(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0117972
(43) 공개일자 2017년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2013.01)
C12Q 1/683 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0128045(분할)
(22) 출원일자 2017년09월29일
심사청구일자 2017년09월29일
(62) 원출원 특허 10-2015-0018961
원출원일자 2015년02월06일
심사청구일자 2015년02월06일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이궁주
세종특별자치시 연기군 조치원읍 섭골길 56 세종 e편한세상 112동 1103호
(74) 대리인
김지형

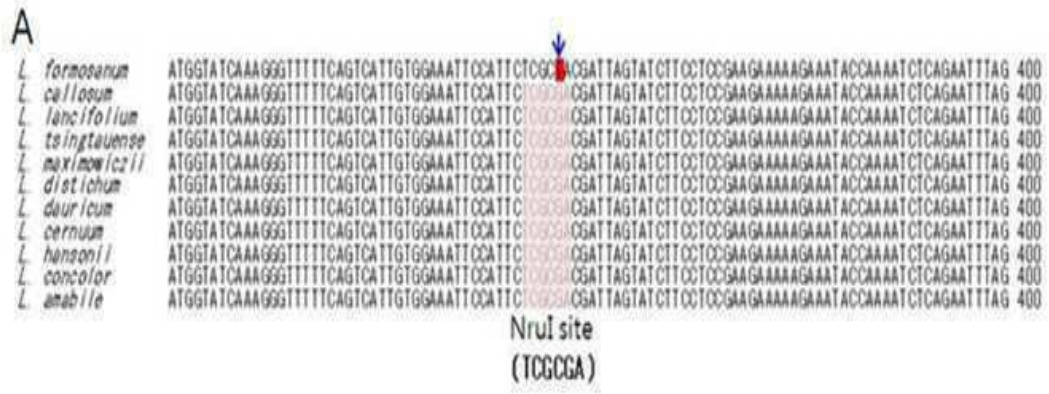
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **MatK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발 방법**

(57) 요 약

본 발명은 MatK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발 방법에 관한 것으로 더욱 상세하게는, 흰나리의 matK 유전자 영역의 염기서열 정보를 활용하여 흰나리와 이들로부터 유래된 교잡종으로부터 자생나리를 구분할 수 있는 CAPS 마커의 개발하는 것을 특징으로 하는 MatK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3a



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/13 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

자생나리의 어린 잎을 잘라 액체질소로 급냉시켜 마쇄한 후, HiGene genomic DNA prep kit를 이용하여 게놈 DNA를 추출하고, 상기 추출한 DNA는 DU-730 UV/Vis Spectrophotometer와 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 흰나리의 DNA를 추출하고, 상기 DNA의 MAtK 유전자 부위를 증폭하여 염기서열을 획득하며 상기 MAtK 유전자 염기서열을 기반으로 희나리의 CAPS 마커를 검증하되, 상기 CAPS 마커 검증은 matK 프라이머로 흰나리5의 DNA를 증폭하고, 상기 증폭한 흰나리의 DNA를 NruI 제한효소로 반응시키며, 상기 MAtK 유전자 부위를 증폭하기 위한 프라이머는 5`에서 3`의 방향으로 ATGGAAGAATTACAAGGG의 염기서열로 제조된 Lily_MAtK_F 프라이머 및; 5`에서 3`의 방향으로 ATGGAAGAATTACAAGGG의 염기서열로 제조된 Lily_MAtK_F 프라이머를 사용하여 MAtK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발방법에 있어서,

상기 MAtK 염기서열에 따라 프라이머를 제작하여 DNA 증폭기를 이용하여 PCR을 실시하고, 상기 PCR조건은 94℃에서 5분간 일차적으로 변성을 유도한 후, 94℃에서 30초간 denaturation, 53℃에서 30초간 어닐링, 72도에서 5분간 PCR 산물의 안정화를 실시하여 PCR산물을 취득하며,

