR(10 pmol/μl)을 각각 1μl, 5X PCR Master mix (Elpisbiotech) 4μl를 첨가하고 최종 반응 볼륨을 20μl가 되도록 멸균수를 첨가한 뒤

반응하였다. PCR 반응은 94℃에서 5분 처리 후, 94℃ 30초, 62℃ 30초, 72℃ 30초를 30회 반복한 뒤 72℃ 5분 처리하는 조건으로 수행하였다.

[0058] 3-3) 내서성 마커의 검증(내서성 강, 약 및 액틴 동시 검증)

[0059] 한 번의 PCR을 통해서 DNA의 존재와 어느 형태의 *BoTPPI-2* 유전자를 가지고 있는지 알아보기 위해서 다음과 같은 전략으로 PCR를 수행하였다. 양배추로부터 추출한 게놈 DNA 20ng을 취하고, 총 6종 프라이머: BoTPPI-2-RF, BoTPPI-2-RR, BoTPPI-2-SF, BoTPPI-2-SR, BoACT2-F 및 BoACT2-R를 각각 10 pmol/μl을 넣고, 5X PCR Master mix (Elpisbiotech) 4μl를 첨가한 후 최종 반응 볼륨을 20μl가 되도록 멸균수를 첨가한 뒤 반응하였다. PCR 반응은 94℃에서 5분 처리 후, 94℃ 30초, 62℃ 30초, 72℃ 30초를 30회 반복한 뒤 72℃ 5분 처리하는 조건으로 수행하였다.

[0060] 4. 유전자 발현분석

[0061] 내서성 마커 개발에 활용한 *BoTPPI-2* 유전자의 다형성이 그 유전자의 발현 및 내서성 관련 유전자의 발현과의 상관성을 분석하기 위하여 전사체 분석을 RT-PCR를 통해 수행하였다. 모본으로 사용한 내훈계 BN1, BN2 양배추를 생장실에서 3주간 기른 후 다음과 같이 시료를 채취하였다. 상온(22℃)에서 자란 시료, 상온에서 38℃로 온도 변경 후 1시간 경과한 시료, 상온에서 12℃의 저온으로 온도 변경후 2일간 노출시킨 뒤, 28℃ 조건으로 옮겨 3시간 처리한 시료와, 이어 38℃에 1시간 추가 노출한 시료를 준비하였다. 준비된 시료로부터 TRIzol Reagent (Lifetechnologies, USA)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 1μg의 총 RNA에 RQ1 RNase-Free DNase (Promaga, USA)를 65℃에 10분간 처리하여 DNA를 제거한 후, Revertra Ace kit (TOYOBO, japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 1μl를 취하고, 정방향 및 역방향 프라이머(각, 10 pmol/μl) 각각 1μl, 5X PCR Master mix (Elpisbiotech) 4μl를 첨가한 후 최종 반응 볼륨을 20 μl가 되도록 멸균수를 첨가한 뒤 반응하였다. PCR 반응은 94℃에서 5분 처리 후, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초를 26회 반복한 뒤 72℃ 5분 처리하는 조건으로 수행하였다. PCR 산물은 1.5% 아가로즈 겔에 전기영동하여 발현양을 분석하였다. 분석한 유전자의 수는 9종이었고, 사용한 프라이머 정보는 하기 표 6과 같다.

표 6

유전자 발현분석에 이용한 프라이머 정보					
Application	Forward primer		Reverse primer		Product (bp)
	Name	Sequence(5'→3') (서열번호)	Name	Sequence(5'→3') (서열번호)	
<i>BoTPPI-1</i> expression	<i>BoTPPI-1-F</i>	TCCCTCGATGAGAGAAATG (22)	<i>BoTPPI-1-R</i>	TTGGGGAAATTTGGAGACAG (42)	287
	<i>BoTPPI-1-BN1F</i>	TACGAGACAGAGGTGAMGGCC (23)	<i>BoTPPI-1-BN1R</i>	CGTGTAGAAAACGCTTAAGCTGCAGAAATACTT (43)	138
	<i>BoTPPI-1-BN2F</i>	CTAGAGACAGAGGTGAGGCT (24)	<i>BoTPPI-1-BN2R</i>	CGTGTAGAAAACGCTTAAGCTGCAGAAATACT (44)	139
					BN1 specific amplification BN2 specific amplification
<i>BoTPPI-2</i> expression	<i>BoTPPI-2-F1</i>	TGGAGGGAAGCTGTTTCTACAGG (25)	<i>BoTPPI-2-R</i>	CAGTCCACCAATCGTCGACAGA (45)	354
	<i>BoTPPI-2-F2</i>	TACATCGGCGACGATCGGAC (26)			For both BN1 and BN2
	<i>Bo9g-F</i>	AGCTGTATTATCTGTGCGAGCA (27)	<i>Bo9g-R</i>	CGAAGCTGTAGAACCAAGTTGGCT (46)	177
					In BN2 case, it amplifies if alternative splicing occurs For both <i>BoTPPI-1</i> and <i>BoTPPI-2</i>
HSR genes and others	<i>BoHSFA2-F1</i>	CATGCTGGAGGATTCGGGCAC (28)	<i>BoHSFA2AS-R</i>	CTTTTAAAGCTGAGGAGCTAACCCGAT (47)	200
	<i>BoHSFA2-F2</i>	CAAGTTGCAGAAATGAGCA (29)	<i>BoHSFA2-R</i>	CATTACGCGCAAGCTGTTGAA (48)	541
	<i>BoHSFB2A-F</i>	CTTTGCTCGTCAAGCTCACA (30)	<i>BoHSFB2A-R</i>	GCTTGAAGCGGTTACTTTGG (49)	117
	<i>BoHOP2-F</i>	AAATCGATCCGGACACACAAG (31)	<i>BoHOP2-R</i>	GCCAGCATGTTGCTGTAGAA (60)	135
	<i>BoHSPI8.2A-F</i>	TTAGCAAAACCTTCGGGCTCA (32)	<i>BoHSPI8.2AB-R</i>	TGCTTCTCTCTCTCTCTCC (51)	106
	<i>BoHSPI8.2B-F</i>	CTCTTAAGGCTTCTCTGGCT (33)			200
	<i>BoHSPI8.2C-F</i>	AGACTGTATGACCCGTTG (34)	<i>BoHSPI8.2C-R</i>	TTCTCGCTGCTCTCTCTCC (52)	150
	<i>BoTPPI-1-F</i>	TGCGTCGATGAGAGAAATG (35)	<i>BoTPPI-1-R</i>	TTGGGGAATTTGGAGACAG (53)	222
	<i>Bo9g-F</i>	AGCTGTATTATCTGTGCGAGCA (36)	<i>Bo9g-R</i>	CGAAGCTGTAGAACCAAGTTGGCT (54)	287
	<i>BoTPPI-2-F1</i>	TGGAGGGAAGCTGTTTCTACAGG (37)	<i>BoTPPI-2-R</i>	CAGTCCACCAATCGTCGACAGA (55)	300
	<i>BoTPPI-2-F2</i>	TACATCGGCGACGATCGGAC (38)			LTR
	<i>BoDHAR3-F1</i>	CCATCACCACGCCAACAGCTC (39)	<i>BoDHAR3-R1</i>	TGCTAGAGGAGGCTCGGGTAC (66)	240
	<i>BoDHAR3-F2</i>	CGCATGAGATTTGCACTTTGACAT (40)	<i>BoDHAR3-R2</i>	TCAATCTCTGTTTGGGCTCC (57)	LTR+10721
	<i>BoDHAR3-F3</i>	AGCAAGGGAAGCTCAAGGCGC (41)	<i>BoDHAR3-R3</i>	ACCTCTGACGACGTTATACCGAG (58)	240
					5'-region
					3'-region
					3'-region

