



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0106550
(43) 공개일자 2013년09월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0028170

(22) 출원일자 2012년03월20일

심사청구일자 2012년03월20일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

허윤강

경기도 성남시 분당구 서현동 292 임광아파트
315-601

이현주

대전시 대덕구 덕암동44-14 홍진빌라 가동302호

임용표

대전광역시 유성구 상대동 상대남로 26번지 트리
폴시티아파트 903동 1602호

(74) 대리인

특허법인다나

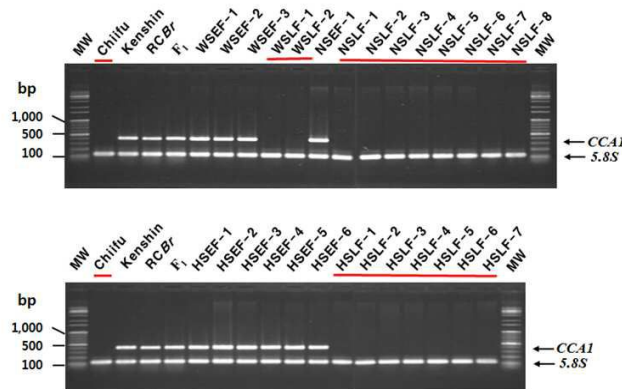
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 배추과 작물의 추대시기 판별용 마커

(57) 요약

본 발명은 배추과 작물의 CCA1 유전자 핵산서열 분석을 통하여 작물의 조기추대 및 만기추대를 판별할 수 있는 PCR용 마커 및 이를 이용한 판별 방법에 관한 것으로, 본 발명을 통하여 배추과 작물의 추대 시기를 간편하게 분석할 수 있어 배추과 작물의 개화시기 조절 및 재배시기 선택에 용이하게 적용할 수 있다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	607003-05-2-SB310
부처명	농림수산식품기술평가원(IPET)
연구사업명	기획과제
연구과제명	배추 개화 및 추대관련 마커 개발
주관기관	충남대학교 산학협력단
연구기간	2011.07.29 ~ 2012.07.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 15 및 16의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 15 및 18의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 15 및 18의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 15 및 18의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열번호 15 및 16의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트는 조기추대와 만기추대를 모두 증폭하되 조기추대의 크기가 더 길게 만들어지는 것을 특징으로 하는 CCA1FxCCA1-R 프라이머 세트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 서열번호 15 및 18의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트는 조기추대의 DNA만 증폭하도록 만들어진 것을 특징으로 하는 CCA1FxCCA1-R 프라이머 세트.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 CCA1FxCCA1-R 프라이머 세트를 포함하는 배추과 작물의 추대 판별용 마커.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 배추과 작물은 배추, 양배추, 갓, 브로콜리, 유채 및 순무 등으로부터 선택된 하나 이상의 배추과 작물의 추대시기 판별용 마커.

청구항 6

(a) 배추과 작물로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계

(b) 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하는 단계

(c) 상기 PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계를 포함하는 배추과 작물의 추대시기 판별 방법.

청구항 7

제7항에 있어서,

상기 PCR은 서열번호 15 및 16의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트의 경우 94℃에서 5분, 94℃ 30초 - 40℃ 30초 - 72℃ 30초를 5사이클, 94℃ 30초 - 60℃ 30초 - 72℃ 30초를 25사이클, 72℃에서 5분 동안 실행하는 것을 특징으로 하는 배추과 작물의 추대시기 판별 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 PCR은 서열번호 14 및 17의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트의 경우 94℃에서 5분, 94℃ 30초 - 55℃ 30초 - 72℃ 30초를 30사이클, 72℃에서 5분 동안 실행하는 것을 특징으로 하는 배추과 작물의 추대시기 판별 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계는 전기영동에 의해 분리되는 것을 특징으로 하는 배추과 작물의 추대시기 판별 방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 배추과 작물의 CCA1 유전자 핵산서열 분석을 통하여 작물의 조기추대 및 만기추대를 판별할 수 있는 PCR용 마커 및 이를 이용한 판별 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 개화(flowering)는 식물이 영양생장단계에서 생식생장단계로 전환되는 것을 의미하며 배추와 같은 식물의 경우는 추대형성으로 대변되기도 한다. 개화는 광주기, 온도(춘화처리), 호르몬 및 자율적 회로(autonomous pathway) 등에 의해 조절되는데 주로 광주기와 온도가 주 환경요인이 된다(Srikanth A, Schmid M (2011) Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. Cell. Mol. Life Sci. 68: 2013-2037.). 개화관련 회로에 관여하는 많은 유전자들과 miRNA들이 애기장대 등에서 잘 밝혀져 왔다. 개화시기(flowering time)는 곡류작물의 생산성과 직결되고, 배추와 같은 채소작물 생산성 및 수확시기에 영향을 준다(Jung C, Muller AE (2009) Flowering time control and applications in plant breeding. Trends Plant Sci. 14: 563-573). 특히 배추의 경우 조기추대는 생산성감소 및 상품의 질을 떨어뜨리기 때문에 재배시준에 따른 개화 및 추대형성 문제가 발생하므로 조기추대와 만기추대를 구별하는 마커의 개발이 시급한 실정이다.
- [0003] 체내시계(circadian clock)는 광주기회로와 연관하여 개화를 조절한다(Jung C, Muller AE (2009) Flowering time control and applications in plant breeding. Trends Plant Sci. 14: 563-573; Imaizumi T (2010) Arabidopsis circadian clock and photoperiodism: time to think about location. Curr. Opin. Plant Biol. 13: 83-89.). CCA1 (Circadian Clock Associated 1)(Wang ZY, Kenigsbuch D, Sun L, Harel E, Ong MS, Tobin EM (1997) A Myb-related transcription factors is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis Lhcb gene. Plant Cell 9:491-507.; Wang ZY and Tobin EM (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. Cell 93: 1207-1217.)은 LHY (Late Elongated Hypocotyl)와 함께 체내시계의 핵심요소로 개화조절과 관계가 있다(Fujiwara S, Oda A, Yoshida R, Niinuma K, Miyata K, Tomozoe Y, Jajima T, Nakagawa M, Hayashi K, Coupland G, Mizoruchi T (2008) Circadian clock proteins LHY and CCA1 regulate SVP protein accumulation to control flowering in Arabidopsis. Plant Cell, 20: 2960-2971.). CCA1 유전자의 발현양상이 냉이(Capsella bursa-pastoris)의 개화생태형(flowering ecotype)에 따른 다른 발현양상을 보여 개화시기와의 연관성을 제시하였다(Slotte T, Holm K, McIntyre LM, Lagercrantz U, Lascoux M (2007) Differential expression of genes important for adaptation in Capsella bursa-pastoris (Brassicaceae). Plant Physiol. 145: 160-173.). 또한 여러 내환경계 체계의 배추를 가지고 QTL지도를 작성한 결과 체내시계와 개화시기 QTL이 같은 장소에 표시되어 체내시계와 개화시기의 연관성을 제시하였다(Lou P, Xie Q, Xu X, Edwards CE, Brock MT, Weinig c, McClung CR (2011) Genetic architecture of the circadian clock and flowering time in Brassica rapa. Theor Appl Genet, 123: 397-409.). 배추의 CCA1 유전자는 본 연구실에 수행한 배추 DNA chip을 활용하여 수행한 microarray 실험결과 조기추대인 rapid cycling Brassica rapa (RCBr)와 만기추대인 내환경계 지부에서 발현정도를 비교하였을 때 RCBr에서 2.2배정도 발현이 증가하였고, RCBr를 장일조건(16시간 광조건)에서 키웠을 경우 단일조건(8시간 광조건)에서 키운 것에 비해 26-60배 정도의 발현양이 증가하여 개화시기와의 연관성을 시사하였다.
- [0004] 배추 (Brassica rapa)에는 여러 아종이 존재한다. *Pekinensis*는 결구형으로 배추를 대표하며, *Chinesis*는 비결구형으로 청경채가 그 예이다. *Parachinensis*는 *Caixin*이라 하며 꽃양배추를 말한다. 그 외에도 *broccoletto*, *narinosa*, *nipposinica*, *tricoloris*, *oleifera* 및 *rapa*가 있다. *B. rapa ssp. pekinensis*에는 생활사가 애기장대보다 짧은 *rapid cycling Brassica rapa* (RCBr)(Williams PH, Hill CB (1986) Rapid-cycling populations of Brassica. Science, 232: 2385-1389.), 남방계배추인 권심(Kenshin)계와 북방계배추인 지부(Chiifu)계가 있다. 권심계는 개화에 필요한 춘화처리(vernalization) 기간이 짧거나 필요치 않으나 지부계는 6주 이상의 춘화처리와 장일조건이 필요하기 때문에 개화 및 추대형성과 관련된 마커 개발에 중요하다.

