

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0102049 (43) 공개일자 2014년08월21일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0015463 (22) 출원일자 2013년02월13일 심사청구일자 2013년02월13일		(71) 출원인 세종대학교산학협력단 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교) (72) 발명자 이상협 대전 서구 청사서로 11, 105동 1406호 (월평동, 무지개아파트) (74) 대리인 특허법인태백

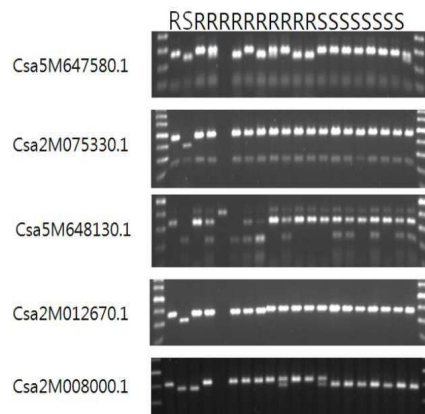
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **오이 노균병 저항성 개체 선별용 분자 마커 및 이를 이용한 선별방법**

(57) 요약

본 발명은 오이 노균병 저항성 개체 선별용 분자 마커 및 이를 이용한 선별방법에 관한 것으로서, 서열번호 1로 기재되는 염기서열 내에서 36번째 염기, 238번째 염기, 349번째 염기 또는 352번째 염기로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기를 포함하는 10-100개의 연속적인 염기서열 또는 그의 상보적인 염기서열로 이루어지는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 다형성 마커를 제공한다. 또한, 상기 다형성 마커를 증폭시킬 수 있는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 프라이머 세트 및 서열번호 4 내지 서열번호 11로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기서열 또는 이에 상보적인 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 제공한다. 또한, 상기 프라이머 세트를 이용한 오이 노균병 저항성 개체를 선별하는 방법 및 오이 노균병 저항성 개체를 육성하는 방법을 제공하고, 상기 프라이머 세트 및 제한효소를 포함하는 오이 노균병 저항성 개체 선별용 키트를 제공한다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	111057-5
부처명	농림수산부
연구사업명	생명산업기술개발사업
연구과제명	오이 노균병 저항성 마커 개발을 통한 노균병 저항성 품종 개발
기 여 율	1/1
주관기관	세종대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.22 ~ 2012.09.21

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 기재되는 염기서열 내에서 36번째 염기, 238번째 염기, 349번째 염기 또는 352번째 염기로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기를 포함하는 10-100개의 연속적인 염기서열 또는 그의 상보적인 염기서열로 이루어지는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 다형성 마커.

청구항 2

청구항 1의 다형성 마커를 증폭시킬 수 있는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 프라이머 세트.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 2 및 서열번호 3인 것을 특징으로 하는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 프라이머 세트.

청구항 4

서열번호 4 내지 서열번호 11로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기서열 또는 이에 상보적인 염기서열로 이루어진 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 프라이머 세트.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 4 및 5의 프라이머 세트, 서열번호 6 및 7의 프라이머 세트, 서열번호 8 및 9의 프라이머 세트 및 서열번호 10 및 11의 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 프라이머 세트.

청구항 6

오이 시료에서 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 DNA를 주형으로 하고, 청구항 2 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 따른 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 증폭 산물을 제한효소로 처리한 후, 처리 산물을 젤 전기영동함으로써 확인하는 것을 특징으로 하는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하는 방법.

청구항 8

청구항 6에 따른 선별 방법을 이용하여 오이 노균병 저항성 개체를 육성하는 방법.

청구항 9

청구항 2 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 따른 프라이머 세트 및 제한효소를 포함하는 오이 노균병 저항성 개체 선별용 키트.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 키트는 DNA 중합효소, dNTPs 및 반응완충액을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 오이 노균병 저항성 개체 선별용 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 오이 노균병 저항성 개체 선별용 분자 마커 및 이를 이용한 선별방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 오이는 수천년 동안 재배되어 왔고, 전세계에서 재배되는 인기 있는 작물이다. 맛깔스런 향기가 있으며, 수분이 많고 각종 비타민과 무기질을 함유하고 있어 대부분의 소비자가 선호하는 생식용 채소로 최근에는 온실이나 비닐하우스 등에서 연중 재배된다. 오이는 생육 중에 많은 수분을 필요로 하는 호습성 채소로 토양 중에 뿌리의 분포가 얇기 때문에 토양수분이 부족할 경우 쉽게 장애를 받는다. 따라서 오이는 비교적 다습한 상태에서 재배되므로 다습한 환경에서 발생하는 노균병, 잿빛곰팡이병, 균핵병 등의 피해를 받기 쉽다.

[0003] 노균병은 진균에 속하는 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*Pseudoperonospora cubensis*) (P.c.)에 의해 유발되고, 오이를 포함하여 많은 박과(Cucurbit) 중에서 유의한 작물 손실을 야기한다. 이 질병은 전세계에서 발견되고, 습도, 온도 조건에 영향을 받는다. 이 질병은 온실에서 성장한 식물뿐만 아니라 노지에서 성장한 식물에서도 발생한다. 노균병은 박과의 가장 중요한 질병 중의 하나이고, 과실 수량 및 품질 저하의 가장 중요한 요인이고, 특히 감수성 모종을 사멸시켜서 재배 농가에 막대한 피해를 끼친다. 초기에는 잎의 앞면에 퇴록된 부정형 반점이 생기고 옅은 황색을 띠며 잎 뒷면에는 수침상으로 나타난다. 아랫잎에서 먼저 발생되고 위로 번지는데 반점들이 합쳐지면 병반은 커지고 잎이 말라 죽는다.

[0004] 오이 노균병은 활물기생(인공배양이 불가능하여 포장에서 자연 발생한 병징 관찰)이라서, 기존에는 포장에서 자연적으로 병이 발병하면 발생된 병징을 관찰하여 저항성 여부를 판단하고, 저항성 개체를 육종 프로그램에 도입해서 저항성 품종을 육성하였다. 그러나, 이는 포장에서의 자연적인 병발생에 의존하기 때문에 선발할 모든 개체에 대해서 균일한 병발생을 담보할 수 없으므로 저항성 개체의 선발이 부정확하고, 병발생 후 병징을 관찰해서 저항성 개체를 선발하므로 시간이 오래 걸리며, 포장에서 오이를 재배한 후 병징을 보고 저항성 개체를 선발하므로 비용이 많이 소요되는 문제점이 있다.

[0005] 한편, 한국특허출원 제10-2012-7013075호는 노균병 저항성 오이 식물의 확인을 위한 방법 및 조성물에 관한 것으로서, 노균병에 대한 증가된 저항성을 갖는 오이 식물주를 확인하기 위한 방법, 및 상기 증가된 질병 저항성을 조건화하는 유전자(들)에 연관된 유전자 마커의 확인에 관한 것이다. 본 발명은 또한 마커-보조 선택에 의해 증가된 노균병 저항성을 갖는 오이 식물주로부터 오이 식물을 육종하는 방법, 그러한 마커 보조 선택을 위해 유용한 핵산 프로브 또는 프라이머를 포함하는 조성물, 및 상기 방법에 의해 생산된 식물 및 식물 부위에 대해 개시하고 있으나, 본 발명의 오이 노균병 저항성 개체 선별용 분자 마커에 대한 언급은 없다.