상기 PCR 완료후, 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 PCR 산물의 증폭여부를 확인하기 위하여 획득한 PCR 산물 10㎕와 NruI 제한효소 및 1X Ez BufferIII가 포함된 반응액 20㎕을 37℃에서 2시간 동안 반응시킨 후, 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 CAPS 마커를 검증하는 것을 특징으로 하는 MatK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 MatK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발 방법에 관한 것으로 더욱 상세하게는, 흰나리의 matK 유전자 영역의 염기서열 정보를 활용하여 흰나리와 이들로부터 유래된 교잡종으로부터 자생나리를 구분할 수 있는 CAPS 마커의 개발하는 것을 특징으로 하는 MatK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 백합(나리; 속명 *Lilium*)은 북반구 온대지역에 약 100여종이 생육하는 것으로 알려졌고, 영국 왕립원예학회에서 9개 그룹으로 분류하고 있으며 우리나라에 자생하는 것은 이 중 대부분 Sinomartagon, Martagon, Leucolirion 그룹에 속한다. 백합은 우리나라 절화 품목 중 장미, 국화에 이어 3위에 이르는 경제적으로 매우 중요한 원예작물로 2012년 재배면적 192 ha에서 약 4,100만본이 생산되어 년 322억원 이상의 판매금액을 보인 소득작물이다.

[0004] 우리나라에서 주로 발견되는 대부분의 Asiatic 계통의 나리는 다양한 화색과 병 저항성 등 우량 형질을 보유하고 있어 종간 또는 속간 교잡을 통한 새로운 품종의 개발에 유용하게 활용될 수 있는 유전자원이다. 하지만 최근의 산업화 및 무차별한 자생식물의 채취와 관리부족으로 이러한 유용 자생 나리의 손실이 급격화되고 있어 유전자원의 보존과 체계적인 식물학적 분류에 대한 필요성이 대두되고 있다. 식물 신품종에 대한 지적 재산권 인정을 위한 국제 식물신품종 보호동맹의 식물 신품종 보호제도가 도입되면서 우리나라도 2002년 1월 50번째 정식 회원국으로 가입하였다. 이에 따라 자국 원산지 식물의 중요성이 더욱 강조되고, 이를 활용한 신품종 육성의 경우 로열티 지불이 의무화되게 되었다. 따라서 국내 자생 및 도입 나리의 경우 원산지 증명 및 자원화 전략과 노력이 절실해졌다고 할 수 있다.

[0005] 대부분 상업종은 Asiatic, Oriental 및 Longiflorum 교잡종이 주를 이루고 있지만 이들간의 종간교잡종인 LA(Longiflorum × Asiatic 교잡종), LO(Longiflorum × Oriental), OT(Oriental × Trumpet 교잡종) 및

OA(Oriental × Asiatic 교잡종) 계통들이 등장하면서 각각의 그룹이 가지고 있는 우량 형질을 유지하면서 단점 형질을 대체하는 시도가 활발해지고 있다. 그 중에서 흰나리는 Longiflorum 그룹에 속하며 흰백색을 가지고 있어 국내 자생종 Asiatic 백합에서 찾기 힘든 화색을 보유하고 있고, 이 두 그룹간의 LA 교잡종의 신품종 보호를 위해서는 정확한 계통의 규명이 필요하게 될 것이다.

[0006] 분자마커는 식물의 DNA 특정 타겟 영역의 염기서열 변화를 이용하여 종내 변이종 또는 특정 지역의 환경에 순화된 생태형과 같이 유전적으로 유사한 백합 유전자원의 식별에 유용하게 활용될 수 있다. 엽록체와 같이 모계를 통해 유전이 되는 세포 소기관의 DNA 영역을 이용하는 rbcL(광합성 탄소고정에 관여하는 Rubisco 유전자 영역) 또는 matK(matulase) 유전자 영역은 염기서열의 길이와 염기의 종류의 변화가 상대적으로 높은 빈도로 발생하여 유사한 유전자원간의 유전적 유연관계 분석과 유전자원을 구분하는 바코드로 활용되어져 왔다. 즉 유전적으로 유연관계가 먼 유전자원들은 이들 핵 또는 엽록체의 DNA 영역에서 많은 염기 변화를 보이고 있어 상대적으로 유전 다양성이 높다고 볼 수 있다.

