



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0105119
(43) 공개일자 2016년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2013.01)

C12Q 2600/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0028394

(22) 출원일자 2015년02월27일

심사청구일자 2015년02월27일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

오창식

경기도 수원시 영통구 매탄동 효원로 363 매탄위브하늘채아파트 123동 401호

김보영

인천광역시 남동구 논현동 한화에코메트로 3차 더타워 A동 2901호

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 SNP 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 잎곰팡이병(leaf mold) 저항성 토마토 판단용 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커, 상기 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 재제를 포함하는, 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 키트 및 (a) 개체로부터 분리된 시료의 DNA로부터 서열번호 1로 구성된

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2

```

C19-S.p1a      CTTCCGACTACGATCCCTTCATTTATCAGTGAATCCCGACGCTCAGGTTAGGTTTCCG 771
C19-S.hab      CTTCCGACTACGATCCCTTCATTTATCAGTGAATCCCGACGCTCAGGTTAGGTTTCCG 771
c19(갈수성)    CTTCCGACTACGATTTCTCGATTTATCATATAATCCCGACGCTCAGGTTAGGTTTCCG 708
C14-S.hab      CTTCCGACTACGATTTCTCGATTTATCATGGAATCCCGACGCTCAGGTTAGGTTTCCG 738
C14-S.chi      CTTCCGACTACGATTTCTCGATTTATCATGGAATCCCGACGCTCAGGTTAGGTTTCCG 738
C14-S.per      CTTCTGACTACGATTTCTCGATTTATCAGGGAATCCCGACGCTCAGGTTAGGTTTCCG 741
C14-S.par      CTTCTGACTACGATTTCTCGATTTATCAGGGAATCCCGACGCTCAGGTTAGGTTTCCG 741
C14-S.chm      CTTCCGACTACGATTTCTCGATTTATCAGGGAATCCCGACGCTCAGGTTAGGTTTCCG 741
C14-S.lyc      CTTCCGACTACGATTTCTCGATTTATCATATAATCCCGACGCTCAGGTTAGGTTTCCG 741

C19S.p1a      ACAACCAATGGATAGCGTGCACTCACTGAGGTTATACGTGCAATAGTGTGATATT 831
C19S.hab      ACAACCAATGGATAGCGTGCACTCACTGAGGTTATACGTGCAATAGTGTGATATT 831
c19(갈수성)    ACAACCAATGGATAGCGTGCACTCACTGAGGTTATACGTGCAATAGTGTGATATT 768
C14S.hab      ACAACCAATGGATAGCGTGCACTCACTGAGGTTATACGTGCAATAGTGTGATATT 798
C14S.chi      ACAACCAATGGATAGCGTGCACTCACTGAGGTTATACGTGCAATAGTGTGATATT 798
C14S.per      ACAACCAATGGATAGCGTGCACTCACTGAGGTTATACGTGCAATAGTGTGATATT 801
C14S.par      ACAACCAATGGATAGCGTGCACTCACTGAGGTTATACGTGCAATAGTGTGATATT 801
C14S.chm      ACAACCAATGGATAGCGTGCACTCACTGAGGTTATACGTGCAATAGTGTGATATT 801
C14S.lyc      ACAACCAATGGATAGCGTGCACTCACTGAGGTTATACGTGCAATAGTGTGATATT 801

C19S.p1a      GCTGATAGGATACCTGATCATTTAGGCACTCACTCACTCACTGAGTTGATGAGG 891
C19S.hab      GCTGATAGGATACCTGATCATTTAGGCACTCACTCACTCACTGAGTTGATGAGG 891
c19(갈수성)    GCTGATAGGATACCTGATCATTTAGGCACTCACTCACTCACTGAGTTGATGAGG 888
C14S.hab      GATGATAGGATACCTGATCATTTAGGCACTCACTCACTCACTGAGTTGATGAGG 888
C14S.chi      GCTGATAGGATACCTGATCATTTAGGCACTCACTCACTCACTGAGTTGATGAGG 888
C14S.per      GCTGATAGGATACCTGATCATTTAGGCACTCACTCACTCACTGAGTTGATGAGG 881
C14S.par      GCTGATAGGATACCTGATCATTTAGGCACTCACTCACTCACTGAGTTGATGAGG 881
C14S.chm      GCTGATAGGATACCTGATCATTTAGGCACTCACTCACTCACTGAGTTGATGAGG 881
C14S.lyc      GCTGATAGGATACCTGATCATTTAGGCACTCACTCACTCACTGAGTTGATGAGG 881

C19S.p1a      CGTTGTAACTCTGTGAGGCGCTATTCCTAAACCTCTATGGAACTCTGCAAGATAGTGT 951
C19S.hab      CGTTGTAACTCTGTGAGGCGCTATTCCTAAACCTCTATGGAACTCTGCAAGATAGTGT 951
c19(갈수성)    CGTTGTAACTCTGTGAGGCGCTATTCCTAAACCTCTATGGAACTCTGCAAGATAGTGT 888
C14S.hab      CGTTGTAACTCTGTGAGGCGCTATTCCTAAACCTCTATGGAACTCTGCAAGATAGTGT 918
C14S.chi      TATACCACTCTATCAGGCGCTATTCCTAAACCTCTATGGAACTCTGCAAGATAGTGT 918
C14S.per      TATACCACTCTATCAGGCGCTATTCCTAAACCTCTATGGAACTCTGCAAGATAGTGT 921
C14S.par      TATACCACTCTATCAGGCGCTATTCCTAAACCTCTATGGAACTCTGCAAGATAGTGT 921
C14S.chm      TATACCACTCTATCAGGCGCTATTCCTAAACCTCTATGGAACTCTGCAAGATAGTGT 921
C14S.lyc      TATACCACTCTATCAGGCGCTATTCCTAAACCTCTATGGAACTCTGCAAGATAGTGT 921