[0062]

[0063] 실시예 1. 양배추 재배와 내서성 조사

[0064] 내서성 양배추의 형질을 조사하기 위하여 아시아종묘(주)로부터 분양받은 내서성이 강한 내혼계 양배추 BN1과 내서성이 약한 내혼계 양배추 BN2 및 교배를 통해 확보한 F1 잡종과 F1을 자가수정하여 얻은 F2 양배추 종자를 과종하여 22℃ 생장실에서 30일 동안 생육시켰다. 상토를 채운 화분 (직경 17cm x 높이 20cm)으로 옮겨 심은 후, 3월 말부터 온실에서 재배하였다(BN1, BN2 및 F1은 10 개체씩, F2는 116 개체를 심음). 4~5일에 한번씩 하 이포넥스(Hyponex)를 희석하여 공급함으로써 영양부족에 의한 영향을 최소화하였다. 도 1과 같이 8월 초까지 4 개월간 유지하면서 결구와 무름병 감염을 조사하였다. 6월부터는 최저온도가 25℃ 이상이었고, 최고온도는 평균 45℃를 넘었으며, 관수관계로 평균습도가 90% 이상을 유지하여, 내서성 조사조건이 완벽하였다.

[0065] 도 2에서 보는 바와 같이, BN1은 엽색이 회록색을 띄며 단단하였으나, BN2는 엽색이 녹색으로 조직이 연하였으며 온실조건에서 두 계통 모두 결구는 되었으나, BN2는 무름병에 걸려 1주만에 모두 죽어갔으나, BN1은 10개체 중 2개체만 약한 무름병 감염증세를 보였다. 즉, BN2 계통은 무름병에 100% 감염되나, BN1과 F1은 80%가 저항성을 나타내는 것으로 확인되었다. 이는 *BoTPPI-2* 유전자의 유전적 차이가 내서성 및 무름병 저항성을 100% 대변하지는 않는다는 것을 시사하였다(즉, 다른 유전적 요인이 함께 작용하나, *BoTPPI-2* 유전자만 활용해도 80%는

예측이 가능하다는 것을 의미). 7월 19일의 데이터를 보면 염색이 BN2에 가깝다 하더라도 BN1의 DNA가 들어가면 20-40% 정도의 무름병 저항성을 가질 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 결국, 무름병 발병율이 내서성을 100% 대변하지는 못할지라도 어느 정도 지표가 될 수 있음을 시사하였다.

[0066] 실시예 2. *BoTPPI-2* 유전자 선발

[0067] *BoTPPI-2* 유전자를 표적 유전자로 선발하게 된 동기는 배정기술에서 언급한 바와 같이 트레할로스 함량과 생물학적 및 비생물학적 스트레스 저항성과 상관관계가 있었고, 내서성이 강한 양배추인 BN1과 약한 내흔계인 BN2 사이에 RNA Seq. 결과 다음과 같은 발현차이를 보이는 것에 근거하였다. 비록 애기장대에서와 같이 열처리에 의해 발현양이 줄어들기는 하였으나 두 내흔계 사이에 발현 차이가 분명하였다.

표 7

BN1과 BN2의 RNA Seq. 결과

내흔계 계통	BN1		BN2	
온도	22℃	45℃	22℃	45℃
RPKM 값*	89	59	8	7

[0069] *RPKM (read per kilobase million): RNA 시퀀싱을 전체 읽은 수(read 수)에 대한 유전자의 빈도수를 의미하는 것이 RPM(출현빈도수)이고, 이를 유전자의 길이 나눈 것이 RPKM이다. 즉, 그 전사체의 출현빈도를 의미한다.

[0070] 실시예 3. *BoTPPI-2* 유전자 클로닝과 서열 분석

[0071] 3-1) 양배추의 *BoTPPI* 유전자

[0072] 양배추 유전체 서열정보를 제공하는 2개의 웹사이트 BRAD와 Ensembl (BRAD에서 제공하는 유전자 서열은 Bo1..로 명명되고, Ensembl에서 제공하는 유전자 서열은 BoXg..로 명명됨)를 이용하여 애기장대 *TPPI* 유전자에 해당하는 양배추 유전자를 검색하면 도 3과 같다. 애기장대의 *TPPI*와 가장 비슷한 유전자는 *TPPJ* 유전자이며, 애기장대 *TPPI* 유전자와 상동성을 보이는 유전자는 양배추에 2종류가 있다. 하나는 3번 염색체에 존재하며 애기장대 유전자와 보다 높은 일치율을 보이며, 다른 하나는 9번 염색체에 존재한다. 3번 염색체에 존재하는 유전자를 *BoTPPI-1*으로 명명하고, 9번 염색체에 존재하는 유전자를 *BoTPPI-2*로 명명하였으며, 위 RNA Seq.결과는 *BoTPPI-2* 유전자와 일치하였다. 또한 두 웹사이트에서 제공하는 유전자의 DNA 서열이 일치하지 않았고, 틀린 부분이 많아서 클로닝하기 위한 프라이머 제작에 어려움이 있었으나 다양한 서열을 시도한 결과 최종적으로 표 5와 같은 프라이머 서열을 결정하여 클로닝하였다. 또한 2개의 *TPPI* 유전자가 존재하기 때문에 모두를 클로닝하여 분석하기로 하였다.

[0073] 3-2) *BoTPPI-1* 유전자의 분석

[0074] *Bo3g005430(BoTPPI-1)* 서열을 근거로 BN1과 BN2로부터 유전자 클로닝하기 위한 프라이머를 제작하여(도 4A), 게놈 DNA를 증폭하고 10개의 클론을 분석하여 최종염기서열을 얻었다(도 5). 도 5에서 보는 바와 같이 BN1과 BN2 사이에 InDel은 발견되지 않았고, SNP만이 발견되었다. 이 SNP의 위치와 서열은 도 4B에 정리하였다. *BoTPPI-1*은 BN1과 BN2 사이에 큰 차이를 보이지 않았고 발현도 거의 되지않아, *BoTPPI-2*의 클로닝과 발현분석의 정확도를 위한 참고자료로 사용하였다(*BoTPPI-2*_BN1과 게놈 DNA 서열이 81%가 일치하기 때문에 프라이머 제작에 참고로 사용해야 함).