[0006] 따라서, 본 발명자들은 기존의 고비용으로 부정확하고 장시간이 소요되는 포장 선발의 단점을 극복하고자, 저항성 유전자에 기반한 염기서열의 차이를 바탕으로 분자 마커를 개발하여 저비용으로 단기간에 정확하게 노균병 저항성 개체를 선발할 수 있음을 확인하고 이를 육종에 도입활용하는 방안을 제시하는 것으로 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 서열번호 1로 기재되는 염기서열 내에서 36번째 염기, 238번째 염기, 349번째 염기 또는 352번째 염기로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기를 포함하는 10-100개의 연속적인 염기서열 또는 그의 상보적인 염기서열로 이루어지는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 다형성 마커를 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 다형성 마커를 증폭시킬 수 있는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 프라이머 세트 및 서열번호 4 내지 서열번호 11로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기서열 또는 이에 상보적인 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 이용한 오이 노균병 저항성 개체를 선별하는 방법 및 오이 노균병 저항성 개체를 육성하는 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머 세트 및 제한효소를 포함하는 오이 노균병 저항성 개체 선별용 키트를

제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 염기서열 내에서 36번째 염기, 238번째 염기, 349번째 염기 또는 352번째 염기로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기를 포함하는 10-100개의 연속적인 염기서열 또는 그의 상보적인 염기서열로 이루어지는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 다형성 마커를 제공한다.
- [0012] 서열번호 1은 유전자 ID Csa2M008000.1의 일부로서, 이병성 및 저항성 allele에서 차이를 보이는 염기서열을 다중염기기재 방식에 따라 작성하였으며, 36번째 염기는 T 또는 C일 수 있으며(y라고 기재), 238번째 염기는 C 또는 T일 수 있으며(y라고 기재), 349번째 염기는 G 또는 A일 수 있으며(r이라고 기재), 352번째 염기는 A 또는 C일 수 있다(m이라고 기재).
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 다형성 마커를 증폭시킬 수 있는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 프라이머 세트를 제공하며, 상세하게는 상기 프라이머 세트는 서열번호 2 및 서열번호 3인 것을 특징으로 한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 서열번호 4 내지 서열번호 11로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염기서열 또는 이에 상보적인 염기서열로 이루어진 오이 노균병 저항성 개체를 선별하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.
- [0015] 상세하게는 상기 프라이머 세트는 서열번호 4 및 5의 프라이머 세트, 서열번호 6 및 7의 프라이머 세트, 서열번호 8 및 9의 프라이머 세트 및 서열번호 10 및 11의 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 프라이머 세트인 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 명세서에서 용어, "프라이머"는 증폭하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다. 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 오이 시료에서 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는 오이 노균병 저항성 개체를 선별하는 방법을 제공한다. 상세하게는, 상기 증폭 산물의 검출은 증폭 산물을 제한효소로 처리한 후, 처리 산물을 젤 전기영동함으로써 확인하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기의 선별 방법을 이용하여 오이 노균병 저항성 개체를 육성하는 방법을 제공한다.
- [0019] 본 명세서에서 용어, "단순 반복 염기서열(simple sequence repeat; SSR) 마커"은 STR(Short Tandem Repeats)이라고도 하며, DNA 상에서 1 내지 6개의 염기가 반복되어 나타나는 서열을 말한다. 일반적으로 SSR 서열은 유전자 내에서 다양한 마커로 사용 가능하며, 특정 유전자의 복제 또는 결실에 관한 연구에 사용되기도 한다. 현재 중국에서 밝혀진 오이 표준 유전체 서열 정보를 분석하면 약 20,000 여개 이상의 단순 반복 염기서열(simple sequence repeat; SSR) 마커가 있다고 알려져 있다. 본 발명자들은 오이 계통 간에 다형성이 많이 관찰되는 900 여개의 SSR 마커 정보를 확보하였으며, 오이 노균병 저항성과 이병성 개체의 서열에서 상기 900 여개의 SSR 서열이 위치하는 영역에 해당하는 서열을 다운로드 해서 이들 서열간에 SSR의 반복 길이(repeat length)가 다른 SSR 마커를 220 여개 확보하였다.
- [0020] 본 명세서에서 용어, "CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences)"는 알려진 염기서열 부분을 PCR 증폭

하고, 제한효소를 처리하여 다형성 부위의 절단유무에 따라 다형성을 검출하는 방법을 말한다. 이는 실험방법이 간단하고 재현성이 있다는 장점이 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 제한효소를 포함하는 오이 노균병 저항성 개체 선별용 키트를 제공한다. 상세하게는, 상기 키트는 DNA 중합효소, dNTPs 및 반응완충액을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명의 "키트"에는 본 발명의 오이 노균병 저항성 개체를 선별할 수 있는 프라이머세트 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다. 특히, 본 발명과 같이 프라이머 세트가 CAPS 마커를 포함하는 경우에는 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약 외에 제한효소를 필요로 한다. 즉, CAPS 마커는 증폭 반응을 수행한 후에, 해당하는 제한효소로 절단해야 증폭 산물을 구별할 수 있기 때문이다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 오이 노균병 저항성 개체 선별용 분자 마커 및 이를 이용한 선별방법에 관한 것으로서, 본 발명의 분자 마커를 이용하면 효율적인(저비용, 단기간, 정확한 선발) 오이 노균병 저항성 개체 선발 기술 확보할 수 있다. 또한, 기존의 육종 방법으로는 10년 이상의 기간과 막대한 비용이 소모되지만, 본 발명에 따른 바이오마커를 활용하면 기존 육종 비용의 1/100 이하와 5년 이내에 품종 육성이 가능하여 오이 종자 시장의 판도를 주도할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 오이 레퍼런스 맵핑(reference mapping)을 통한 염색체별 pseudomolecule 서열을 나타낸다.
 도 2는 노균병 이병성/저항성 개체간에 다형성을 보이는 SSR 마커를 대상으로 아가로즈젤 상에서 전기영동 후 다형성 밴드패턴 결과 이미지를 나타낸다.
 도 3은 아크릴아마이드 젤을 이용한 SSR 마커의 다형성 분석결과를 나타낸다.
 도 4는 오이 노균병 저항성/이병성 개체간 다형성을 보이는 SSR 마커에 대한 유전자 지도상의 위치를 확인한 결과이다.
 도 5는 오이 NBS-LRR 유전자의 유전체 상의 위치를 나타낸다.
 도 6은 다형성을 보이는 NBS-LRR 유전자의 PCR 증폭 사진이다.
 도 7은 증폭된 NBS 유전자에 적합한 제한효소를 처리한 후 노균병 저항성(R)과 이병성(S) 간에 다형성 검출 결과이다.
 도 8은 NBS-LRR 유전자 유래 CAPS 마커의 유전형-표현형(genotype-phenotype) 비교 결과이다.
 도 9는 후보 유전자 연구 결과를 요약하여 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0026] <실시예 1> 오이 노균병 저항성/이병성 개체 유전체 서열 분석

[0027] 노균병 저항성 마커 개발을 위한 QTL mapping을 하기 위해서 제일 선행되어야 할 것이 노균병 저항성과 이병성 개체 간의 다형성(염기서열의 차이)을 보이는 바이오마커 후보이고 이러한 다형성 마커를 이용하여 매핑 집단에 매핑해서 유전자 지도를 확보하는 작업이다.