```

폴리뉴클레오티드의 SNP 마커 부위를 증폭시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 증폭된 SNP 마커 부위의 염기를 결정하는 단계를 포함하는, 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단 방법에 관한 것이다.

본 발명의 신규 SNP 마커 및 이를 이용한 HRM 분석 방법은 잎곰팡이병 저항성 토마토를 판단할 수 있는 수단으로 사용될 수 있으므로, 육안으로 구별되지 않는 잎곰팡이병 저항성 토마토를 객관적으로 평가할 수 있는 수단으로 사용되므로, 잎곰팡이병에 대한 저항성 토마토를 구별할 수 있으며, 품종개량 및 개량된 품종에 대한 저항성을 평가할 수 있을 것이다. 또한, 토마토 잎곰팡이병에 대한 Cf-9 저항성 품종과 감수성 품종을 구별할 수 있을 뿐만 아니라, Cf-9과 상당히 유사한 저항성 유전자인 Cf-4도 구별할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213003-04-1-SBG20

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 Golden seed Project_원예종자사업단

연구과제명 국내용 토마토 청고병/흰가루병 및 과색 관련 분자표지 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.07.25 ~ 2017.05.02

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 Cf-9 유전자의 806번째 염기가 C이며, 847번째 염기가 A이고, 상기 806번째 염기 및 847번째 염기를 포함하는 5 내지 300개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 잎곰팡이병(leaf mold) 저항성 토마토 판단용 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커.

청구항 2

제1항의 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 제제는 서열번호 2 및 3으로 구성된 폴리뉴클레오티드로 표시되는 프라이머인 것인 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항의 조성물을 포함하는 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 키트는 HRM 분석 키트인 것인 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 키트.

청구항 6

(a) 개체로부터 분리된 시료의 DNA로부터 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오티드의 SNP 마커 부위를 증폭시키는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 증폭된 SNP 마커 부위의 염기를 결정하는 단계를 포함하는, 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

서열번호 1의 폴리뉴클레오티드에서, 806 번째 염기의 대립유전자가 C이고, 847번째 염기의 대립유전자가 A인 경우, 잎곰팡이병 저항성이 일반 토마토보다 높은 것으로 판단하는 것인 방법.

발명의 설명

기술분야

- [0001] 본 발명은 잎곰팡이병(leaf mold) 저항성 토마토 판단용 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커, 상기 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 키트, 및 (a) 개체로부터 분리된 시료의 DNA로부터 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오티드의 SNP 마커 부위를 증폭시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 증폭된 SNP 마커 부위의 염기를 결정하는 단계를 포함하는, 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] *Cladosporium fulvum*은 토마토 잎곰팡이병을 일으키는 병원균으로, 주로 잎을 통해 감염하며 잎표면에 노란색 반점이 나타나는 병징을 보인다. 식물세포에 병원균이 증식을 하면서 잎의 기공이 병원균에 의해 막히게 되고, 결국에는 기공이 막혀 기능을 제대로 하지 못해 잎이 시들고 탈엽이 진행되면서 식물체가 죽게 된다.
- [0003] 잎곰팡이병을 방제하기 위한 다양한 방법이 시도되고 있으나, 잎곰팡이병 저항성 품종을 정확하게 판단할 수 있는 방법에 대해 개발되지 않고 있다. 다만, 일본특허공개번호 1999-504521호에는 식물 병원체 내성 유전자로 Cf-4 또는 Cf-9를 개시하고 있을 뿐이다.
- [0004] 또한, 토마토 야생종에서 잎곰팡이병에 대해 저항성을 보이는 종이 일부 알려져 있으며, 잎곰팡이병에 대한 저항성 유전자로는 Cf 유전자들이 있다. 그 중 Cf-9 저항성 유전자는 토마토 야생종인 *Solanum pimpinellifolium*에서 유래되었고, Cf-4는 또 다른 야생종인 *Solanum habrochaites*으로부터 유래되었다. Cf-9 저항성 유전자와 Cf-4 저항성 유전자는 상당히 비슷한 염기서열을 가지고 있어, 기존에 개발된 유전자 기반 마커로는 Cf-9과 Cf-4, 그리고 감수성 대립유전자 모두를 구별하기에는 한계가 있다. 이러한 기존 마커의 한계점과 저비용 고효율을 볼 수 있는 SNP마커 개발의 필요성이 대두되었다.
- [0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 잎곰팡이병에 저항성을 가지는 토마토를 판단할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 잎곰팡이병 저항성에 관여하는 Cf-9 유전자에 포함된 SNP를 이용할 경우, 유전적으로 결정되는 잎곰팡이병에 저항성을 가지는 토마토의 품종을 판단할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 하나의 목적은 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 SNP 마커를 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 SNP 마커 부위의 염기를 결정하는 단계를 포함하는, 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서, 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 단일염기다형성인 SNP(Single Nucleotide Polymorphism, 단일 염기 다형성) 마커를 제공한다.
- [0011]
- [0012] 본 발명에서는 Cf-9 저항성 유전자 특이적인 SNP 프라이머를 디자인하였으며, 41개의 토마토 F1 시판품종들을 이용하여, 고해상도 용해(high resolution melting, HRM) 분석을 위한 상기 SNP 프라이머를 이용하여 잎곰팡이병에 대한 Cf-9 저항성 품종과 감수성 품종을 구별하였을 뿐만 아니라 Cf-9과 상당히 유사한 Cf-4 저항성 유전자를 가진 품종도 구별할 수 있음을 확인하였다. 이를 통해, HRM 분석을 이용하여 Cf-9 특이적인 마커를 이용해