[0075] 3-3) BN1 양배추로부터 *BoTPPI-2* 유전자 클로닝 및 분석

[0076] 표 5 및 도 6A와 같이 프라이머를 제작하여 BN1과 BN2의 게놈 DNA를 이용하여 PCR를 수행하였다(도 6B). 그 결과 9번째 엑손과 인트론에 걸쳐있는 프라이머를 이용하였을 경우, BN1과 BN2로부터 증폭이 가능하나 BN2로부터는 그 이후나 전체 서열을 증폭이 불가능하여 두 계통간에 유전자가 차이가 있을 것으로 예측되었다. 우선 Bo9g440-F와 Bo9g440-R 프라이머 조합을 이용하여 BN1으로부터 DNA를 증폭하여 완전한 서열을 얻었다(도 7). 서열분석 시 오류를 최소화하기 위하여 10개 이상의 클론을 분석하여 최종서열을 얻었다.

[0077] 3-4) BN2 양배추로부터 *BoTPPI-2* 유전자 클로닝 및 분석

[0078] 도 6B에서와 같이 BN2로부터는 *BoTPPI-2* 유전자의 뒷부분이 증폭되지 않기 때문에 상기 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 인접한 유전자(*Bo9g17430*)의 서열과 앞의 공통부분 서열을 이용하여 iPCR를 통하여 전체 서열을

결정하였다. 이때 사용한 프라이머 서열(표 5)과 위치는 도 8A와 같다. 최종적으로 BN2의 *BoTPPI-2*에는 10번째 엑손 전 인트론에 4,616bp의 LTR (long-terminal repeat)이 삽입되었음을 알 수 있었다(도 8B 및 도 9). BN1과 BN2의 서열을 비교한 결과 LTR 서열의 삽입부분을 제외하고는 두 계통간에 서열의 큰 차이를 보이지 않았다(도 10). 2 종류의 *BoTPPI-2*가 존재함을 입증하기 위하여 Bo9g440-F과 Bo9g430-R 프라이머 조합으로 PCR를 수행한 결과(도 11), BN1(내서성에 강한 양배추)의 경우는 3,179bp DNA가 증폭되고, 4,616bp LTR이 삽입된 BN2(내서성에 약한 양배추)의 경우는 7,795bp DNA가 증폭되었으며, 조은종묘(주)가 제공한 내혼계 양배추의 경우 내서성에 강한 것과 약한 것 5개 중에서 각각 4개는 BN1과 같은 유전자를 가졌고, 다른 4개는 BN2와 같은 유전자를 지닌 것을 확인할 수 있었다. 이는 적어도 80% 정도는 이 유전자를 이용하여 내서성의 판별이 가능하다는 것을 시사한다.

[0079] **실시예 4. PCR 검정용 프라이머 개발과 검정**

[0080] 내서성 강·약 양배추를 판별하기 위해서 PCR용 프라이머를 개발하였다. BN1의 *BoTPPI-2* 유전자가 증폭되는 것은 내서성이 강함을, BN2의 *BoTPPI-2* 유전자가 증폭되는 것은 내서성이 약한 양배추를 판별하는 것으로 개발하기 위하여 프라이머를 작성하였다(도 12A). 그 프라이머를 이용하여 PCR를 수행하여 BN1 타입 또는 BN2 타입 특이적 밴드를 증폭할 수 있었다(도 12B). 위 마커의 범용성을 검증하기 위하여 도 11에서 이용한 조은종묘(주)의 계통을 이용하여 PCR를 수행한 결과, 도 11과 동일한 결과를 얻었다(도 13). 그러나 육종가에 의해 분류된 양배추의 80% 정도만 일치하고 1계통(20%)은 일치하지 않아 *BoTPPI-2* 유전자가 내서성을 판별하는 대표적인 유전자이나, 이 유전자 하나만으로는 100% 내서성을 설명할 수 없다는 것을 시사하였다.

[0081] 마커 개발에 사용한 BN1과 BN2의 교배집단을 이용하여 마커의 활용성을 검증하였다. F2 개체 116개 중 5개체씩을 4 그룹으로 분류하였다. 염색으로 보아 BN1과 가장 가까운 그룹 A는 모두 BN1 타입(내서성 강)의 *BoTPPI-2*를 지녔고, BN1과 약간 덜 가까운 그룹 B는 5개 중 4개가 내서성 강으로, 내서성이 약한 BN2 타입의 염색을 지닌 그룹 D는 모두가 내서성이 약한 BN2 타입을 가졌으며, BN2에 가까운 그룹 C는 3개는 이형접합체(heterozygote)였고 하나는 BN1 타입이고, 다른 하나는 BN2 타입으로 나타났다(도 14). 이상의 결과는 *BoTPPI-2* 유전적 차이가 100% 내서성을 대변하지는 못할지라도, 80% 정도를 판별할 수 있어 마커로 활용이 가능하다는 것을 시사하였다.

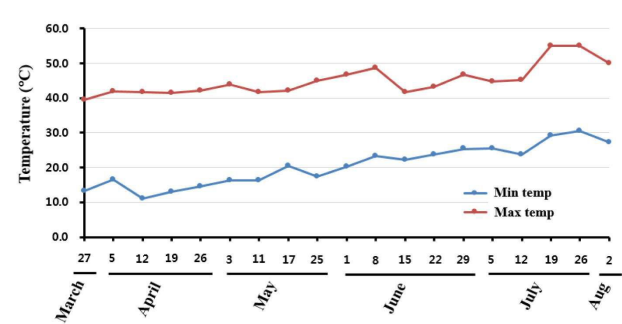
[0082] *BoTPPI-2*의 다형성이 그 유전자의 발현과 관련유전자의 발현과 관계가 있는가를 알아보기 위하여 발현 분석을 하였다. 도 15에서 보는 바와 같이 *BoTPPI-1*은 BN1과 BN2에서 발현이 되지 않으나, *BoTPPI-2*는 BN1에서만 발현이 되고, BN2에서는 발현이 되지 않았다. 그러나 열충격관련 일부 유전자는 BN1과 BN2 사이에 발현의 차이를 보이지 않았다. 따라서 *BoTPPI-2*가 열충격 단백질 발현과 관련은 없으나, 알려지지 않은 과정을 통하여 내서성과는 관련이 있는 것으로 유추되었다.