[0028] 노균병 이병성과 저항성 개체 간에 다형성을 보이는 바이오마커를 선발하는 방법은 다양한데, 본 발명에서는 유

전체 서열을 바탕으로 다형성 마커를 선발하는 전략을 추구하였다. 먼저 노균병에 대해서 저항성을 보이는 개체와 이병성을 보이는 개체를 선발한 후 이들 개체를 대상으로 전체 유전체 염기서열 분석 작업을 실시하였다. 그 결과로 전체 12.8 Gb의 오이 유전체 서열을 최종 확보하였다. 이는 오이 전체 유전체 크기의 30-40 배에 해당하는 규모이다.

[0029] 이병성 오이 개체에서 6.3 Gb 서열을 확보하였고, 저항성 오이 개체에서 6.5 Gb 염기 서열을 확보하였다. 이병성 및 저항성 개체에서 확보된 염기 서열은 오이 전체 유전체 크기의 약 15 배에 해당하는 유전체 정보이다. 이렇게 확보된 유전체 정보를 각 염색체별로 배정(assign)하는 어셈블리(assembly) 작업을 맨 처음 실시하였다. 현재 오이에서는 중국에서 사용하는 육종라인인 chinness long 9930을 대상으로 발표한 오이 표준 유전체 정보가 있다. 따라서 본 발명자들이 분석한 염기서열을 어셈블리(assembly) 하는 방법으로, 오이 표준 유전체 정보인 chinness ling 9930 서열을 표준(reference)으로 하여 표준 서열에 염기서열분석(sequencing)한 서열을 매핑해서 어셈블리(assembly) 하는 레퍼런스 맵핑(reference mapping)이란 방법을 CLC genome workbench 소프트웨어를 이용하여 실시하였다. 어셈블리(Assembly) 결과는 도 1에 나타난 바와 같이, 오이 표준 유전체에 바탕을 둔 7개 염색체에 해당하는 오이 노균병 저항성 식물과 이병성 식물 유래의 pseudomolecule 서열을 확보하였다(도 1).

[0030] 현재까지 국내외에서 분석된 오이 유전체 정보는 본 발명자들이 실시한 정보와 표준 유전체 정보인 chinness long 9930 이외에도 Gy14 (미국 피클용 오이 육종에 대표적으로 사용되는 육종 라인, 노균병에 대해 감수성이고, 저온에 대해 감수성으로 알려짐)와 B10 (폴란드에서 광범위하게 사용되는 육종 라인, 노균병에 대해 감수성으로 알려짐)이 존재한다. 따라서 이들 서열도 공공 데이터베이스에서 다운받아 레퍼런스 맵핑(reference mapping)을 실시하여 이들 식물체에 대해서 7개의 pseudomolecules에 해당하는 염기서열을 확보하였다.

[0031] 이들 유전체 염기서열 정보는 노균병 저항성 연관 분자마커 개발에 필요한 다형성 마커 정보 뿐만 아니라, 추후 노균병 저항성 QTL cloning을 위해서 필요한 고밀도 유전자지도 작성용으로 본 염기 서열 정보가 필수적이고 유용하게 활용될 수 있다. 특히 노균병 저항성 연관 마커 개발에 필요한 실제적인 실험을 하기 이전에 유전체 정보에서 위양성(false positive) 정보를 제거할 수 있으므로, 마커 개발에 걸리는 시간과 비용을 최소화할 중요한 수단으로 본 발명의 결과가 활용될 것으로 판단된다.

[0032] <실시예 2> 유전체 기반 단순 반복 염기서열(simple sequence repeat; SSR) 마커 확보

[0033] 현재 중국에서 밝혀진 오이 표준 유전체 서열 정보를 분석하면 약 20,000 여개 이상의 단순 반복 염기서열(simple sequence repeat; SSR) 마커가 있다고 알려져 있다. 따라서 중국에서 보고된 오이 계통 간에 다형성이 많이 관찰되는 900 여개의 SSR 마커 정보를 확보하였다. 오이 노균병 저항성과 이병성 개체의 서열에서 상기 900 여개의 SSR 서열이 위치하는 영역에 해당하는 서열을 다운로드 해서 이들 서열간에 SSR의 반복 길이(repeat length)가 다른 SSR 마커를 220 여개를 확보하였다. 하지만 이러한 다형성 정보는 유전체에서 밝혀진 염기서열에만 전적으로 의존한 데이터이기 때문에, 노균병 저항성과 이병성 간의 반복 길이(repeat length) 차이가 실제 유전체 서열상에 존재하는 것인지, 아니면 염기서열 분석 상에서 흔히 발생하는 염기서열 에러(sequencing error)인지를 확인할 필요가 있다.

[0034] 따라서 실제 SSR이 포함된 영역을 증폭할 프라이머를 제작하여 실제 젤 상에서 전기영동을 실시하여 다형성을 관찰하는 후속 작업을 진행하였다. 이들 220 여개의 SSR 영역을 포함하는 좌, 우 프라이머를 제작, 구매하여, 오이 이병성과 저항성에서 분리한 DNA를 주형(template)으로 해서, 95℃ 변성(denature), 60℃ 결합(annealing), 74℃ 연장(extension)으로 35회의 PCR 반응을 실시했다. PCR 반응을 통해 증폭된 PCR 산물을 먼저 아가로스 젤 상에서 전기영동해서 반복 길이(repeat length) 차이에 의해 밴드 패턴이 아가로스 젤에서 분리되는지 여부를 확인하였다. 확인 결과, 유전체 정보 분석에 의해 노균병 저항성과 이병성에서 다형성을 보이는 SSR 마커의 대부분이 도 2에서 보이는 것처럼 아가로스 젤 상에는 차이를 발견하기 힘들다는 것을 알 수 있었다(도 2).

[0035] 그 이유는 아가로스 젤 상에서 확인될 수 있는 SSR 서열의 다형성은 최소한 10 bp 정도의 반복 길이(repeat length) 차이를 보여야 하는데, 반복 길이(repeat length) 차이가 대부분 10 bp 이하인 것을 알 수 있었다. 하지만 아가로스 젤에서 검정이 어려운 SSR 마커 유래의 PCR 산물은, 이보다 작은 bp 차이(대개 4bp 이상의 차이

검출)를 분석할 수 있는 아크릴아마이드 젤 상에서 다형성을 확인할 수 있다 (도 3). 따라서 아가로즈 젤 상에서 다형성을 확인하지 못한 SSR 마커들은 아크릴아마이드젤에서 다형성을 확인하는 작업을 실시하였다.