- [0005] 배추의 개화 또는 추대형성과 관련된 마커 개발은 비결구형의 DH line을 이용하여 만기추대와 연관된 RAPD 마커가 알려진 후(Ajisaka H, Kuginuki Y, Yui S, Enomoto S, Hirai M (2001) Identification and mapping of a quantitative trait locus controlling extreme late bolting in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* syn. *campestris* L.) using bulked segregant analysis. *Euphytica*, 118: 75-81.), 핵산서열과 mapping을 연관해서 연구되었다. EST(expressed sequence tag) 등 핵산서열 정보를 이용한 SNP 중에서 BrFLC1 (*B. rapa* Flowering Locus C1)과 BrFLC2가 추대시기와 관계가 있음을 보고하였으며(Li F, Kitashiba H, Inaba K, Nishio T (2009) A *Brassica rapa* linkage map of EST-based SNP markers for identification of candidate genes controlling flowering time and leaf morphological traits. *DNA Res.* 16: 311-323.), QTL 분석을 통하여 BrFLC2가 춘화처리와 관계가 있음을 밝혀(Zhao J, Kulkarni V, Liu N, Carpio DPD, Bucher J, Bonnema G (2010) BrFLC2 (FLOWERING LOCUS C) as a candidate gene for a vernalization response QTL in *Brassica rapa*. *J. Exp. Bot.* 61: 1817-1825.) 개화시기의 마커로의 가능성을 굳혔다. 최근에는 추대시기와 연관된 QTL이 FLC와 FT(Flowering Time) 유전자와 관련이 있음을 추가적으로 보고하였다(Kakizaki T, Kato T, Fukino N, Ishida M, Hatakeyama K, Matsumoto S (2011) Identification of quantitative trait locus controlling late bolting in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) parental line Nou 6 gou. *Breed. Sci.* 61: 151-159.). 그러나, 활용가능한 마커로는 배추의 FLC1 유전자의 splicing site SNP를 CAPS마커로 개발한 것(Yuan YX, Wu J, Sun RF, Zhang XW, Xu DH, Bonnema G, Wang XW (2009) A naturally occurring splicing site mutation in the *Brassica rapa* FLC1 gene is associated with variation in flowering time. *J. Exp. Bot.* 60: 1299-1308.)이 유일하다 하겠고, 그 마커의 활용도는 미지수인채 남아 있어 배추로부터 편리하게 사용할 수 있는 개화 및 추대관련 마커의 개발이 절실히 요구되고 있다. 배추와 같은 엽채류 작물의 개화시기의 조절은 생산성 및 품질에 중요한 영향을 미치고, 재배시기의 선택에도 중요하다. 배추의 개화 또는 추대시기와 관련된 QTL 및 CAPS 마커가 보고된 바 있으나, 효율적인 마커는 없는 실정이다.
- [0006] 본 연구에서는 광주기성회로와 연관이 있는 체내시계 유전자인 CCA1 유전자를 클로닝하고 분석하여 InDel 부분을 찾아내고 이 서열을 근거로 편리한 PCR 이용 개화마커를 개발하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Yuan YX, Wu J, Sun RF, Zhang XW, Xu DH, Bonnema G, Wang XW (2009) A naturally occurring splicing site mutation in the *Brassica rapa* FLC1 gene is associated with variation in flowering time. *J. Exp. Bot.* 60: 1299-1308.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 배추과 작물의 CCA1 유전자 핵산서열 분석을 통하여 작물의 조기추대 및 만기추대를 판별할 수 있는 PCR용 마커 및 이를 이용한 판별 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 서열번호 15 및 16의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 15 및 18의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 CCA1FxCCA1-R 프라이머 세트를 제공한다.
- [0010] 본 발명은 상기 CCA1FxCCA1-R 프라이머 세트를 포함하는 배추과 작물의 추대시기 판별용 마커를 제공한다.
- [0011] 본 발명은 배추과 작물로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하는 단계; 및 상기 PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계를 포함하는 배추과 작물의 추대시기 판별 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명을 통하여 배추과 작물의 추대 시기를 간편하게 분석할 수 있어 배추과 작물의 개화시기 조절 및 재배시기 선택에 용이하게 적용할 수 있고, 육종시 유묘시기에 개화성질을 파악할 수 있어 육종의 시간을 크게 단축하여 종자산업의 활성화에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 실시예 5에 따른 내흔계 배추를 클로닝하여 얻은 핵산서열을 ClustalW2-Multiple Sequence Alignment 프로그램으로 분석하여 얻은 유연관계 계통을 나타낸 것이다.
- 도 2는 실시예 5에 따른 마커를 개발하기 위하여 3번 엑손과 3번 인트론 및 4번 엑손서열을 비교하여 제작한 PCR용 프라이머를 나타낸 것이다.
- 도 3은 실시예 5에 따른 마커를 개발하기 위하여 3번 엑손과 3번 인트론 및 4번 엑손서열을 비교하여 제작한 PCR용 프라이머를 나타낸 것이다.
- 도 4는 실시예 6에 따른 CCA1F x CCA1-R1 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 실시예 6에 따른 CCA1F x CCA1-R1 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 실시예 6에 따른 CCA1F x CCA1-R2 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 실시예 6에 따른 CCA1F x CCA1-R3 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 실시예 6에 따른 CCA1F x CCA1-R1 및 CCA1F x CCA1-R3 프라이머 세트를 이용하여 계절 별 품종에 대하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 서열번호 15 및 16의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 15 및 18의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 CCA1FxCCA1-R 프라이머 세트를 제공한다.
- [0015] 조기추대 배추과 작물과 만기추대 배추과 작물의 개화를 조절하는 것으로 알려진 유전자 CCA1의 서열을 분석하여 공통 부분 및 상이한 부분을 분석하여 프라이머를 제작하였다.
- [0016] 본 발명은 상기 서열번호 15 및 16의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트는 조기추대와 만기추대를 모두 증폭되 조기추대의 크기가 더 길게 만들어지는 것을 특징으로 하는 CCA1FxCCA1-R 프라이머 세트를 제공한다.
- [0017] 상기 서열번호 15 및 16의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트는 조기추대 배추의 만기추대 DNA 보유 여부를 판별할 수 있다.
- [0018] 상기 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 시행하면 조기추대와 만기추대 DNA가 서로 다른 크기로 증폭된 산물을 얻을 수 있고 이를 이용하여 추대를 판별할 수 있다.
- [0019] 본 발명은 상기 서열번호 15 및 18의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트는 조기추대의 DNA만 증폭하도록 만들어진 것을 특징으로 하는 CCA1FxCCA1-R 프라이머 세트를 제공한다.
- [0020] 상기 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 시행하면 조기추대는 모두 증폭이 되고 만기추대는 증폭이 되지 않으므로 이를 통하여 배추과 작물의 추대시기를 판별할 수 있다.
- [0021] 그러나 조기추대와 만기추대의 DNA가 혼합된 경우에는 조기추대로만 해석될 위험이 존재하므로 상기 서열번호 15 및 16의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트의 PCR 결과를 참고하여 분석할 수 있다.