[0083] **실시예 5. 여러 양배추 내혼계와 재배품종에 대한 적용**

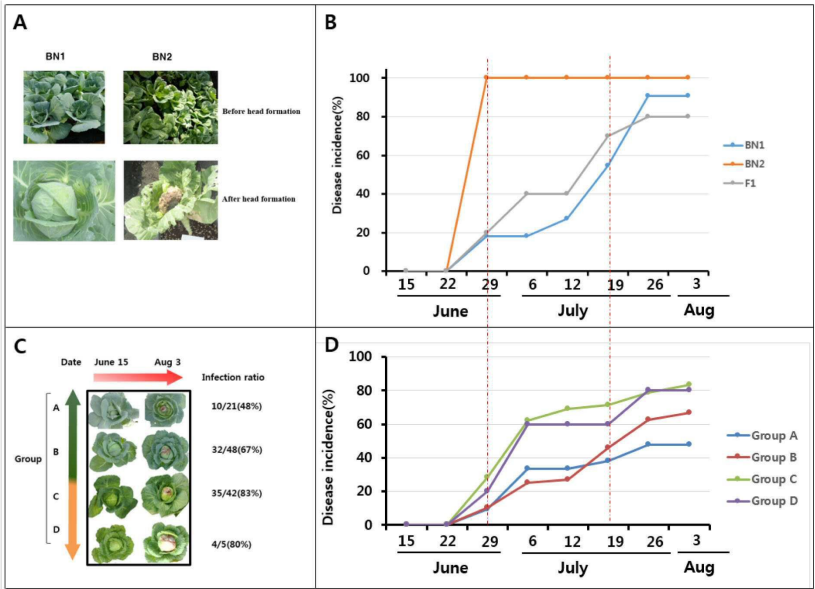
[0084] 위에서 개발한 마커의 범용성을 알아보기 위해서 표 1 내지 표 4와 같이 183계통의 양배추를 대상으로 PCR을 수행하였다. 그 결과, 145 계통의 양배추는 내서성 강 유전자형으로 나타났고, 11 계통의 양배추는 내서성 약 유전자형으로, 그리고 27 계통의 양배추는 이형접합체로 나타났다. 종자회사 및 육종가의 제언에 의하면 내서성 유전자형이 동형으로 또는 이형으로 존재하면 내서성이 있는 것으로 판단되고, 내서성이 약한 양배추는 BN2 타입이 동형으로 존재해야 되는 것으로 결정할 수 있었다. 배경기술에서 언급한 바와 같이 내서성이 약한 양배추(BN2 타입)는 조기숙기를 지니며 조직이 연하고 추대가 늦어 봄 재배에 좋은 양배추 품종을 개발하기 위한 좋은 재료이며, 본 연구에서 개발한 PCR 마커로 완전한 선발이 가능한 것으로 확인되었다.

도면

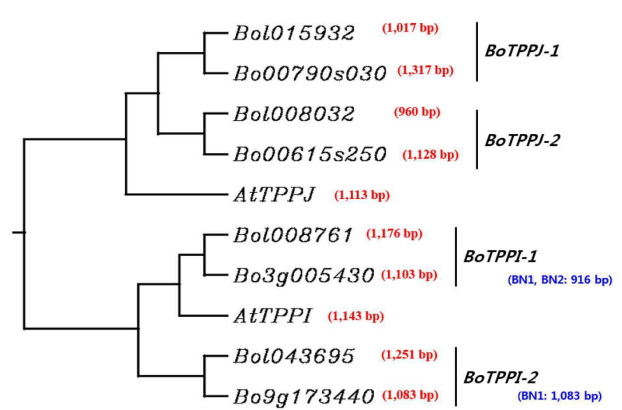
도면1



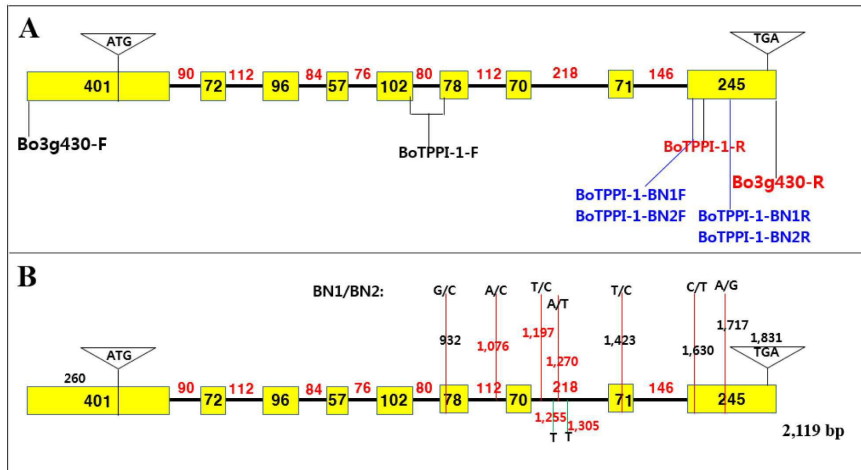
도면2



도면3



도면4



도면5a

A: 양배추 BN1과 BN2의 *BoTPPI-1* 서열

>BoTPPI-1_BN1

TCGGAGCTCTCTCTCTACTACTACAAAACACTCCCTTCTTCATCTCTCCAGACGAACAACAGTTTCATGGATCGTAAGTAGTCTTCCTATA
ATAATCTTTCTTCACGAAGCCTAAATGATCTTTCTTCTACCAAAATTTGTGTGTTTCCGCGACAGATGCAGCATCTCTTCGATAGAAGAT
GTTTGGAGAAAATCCACGAAGCTTCGGGAGGGAAACAATAAGTAATTTCTTGATTATGACGGTACTCTCTCCCATCGTGTGATGATCCGGA
CAGAGCTTCTAGTGCACAGGTTTGTGCTTGATATCACATAATCTTTTGACCTTATGATTATTAATTAATCTATGTGATTAAATTCAC
ATTTTCATGTGCTATCTCAGATGAGAAGAACAGTAAAAAACTGCTAAGTGTGTTTCCCACTGTTTAAATAGTCTGGGAGATGCTCAGACAAGG
TATTTATTTTTCCTTGCTATTTTCCCACAATATTTTAAATTTATTTATGATGATATTAATAGTCAATTTTGGTCTAAGTCAAGTTTGTG
TATTATGTCTTCCCAAGGTTGATATAGTTTGTGACAGTGTGATATATGCTGGCAGCATGGCGATGGACATTAAGGCGCGCGCAAAA
GGTTTCTCCGACGACAAGAGGGTAAATTCAAATTTACATAATTAAGTCAATAAAAACAATAATAATTTGTTTGTCATCTAACTTATTTAT
TCTTTTGTTTAGGTTAAACAGTCTTCTCTGTACCAACAGCCAGCTCTATCTCCCATGTGATGAAGATAGACATTCAGCAAACTTTATG
TACCTGTCCGTCAGGTGCGCTAAATTAACATTCGATGTGCTAAATTTATAGGTTCTATAGACAACATTTGGGAAAGAACCAATCAACTCTGT
GAGTCATAGTADGAAAACCAACAAGTTCTGTGCTCTGTGTCATTCGTTGCTGCATAGGAAGAGTAAATCGAATAACATTAAGAGAAAAGTT
TATTAATTAATGAAGAAATCAAGTTCTAAATGAGAAAACATAATAATCCAGAAATAGGCGAACCTGGTTTACAGAGTTCCGTCGGTATTAAGGA
ATCCCTTAGGCTTAAATCGAACAGGTCGAAAGGTTATGACATGACATTTCTTCCAGTGGTCATAGAGTAACTTACAGAAACATTTGTGATTT
TAACATAACAGTAGTGTTAAATTAATCAAAATATGTTTGGATGTAAATTAACAGGTTTTCGAATACGCTCTATGATTAAGGGATAGAGGAA
AGBCTCTTAGTCTTGTGATAGTCACTTGGTAGTCTCAGCTGCTCTCTTTTCTTAATAACATCTCTATTTTCAACATCTATAATAAAA
ACAAGCAATAAGTTTTTTCTGTGTGTCTTCATATTCAAAAGTGCTTGTGCTCCAGTATCATTTTTCATCATCAATATGCCTCTCAT
TCACCTTTTAAAGATTTTGATACAAATTAATAAAGATTAAGCAATAGTTTGTGAACCTCAGAGGTTTGGAAACTCTAACAGCAATTTCCCGAT
TATTTCTGGTGATGACGGCAGCGAGAAAGATTTTAAGGTATACCAATTAATTTTCCATATAGCTAATTTTCAATAGTAAAGTTTAAAAAAC
TAATATTTTCATAAAAATTAATAATCCCAACAATATTTGATCAACACATTAATATGTGTGTTTAAATTTTGGCCCTGTAAATGAATAGTA
TGTCCAGACAGACAGGTTGAAGCGTGGCGCTTGTGCTTCCAAATTCCCAAGGATACGGATGCTCATATTATTTGTCAAGATCGATCCGAGG
CATGTCCACACAGCATAGTATTTTGCAGATTACAGGTTTCTTCTACAGTGTCACTCTCTATAAAACGAACTCAATAGGTGATGAATTTCTGT
CAAGCATGTGTGGCGTGGAAACAATGCAGCCAGAGTGTGAAGAGGATGATATAATAATGA