[0007] CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequences)는 제한 증폭 다형성 시퀀스라고도 하며, 제한효소 처리에 의한 배열차를 검출하는 품종식별법이다.

[0008] 사전에 품종 간에서 염기 배열의 차가 있다는 것을 알고 있는 유전자를 목적으로 해서 검출이 이루어지며, 종의 게놈 중에서 해당 유전자만을 PCR 법에 의해 선별하여 증폭한다. 대부분의 마커에서는 증폭된 유전자의 길이와 품종 간의 차가 없으나, 유전자 내부의 배열은 다르기 때문에 그 배열의 차를 인식하는 제한효소를 선발해서 처리한다. 제한효소로 절단된 DNA를 보유하는 품종과 절단되지 않는 DNA를 가지는 품종과의 차이를 구별할 수 있으며 그 길이의 차이는 전기영동법에 의해 쉽게 검출된다.

[0009] 국내등록특허공보 제10-1271367호(나리 속 식물에서 분리한 SSR 프라이머 및 이의 용도)는 서열번호 1 내지 서열번호 60으로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 갖는 SSR 프라이머쌍 및 이를 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 나리 속 식물의 DNA 다형성 검출 방법 및 품종 판별 방법에 관한 것이나, 종별 구별 마커의 종류가 다양하여 결과를 얻기까지 시간이 오래 걸린다는 문제점이 있으며, 게놈 상에 널리 분포하는 반복 서열을 활용하는 것이어서 특정 나리를 단시간에 식별하는 것에 어려움이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) KR 10-1271367 B1 (2012. 05. 29)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 상기의 문제점을 해결하기 위해 본 발명에 따른 matK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발 방법을 이용하여 모계로부터 유전되는 matK 유전자 영역의 염기서열 정보를 활용하여 흰나리와 이들로부터 유래된 교잡종으로부터 자생나리를 구분할 수 있는 CAPS 마커의 개발을 위해 활용 가능한 제한효소의 선정과 유전자원 간에 식별 가능성을 검증하는 것에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따른 MatK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발 방법은 흰나리의 DNA를 추출하는 단계, 상기 추출한 흰나리의 DNA로 MatK 유전자 부위를 증폭하여 염기서열을 획득하는 단계, 상기 획득한 MatK 유전자 염기서열을 기반으로 흰나리의 CAPS 마커를 검증하는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한 상기 CAPS 마커 검증은 matK primer로 흰나리의 DNA를 증폭하는 단계, 상기 증폭한 흰나리의 DNA를 NruI 제한효소로 반응시키는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0016] 또한 MatK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발 방법에 있어서, 상기 MatK 유전자 부위를 증폭하기 위한 프라이머는 5'에서 3'의 방향으로 ATGGAAGAATTACAAGGG의 염기서열로 제조된 Lily_matK_F 프라이머 및 5'에서 3'의 방향으로 CTAATTATTCACCAGGTC의 염기서열로 제조된 Lily_matK_R 프라이머를 사용하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 matK 유전자 부위를 활용하여 여러 종류의 나리 중 흰나리를 식별할 수 있는 CAPS 마커를 개발하는 방법에 관한 것으로 흰나리 및 흰나리와 교배된 교배종으로부터 자생나리를 구별할 수 있는 효과가 있다.

[0019] 또한 향후에 흰나리를 활용하여 새로운 품종을 개발하고자 교배친으로 이용할 때 흰나리로부터 유전물질의 후대 전달여부를 판단하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1a는 흰나리 및 자생나리의 MatK 유전자 부위의 PCR 결과를 나타내는 상대도.