- [0022] 본 발명은 서열번호 15 및 16, 서열번호 15 및 18의 핵산서열로 이루어진 CCA1FxCCA1-R 프라이머 세트를 포함하는 배추과 작물의 추대시기 판별용 마커를 제공한다.
- [0023] 이에 한정되는 것은 아니지만 상기 배추과 작물은 배추, 양배추, 갓, 브로콜리, 유채 및 순무일 수 있고, 배추는 결구형에 속하는 남방계 배추인 권심(Kenshin)계와 북방계 배추인 지부(Chiifu)계 및 *rapid cycling Brassica rapa*(RCBr)일 수 있다.
- [0024] 본 발명은 배추과 작물로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 15 및 16, 서열번호 15 및 18의 핵산서열로 이루어진 CCA1FxCCA1-R 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하는 단계; 및 상기 PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계를 포함하는 배추과 작물의 추대시기 판별 방법을 제공한다.
- [0025] 상기 PCR은 서열번호 15 및 16의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트의 경우 94℃에서 5분, 94℃ 30초 - 40℃ 30초 - 72℃ 30초를 5사이클, 94℃ 30초 - 60℃ 30초 - 72℃ 30초를 25사이클, 72℃에서 5분 동안 실행할 수 있고, 서열번호 14 및 17의 핵산서열로 이루어진 프라이머 세트의 경우 94℃에서 5분, 94℃ 30초 - 55℃ 30초 - 72℃ 30초를 30사이클, 72℃에서 5분 동안 실행할 수 있다.
- [0026] 또한 상기 PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계는 전기영동에 의해 분리되는 것을 특징으로 하는 배추과 작물의 추대시기 판별 방법을 제공한다.
- [0027] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0028] <실시예 1> DNA 추출 및 CCA1 유전자 클로닝
- [0029] 개화관련 유전자 서열 분석을 위한 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 재료는 내혼계 지부(Chiifu, 서열번호 3)와 권심(Kenshin, 서열번호 2) 및 rapid cycle *Brassica rapa* (RCBr, 서열번호 1) 내혼계를 이용하였다.
- [0030] 상기 배추 조각을 액체질소와 막자사발을 이용하여 갈아 배추 분말을 얻고 DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN Inc.)를 이용하여 DNA를 추출하였다.
- [0031] 지부, 권심, RCBr 및 여러 내혼계 배추의 CCA1 유전자를 클로닝하기 위하여, NCBI 데이터베이스에 있는 애기장대, 유채의 CCA1 등의 서열을 비교하여 forward primer는 uCCA1f: 5'-ATGGAGACWAATTCGTCTGGAGAAG, reverse primer는 uCCA1r: 5'-TCATGTTGAAGYTTGWGTTTCCAAC으로 작성하였고, PCR은 에러를 방지하기 위하여 Exi Taq 중합효소 (Takara Inc.)를 이용하여 수행하였다. PCR은 혼합물을 94℃에서 5분 변성을 시킨 후 94℃ 30초 - 52℃ 30초 - 72℃ 3분을 30 사이클 돌린 후 72℃에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 1% 아가로스젤로 전개하고, 긴 파장의 UV하에서 밴드(band)를 절단하였다. 아가로스젤로부터 DNA 용출(elution)은 MEGA-Spin (iNTRON Biotech., Inc.) kit를 이용하여 수행하였고, 분리한 DNA는 T&A Cloning Kit (RBC Inc.)를 이용하여 TA-벡터에 삽입하고 대장균에 형질전환하였다. 형질전환된 대장균으로부터 플라스미드 DNA는 DNA-Spin™ Plasmid DNA Purification Kit (iNTRON Biotech., Inc.)를 이용하여 순수분리하였다.
- [0032] <실시예 2> 핵산서열분석
- [0033] CCA1 유전자의 핵산서열 분석하기 위하여 계통마다 적어도 5-10개의 클론에 해당되는 플라스미드 DNA를 마크로젠에 보내어 핵산서열을 양방향에서 읽었다. 서열을 BlastX 분석을 통하여 CCA1으로 판단되면, 중앙부분의 서열을 분석하기 위하여 forward primer: 5'-CGCTAGACATAGCTATCCCTCCTC, reverse primer: 5'-CGTTGCAGCTGCAAGTGCT를 이용하여 핵산서열분석을 한번 더 수행하고 전체의 핵산서열을 완성하였다. 각 계통에 여러 개의 CCA1 유전자가 존재할 수 있어 모든 클론의 서열을 분석하여 애기장대 CCA1과 가장 가까운 것부터 번호를 붙였다. 각 유전자간의 상관관계는 ClustalW2-Multiple Sequence Alignment 프로그램을 이용하여 분석하였다.

[0034] <실시예 3> 마커 개발을 위한 PCR 조건과 전기영동

[0035] 프라이머는 지부와 권심 및 RCB_r 사이에 상이한 부분과 공통부분을 이용하여 작성하였으며, 대조군으로는 5.8S RNA 서열을 증폭하는 프라이머를 활용하였다 (표 1).

표 1

[0036]

CCA1	E1	I1	E2	I2	E3	I3	E4	I4	E5	I5	E6	I6	E7	I7	E8	Total
RCB _r	39	129	112	118	47	379	195	82	114	77	807	84	45	57	225	2,510
Kenshin	39	128	112	118	47	380	195	82	114	77	810	81	45	63	225	2,516
Chiifu	39	130	112	117	47	229	195	86	114	77	810	84	45	57	225	2,367

[0037] 최적의 PCR 조건을 확립하기 위하여 annealing 온도를 40℃에서 65℃까지 다양하게 변화시켰으며, 반응 횟수 (또는 사이클)도 15에서 35까지 시도하여 다음과 같은 최적 조건을 찾았다. CCA1F x CCA1-R1 프라이머 조합의 경우는 94℃에서 5분, 94℃ 30초 - 40℃ 30초 - 72℃ 30초를 5사이클, 그리고 94℃ 30초 - 60℃ 30초 - 72℃ 30초를 25 사이클 돌린 후 72℃에서 5분간 반응시켰다. CCA1F x CCA1-R2 및 CCA1F x CCA1-R3 프라이머 조합의 경우는 94℃에서 5분 변성을 시킨 후 94℃ 30초 - 55℃ 30초 - 72℃ 30초를 30 사이클 돌린 후 72℃에서 5분간 반응시켰다. 마커검증을 위한 PCR은 CCA1 프라이머 세트와 5.8S 프라이머 세트를 동시에 넣고 수행하였으며 PCR premix는 LPS Biotech.을 이용하였다. PCR 산물의 전기영동은 1.5% 아가로오스 겔을 이용하였고, EtBr 염색후 Gel Doc (Bio-Rad Inc.)으로 촬영하여 분석하였다.

[0038] <실시예 4> 핵산서열분석 및 PCR 프라이머 작성

[0039] 배추의 CCA1 게놈 DNA 분석은 RCB_r과 조기추대인 권심 내흔계와 만기추대인 지부 내흔계를 대상으로 우선 수행하였다. 단백질 합성 개시 코돈인 ATG부터 종료 코돈인 TGA까지 분석한 결과 RCB_r은 2,510 bp, 권심은 2,516 bp 그리고 지부는 2,367 bp로 조기추대보다 만기추대는 약 140 bp정도 짧았다 (서열번호 1 내지 3). 조기추대와 만기추대의 차이점은 3번째 인트론(intron)의 길이 때문이었으며(표 5), 이는 추대시기와 연관이 있을 것이라는 것을 시사한다. 이를 좀더 증명하기 위하여 1번째 엑손(exon)과 4번째 엑손사이의 DNA를 여러 내흔계 배추로부터 클로닝하여 핵산서열을 분석하였다(서열번호 4 내지 14). 이 핵산서열을 근거로 유연관계를 ClustalW2-Multiple Sequence Alignment 프로그램으로 분석한 결과 애기장대 CCA1을 중심으로 조기추대와 만기추대가 별도의 그룹으로 나타났다 (도 1). 이는 CCA1 유전자의 부분을 이용하여 추대관련 마커의 개발이 가능하며, 특히 3번째 인트론 그 표적이 될 것이라는 것을 시사한다. 흥미롭게도 RCB_r, 권심, CI79, Bn616 및 WSEF의 세 번째 인트론에 3개의 putative miRNA 표적서열이 존재하여(data not shown) CCA1 발현을 조절할 수도 있을 것이라는 것을 암시한다.

[0040] 개화 및 추대마커를 개발하기 위해서 3번째 엑손(exon)과 3번째 인트론 및 4번째 엑손서열을 비교하여 PCR용 프라이머를 제작하였다 (도 2 및 3). 프라이머의 TM 값은 59도로 맞추고, CCA1F x CCA1-R1은 조기추대와 만기추대 모두를 증폭되 조기추대의 크기가 길게 만들었으며, CCA1F x CCA1-R2와 CCA1F x CCA1-R3는 조기추대의 DNA만 증폭하도록 만들었다. 따라서 만기추대의 경우 DNA가 존재하지 않은 것인지 존재하는데 증폭되지 않은 것인지를 구분하기 위하여 5.8S 프라이머 세트를 동시에 활용할 수 있도록 제작하였다.

[0041] <실시예 5> PCR에 의한 검증

[0042] PCR 프라이머를 작성한 후 검정을 위해 국내종묘회사에서 활용하고 있는 내흔계통 배추(표 2) 및 배추유전자는 행에서 분양받은 배추(표 3)를 사용하였다.