>BoTPPI-1_BN2

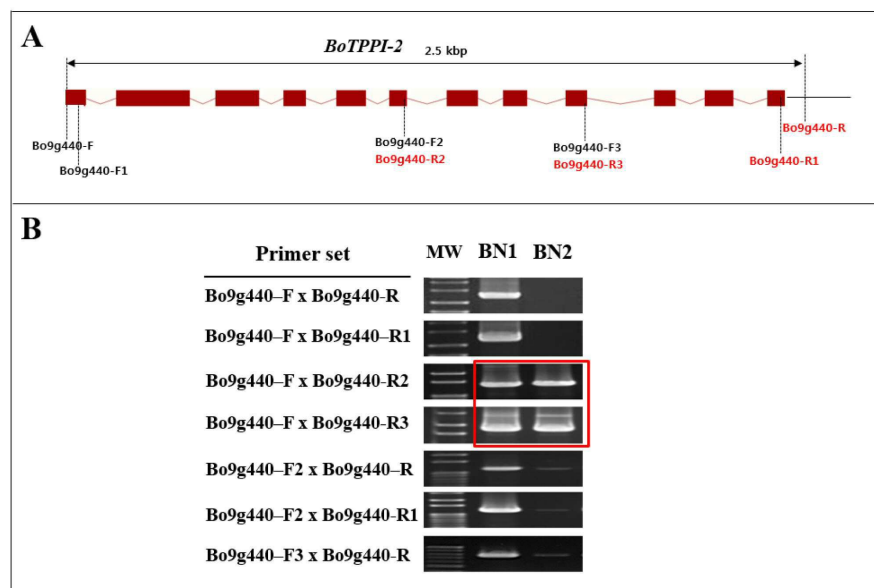
TGGCGGATCTTCTCTCACTTCACTCAAAAACCTACCCCTTCTTCATCTCTCCAGAGCAACAACCTAGTTCATGGATGGTAAAGTAACTCTTCATA
 ATAACTATCTTCTTCACGAAGCCATAAGTATCTTTCTTCTACAAATTTTGGTGTGTTCCGCGACAGATGACAGCATCTCTTCGATAGAAAT
 GTTTGAGAAAACTACAGAAGCTTCGGGAGGGGAAACAAATGCTAAATTTCTTGATTATGACGGTCACTCTCTCCCATCTGGTATGATATCCAGA
 CAGAGCGTCCATGTCGACGCAAGGTTTGGTCTTGATATACATTAATCTTTTGACCTTATGATTTAAATTAATCATTTGTGTAATTAATCAT
 ATTTTCATTGGCTATTCTTCAGATGAGAGAAAGCAAAAAAAGTGCCTAAGTGTTTTCACACTGCTATAGCTATCGTGAATGCTGACGAGAAGG
 TATTTATTTTTCCTTGCTATTTTCCCACAATATTTTAAATTTTATGTATATATAGCTAATTTTGGTCTTTTGGGTACAAAGCTAATTTTAA
 TTTATTTAGCTTTCCAAAGGGTGTATAGCTTTGTGAGCTAGTCGAGCTGATATTGCTGGCAGCATGGCGATGGACATTAAGGCGGCGCGGAAAA
 GGTTTCTCCGACGACAAGAGGGATATTTCAAATTCATAATTAAGCTGATAAAAAACAATAATGATATTTGTTGTCATCAAACTTTTATTTG
 TCTTTTGTTTAGGTTAAAGCACTCTCTCTGTACCAACGACGCAAGTCTCTATCTCCCATGATGATGAAGTAAGACATACGACAACATATATA
 TACCTGTGCGCTTCAGTGGCGCTAAATTAACATTCGATGCTGCTAAATTTTATAGGTTCTATAGACAACATTTGGAGAAACCAACCAACTCTCT
 GAGTCATAGTAAAGAAAACAAGTCTGTGCTCTCTGTGCGACTTCGTTGCGTCTGACGAGAAGGTAAATCGAAATACCATTAAGAGAAAAGTT
 TTATTAACATAAGTAAATCAAGTTTAAAAAGGAAAAACATAATAATCCAGAAATAGGCGCAACCTGGTTCTACAGGTTCCGGTCGGTATTAAGGA
 ATACCTTAGCTTTAACTCAAGAGGTCGAGGAAGTATGACATGACATTTTCCAGCTGGTCAAGATATATACAGAAATCATTTGATGATTA
 TAACATAACAGTGAAGTGAATAATATCTACATATGTTTGGATGTAAATCAACAGGTTTTCGAATACGTCCTATGATGAATGGGATAAGGAA
 AAGCTCTTGAGTTCTTGTAGAGTCACTTGGTGAAGTTCTCAGCTGCTCTCTCTTTCTTAAATCAAAATCACTTTTCAACATCTATATAAAA
 ACAAGGCAATAAGTTTTTTTCTTGTGTGTCCTCTTATCAAAGTGTCCTTGTCCACTGATCATTTTCATCACTAAATGCGCTCTATT
 TCACCTTTTAAAGATTTTGATACATTAATTAAGAAGTGAAGCTTTTGTGAACCTCAAGGGTTTGGAAACTCTAACAGAGTTTTCGCCGATT
 TCATCTGGTGATGACGCGACGAGGAAGATTTTAAGGTTATACCAATTTATTTTCCATATAGCTAATTTATCAATAGTAAAGTTTAAAAAAGC
 TAAATATTTCAATAAAAAATTAATAATCCAAACAATTAAGTTTACCAACATATATATGTTGTATTTAAAAATTTGGCCCTGTAAATGAATAGAG
 TGTACGACGAGAGGTTGAAGGCTGTGGCGTTCTGTCTCCAAATCCCCAAGGATACGGATGCCCTATATTATTTGTCAGAGTCACTCCGAGG
 CATGTCCACACACATAGATATTTTGCAGTTACAGGTTTCTTCACTAGCTCTAAGCTCTCTTAAAAACGAACTCAATAGGTGATGAATTTCTTG
 CAAGCATTTGGTGGCGTGGAAAAACAATGACGCCAGATGTGTGAGAGAGGATGATAATAATGA

도면5b

B: BoTPPI-1_BN1과 BoTPPI-1_BN2 서열의 비교. 엑손(exon)은 음영처리하였으며, 붉은색은 SNP를 나타내고, 녹색은 InDel을 나타냄.