도 1b는 흰나리 및 자생나리의 MatK 유전자의 염기 치환 부위를 나타내는 상태도.

도 2는 흰나리 및 자생나리의 유사도 분석도.

도 3a는 흰나리 및 자생나리 MatK 유전자에서 NruI 제한효소 사이트를 나타내는 상태도.

도 3b는 흰나리 및 자생나리의 MatK 유전자를 증폭하여 Nru I 제한효소를 CAPS 마커로 사용하여 절단된 유전자를 나타내는 상태도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 MatK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발 방법에 관한 것이다.

[0024] MatK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발 방법은 흰나리의 DNA를 추출하는 단계, 상기 추출한 흰나리의 DNA로 MatK 유전자 부위를 증폭하여 염기서열을 획득하는 단계, 상기 획득한 MatK 유전자 염기서열을 기반으로 흰나리의 CAPS 마커를 검증하는 단계로 이루어지는 것이 바람직하다.

[0025] 또한, 상기 CAPS 마커 검증은 matK 프라이머로 흰나리의 DNA를 증폭하는 단계, 상기 증폭한 흰나리의 DNA를 NruI 제한효소로 반응시키는 단계로 이루어지는 것이 바람직하다.

[0026] 또한 MatK 유전자 부위를 활용한 흰나리 식별 CAPS 마커 개발 방법에 있어서, 상기 MatK 유전자 부위를 증폭하기 위한 프라이머는 5'에서 3'의 방향으로 ATGGAAGAATTACAAGGG의 염기서열로 제조된 Lily_matK_F 프라이머 및 5'에서 3'의 방향으로 CTAATTATTCACCAGGTC의 염기서열로 제조된 Lily_matK_R 프라이머를 사용하는 것이 바람직하다.

[0028] 도 1a는 흰나리 및 자생나리의 MatK 유전자 부위의 PCR 결과를 나타내는 상대도로 M은 DNA marker이며 1은 날개하늘나리, 2는 말나리, 3은 땅나리, 4는 섬말나리, 5는 솔나리, 6은 중나리, 7은 참나리, 8은 털중나리, 9는 하늘나리, 10은 하늘말나리, 11은 흰나리를 나타낸다.

[0029] 도 1b는 흰나리 및 자생나리의 MatK 유전자의 염기 치환 부위를 나타내는 상태도이다.

[0030] 도 2는 흰나리 및 자생나리의 유사도 분석도이다.

[0031] 도 3a는 흰나리 및 자생나리 MatK 유전자에서 NruI 제한효소 사이트를 나타내는 상태도이다.

[0032] 도 3b는 흰나리 및 자생나리의 MatK 유전자를 증폭하여 Nru I 제한효소를 CAPS 마커로 사용하여 절단된 유전자를 나타내는 상태도로 M은 DNA marker이며 1은 흰나리, 2는 날개하늘나리, 3은 말나리, 4는 땅나리, 5는 섬말나리, 6은 솔나리, 7은 중나리, 8은 참나리, 9는 털중나리, 10은 하늘나리, 11은 하늘말나리를 나타낸다.

[0034] 본 발명에 사용되는 흰나리는 대만이 원산지로 영국 왕립원예학회 분류상 대부분 식물체의 크기가 큰 흰색 백합의 원조인 Longiflorum 그룹에 속하는 것으로 우리나라 자생종과의 교배 친화성이 높은 것으로 나타나고 있다.

[0036] 이하에서 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위를 제한하는 것이 아님은 당업자에게 있어서 명백한 사실이다. 즉, 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 당업자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

[0038] 실시예 1 : 흰나리 및 자생나리 준비

[0039] 본 발명에 사용된 백합된 한국생명공학연구원에서 수집 관리중인 흰나리와 강원도 평창에서 구입하여 충남대학교 원예학과에서 관리중인 날개하늘나리, 땅나리, 솔나리, 중나리, 참나리, 털중나리, 하늘나리, 말나리, 섬말나리, 하늘말나리로 이루어지는 10종의 자생나리를 비교 대상으로 이용하였다.