표 2

[0043]

Seed Company	Symbol	Accession No	Remarks
--------------	--------	--------------	---------

Woori Seed	WSEF-1	W-1061	Early flowering
	WSEF-2	W-1118	
	WSEF-3	W-1121	
	WSLF-1	W-1067	Late flowering
	WSLF-2	W-1071	
Nonghyup Seed	NSEF-1	BN-615	Early flowering
	NSLF-1	BN-522	Late flowering
	NSLF-2	BN-546	
	NSLF-3	BN-570	
	NSLF-4	BN-573	
	NSLF-5	BN-524	
	NSLF-6	BN-547	
	NSLF-7	BN-515	
	NSLF-8	BN-569	
Hankook Seed	HSEF-1	CI-79	Early flowering
	HSEF-2	CI-26	
	HSEF-3	CI-50	
	HSEF-4	CI-53	
	HSEF-5	CI-54	
	HSEF-6	CI-58	
	HSLF-1	CI-1	Late flowering
	HSLF-2	CI-3	
	HSLF-3	CI-18	
	HSLF-4	CI-59	
	HSLF-5	CI-61	
	HSLF-6	CI-63	
	HSLF-7	CI-8	

표 3

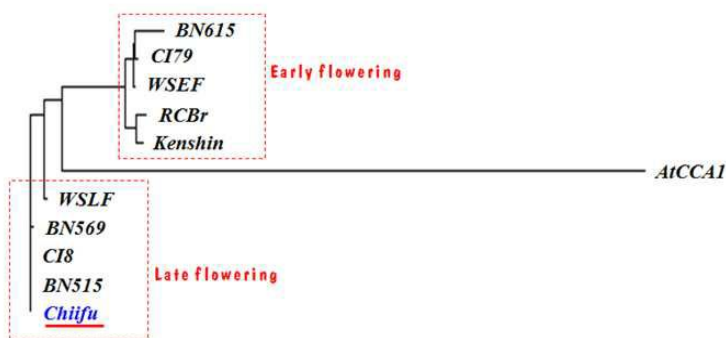
[0044]

No	종자명		Seed company	Cultivation
	Korean	English		
1	골든벨배추	Goldenbell	Hyundae	Spring
2	진광	Jinkwang	Nonghyup	
3	봄배추	Bombaechu	Asia	
4	춘미봄배추	Chungmibom	Koregon	
5	춘광	Chungkwang	Sakata Korea	
6	케이티엑스(KTX)	KTX	Hyundae	Summer
7	강추열름배추	Kangchuyeorm	Nonghyup	
8	CR하광배추	CRhakang	Asia	
9	CR안심배추	CRahnsim	Baechu & Breeding	
10	내병성여름	Naebyungseongyeorm	Daenong	
11	가을맛	Gaeulmat	Nongwoobio	Fall
12	불암플러스	Bullarmplus	Seminis	
13	장생3호배추	Jangsaeng3	Asia	
14	노랑추석	Norangchuseok	Seminis	
15	속노랑배추	Socknorangbaechu	Daenong	
16	생그린월동	Sangreenweorldong	Hyundae	Winter
17	설중매배추	Seoljungmaebaechu	Nonghyup	
18	남풍배추	Nampungbaechu	Asia	
19	청풍	Cheongpung	Seminis	
20	승승장구	Seungseungjangku	Takii Korea	

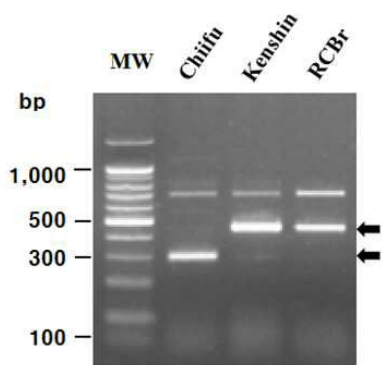
- [0045] 마커 개발을 위한 부위의 증폭여부를 알아보기 위하여 대표적인 내흔계 DNA (지부, 권심 및 RCB_r)와 CCA1F x CCA1-R1 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였다(도 4). 그림과 같이 조기추대(권심과 RCB_r)에서는 440 bp 정도의 밴드가 증폭되는데 반해 만기추대(지부)에서는 300 bp 정도의 밴드가 증폭되었다.
- [0046] 실험을 통하여 PCR 조건을 확립하고, 대표적인 배추 내흔계와 국내 몇 종묘회사에서 사용하고 있는 내흔계 배추 (표 1)을 이용하여 세 종류의 프라이머 세트로 PCR을 수행하였다. 이때 DNA존재를 확인하기 위해서 5.8S 프라이머 세트도 동시에 넣고 PCR을 수행하였다. 그 결과 CCA1F x CCA1-R1 프라이머 조합에서는 조기추대(권심계)와 만기추대(지부계) DNA가 다른 크기로 증폭되었다(도 5). CCA1F x CCA1-R2 프라이머 조합을 이용한 경우 조기추대는 모두 증폭이 되었고, 만기추대는 대부분 증폭이 되지 않았으나 일부에서 증폭이 일어나 활용이 어렵다는 결론을 내릴 수 있었다(도 6). 그러나 CCA1F x CCA1-R3 프라이머 조합에서는 조기추대와 만기추대를 정확히 구분할 수 있었다(도 7). 즉 조기추대에는 증폭이 되고, 만기추대에서는 되지 않았다. 그러나, 조기추대와 만기추대의 DNA가 혼합된 경우에는 조기추대로만 해석될 위험성이 존재하여, CCA1F x CCA1-R1 프라이머 조합의 결과를 참고해야 될 것으로 사료된다. 이상과 같이 CCA1F x CCA1-R3 프라이머 조합을 이용하여 내흔계 배추의 조기추대와 만기추대를 명확히 구분할 수 있었다.
- [0047] 계절에 따른 재배 품종은 추대시기가 중요한 경우가 있다. 즉, 월동배추는 재배기간이 길어서 만기추대가 선호되고, 봄배추는 장일조건이기 때문에 만기추대가 역시 선호된다. 계절에 따라 널리 재배되고 있는 시판 품종 중에서 5가지씩을 선택하여 추대의 경향을 분석하였다(도 8). 가을재배 품종에서는 조기추대 DNA가 없었으나, 봄, 여름, 월동재배 품종에는 조기추대와 만기추대 DNA가 섞여 있었다. 특히하게 월동배추는 모두 조기추대를 대변하는 DNA를 가지고 있었다.
- [0048] 결론적으로 CCA1F x CCA1-R3 프라이머 조합은 조기추대와 만기추대를 구별하는 마커가 될 수 있으며, CCA1F x CCA1-R1 프라이머 조합은 조기추대계통이 만기추대를 대변하는 DNA도 동시에 가지고 있는지를 판단할 수 있었다.