BoTPPI-1_BN1	Exon 1	120
BoTPPI-1_BN2		120
BoTPPI-1_BN1	ATCTTTCTCTACAAATTTTGTGTGTTCGCGACAGTGCAGCATCCTCTGCAATAGAAATGTTGAGAAATCACAGAAGCTTCGCGAGGGAACAATCGTAATATCTTGA	240
BoTPPI-1_BN2	ATCTTTCTCTACAAATTTTGTGTGTTCGCGACAGTGCAGCATCCTCTGCAATAGAAATGTTGAGAAATCACAGAAGCTTCGCGAGGGAACAATCGTAATATCTTGA	240
BoTPPI-1_BN1	TATGACGCTACTCTCTCCCATCGTGTGATCCAGACAGAGCTTCAITGCAAGCAAGGTTGTGCTTGTATACATTAATCTTTTGGACCTATGATTTAATTAATCTATGTG	360
BoTPPI-1_BN2	TATGACGCTACTCTCTCCCATCGTGTGATCCAGACAGAGCTTCAITGCAAGCAAGGTTGTGCTTGTATACATTAATCTTTTGGACCTATGATTTAATTAATCTATGTG	360
BoTPPI-1_BN1	Exon 2	480
BoTPPI-1_BN2		480
BoTPPI-1_BN1	GTCAATTTCCCAATATTTTAAATTTATGATAAATAGCTAATTTTGTCTCTTTTGGTCAAGCTAAATTTAGTATTTATGCTTTTCCAAGGTTGATAACCTTTGTCAAGCTAGCT	600
BoTPPI-1_BN2	GTCAATTTCCCAATATTTTAAATTTATGATAAATAGCTAATTTTGTCTCTTTTGGTCAAGCTAAATTTAGTATTTATGCTTTTCCAAGGTTGATAACCTTTGTCAAGCTAGCT	600
BoTPPI-1_BN1	GAGCTGATTTATGCTGACGACCTGCGATGACATTAAGGCGCGCAAGGTTTCTCCAGACACAGAGGTAATTTCAAATACATAATTAAGTATAAAACAAATATATAT	720
BoTPPI-1_BN2	GAGCTGATTTATGCTGACGACCTGCGATGACATTAAGGCGCGCAAGGTTTCTCCAGACACAGAGGTAATTTCAAATACATAATTAAGTATAAAACAAATATATAT	720
BoTPPI-1_BN1	Exon 4	840
BoTPPI-1_BN2		840
BoTPPI-1_BN1	Exon 5	960
BoTPPI-1_BN2		960
BoTPPI-1_BN1	Exon 6	1080
BoTPPI-1_BN2		1080
BoTPPI-1_BN1	Exon 7	1200
BoTPPI-1_BN2		1200
BoTPPI-1_BN1	Exon 8	1559
BoTPPI-1_BN2		1559
BoTPPI-1_BN1	Exon 9	1799
BoTPPI-1_BN2		1799
BoTPPI-1_BN1		1919
BoTPPI-1_BN2		1919
BoTPPI-1_BN1		2015
BoTPPI-1_BN2		2015