표 1

[0041]

학명	분류	개화기	화색	잎 배열	한국 명
Lilium formosanum Wallace	교잡종	8~9월	흰색	호생엽	흰나리
Lilium dauricum Ker-Gawler	아시아계	7~8월	황적색	호생엽	날개하늘나리
Lilium callosum Siebold & Zucc.	아시아계	7월	주황,노랑	호생엽	땅나리
Lilium cernuum Kom.	아시아계	7월	분홍	호생엽	솔나리
Lilium leichtlinii (Regel) Baker	아시아계	7~8월	오렌지	호생엽	중나리
Lilium lancifolium Thunb.	아시아계	7~8월	레드 오렌지	호생엽	참나리
Lilium amabile palibin	아시아계	6~7월	오렌지	호생엽	털중나리
Lilium concolor Salisb.	아시아계	6월	레드 오렌지	호생엽	하늘나리
Lilium distichum Nakai.	말나리계	7~8월	엘로우 오렌지	돌려나기	말나리
Lilium hansonoii Leichtl	말나리계	7월	노랑	돌려나기	섬말나리
Lilium tsingtauense Gilg	말나리계	6~7월	오렌지, 엘로우 오렌지	돌려나기	하늘말나리

[0042] 실시예 2 : 흰나리 및 자생나리의 잎 샘플링 및 DNA 추출

[0043] 흰나리 및 자생나리의 잎 샘플링 및 DNA 추출을 위해 충남대학교 온실에서 관리 중이던 자생나리의 어린 잎을 잘라내어 액체질소로 급냉시켜 마쇄한 후, HiGene genomic DNA prep kit(BIOFACT, Daejeon)를 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다.

[0044] 상기 추출한 DNA는 DU-730 UV/Vis Spectrophotometer (Beckman coulter, CA)와 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 추출한 DNA의 정량 및 정성분석을 하는 것이 바람직하다.

[0046] 실시예 3 : 흰나리 및 자생나리 matK 영역의 증폭 및 염기서열 분석

[0047] 상기 흰나리 및 자생나리의 추출한 DNA의 염기서열을 획득한 후, 미국 NCBI에 공개되어 있는 유전정보를 이용하여 matK 염기서열을 획득하였다.

[0048] 상기 획득한 matK 염기서열에 따라 프라이머를 제작하여 PCR을 실시하였다. 상기 PCR 조건은 94℃에서 5분간 일차적으로 변성을 유도한 후 94℃에서 30초간 denaturation, 53℃에서 30초 간 annealing, 72℃에서 5분간 PCR 산물의 안정화를 실시하여 PCR 산물을 취득하였다.

[0049] 상기 PCR 완료 후 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 PCR 산물의 증폭여부를 확인한 후, T-Blunt vector(Biofact)에 PCR 산물을 삽입한 후 M13(-20) primer쌍을 이용하여 염기서열을 분석하였다.

표 2

[0051]

primer name	5' → 3' sequence of primers	Annealing Temperature(℃)
Lily_matK_F	ATGGAAGAATTACAAGGG	53
Lily_matK_R	CTAATTATTCACCAGGTC	53
M13_F	CAGGAAACAGCTATGA	46
M13(-20)_R	GTAAAACGACGGCCAGT	52

[0052] 상기 실시예 3에 의해 흰나리 및 자생나리 matK의 염기서열을 분석한 결과 상기 흰나리 및 자생나리에서 matK 유전자는 하기 도 1a에 나타난 바와 같이 1,539bp 길이로 PCR 증폭되었으며, 흰나리의 matK 유전자 부위에서 염기서열 변화가 있었으며 하기 도 1b에 나타난 바와 같이 165번, 272번, 347번, 739번, 1050번 및 1071번의 염기서열이 치환된 것을 확인 할 수 있었다.