도면

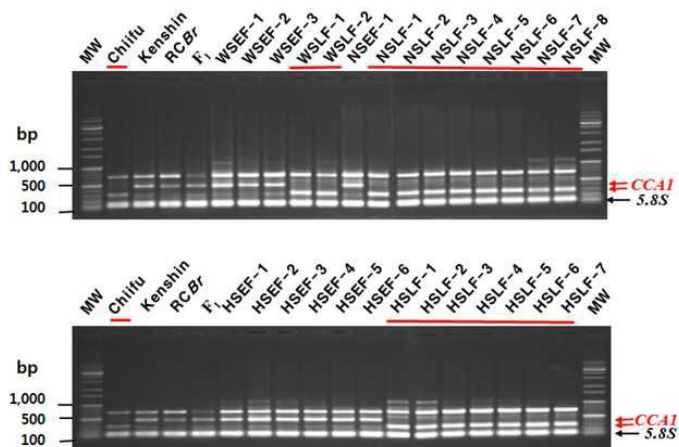
도면1



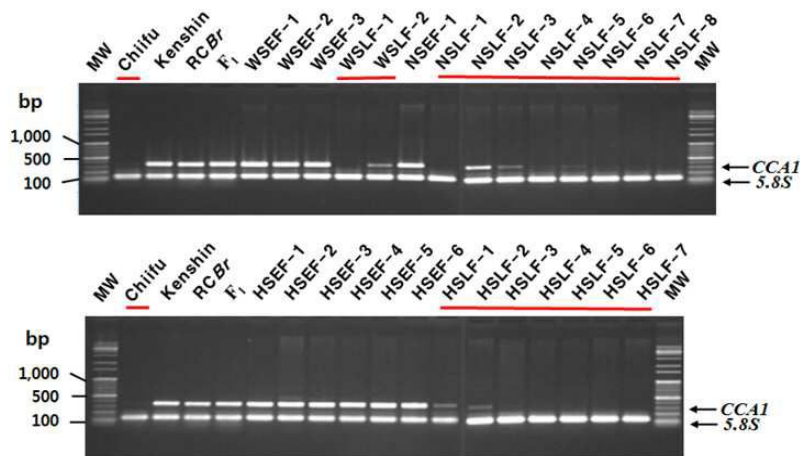
도면4



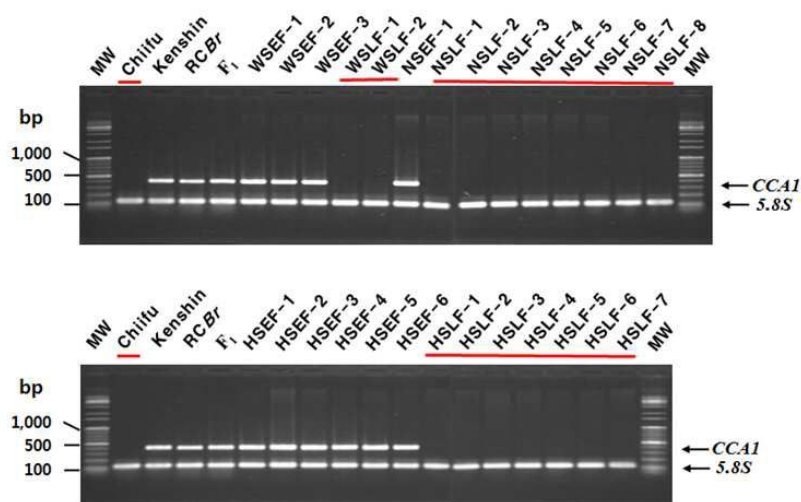
도면5



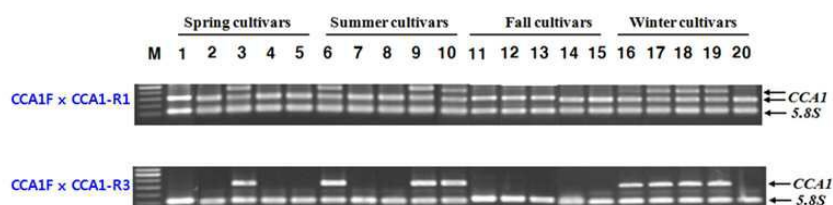
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Chungnam National University Industry collaboration Foundation
- <120> Markers for detecting early and late flowering inbred line for cabbages
- <130> P120170
- <160> 15
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 2510
- <212> DNA
- <213> rapid cycle Brassica rapa(RCBr)
- <400> 1

```

atggagacta attcgtctgg agaagatctc gttgttaagg taattataat ttaaatgttt      60
gttaagggtga aagaccaaag atggaaactt tttttttttg aaaaacaaag atggaaactt      120
ttgtgttttt tttgttttgt ttgttgtaat aaaaaaaatt aatattagac gagaaagccg      180
  
```

tatacgataa caaagcaacg tgaagatgg actgaggaag aacataatag gttccttgat	240
gccttgaggc ttacggttag agcctggcaa aagatcgaag gttgtttttg attttttttg	300
tatgttcttg ttctgtagat gaggttccgt ttgccttggt tgttcaaact gatttgcctt	360
ttttttctta ttctgttggc cagaacatgt agcaacgaaa actgctgtcc agattagaag	420
ccatgctcag aaatttttct ccaaggtaac tcgtctgaca agtgttctgc ttcttaatag	480
atatgattta gctggagaaa caatgatatc tgaggtaaca aagtaatagt ttgagagagt	540
taattatctt gtcttctat atgttgtcaa aatccacaca tgttgtcttc ataagaatat	600
ttagtttctc ttgaaagtca ggggagaaca actttttcct tattaagtct taaaattctg	660
aggtagtggc aaaagctggg gtaggtcctg aatatgttta ttgttttttg tgatgatgag	720
ccacagaggt aacaattttg atttagagtc attgaatacc aatagatata tgtttgtttg	780
tgttttatct agagggtaac aagactactc tctcatctcc tcaggtagag aaagaggctg	840
aggctaaagg tgtaccagtg gctcaaacgc tagacatagc tatccctcct ccgcgcccta	900
aacgaaaacc aaacaatcct tatcctagaa agaccggaac tggatctctc cccatctcaa	960
aaccgggtct gaatgatgga aaagagtccc ttggatcagc aaaagtttct cttcctgagg	1020
tgaacttcat agtcaatcaa cttgacatct tgtttagta tgcattgtaa ttgataaaga	1080
tttgtgtcct tgttttttca gatggccagt gaagatctgc aggaagacaa ctgctcagac	1140
tgtctcactc atcaacacgt ctctgtgca tcaaacgcaa gcacttttct agagtctta	1200
ccttcacggg aacaggtaaa aattacattg ctatttgagg ttttaagagt attagtactt	1260
ttcatgaaac tataatgtga gggaatgaac aggggaataa caaggagtca aactcagcca	1320
attacagtga acctcagact tatccaagc atatccctct gctagtcca ttggggagct	1380
ccataacaac ctctctgtca catgctctc cttcagatcc agacgagagt agtcatcacc	1440
tccacacagt ttcaggccat catcagtcct ttctgacca tatcatgtcc acccttttac	1500
aaacaccagc tctatacaca gctgcatctt tcgctcaac gtttggtggc ggccacaag	1560
ggaacttggc cgccatggct gcagccactg ttgcagctgc aagtgtctgg tgggccgcca	1620
atggaatgct acctctctgc gctcctttta gctcaggtgg tttgacctgt caccctccag	1680
ctactgtta tggaccttc ggtgaagtag accacacaaa aacagtggat caagaacact	1740
ccgaggcgtc aaaggctaga tcttcgttgg aatcagagga ggctaaaaat gggagtaaac	1800
cagattgtca tcatcatcct tgtgcagcga ccgagactga tgcaaaggga tcagatggag	1860
ctagagatag aaagcaagtt gacaggtctt ctttgactc gaacactcct tcgagtagtg	1920
acgatgttga ggctgatgct ttggtggaga ggcaagagaa cggtggcacc accaatgagg	1980
aagtgaaaga agtggatggg gacactacta acaatccaca aatttcagag tctaatacgc	2040

gacgcagtag aatcagtagc tctaacttag ctgatccatg gaagtctgtt tcagatgagg	2100
tacttaaaac taaaaagatt caaaacttcc ttttatTTaa aatcgTTtat tcaacaaaat	2160
gttatttgta tttttttttt caggacgaa ttgcTTttag agctctgttt gcaagagaag	2220
tgttgccaca aagttttaca tatcagagag aggagggtca acaacaaaga tatccaatgg	2280
agcttgatct taactcagca gctgatgatc aagaagagaa cagaaacata gcgTTTTtg	2340
gtgtttcaaa gcagcagcag ctaagtagag gaaggacagg tttcaagcct taaaaagat	2400
gttcaatgga agctaaagaa agtagagtca tcagcaacac caatcctatc atcagtgttg	2460
aacagaaaga tcctaagcgg attcggttg aaacacaaac ttcaacatga	2510
<210> 2	
<211> 2516	
<212> DNA	
<213> Kenshin	
<400> 2	
atggagacaa attcgtctgg agaagatctg gttgttaagg taattataat ttaaatgttt	60
gttaaggTga aagaccaaag atggaaactt ttttttttg aaaaacaaag atggaaactt	120
ttgtgttttt tttgtttgt ttgttgtaat aaaaaatta atattagacg aggaagccgt	180
atacgataac aaagcaacgt gaaagatgga ctgaggaaga acataatagg ttccttgatg	240
ccttgaggct ttacggtaga gcctggcaaa agatcgaagg ttgtttttga tttttttgt	300
atgttcttgt tctgtagatg aggttccgtt tgctttgttt gttcaaacTg attTgccttt	360
tttttcttat tcgtttggac agaacatgta gcaacgaaaa ctgctgtcca gattagaagc	420
catgctcaga aattttctc caaggtaact gtctgacaag tgttctgctt cttaatagat	480
attgatttag ctggagaaac aaatgatatc ggaggtaaca aagtagtagt tttagagagt	540
taattatctt gtcttctat atgttgTcaa tccacacatg ttgtcttcat aagaatattt	600
agtttctctt gaaagttagg ggagaacaac ttttcttta ttaaagTct taaaattctg	660
aggtagtggc aaaagctggg gtaggtcctg aatatgttta ttgttctttg tgatgatgag	720
ccacagaggt aacaattttg atttagagtC attgaatacc aatagatata tgtttgtttg	780
tgttttatct agagggtaac aagactactc tctcatctcc tcaggtagag aaagaggctg	840
aagctaaagg tgtaccagtg gctcaaagc tagacatagc tatccctcct ccgcgcccta	900
aacgaaaacc aaacaatcct tatcctagaa agaccggaac tggatctctc cccatctcaa	960
aaccgggtct gaatgatgga aaaggtccc ttggatcagg aaaagtttct cttctgagg	1020
tgaacttcat agtcaatcaa cttgacatct tgttTtagta tgtcatgtaa ttgaacaga	1080