[0036] 따라서 아가로즈 젤과 아크릴아마이드 젤을 통해서 약 200 여개의 SSR 마커가 노균병 저항성과 이병성 개체에 다형성을 보인다는 사실을 최종 확인하였다. 노균병 이병성과 저항성에서 다형성을 보이는 200 여개의 SSR 마커를 중국에서 발표한 오이 염색체 지도(physical map) 상에 맵핑(mapping) 하였다. 맵핑 결과, 오이 전체 유전체를 충분히 커버할 수준의 다형성 SSR 마커가 확보되었다. 염색체 지도(physical map) 상의 위치를 오이 유전자 지도와 비교 분석해 보면 도 4에서 보이는 것처럼 몇몇 영역을 제외하고는 대부분의 SSR 마커가 5 cM 이내에 위치하며, 전체 유전체를 비교적 균일하게 커버하고 있다는 것을 알 수 있었다(도 4).

[0037] 도 4에서는 7 개의 오이 염색체를 찾아 볼 수 있고, 각 염색체별로 유전자 지도상의 거리를 나타내고 있다. 검게 표시된 영역은 다형성을 보이는 SSR 마커가 존재하는 영역이다. 이외에도 약 3,800 개의 유전자에 기반을 둔 SSR 마커도 오이 유전체와 전사체(transcriptome) 서열을 기반으로 선발되었다(표 1). 이렇게 선발 된 유전자 기반의 EST-SSR 마커에 대해 본 발명자들이 해독한 노균병 저항성과 이병성 개체에서 염기서열의 다형성이 보이는지 여부도 현재 분석중이다. 이러한 분석이 끝나면 다형성을 보이는 EST-SSR 마커를 상기의 유전자 지도에 맵핑(mapping)하고, 이를 추후 노균병 저항성 유전자 클로닝(cloning)에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

표 1

[0038] 오이 유전체서열과 transcriptome 서열 분석을 통해 개발된 EST-SSR 마커 중의 일부 예시

Unigene ID	반복 염기서열 (Repeat sequences)	반복 수 (Number of repeats)	크기 (Size)
CU084387	CGG	6	18
CU084394	CAG	5	15
CU084394	TGA	6	18
CU084404	TTC	5	15
CU084409	GT	7	14
CU084412	GA	11	22
CU084413	CTT	7	21
CU084414	CA	9	18
CU084434	TTC	7	21
CU084436	AAG	7	21
CU084439	TGG	7	21
CU084450	AT	8	16
CU084456	CA	6	12
CU084456	TTC	5	15
CU084457	GAA	8	24
CU084459	TCT	7	21
CU084461	TTC	10	30
CU084473	TCT	6	18
CU084475	TTA	5	15

[0039] 한편, 보다 정밀한 노균병 저항성 연관 마커 개발이나, 노균병 저항성 QTL을 클로닝(cloning) 하기 위해서는 도 4의 유전자 지도보다는 훨씬 고밀도로 포화(saturation)된 유전자 지도 작성이 필요하다. 더 많은 다형성 마커가 포화(saturation)된 고밀도 유전자 지도 작성을 위해서는 지금 보다 훨씬 많은 다형성 마커 개발과 유전자 지도 상의 맵핑(mapping)이 필요하다. 따라서 이러한 목적을 위해서는 노균병 저항성과 이병성 개체 간에 대량으로 발견되는 단일 염기서열 다형성 마커(single nucleotide polymorphism; SNP)를 활용할 수 있다. 두 유전체 서열을 비교 분석하여, 최소 80 만개 이상의 SNP 후보 마커를 확보 한 상태이고, 이들의 염색체상의 위치를 오이 pseudomolecule 상에 확인한 상태이다. 그리고 이와 더불어 추후에 이러한 SNP 마커가 활용될 경우에 이들 SNP 마커를 활용할 시스템을 구축하였다. 즉, SNP 마커를 검출할 프라이머를 제작한 후에 고해상도 멜팅(High Resolution Melt; HRM) 기기를 이용하여 단일서열 차이(SNP)를 구별할 프로토콜을 확보하였다.

[0040] <실시예 3> 노균병 저항성 후보 유전자를 활용한 노균병 저항성 QTL 맵핑 및 노균병 저항성 유전자 발굴

[0041] 최근에 토마토(tomato), 애기장대(Arabidopsis), 담배(tobacco), 쌀(rice), 후추(pepper), 아마(flax) 등 다양한 식물체로부터 세균, 바이러스, 균류, 곤충 등 세포내·외에서 다른 생활방식을 가진 다양한 식물병원균에 특이적 저항성을 유도하는 30 여개의 식물 병저항성(R) 유전자들이 분리되었다. 흥미롭게도 이들 유전자들은 분자구조적으로 서로 유사성을 가지고 있으며 크게 5 종류로 대별된다. 이 5 종류의 저항성 유전자 구조에서 가장 많은 비중을 차지하는 것이 염기-결합 사이트(nucleotide-binding site; NBS)와 LRR 도메인을 함께 가지는 NBS-LRR 형태의 유전자들이다. 따라서 오이 유전체 서열을 분석해서 67 개 정도의 NBS-LRR 유전자를 발견하였다(표 2).

표 2

[0042] 오이 NBS-LRR 유전자 리스트

ID	GenBank best hit
Csa1M334920.1	B9IP48 Tir-nbs-lrr resistance protein (Fragment)
Csa1M572370.1	B9GV40 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M008000.1	B9V0H2 NBS-LRR disease resistance protein family-1
Csa2M012670.1	B9HE76 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M014830.1	B9NCG3 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M015330.1	B9NCG6 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M020890.1	B9N9Q3 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa2M020940.1	B9I4D9 Tir-nbs-lrr resistance protein (Fragment)
Csa2M021510.1	B3VTL6 TIR-NBS-LRR RCT1 resistance protein
Csa2M021530.1	Q8GTC4 NLS-TIR-NBS disease resistance protein (Fragment)
Csa2M021540.1	B9IP48 Tir-nbs-lrr resistance protein (Fragment)
Csa2M022270.1	Q19PL7 TIR-NBS-LRR-TIR type disease resistance protein
Csa2M022780.1	B9NAV8 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa2M022790.1	B9GGU2 Tir-nbs-lrr resistance protein (Fragment)
Csa2M059700.1	B3VTL6 TIR-NBS-LRR RCT1 resistance protein
Csa2M074130.1	Q6ZJF7 Putative NBS-LRR resistance protein RGH1
Csa2M074250.1	B9I4D9 Tir-nbs-lrr resistance protein (Fragment)
Csa2M075330.1	B9IQ79 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa2M075440.1	B9NCG3 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M096930.1	B9I7H9 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M401400.1	Q0PDU9 NBS-containing resistance-like protein (Fragment)
Csa2M403680.1	B9NCG6 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M432260.1	B9NCL4 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M433370.1	B9N679 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa3M044470.1	B9GHK5 Tir-nbs resistance protein
Csa3M172400.1	B9IP06 Nbs-lrr resistance protein
Csa3M206330.1	Q2L361 Putative CC-NBS-LRR resistance protein
Csa3M308200.1	A1YEB0 NBS1
Csa3M687220.1	Q6URA2 TIR-NBS-LRR type R protein 7
Csa3M695840.1	B9NAW5 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa3M710180.1	B9NCH8 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa3M814390.1	B9I533 Nbs-lrr resistance protein
Csa3M814400.1	B9IL69 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa3M815400.1	B9I533 Nbs-lrr resistance protein
Csa3M822460.1	C6FF78 NBS-LRR disease resistance protein
Csa3M824920.1	B3VTL6 TIR-NBS-LRR RCT1 resistance protein
Csa3M824940.1	B3VTL6 TIR-NBS-LRR RCT1 resistance protein
Csa4M015710.1	B9GZ62 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa4M015840.1	B9IP06 Nbs-lrr resistance protein
Csa4M015850.1	B9IP06 Nbs-lrr resistance protein