[0054] 실시예 4 : 흰나리 및 자생나리의 matK 염기서열을 이용한 염기서열 유사도 분석

[0055] 상기 실시로 흰나리 및 자생나리의 matK 염기서열을 이용한 유사도 분석은 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software 의 UPGMA 법을 이용하였다.

[0056] 상기 흰나리 및 자생나리 matK 유전자 부위의 염기서열에 근거하여 유전적 근연성을 분류해본 결과 상기 흰나리 및 자생나리 유전자원은 도 2에 나타난 바와 같이 6개 그룹으로 분류할 수 있었다. 첫번째 그룹은 모두 matK 유전자가 염기서열이 100% 일치하는 것들로 솔나리, 털중나리, 날개하늘나리, 하늘말나리 및 참나리가 속하였다. 두 번째는 땅나리가 속하는 그룹으로 89번 염기서열이 기존 나리들과의 차이점을 나타내었다. 세번째는 Martagon 그룹에 속하는 자생나리로 말나리와 섬말나리 2가지 종의 염기서열이 동일하다는 것을 알 수 있었으며, 공통적으로 1,037번 염기서열이 다른 종과 차이를 나타내었다. 네번째와 다섯번째 그룹은 중나리가 1,125번에서 하늘나리가 1,172 및 1,251번 염기서열이 변화된 것을 나타내었다. 마지막으로 여섯번째 그룹에는 흰나리가 포함되었으며, 상기 10종의 자생나리와 특이적으로 matK 유전자 전 영역의 6 곳에서 염기변화가 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0058] 실시예 5 : 흰나리 식별 CAPS 마커전환 및 검증

[0059] 본 발명에서 확보한 matK의 염기서열에 존재하는 모든 제한효소의 위치를 GENETYX-WIN Software Ver. 5.0(Genetyx)을 이용하여 탐색하였으며, 상기 흰나리를 식별할 수 있는 matK 유전자 부위를 활용하여 CAPS 마커로 검증하기 위해 PCR을 실시하여 matK 유전자 부위를 증폭시킨 후, CAPS 마커로 활용될 수 있는 TCGCGA의 염기서열로 이루어지는 NruI 제한효소를 이용하여 전기영동을 실시하였다.

[0061] *상기 PCR은 matK 프라이머 정보를 기반으로 DNA 증폭기를 이용하였으며 PCR 조건은 염기서열은 확인할 때와 동일한 조건으로 수행하였다.

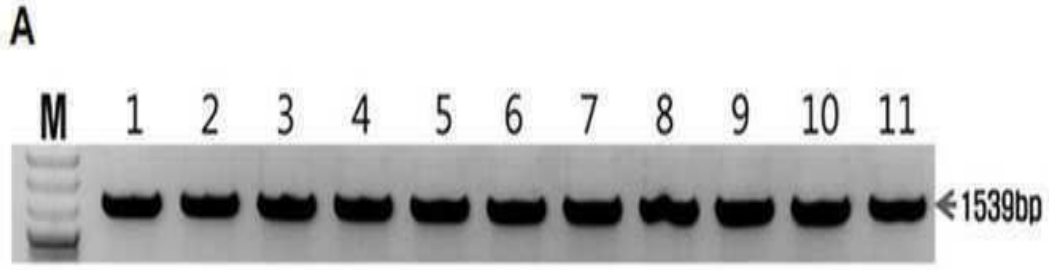
[0062] 또한, 상기 PCR을 실시하여 획득한 PCR 산물 10㎕와 NruI 제한효소(Enzynomics, Daejeon) 및 1X Ez BufferⅢ가 포함된 반응액 20㎕을 37℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 CAPS 마커 검증을 하였다.