ttgtatgctt tgttttttca gacgaccaat gaagatctgc aggaagacaa ctgctcagac	1140
tgtctcactc atcaacacgt ctctgctgca tcaaacgcaa gcacttttct agagtcttta	1200
ccttcacggg aacaggtaaa aattacattg ctatttgagg gttaaagagt attagtactt	1260
ttcatgaaac tataatgtga gggaaggaac aggggaataa caaggagtca aactcagcca	1320
attacagtga acctcagact tatccaaggc atatccctct gctagttcca ttggggagct	1380
ccataacaac ctctctgtca catgctcctc cttcagatcc agacgagaac agtcatcatc	1440
cccacacagt ttcaggccat catcagtcct ttcctgacca tatcatgtcc acccttttac	1500
aaacaccagc tctatacaca gccgcatctt tcgctccac gtttggtggc ggcgcccccac	1560
aagggaactt agccgccatg gctgcagcca ctgttcagc tgcaagtgtc tgggtggccg	1620
ccaatggaat gctacctctc tgcgctcctt ttagctcagg tggtttgacc tgtcacctc	1680
cagctactgc ttatggacct tccggtgaag tagaccacac aaaaacagtg gatcaagaac	1740
actccggggc gtcaaaggct agatcttcgt tggaaacaga ggaggctaaa aatgggagta	1800
aaccagattg tcatcatcat ctttgtcag cgaccgagac tgatgcaaag ggatcagatg	1860
gagcgaggga cagaaagcaa gttgacaggt cttcttgtgg ctccaacact ccttcgagta	1920
gtgacgatgt tgaggetgat gctttggtgg agaggcaaga gaacggtggc accaccaatg	1980
aggaagtga agaagtggat ggggacacta ctaacaatcc aaaaacttca gagtctaag	2040
cgcgacgcag tagaatcagt agctctaact tagctgatcc atggaaggct gtttcagatg	2100
aggtacttaa aactaaaaag attcaaaact tccttttatt taaaatcggt tattcaacaa	2160
aatgttattt gtattttttt cagggacgaa ttgcttttag agctctgttt gcaagagaag	2220
tggtgccaca aagttttaca tatcagagag aggagggtca acaacaacaa caaagatatc	2280
caatggagct tgatcttaac tcagcagctg atgatcaaga agagaacaga aacatagcgt	2340
ttttgggtgc ttcaaagcag cagcagctaa gtagaggaag gacaggtttc aagccttaca	2400
aaagatgttc aatggaagct aaagaaagta gagtcatcag caacaccaat cctatcatca	2460
gtgttgaaca gaaagatcct aagcggatta ggttggaac aaaaacttca acatga	2516
<210> 3	
<211> 2367	
<212> DNA	
<213> Chiifu	
<400> 3	
atggagacta attcgtctgg agaagatctg gttgttaagg taattataat ttaaatgttt	60
gttaaggtga aagaccaaag atggaaactt ttttttttg aaaaacaaag atggaaactt	120

ttgtgttttt tttttgtttg ttgtttgtaa taaaaaaaaat taatattaga cgagaaagcc	180
gtatcacgata acaaagcaac gtgaaagatg gactgaggaa gaacataata ggttccttga	240
tgccttgagg ctctacggta gagcctggca aaagatcgaa ggttgttttt gatttttttt	300
gtatgttctt gtctctgtaga tgaggttccg ttgtctttgt ttgttcaaac tgatttgatt	360
ttttttctta ttcgttttga cagaacatgt agcaacgaaa actgctgtcc agattagaag	420
ccatgctcag aaatttttct ccaaggtaac tgtctgacaa gtgttctgct tcttgcttta	480
gccaatagat attgatttag ctggagaaac aaatggtatc tgaggtaaca aagtagtagt	540
tttagagagt gttagtatc ttgtcttctt atatgtttat caatcaacac atgttgtaat	600
agttgtgtct tctcataaga atagtttgtt tgcctttgtt actgggtaac aagactactc	660
tctcatctcc tcaggttagag aaagaggctg aagctaaagg tgtaccagtg gctcaaacgc	720
tagacatagc tatccctcct ccgcgccta aacgaaaacc aaacaatcct tatcctagaa	780
agaccggaac tggatctctc cccatctcaa aaccgggtct gaatgatgga aaagagtccc	840
ttggatcagg aaaagtttcg cttcctgagg tgaacttcat agtcaacatc ttgttgtagt	900
atgtcttatt cctcctcatg taattgaaac agattgtaat gctttttctt ttcagacgac	960
caatgaagat ctgcaggaag acaactgtct agactgtctc actcatcaac acctctctgc	1020
tgcacaaac gcaagcactt ttctagagtt cttaccttca cggaacagg taaaaattac	1080
attgtatatt gagggtttaa gagtattagt acttttcatg aaactataat gtgaggaag	1140
gaacagggga ataacaagga gtcaaaactca gccaatata gtgaacctca gacttatcca	1200
aggcatatcc ctctgctagt tccattgggg agctccataa caacctctct gtcacatgct	1260
cctccttcag atccagacga gaacagtcat catccccaca cagtttcagg ccatcatcag	1320
tcctttcctg accatatcat gtccaccctt ttacaaacac cagctctata cacagctgca	1380
tctttcgctt ccacgtttgg tggcggcggc ccacaaggga acttagccgc catggctgca	1440
gccaccgttg cagctgcaag tgcttgggtg gccgccaatg gaatgctacc tctctgcgct	1500
ccttttagct caggtgggtt gacctgtcac cctccagcta ctgcttatgg accttcggt	1560
gaagtagacc acacaaaaac agtggatcaa gaacactctg aggccttcaa ggctagatct	1620
tcgttggaat cagaggaggc taaaaatggg agtaaacagc attgtcatca tcatccttgt	1680
gcagcgaccg agactgatgc aaagggatca gatggagcga gggacagaaa gcaagttgac	1740
aggctttctt gtggctcgaa cactccttcg agtagtgacg atgttgaggc tgatgctttg	1800
gtggagaggc aagagaacgg tggtaccacc aatgaggaag tgaaagaagt ggatggggac	1860
actactaaca atccacaaac ttcagagtct aatgcgcgac gcagtagaat cagtagctct	1920
aacttagctg atccatggaa gtctgtttca gatgaggtac ttaaaactaa aaagattcaa	1980

aacttccttt tattttaa at cgtttattca acaaaatgtt atttgtat tt ttttttcag	2040
ggacgaattg ctttttagagc tctgtttgca agagaagtgt tgccacaaag ttttacatat	2100
aagagagagg aggggtcaaca acaaagatat ccaatggagc ttgatcttaa ctcagcagct	2160
gatgatcaag aagagaacag aaacatagcg tttttgggtg cttcaaagca gcagctatta	2220
agtagaggaa ggacaggttt caagccttac aaaagatgtt caatggaagc taaagaaagt	2280
agagtcatca gcaacaccaa tcctatcatc agtgttgaac agaaagatcc taagcggatt	2340
aggttggaac cacaaacttc aacatga	2367
<210> 4	
<211> 1005	
<212> DNA	
<213> BN615	
<400> 4	
atggagacta attcgtctgg agaagatctg gttgttaagg taattataat ttaaagtgtt	60
gttaagggtga aagaccaaag atggaaactt ttttttttg aaaaacaaag atggaaactt	120
ttgtgttttt ttttgtttgt ttgttgtaat aaaaaatta atattagacg aggaagccgt	180
acacgataac aaagcaacgt gaaagatgga ctgaggaaga acataatagg ttccttgatg	240
ccttgaggct ttacggtaga gcctggcaaa agatcgaagg ttgtttttga tttttttgt	300
atgttcttgt tctgtagatg aggttccgtt tgctttgttt gttcaaacgt atttgccttt	360
tttttcttat tcgtttggac agaacatgta gcaacgaaaa ctgctgtcca gattagaagc	420
catgtcaga aatttttctc caaggtaact gtctgacaag tgttctgctt cttaatagat	480
attgatttag ctggagaaac aaatgatac ggaggtaaca aagtagtagt tttagagagt	540
taattatctt gtcttcctat atgttgtcaa tccacacatg ttgtcttcat aagaatattt	600
agtttctctt gaaagtcagg ggagaacaac ttttcctta ttaaaagtct taaaattctg	660
aggtagtggc aaaagctggg gtaggtcctg aatatgttta ttgttctttg tgatgatgag	720
ccacagaggt aacaattttg atttagagtc attgaatacc aatagatata tgtttgtttg	780
tgttttatct agagggtaac aagactactc tctcatctcc tcaggtagag aaagaggctg	840
aagctaaagg tgtaccagt gctcaaagc tagacatagc tatccctcct ccgcgcccta	900
aacgaaaacc aaacaatcct tatcctagaa agaccggaac cggaagtgga tccctcccat	960
ctcaaaaacg tgtctgaacg atggaaaaca gtccattgcg tcagg	1005
<210> 5	
<211> 994	