Csa4M016430.1	B9NBC0 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa4M638480.1	B9MVJ7 Nbs-lrr resistance protein
Csa5M152980.1	B9GWT3 Tir-nbs resistance protein
Csa5M165310.1	B9HYP1 NBS resistance protein
Csa5M165320.1	Q8LJ95 NBS-LRR resistance protein RGH1-like
Csa5M165820.1	B9GZV0 Nbs-lrr resistance protein
Csa5M266890.1	Q84XF9 NBS-LRR resistance protein RGH2
Csa5M484620.1	B9NFN7 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa5M495930.1	B9N9Q6 Tir-nbs-lrr resistance protein (Fragment)
Csa5M579560.1	C6FF80 NBS-LRR disease resistance protein
Csa5M647510.1	B9NDR6 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa5M647620.1	Q19PN4 TIR-NBS-LRR-TIR type disease resistance protein (Fragment)
Csa5M648130.1	B9NDR6 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa5M648640.1	B9GT00 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa5M648650.1	B9NDR6 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa6M375730.1	Q84XG0 NBS-LRR resistance protein RGH1
Csa6M490170.1	B9HE76 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa7M073380.1	C4TPD9 Putative uncharacterized protein NbSS52
Csa7M239020.1	B9H475 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa7M239020.2	B9H475 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa7M420890.1	B9HBI8 Nbs-lrr resistance protein
Csa7M425900.1	Q84XG0 NBS-LRR resistance protein RGH1
Csa7M425930.1	Q84XF9 NBS-LRR resistance protein RGH2
Csa7M425940.1	Q94J89 Putative NBS-LRR type resistance protein
Csa7M426510.1	Q84XG0 NBS-LRR resistance protein RGH1
Csa7M426520.1	Q2L359 Putative CC-NBS-LRR resistance protein
Csa7M426530.1	B9MYE0 Cc-nbs-lrr resistance protein

[0043] 오이 유전체에서 발견된 67 개의 NBS-LRR 유전자들의 염색체 상의 위치를 확인한 결과는 도 5에 나타났다. 상당히 특이한 점은 2번 염색체의 1-2 Mb 부근에 상당히 많은 숫자의 NBS-LRR이 뭉쳐져 있는 NBS-LRR 클러스터 (cluster)가 분포하는 것으로 밝혀졌다.

[0044] 결과적으로, 2번, 4번, 5번 염색체에 존재하는 NBS-LRR 타입의 유전자들이 노균병 저항성에 관여할 것이 클 것으로 판단된다. 38 개의 NBS-LRR 유전자가 염색체 2번, 4번, 5번에 위치하고 있고, 이들 유전자에 대해서 오이 노균병 저항성과 이병성 개체 서열을 비교 분석해본 결과 10개의 NBS-LRR 유전자가 노균병 이병성과 저항성 간에 서열 차이를 보였다(표 3).

표 3

[0045] 오이 2번, 5번 염색체 상의 다형성을 보이는 NBS 유전자 리스트

염색체	유전자	염색체 위치
2	Csa2M008000.1	1354160..1355840
2	Csa2M075330.1	1957620..1958660
2	Csa2M433370.1	22683340..22688680
2	Csa2M020940.1	2499980..2505240
2	Csa2M012670.1	2203360..2207200
5	Csa5M647510.1	27414850..27420430
5	Csa5M647580.1	27440540..27449720
5	Csa5M647620.1	27466480..27473250
5	Csa5M648130.1	27478160..27480930
5	Csa5M648650.1	27491800..27494660

[0046] 이들 이병성과 저항성 개체 간에 다형성을 보이는 NBS-LRR 서열을 증폭할 프라이머의 조합은 표 4와 같다.

표 4

[0047] 다형성을 보이는 NBS 유전자 증폭용 프라이머 리스트

유전자 ID	프라이머 명	염색체 번호	염색체 위치	프라이머 방향	프라이머 서열
Csa2M008000.1	Chr2_1354160_3_L	2	1354160..1355840	LEFT	TACGACTCCTGGTCGTGACA (서열번호 2)
	Chr2_1354160_3_R	2	1354160..1355840	RIGHT	GGAGATGGAAGTTGAAAGCA (서열번호 3)
Csa5M647580.1	Chr5_27440540_2_L	5	27440540..27449720	LEFT	GATGGTTGTCGATCAAGAGG (서열번호 4)
	Chr5_27440540_2_R	5	27440540..27449720	RIGHT	TGTCTATCTCAACAGTGGATTG (서열번호 5)
Csa5M648130.1	Chr5_27478160_2_L	5	27478160..27480930	LEFT	TCAAGTTTTGAGCAGCCATT (서열번호 6)
	Chr5_27478160_2_R	5	27478160..27480930	RIGHT	CCTGATTTTTAGGTGTGCCA (서열번호 7)
Csa2M075330.1	Chr2_1957620_1_L	2	1957620..1958660	LEFT	GCGGTACTCTCATTGACAT (서열번호 8)
	Chr2_1957620_1_R	2	1957620..1958660	RIGHT	ACGAGGACCGAATACACAGG (서열번호 9)
Csa2M012670.1	Chr2_2203360_1_R	2	2203360..2207200	LEFT	TGATTGCAGGATCACTTTCG (서열번호 10)
	Chr2_2203360_1_L	2	2203360..2207200	RIGHT	CCCGTGGACATCTCTACTTGA (서열번호 11)
Csa5M647620.1	Chr5_27466480_4_L	5	27466480..27473250	LEFT	CCTGATTTTTAGGTGTGCCA (서열번호 12)
	Chr5_27466480_4_R	5	27466480..27473250	RIGHT	TGAAATGACATTGGAGCTTGA (서열번호 13)
Csa5M648650.1	Chr5_27478160_4_L	5	27491800..27494660	LEFT	GCAAGAAATGGGTCGAAAGA (서열번호 14)
	Chr5_27478160_4_R	5	27491800..27494660	RIGHT	GGCAGAACTCCAACGATA (서열번호 15)
Csa5M647510.1	Chr5_27414850_1_L	5	27414850..27420430	LEFT	ACACCAAGCCTCCAACATTC (서열번호 16)
	Chr5_27414850_1_R	5	27414850..27420430	RIGHT	CGATCTTCTGCGTCCTGATT (서열번호 17)
Csa2M020940.1	Chr2_2499980_1_L	2	2499980..2505240	LEFT	GTGGATTGAGTGGCAAGGAT (서열번호 18)
	Chr2_2499980_1_R	2	2499980..2505240	RIGHT	AAATTTTAGCCACGGTAGATCA (서열번호 19)