[0063] 상기 matK 유전자 부위를 상기 실시예 3에서 사용한 프라이머를 이용하여 증폭한 뒤 NruⅠ제한효소를 처리한 결과는 도 3a 및 도 3b와 같이 나타났으며, 10종의 자생나리에서는 1,196bp 및 343bp 부위가 상기 NruⅠ제한효소

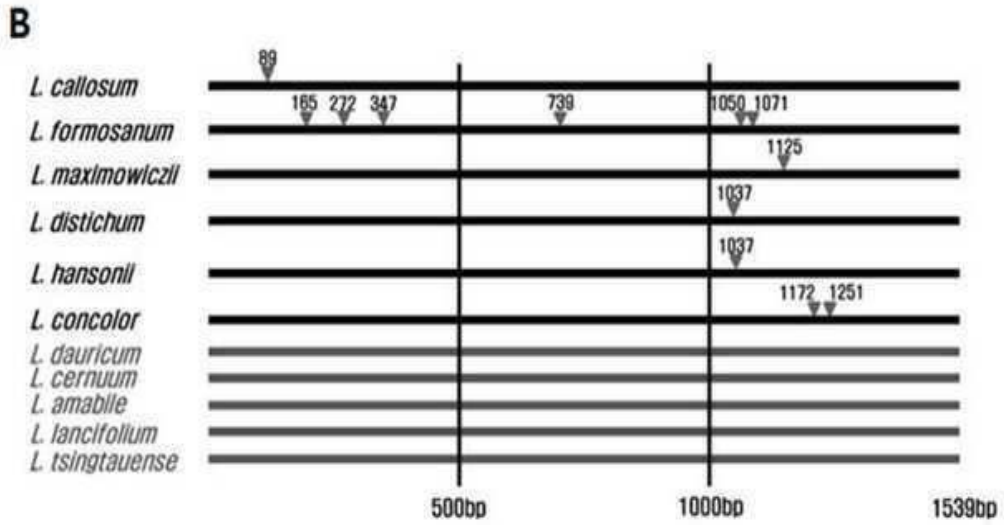
에 의해 절단되어 두 조각으로 나누어지는 것을 확인할 수 있었으며, 흰나리는 343번 염기서열이 G에서 T로 염기 치환이 일어나 상기 Nru I 제한효소의 작용이 불가능하여 기존의 1,539bp의 단일 유전자 조각으로 나타나는 것을 하기 도 3b에서 확인할 수 있다.