<212> DNA

<213> CI79

<400> 5

atggagacaa attcgtctgg agaagatctg gttgttaagg taattataat ttaaatgttt	60
gttaagggtga aagaccaaag atggaaactt ttttttttg aaaaacaaag atggaaactt	120
ttgtgttttt ttttgtttgt ttgttgtaat aaaaaatta atattagacg aggaagccgt	180
atacgataac aaagcaacgt gaaagatgga ctgaggaaga acataatagg ttccttgatg	240
ccttgaggct ttacggtaga gcctggcaaa agatcgaagg ttgtttttga tttttttgt	300
atgttcttgt tctgtagatg aggttccgtt tgctttgttt gttcaaacgt atttgccttt	360
tttttcttat tcgtttggac agaacatgta gcaacgaaaa ctgctgtcca gattagaagc	420
catgctcaga aatttttctc caaggtaact gtctgacaag tgttctgctt cttaatagat	480
attgatttag ctggagaaac aaatgatatc ggaggtaaca aagtagtagt tttagagagt	540
taattatctt gtcttctat atgttgtcaa tccacacatg ttgtcttcat aagaatattt	600
agtttctctt gaaagttagg ggagaacaac tttttcctta ttaaaagtct taaaattctg	660
aggtagtggc aaaagctggg gtaggtcctg aatatgttta ttgttctttg tgatgatgag	720
ccacagaggt aacaattttg atttagagtc attgaatacc aatagatata tgtttgtttg	780
tgttttatct agagggtaac aagactactc tctcatctcc tcaggtagag aaagaggctg	840
aagctaaagg tgtaccagtg gctcaaagc tagacatagc tatccctcct ccgcgcccta	900
aacgaaaacc aaacaatcct taccctagaa agaccggaac tggatctctc cccatctcaa	960
aaccgggtct gaatgatgga aaagagtcct ttgg	994

<210> 6

<211> 845

<212> DNA

<213> BN515

<400> 6

atggagacta attcgtctgg agaagatctg gttgttaagg taattataat ttaaatgttt	60
gttaagggtga aagaccaaag atggaaactt ttttttttg aaaaacaaag atggaaactt	120
ttgtgttttt tttttgttt gttgttgta ataaaaaaaa ttaatatag acgagaaagc	180
cgtatagat aacaaagcaa cgtgaaagat ggactgagga agaacataat aggttccttg	240
atgccttgag gctctacggt agagcctggc aaaagatcga aggttgtttt tgattttttt	300
tgtatgttct tgttctgtag atgaggttcc gtttgctttg tttgttcaa ctgatttgat	360
tttttttctt attcgtttgg acagaacatg tagcaacgaa aactgctgtc cagattagaa	420

gccatgctca gaaatttttc tccaaggtaa ctgtctgaca agtgttctgc ttcttgcttt 480

agccaataga tattgattta gctggagaaa caaatggat ctgaggtaac aaagtagtag 540

ttttagagag tgtagttaat ctgtcttcc tataatgtta tcaatcaaca catgttgtaa 600

tagttgtgtc ttctcataag aatagtttgt ttgctttgtt tactgggtaa caagactact 660

ctctcatctc ctgagtaga gaaagaggct gaagctaaag gtgtaccagt ggctcaaacg 720

ctagacatag ctatccctcc tccgcgcctt aaacgaaaac caaacaatcc ttatcctaga 780

aagaccggaa ctggatctct ccccatctca aaaccgggtc tgaatgatgg aaaagagtcc 840

cttgg 845

<210> 7

<211> 844

<212> DNA

<213> BN569

<400> 7

atggagacta attcgtctgg agaagatctg gttgttaagg taattataat ttaaatgttt 60

gttaaggtag aagaccaaag atggaaactt ttttttttg aaaaacaaag atggaaactt 120

ttgtgttttt tttttgtttg ttgtttgtaa taaaaaaat taatattaga cgagaaagcc 180

gtatagata acaaagcaac gtgaatgatg gactgaggaa gaacataata ggttccttga 240

tgccttgagg ctctacggtg gagcctggca aaagatcgaa ggttgttttt gatttttttt 300

gtatgttctt gttctgtaga tgaggttccg ttgctttgt ttgttcaaac tgatttgatt 360

ttttttctta ttctgttggg cagaacatgt agcaacgaaa actgctgtcc agattagaag 420

ccatgctcag aaatttttct ccaaggtaac tgtctgacaa gtgttctgct tcttgcttta 480

gccaatagat attgatttag ctggagaaac aaatggatc tgaggtaaca aagtagtagt 540

tttagagagt gttagtatc ttgtcttctt atatgtttat caatcaacac atgttgtaat 600

agttgtgtct tctcataaga atagtttgtt tgctttgttt actgggtaac aagactactc 660

tctcatctcc tcaggtagag aaagaggctg aagctaaagg tgtaccagtg gctcaaacgc 720

tagacatagc tatccctcct ccgcgcctta aacgaaaacc aaacaatcct tatcctagaa 780

agaccggaac tggatctctc ccatctcaa aaccgggtct gaatgatgga aaagagtccc 840

ttgg 844

<210> 8

<211> 844

<212> DNA

<213> CI8

<400> 8

atggagacta attcgtctgg agaagatctg gttgtaagg taattataat ttaaatgttt	60
gttaaggtga aagaccaaag atggaaactt ttttttttg aaaacaaag atggaaactt	120
tttggttttt tttttgttg tttgttgtaa taaaaaaaaat taatattaga cgagaaagcc	180
gtatacgata acaaagcaac gtgaaagatg gactgaggaa gaacataata ggttccttga	240
tgcttgagg ctctacggta gagcctggca aaagatcgaa ggttggtttt gatttttttt	300
gtatgttctt gttctgtaga tgaggttccg ttgctttgt ttgttcaaac tgatttgatt	360
ttttttctta ttcgtttgga cagaacatgt agcaacgaaa actgctgtcc agattagaag	420
ccatgctcag aaatttttct ccaaggtaac tgtctgacaa gtgttctgct tcttgcttta	480
gccaatagat attgatttag ctggagaaac aaatggatc tgaggtaaca aagtagtagt	540
tttagagagt gttagtatc ttgtcttctt atatgtttat caatcaacac atgttgtaat	600
agttgtgtct tctcataaga atagtttggt tgctttgttt actgggtaac aagactactc	660
tctcatctcc tcaggtagag aaagaggctg aagctaaagg tgtaccagtg gctcaaacgc	720
tagacatagc tatccctcct ccgcgccta aacgaaaacc aaacaatcct tatcctagaa	780
agaccggaac tggatctctc cccatctcaa aaccgggtct gaatgatgga aaagagtccc	840
ttgg	844

<210> 9

<211> 993

<212> DNA

<213> RCB

<400> 9

atggagacta attcgttga gaagatctcg ttgttaaggt aattataatt taaatgtttg	60
ttaaggtgaa agaccaaaga tggaaacttt tttttttga aaaacaaaga tggaaacttt	120
tggttttttt ttgtttgtt tgttgtaata aaaaaatta atattagacg agaaagccgt	180
atacgataac aaagcaacgt gaaagatgga ctgaggaaga acataatagg ttccttgatg	240
ccttgaggct ttacgtaga gcctggcaaa agatcgaagg ttgtttttga tttttttgt	300
atgttcttgt tctgtagatg aggttccgtt tgctttgttt gttcaaactg atttgctttt	360
tttttcttat tcgtttggac agaacatgta gcaacgaaaa ctgctgtcca gattagaagc	420
catgctcaga aatttttctc caaggtaact cgtctgacaa gtgttctgct tcttaataga	480
tatgatttag ctggagaaac aatgatatct gaggttaaca agtaaatagt tgagagagtt	540

aattatcttg tcttcctata tgttgtcaaa atccacacat gttgtcttca taagaatatt 600
tagtttctct tgaaagtcag gggagaacaa ctttttcctt attaagtcctt aaaattctga 660
ggtagtggca aaagctgggg taggtcctga atatgtttat tgttttttgt gatgatgagc 720
cacagaggta acaattttga tttagagtca ttgaatacca atagatatat gtttgtttgt 780
gttttatcta gagggtaaca agactactct ctcatctcct caggtagaga aagaggctga 840
ggctaaaggt gtaccagtgg ctcaaagct agacatagct atccctcctc cgcgccttaa 900
acgaaaacca aacaatcctt atcctagaaa gaccggaact ggaatctctcc ccatctcaaa 960

accgggtctg aatgatggaa aagagtcctt tgg 993

<210> 10

<211> 999

<212> DNA

<213> Kenshin

<400> 10

atggagacaa attcgtctgg agaagatctg gttgttaagg taattataat ttaaatgttt 60
gttaaggatga aagaccaaag atggaaactt tttttttttt gaaaaacaaa gatggaaact 120
tttgtgtttt tttttgtttg ttgtttgtaa taaaaaaaat taatattaga cgaggaagcc 180
gtatacgata acaaagcaac gtgaaagatg gactgaggaa gaacataata ggttccttga 240
tgccttgagg ctttacggta gagcctggca aaagatcgaa ggttgttttt gatatTTTT 300