도면6

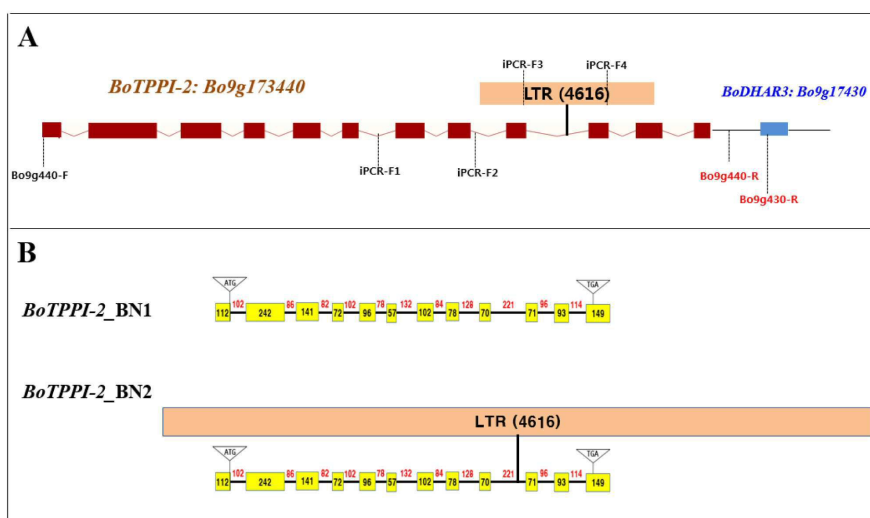


도면7

2B-TPIPI-2_BN1

TCCTCATCTCATCATCCATCCATCTCTCTCTTTTTCCTCTCCCTAAATCTCAGITTTAACTTTGATTCAGAGTAC
AATTTACCCCTTGAGGCCATATTTCTTAAATGGGTAAAGCATTGGCTTGTTTACTAGGTTTCATCTCAACATAAGCTAG
TATATATCTCTCATTACCACCTTGATTAAACCAATTGATATCTGTGTTTACTCAGTGAGCTTTGCTGGGAAAGAACCA
CAGAGAAATGTCAAACCGGTGTCGTACAGAGACCAAAAGTTAAGTATCATCTCCATAACACTTCTCTTGCTCGAGAAAA
CGCTTCTCAAGAACTCGAGATCATCAATGGTGGCCAAAGATCAACGGTCTGGGTGCGTTCAATCGGGGCTTCTCTCT
TACTCATCTCAAACTCATGCTCTCTCTGCTCTCTCGAGAAACACTTCAGCTCATGGATCGTAAAGTAGTCTCCATATA
CAACTCTCTCTCAACAAACTCTCGAAGATCGCTTTTCTCTCTCAAACTTTTAATGTGTGTTCCGACAGATCGGCCATAT
TTCAGCATTTAGAAATTTTGTAGAAGATACAGAGGCTTCAGGAGGGAAACAAATCGTAAATGTTCTTGATTATGACGG
TACTCTCTCTCCATCGTTGTAGTCACGACAAAGGCTTCAGTCAAGCAAGGTTTCTTCAAACTCATGTTATTTGTT
TTCACCTAATCATTTTATCTCTGTGATTAATCACTGTTTGAATGATGTTCTCAGTAGAGAAAGCTGTAAAAAAGCT
GGCTAAATGTTTCCCAACTGCAATAGTTACCGGTAGTGATGATCAAGCAAGTATTTTAATGTGTTTCTGGCATTTCTCTC
ATATTTTATGACGGTATATATAAAAAATTTATATAAATAAATTAATTTTAAATAATTTGTTTCTTTCGAAGTTCTCTCA
AACTTTGTGAAGCTGGCTGAGCTGTATATGCTGGACGCAATGGCATGGACATTAAGGTTCAGCAAAAGGTTTCTCCA
GACACAGAGGGGTAATATAATTAATTTCAATAAAAAAGAGTACCATTTGATTTATTTTGGTTTAAAGTTTATTTAATTTCTCT
TTCTTGCTCAGGTTTAAACAGCTCTCTGTGTTACCAACAGCCAGTGACTATGTTCTCATAGTCAGTGAAGTAAGACATAT
TATGTTCCGGCTTAAACAAATAAATTTATATATGTTTCTCTGTATCAGCAGAAATACCTGTGCGTGCTCTTCCAAATTTGT
TGTTATAATTTAACACTGTGTTATGTTGTGTTTGAATTTAAAGTCTATAAAACAACCTTGGAGAAAACCTAAATCAACT
CTCTGGGTCATAGTAGAAAACCAAGAGTTTACCCGCTCTGTGTCACCTTCTGTTGGTGGGAGGAGAAGGTAAATCGTAC
CACACTAAAAATATATCTTTTATAATAATAAAGAAATACCAATAGAATGCGAAAGTAAATATATCTCAGAAATGGAG
CGCTTCTCAGAGTTCTGTCGGTATAGAGATATGAGAGATATCTACCTCAAACTGACGCAAGGTGAGAGGTATGATCAT
GACGTTCTCTCATCTGTACAAAGAACTCTTTAAACAAATTTGTAATATAGTTTCTGTTGTCTCAACAGTCAAGCTGAGTGT
AAAAATTTAAATTTAAATTTGTTTGAATATAATAACAACAGGTTTCGAAAACCGCTCATATGTCATGGGAAATATA
GAAAAGGCTTGTAGTTCTGTAGAGTCACTTGGTAGGTGCTCAGTAGCCCTCTCTCTTCTTCAAAAACAAATATCTT
TTTCAACTCTATAATTAATAAAGCAAAATTAAGTTGTCTGCTGTTTATTAAGAACCAATTTCTCTCAACTAAT
ATTTTTCATCATCAATATGCTCTCAGTTCACTTTAAATAATGGGATACTATCAATTTACAGACTGAAGTAAATTTTGA
ACCTTTTGGAATACGACAGGGGTTTGGGAAGCTATAACAACGTTTTCGCCGTTTACATCGGCGACAGCTCGGCACGGAAGA
TGCAATTTAAGGTATACGAATATTCGATAGATATAAAAAAAATATCATATACCTAAGTTACGGGCGCTAAATATAT
TGATTAAACATTTGGTACCATGTAATTAAGTATGCTACGACAGGGGTGAAGGCTTTGGCATACTGTTTCCCAAAATTTCC
AAGGATACAGATGCTTCGATATCTCTGCAAGATCGCTCGAGGACAGTCACACACGGGTATTTAATAATATGTATATC
CATAGTATCCGCTCATGATTTTCGCAAGTACATGGTTTCTATACGTGCAATCTCTTCAAAAATAAATCAATGATG
GATGAAATTTCTTTCGACAGATTTGTGTGAAGTGGAAACAAATTCGACGCAAGAAATGAAGAGGGATGTAATAAATGAGCT
AGTGCAAAATTCGAAATATTTGATGCCAACCAATATGATATGGTAAACCTTTCATGGAAGCTGTGTAGA

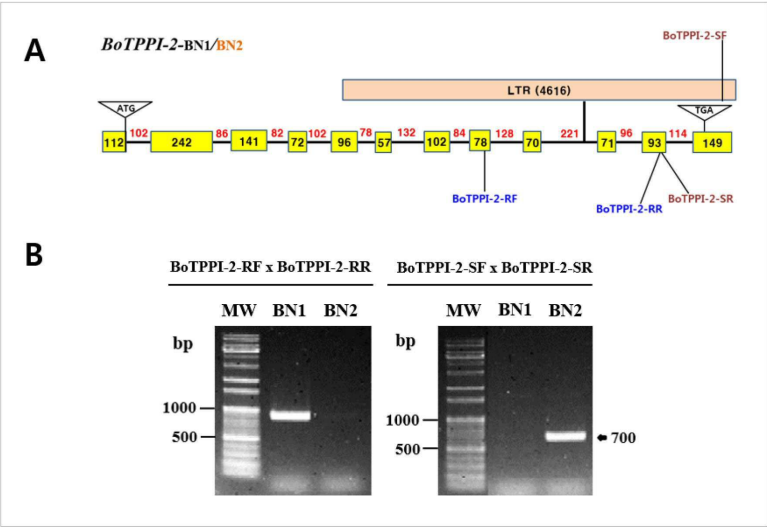
도면8



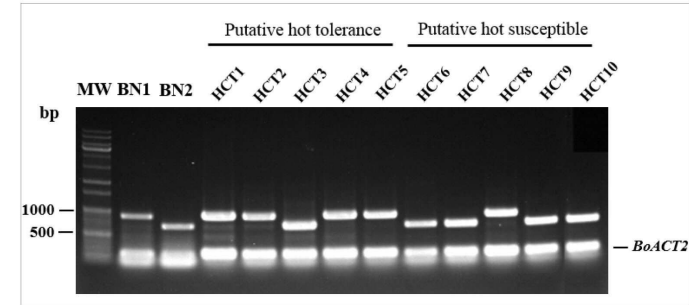
도면9

[illegible]