도면

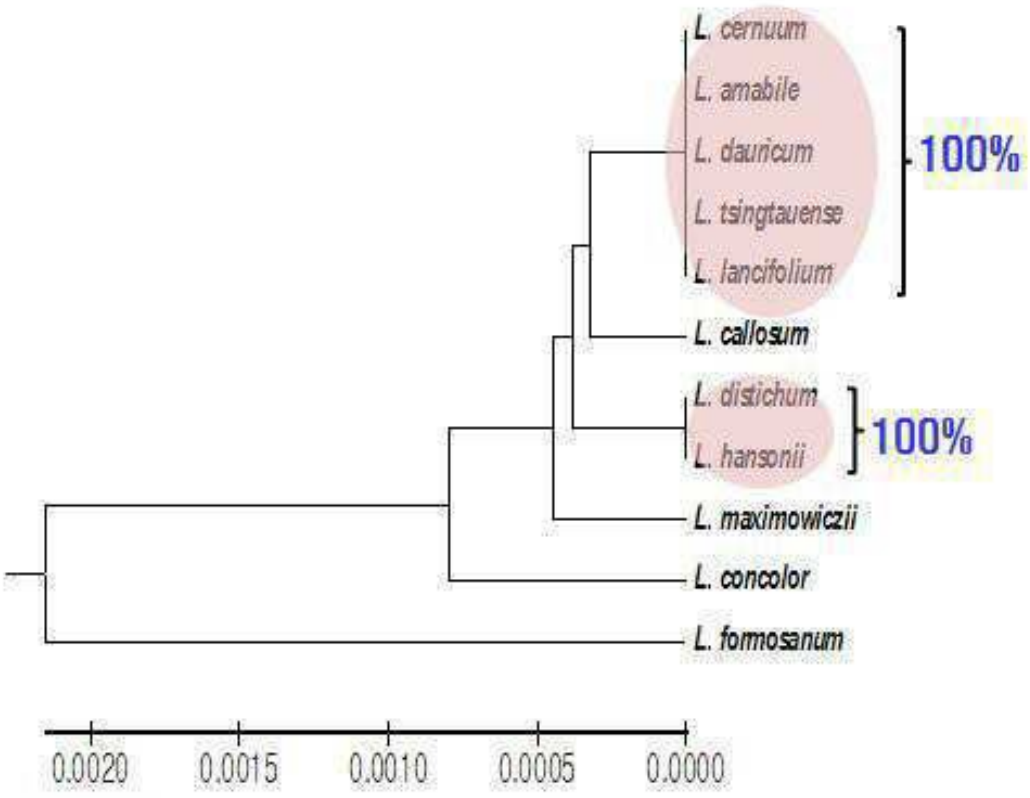
도면1a



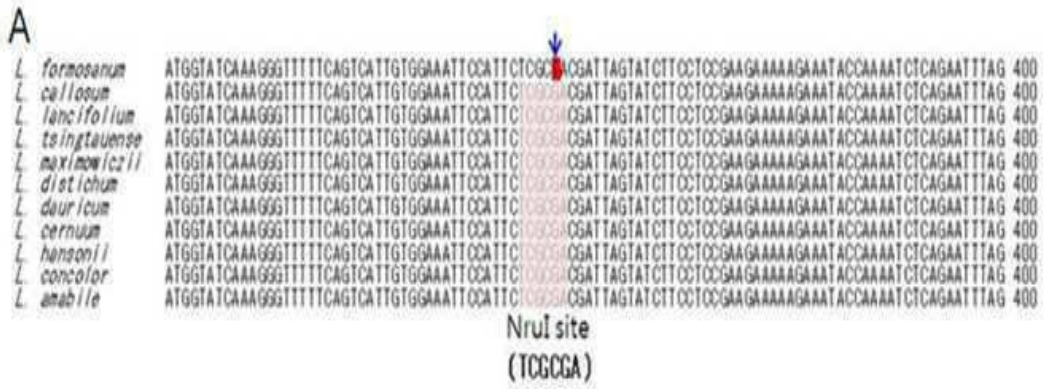
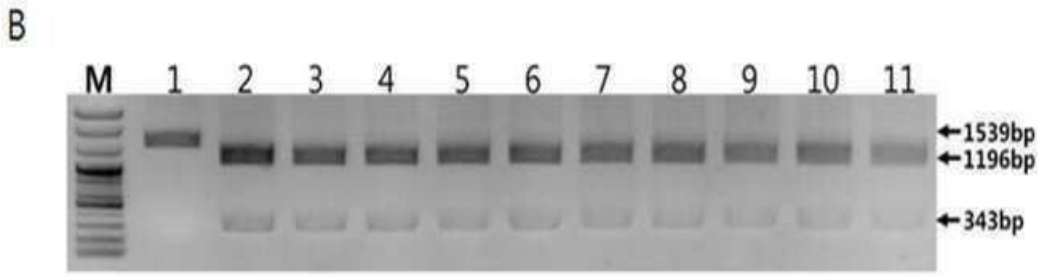
도면1b



도면2


L. cernuum
L. amabile
L. dauricum
L. tsingtauense
L. lancifolium
L. callosum
L. distichum
L. hansonii
L. maximowiczii
L. concolor
L. formosanum
100%
100%
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000

도면3a


A
L. formosanum
L. callosum
L. lancifolium
L. tsingtauense
L. maximowiczii
L. distichum
L. dauricum
L. cernuum
L. hansonii
L. concolor
L. amabile
NruI site
(TCGCGA)

도면3b