[0048] 작성된 프라이머를 이용하여 오이 노균병 이병성 개체(S)와 저항성 개체(R)에서 분리된 DNA를 주형(template)으로 이용해서 PCR 반응을 실시하였다(도 6). 이렇게 증폭된 PCR 산물을 적절한 제한 효소를 처리하여 다형성을 검출하는 CAPS 마커로의 전환을 추진하였다. 이를 위해, 이들 유전자에 해당하는 노균병 저항성과 이병성 서열 간에 적용되는 제한 효소의 차이를 분석하였다. 이러한 제한효소 맵핑(restriction enzyme mapping)을 실시한 결과는 표 5 및 도 7에 나타났다.

표 5

[0049]

NBS-LRR 유전자의 CAPS 마커 전환을 위한 제한 효소

번호	유전자 이름	프라이머 조합	제한효소
1	Csa5M647510.1	Chr5_27414850_1_L / Chr5_27414850_1_R	AvAII
2	Csa5M647580.1	Chr5_27440540_2_L / Chr5_27440540_2_R	ApoI
3	Csa5M647620.1	Chr5_27466480_4_L / Chr5_27466480_4_R	MboI
4	Csa5M648130.1	Chr5_27478160_2_L / Chr5_27478160_2_R	MboI
5	Csa5M648650.1	Chr2_1354160_1_R / Chr2_1354160_1_R	MboI
6	Csa2M008000.1	Chr2_1354160_3_L / Chr2_1354160_3_R	Tsp45I
7	Csa2M075330.1	Chr2_1957620_1_L / Chr2_1957620_1_R	AvAII
8	Csa2M020940.1	Chr2_22683340_2_R / Chr2_2499980_1_R	XcmI
9	Csa2M012670.1	Chr2_2203360_1_R / Chr2_2203360_1_L	AvAII

[0050]

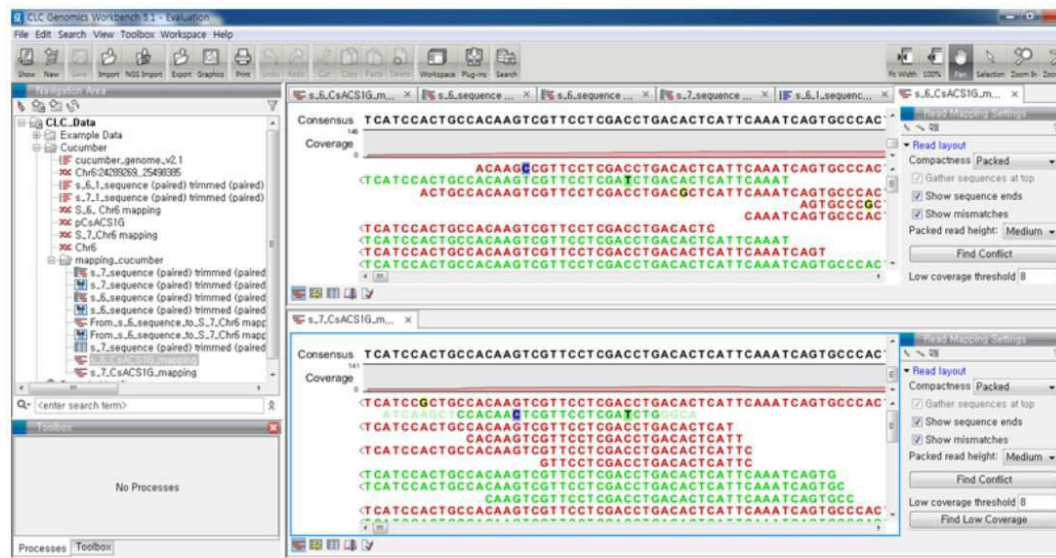
이렇게 변환된 CAPS 마커 중에서 오이 노균병 저항성과의 연관 정도를 확인하기 위해서, 오이 노균병 저항성 개체(10 개체)와 이병성 개체(8 개체)에서 DNA를 분리하였다. 이렇게 분리된 DNA를 주형(template)으로 하고, 적절한 프라이머 조합을 이용해서 PCR 반응을 실시한 후에 적절한 제한 효소를 처리하여 아가로스 겔에 전기영동하였다. 밴드 패턴에 의한 지노타입핑(genotyping) 분석을 한 후 이들의 실제 표현형(penotyping, 저항성, 이병성 여부)과 비교 분석하였다(도 8).

[0051]

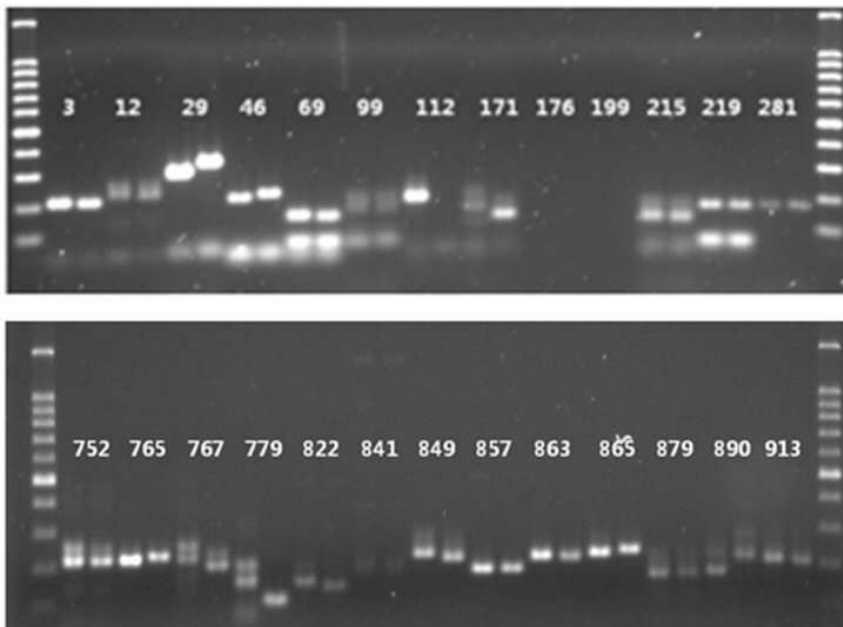
여러 가지 다양한 CAPS 마커 중에서도, 도 8에서 나타난 것처럼 Csa2M008000.1에서 유래한 CAPS 마커에서만 유전형(genotype)과 표현형(phenotype)이 상당히 일치한다는 결과를 보여주었다. 특히 CAPS마커 Csa2M008000.1은 저항성 개체에서는 표현형과 이병성이 몇몇 불일치하지만, 이병성 표현형을 보이는 개체에서는 유전형(genotype)과 일치하는 결과를 보였다. 즉, 조사한 이병성 8 개체에서는 모두 이병성 유래의 밴드만 발견되고 저항성 유래의 밴드패턴은 발견되지 않았다. 이 결과는 아래 두 가지 사실을 시사하고 있다. 첫째, 포장에서의 병 접종 없이도 상기의 CAPS 마커를 이용해서 이병성 개체를 선발해서 포장에서 제거할 가능성을 보여 주고 있다. 물론 약간의 저항성 개체가 없어질 가능성은 현재 상존하지만, Csa2M008000.1 이병성 allele에서 유래한 상기의 CAPS 마커를 가지고 포장에서 이병성 개체 제거용 마커로 활용할 여지는 충분한 것으로 판단된다. 두 번째는 Csa2M008000.1 유전자에서 유래한 저항성 allele이 노균병 저항성을 single gene 유전양식처럼 100% 유도하지 않지만, 저항성의 상당 부분을 책임지는 것으로 판단된다. 따라서 상기의 CAPS 마커를 통해서 야생자원이거나 육종계통에 존재하는 Csa2M008000.1 유래 저항성 allele의 육종 계통에의 도입에 의한 저항성 품종 육성이 가능할 것으로 판단된다.