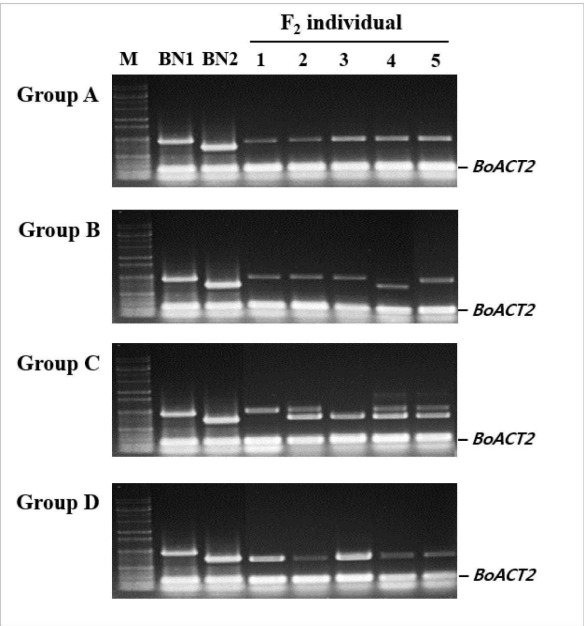
도면12



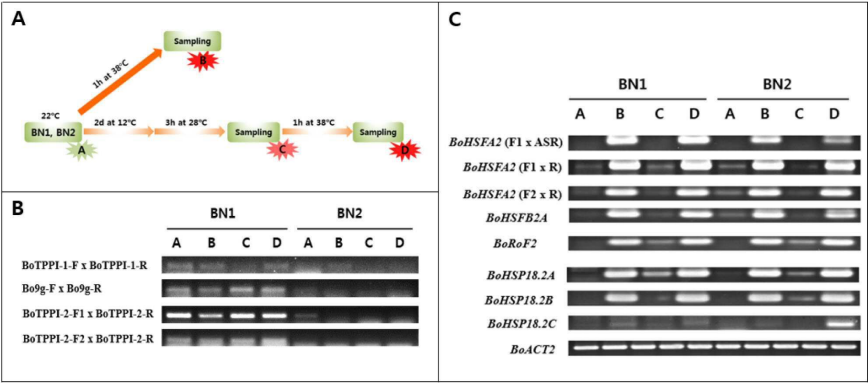
도면13



도면14



도면15



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Primer set for discriminating heat-tolerant Brassica oleracea cultivar using BoTPPI gene and uses thereof
- <130> PN18391
- <160> 58
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Primer_Bo3g-F
- <400> 1
- tgcgagcttc ttctectact catcc 25
- <210> 2
- <211> 22
- <212> DNA
- <213>
- > Artificial Sequence
- <220><223> Primer_Bo3g-R
- <400> 2
- cctcttcaca cwcytggtg ca 22
- <210> 3
- <211> 28
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_Bo9g440-F
 <400> 3
 tcctcatctt catcatccac tccatctc 28
 <210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g440-R
 <400> 4
 tctacaacgt tccatgaaag gttagcca 28
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g440-F1
 <400> 5
 ctcagtttaa ctttgattca agtactaatt 30
 <210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g440-F2
 <400> 6
 acaaataac ctgtcgtgct cttcaat 27
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g440-F3
 <400> 7
 gagtcacttg gtgagtgtc a 21
 <210> 8
 <211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g440-R1
 <400> 8
 cttcatattc ttggctgcat ttgtttcca 29
 <210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g440-R2
 <400> 9
 attgaagagc acgacaggta tatttgt 27
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g440-R3
 <400> 10
 tgagcactca ccaagtgact c 21
 <210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_iPCR-F1
 <400> 11
 cgacaaatat acttgtcgtg ctcttca 27
 <210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_iPCR-F2
 <400> 12
 gtatgacatg acgttctctc atttgac 27

<210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_iPCR-F3
 <400> 13
 caagccatct ggttacaaga acttcta 27
 <210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_iPCR-F4
 <400> 14
 ctaaacttat caaacgcttc tcccttc 27
 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g-430-R
 <400> 15
 accgcttgat aaatccgacg tg 22
 <210> 16
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoTPPI-2-RF
 <400> 16
 tcatagtaga aaaccagaag ttaccg 27
 <210> 17
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoTPPI-2-RR
 <400> 17

gacggatctt gcagagaata cgaa	24
<210> 18	
<211> 20	
<212>	
> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer_BoTPPI-2-SF	
<400> 18	
ggcacttgat cgaggatgat	20
<210> 19	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer_BoTPPI-2-SR	
<400> 19	
atcttgcaga gaatacgaag catct	25
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer_BoACT2-F	
<400> 20	
tgccaatcta cgagggtttc	20
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer_BoACT2-R	
<400> 21	
tctcgatgga agagctggtt	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Primer_BoTPPI-1-F

<400> 22

tgcgtcgatg agaagaaatg 20

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_BoTPPI-1-BN1F

<400>

> 23

tacgagacag aggtgaaggc c 21

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_BoTPPI-1-BN2F

<400> 24

ctacgagaca gaggtgaagg ct 22

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_BoTPPI-2-F1

<400> 25

tggagcgaac tggttctaca gg 22

<210> 26

<211>

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_BoTPPI-2-F2

<400> 26

tacatcggcg acgatcggaac 20

<210> 27

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g-F
 <400> 27
 agctgtatta tgctggcagc ca 22
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoHSFA2-F1
 <400> 28
 catggtggag gatccggcaa 20

 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoHSFA2-F2
 <400> 29
 caagttgcag aaatggagca 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoHSFB2A-F
 <400> 30
 ctttgtccgt cagctcaaca 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoROF2-F
 <400>
 31
 aaatcgatcc ggacaacaag 20

<210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoHSP18.2A-F
 <400> 32
 ttagcaaacg cttccggctc a 21
 <210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoHSP18.2B-F
 <400> 33
 ctcttaacgc cttcctcggc t 21
 <210> 34
 <211>
 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoHSOP18.2C-F
 <400> 34
 agacctgtat gaccggttcg 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoTPP1-1-F
 <400> 35
 tgcgtcgtat agaagaaatg 20
 <210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g-F
 <400> 36

agctgtatta tgctggcagc ca	22
<210> 37	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer_BoTPPI-2-F1	
<400> 37	
tggagcgaac tggttctaca ggt	23
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer_BoTPPI-2-F2	
<400> 38	
tacatcggcg acgatcggac	20
<210> 39	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer_BoDHAR3-F1	
<	
400> 39	
ccatcaccac acccaacaag etc	23
<210> 40	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer_BoDHAR3-F2	
<400> 40	
ccacatgaag attgcacttg gacat	25
<210> 41	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Primer_BoDHAR3-F3
 <400> 41
 agcaagagga actcaagcgg c 21
 <210> 42
 <211>
 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoTPPI-1-R
 <400> 42
 ttggggaatt tggagacaag 20
 <210> 43
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoTPPI-1-BN1R
 <400> 43
 cgtgtagaaa accgttaact gcaaaatact t 31
 <210> 44
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoTPPI-1-BN2R
 <400> 44
 cgtgtagaaa accgttaact gcaaaatact 30
 <210> 45
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoTPPI-2-R
 <400> 45
 cactccacca atcgtegcaa ga 22
 <210> 46
 <211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g-R
 <400> 46
 cgaacctgta gaaccagttc gct 23
 <210> 47
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoHSFA2AS-R
 <400> 47

 cttttaagct gaggactaac caccgat 27
 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoHSFA2-R
 <400> 48
 cattagcgcg aactgttgaa 20
 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoHSFB2A-R
 <400> 49
 gcttgaggcg ttaactttcg 20
 <210> 50
 <211> 20
 <212>
 DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoROF2-R
 <400> 50
 gccagcatgt tgctgtagaa 20

<210> 51
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoHSP18.2AB-R
 <400> 51
 tcgtttctcct tgctcctctc tcc 23
 <210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoHSP18.2C-R
 <400> 52
 ttctcgtgc ttctctctcc 20

 <210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoTPP1-1-R
 <400> 53
 ttggggaatt tggagacaag 20
 <210> 54
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_Bo9g-R
 <400> 54
 cgaacctgta gaaccagttc gct 23
 <210> 55
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer_BoTPPI-2-R

<400> 55

cactccacca atcgtcgcaa ga 22

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_BoDHAR3-R1

<400> 56

tgctagagga ggctcagggt ac 22

<210> 57

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_BoDHAR3-R2

<400> 57

tcacatcctc tgtttgcgcc tc 22

<210> 58

<211> 24

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_BoDHAR3-R3

<400> 58

acctctcgag cagcttatac cgag 24