ttgtatgttc ttgttctgta gatgaggttc cgtttgcttt gtttgttcaa actgatttgc 360
cttttttttc ttattcgttt ggacagaaca tgtagcaacg aaaactgctg tccagattag 420
aagccatgct cagaaatTTT tctccaaggt aactgtctga caagtgttct gcttcttaat 480
agatattgat ttagctggag aaacaatgat atctgaggta acaaagtaat agtttgagag 540
agttaattat ctgtcttcc tatatgttgt caaaatccac acatgttgtc ttcataagaa 600
tatttagttt ctcttgaaag tcaggggaga acaactTTTT ccttattaaa agtcttaaaa 660
ttctgaggta gtggcaaaag ctggggtagg tcctgaatat gtttattgtt ttttgtgatg 720

atgagccaca gaggtaacaa ttttgattta gagtcatgta ataccaatag atatatgttt 780
gtttgtgttt tatctagagg gtaacaagac tactctctca tctcctcagg tagagaaaga 840
ggctggggct aaaggtgtac cagtggctca aacgctagac atagctatcc ctctcccgcg 900
ccctaaacgt aaaccaaaca atccttatcc tagaaagacc ggaactggat ctctcccat 960
ctcaaaaccg ggtctgaatg atggaaaaga gtcccttgg 999

<210> 11

<211> 995

<212> DNA
<213> WSEF
<400> 11

atggagacta attcgtctgg agaagatctg gttgttaagg taattataat ttaaatgttt	60
gttaaggatga aagaccaaag atggaaactt tttttttttt gaaaaacaaa gatggaaact	120
tttgtgtttt tttttgtttg tttgttgtaa taaaaaaatt aatattagac gaggaagccg	180
tatacgataa caaagcaacg tgaagatgg actgaggaag aacataatag gttccttgat	240
gccttgaggc tttacggtag agcctggcaa aagatcgaag gttgtttttg attttttttg	300
tatgttcttg ttctgtagat gaggttccgt ttgctttgtt tgttcaaact gatttgcctt	360
ttttttctta ttcgttttga cagaacatgt agcaacgaaa actgctgtcc agattagaag	420
ccatgctcag aaatttttct ccaaggtaac tgtctgacaa gtgttctgct tcttaataga	480
tattgattta gctggagaaa caaatgatat cggaggtaac aaagtagtag ttttagagag	540
ttaattatct tgtcttcta tatgttgta atccacacat gttgtcttca taagaatatt	600
tagtttctct tgaagtcag gggagaacaa ctttttcctt attaaaagtc ttaaaattct	660
gaggtagtagg caaaagctgg ggtaggctct gaatatgttt attgttcttt gtgatgatga	720
gccacagagg taacaatttt gatttagagt cattgaatac caatagatat atgtttgttt	780
gtgttttata tagagggtaa caagactact ctctcatctc ctcaggtaga gaaagaggct	840
gaagctaaag gtgtaccagt ggctcaaacg ctagacatag ctatccctcc tccgcgcct	900
aaacgaaaac caacaatcc ttatcctaga aagaccggaa ctggatctct ccccatctca	960
aaaccgggtc tgaatgatgg aaaagagtcc cttag	995

<210> 12
<211> 844
<212> DNA
<213> WSLF
<400> 12

atggagacta attcgtctgg agaagatctg gttgttaagg taattataat ttaaatgttt	60
gttaaggatga aagaccaaag atggaaactt tttttttttt gaaaaacaaa gatggaaact	120
tttgtgtttt tttttgtttg tttgttgtaa taaaaaaatt aatattagac gaggaagccg	180
tatacgataa caaagcaacg tgaagatgg actgaggaag aacataatag gttccttgat	240
gccttgaggc tttacggtag agcctggcaa aagatcgaag gttgtttttg attttttttg	300
tatgttcttg ttctgtagat gaggttccgt ttgctttgtt tgttcaaact gatttgcctt	360

ttttttctta ttcgtttgga cagaacatgt agcaacgaaa actgctgtcc agattagaag	420
ccatgctcag aaatTTTTct ccaaggtaac tgtctgacaa gtgttctgct tcttgcttta	480
gccaatagat attgatttag ctggagaaac aaatgggtatc tgaggtaaca aagtagtagt	540
tttagagagt gttagtattc ttgtcttctc atatgtttat caatcaacac atgttgtaat	600
agttgtgtct tctcataaga atagtttgtt tgctttgttt actgggtaac aagactactc	660
tctcatctcc tcaggtagag aaagaggctg aagctaaagg tgtaccagtg gctcaaacgc	720
tagacatagc tatccctcct ccgcgccta aacgaaaacc aaacaatcct tatcctagaa	780
agaccggaac tggatctctc cccatctcaa aaccgggtct gaatgatgga aaagagtcctc	840
ttgg	844
<210> 13	
<211> 845	
<212> DNA	
<213> BrCCA1	
<400> 13	
atggagacta attcgtctgg agaagatctg gttgttaagg taattataat ttaaatgttt	60
gttaaggtag aagaccaaag atggaaactt ttttttttg aaaaacaaag atggaaactt	120
ttgtgttttt tttttgttt gttgtttgta ataaaaaaaa ttaatattag acgagaaaagc	180
cgtatacgat aacaaagcaa cgtgaaagat ggactgagga agaacataat aggttccttg	240
atgccttgag gctctacggt agagcctggc aaaagatcga aggttgtttt tgattttttt	300
tgtatgttct tgttctgtag atgaggttcc gtttgctttg tttgttcaaa ctgatttgat	360
tttttttctt attcgtttgg acagaacatg tagcaacgaa aactgctgtc cagattagaa	420
gccatgctca gaaatttttc tccaaggtaa ctgtctgaca agtgttctgc ttcttgcttt	480
agccaataga tattgattta gctggagaaa caaatggtat ctgaggtaac aaagtagtag	540
ttttagagag tgttagtatt ctgtcttcc tatagttta tcaatcaaca catgttgtaa	600
tagttgtgtc ttctcataag aatagtttgt ttgctttgtt tactgggtaa caagactact	660
ctctcatctc ctgagtaga gaaagaggct gaagctaaag gtgtaccagt ggctcaaacg	720
ctagacatag ctatccctcc tccgcgcctt aaacgaaaac caacaatcc ttatcctaga	780
aagaccggaa ctggatctct ccccatctca aaaccgggtc tgaatgatgg aaaagagtcc	840
cttgg	845
<210> 14	
<211> 1028	

<212> DNA

<213> AtCCA1

<400> 14

atggagacaa attcgtctgg agaagatctg gttattaagg taaattaaac taaattttag	60
ggggaagatg attgttttag gtgtcaaaga ttgagaatit taatgaaact tgatatagac	120
tcggaagcca tatacgataa caaagcaacg tgaaagggtg actgaggaag aacataatag	180
attcattgaa gctttgaggc tttatggtag agcatggcag aagattgaag gttgattttt	240
atttcccttt atatgtctta ttttttgtgt ttgcagaggt ttgtcttcaa actgatttgc	300
tttttttcat ttggacagaa catgtagcaa caaaaactgc tgtccagata agaagtcacg	360
ctcagaaatt tttctccaag gtaaaatcgg ttaatittga aatgatgttc tcattttcat	420

tggtttaatg cttaagactt attgaaagcc aggcaagttt tctgcttctt ttgctttcta	480
gtcaggagat agatagatta cgtttttaga gtttagtaat gagcaataag tcttaaaata	540
gttggagaaa tgacgagatg taatcgtttt cttttgttta tgcctatatac ttgttaatcc	600
acaaacatgt acatagattc ttcagaagaa tgtttagttt tttagattct tcagataaac	660
ttgtgtcttc ttaccgattc tgaggtagtg gcaaaagtgg gctgagtgtc agaaattttt	720
gaatgttcct tgtgataagc catagaggta aaccattttt gattttccag ttctgtcatt	780
taaacttgtt agtgtcatta gatttttgtt tgtttacgtt tgttttagagg gtaacaaaac	840

tactctcacc tctctcaggt agagaaagag gctgaagcta aagggtgtagc tatgggtcaa	900
gcgctagaca tagctattcc tctccacgg cctaagcgta aaccaaaca tccttatcct	960
cgaagacgg gaagtggaac gatccttatg tcaaaaacgg gtgtgaatga tggaaaagag	1020
tcctttgg	1028

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCA1F

<400> 15

gtccagatta gaagccatgc tcaga	25
-----------------------------	----