도면

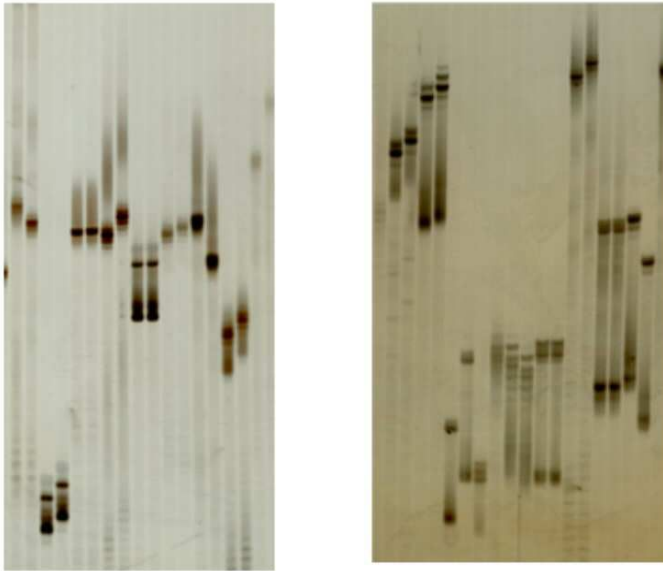
도면1



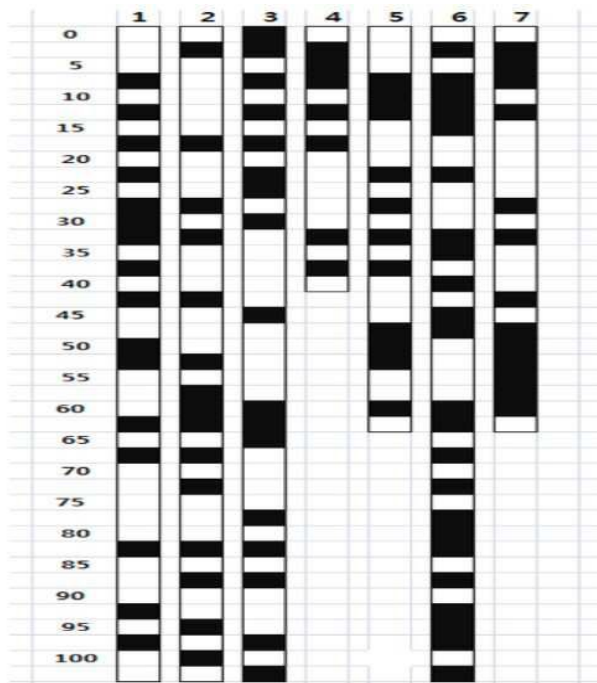
도면2



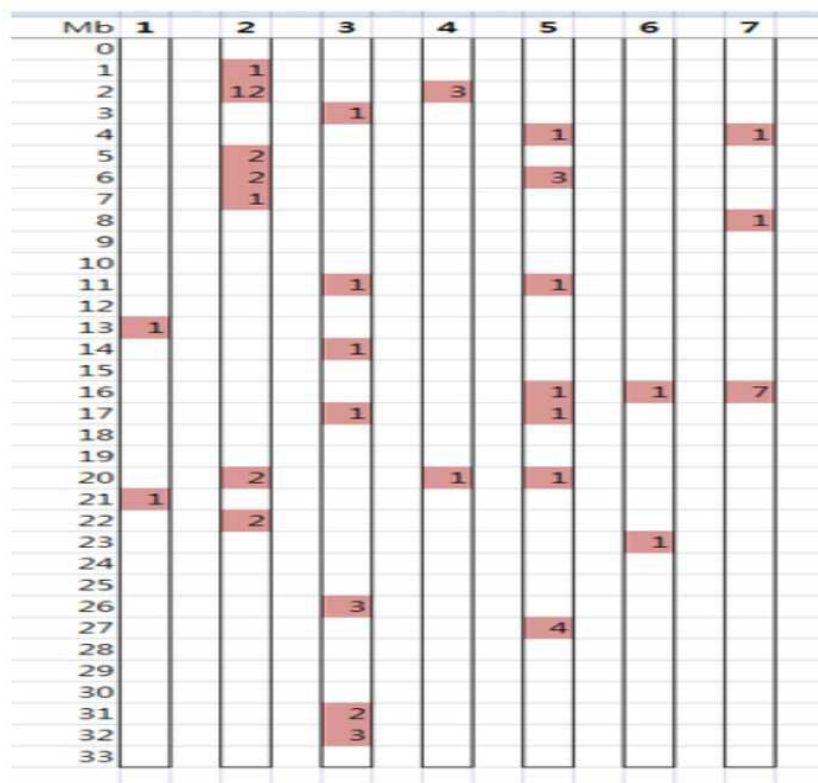
도면3



도면4



도면5



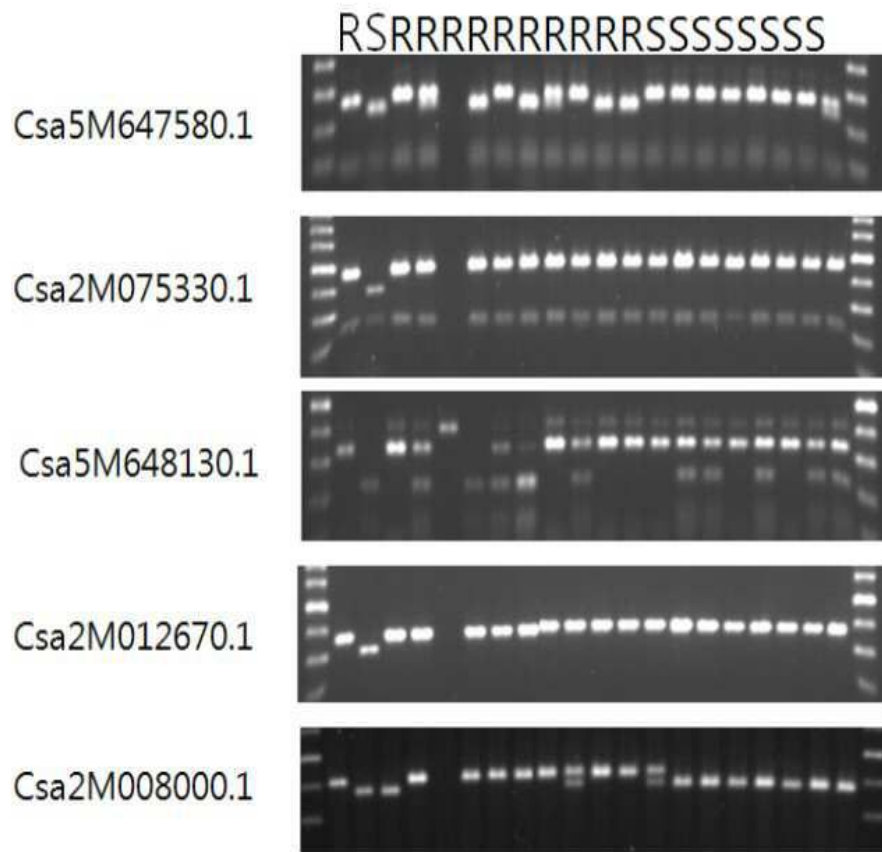
도면6



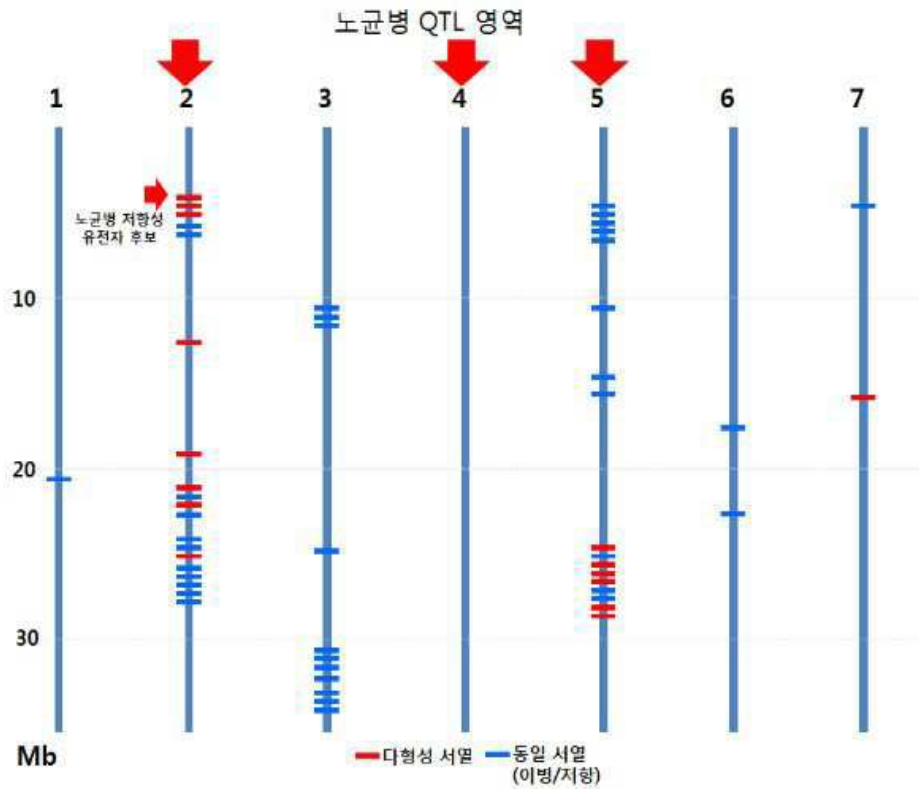
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110>	Industry-Academia Cooperation Group Of Sejong University	
<120>	Molecular marker for selecting cucumber downy mildew disease resistant variety and selection method using the same marker	
<130>	DP-2012-0812	
<160>	19	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	431	
<212>	DNA	
<213>	Cucumis sativus	
<400>	1	
	ggagatggaa gttgaaagca tagttcaaga tgtgaytgag gctagtcaac aacaactcaa	60
	ttctatitita cccgtttatg gaacgggtgg atcaggaaaa accacttttg cccagttggt	120
	gtttaatgac gagaggattg gaaaacaatt tcatacact gtttgggtat gtgtgtctca	180
	acctttgtc atcaacgaga tcttgagtc aatcttgaaa aaggtaagca aaagcaayga	240
	taatcgtagc aaggatgata aggacacctt aattcgcaat cttaaagaag tgatgggtgg	300

aaaaagatat ttctttgtgc ttgacaatgt ttggaatgaa aacaaaatrt tmtgggagaa 360
gttgaaggaa tgcttaatga gtattgttga agaattagga agcagtgtcc ttgtcacgac 420
caggagtcgt a 431

<210> 2
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Csa2M008000.1 LEFT primer

<400> 2

tacgactcct ggtcgtgaca 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Csa2M008000.1 RIGHT primer

<400> 3

ggagatggaa gttgaaagca 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Csa5M647580.1 LEFT primer

<400> 4

gatggttgtc gatcaagagg 20

<210> 5
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Csa5M647580.1 RIGHT primer

<400> 5

tgtctatcct caacagtgga ttg 24

<210> 6
<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Csa5M648130.1 LEFT primer
 <400> 6
 tcaagttttg agcagccatt 20
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Csa5M648130.1 RIGHT primer
 <400> 7
 cctgatTTTT caggtgttcc a 21
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Csa2M075330.1 LEFT primer
 <400> 8
 gcggctacct tcattgacat 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Csa2M075330.1 RIGHT primer
 <400> 9
 acgaggaccg aatacacagg 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Csa2M012670.1 LEFT primer
 <400> 10
 tgattgcagg atcactttcg 20

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Csa2M012670.1 RIGHT primer
 <400> 11
 cccgtggaca tctctacttg a 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Csa5M647620.1 LEFT primer
 <400> 12
 cctgatTTTT caggtgttcc a 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Csa5M647620.1 RIGHT primer
 <400> 13
 tgaaatgaca ttggagcttg a 21
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Csa5M648650.1 LEFT primer
 <400> 14
 gcaagaaatg ggtcgaaaga 20
 <
 210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Csa5M648650.1 RIGHT primer

<400>	15	
ggcagaaact ccaacggata		20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Csa5M647510.1 LEFT primer	
<400>	16	
acaccaagcc tccaacattc		20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Csa5M647510.1 RIGHT primer	
<400>	17	
cgatcttctg cgtcctgatt		20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Csa2M020940.1 LEFT primer	
<400>	18	
gtggattgag tggcaaggat		20
<210>	19	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Csa2M020940.1 RIGHT primer	
<400>	19	
aaattttagc cacggtagat ca		22