보다 빠르고 저비용으로 잎곰팡이병 저항성 품종을 판별해 낼 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

- [0013] 상기 마커는 바람직하게는 Cf-9 유전자의 SNP 부위를 포함하는 전체 또는 일부 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 보다 바람직하게는 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오티드의 전체 또는 일부 폴리뉴클레오티드일 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오티드인 Cf-9 유전자의 번역시작 위치에서 806번째 염기가 C이며, 847번째 염기가 A이고, 상기 806번째 염기 및 847번째 염기를 포함하는 5 내지 300개, 바람직하게는 80 내지 250개, 보다 바람직하게는 140 내지 190개, 가장 바람직하게는 166개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 잎곰팡이병(leaf mold) 저항성 토마토 판단용 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 용어 "Cf-9 유전자"란, *Cladosporium fulvum*에 저항성을 가지는 유전자 중에 하나로, 총 2,592개의 염기서열을 가지고 있다. 상기 Cf-9 유전자의 염기서열은 NCBI의 GeneBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있는데, 그 예로서, GenBank Accession No. U15936으로 표시되는 유전자가 될 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 용어 "SNP 마커"란, 개체 또는 종을 식별하기 위해 이용되는 DNA 서열 상의 단일 염기 다형성 대립인자 염기쌍을 의미한다. SNP는 비교적 그 빈도가 높고 안정하며 유전체 전체에 분포되어 있고 이에 의하여 개체의 유전적 다양성이 발생하므로, SNP 마커는 개체 간의 유전적 근접성을 알려주는 지표의 역할을 할 수 있다. SNP 마커는 일반적으로 단일 염기 다형성에 수반되는 표현형의 변화를 포함하지만 경우에 따라 그렇지 않을 수도 있다. 본 발명의 SNP 마커의 경우 아미노산 서열의 변이 또는 잎곰팡이병 저항성과 같은 개체의 표현형의 차이를 나타낼 수 있다.
- [0016] 본 발명의 용어 "다형성(polymorphism)"이란, 하나의 유전자 좌위(locus)에 두 가지 이상의 대립유전자(allele)가 존재하는 경우를 의미하며 다형성 부위 중에서, 개체에 따라 단일 염기만이 다른 것을 단일 염기 다형성이라 한다. 바람직한 다형성 마커는 선택된 집단에서 1% 이상, 더욱 바람직하게는 5% 또는 10% 이상의 발생빈도를 나타내는 두 가지 이상의 대립유전자를 가진다.
- [0017] 본 발명의 용어 "대립유전자(allele)"란, 상동염색체의 동일한 유전자좌위에 존재하는 한 유전자의 여러 타입을 의미한다. 대립유전자는 다형성을 나타내는데 사용되기도 하며, 예컨대, SNP는 두 종류의 대립인자(biallele)를 갖는다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 시판되고 있는 잎곰팡이병 저항성 및 감수성 품종을 대상으로 증폭된 Cf-9 유전자 부위의 염기서열 분석을 통해서, 잎곰팡이병에 대한 저항성 품종 그룹과 감수성 품종 그룹을 정확하게 구별할 수 있는 두 개의 SNP를 확인하였으며, Cf-9 유전자의 번역시작 위치에서 806번째 염기인 C가 감수성 품종의 경우에는 염기 A로, 847번째 염기인 A가 G로 바뀌어져 있음을 확인하였다(도 2). 또한, HRM 분석을 통해서 Cf-9 저항성 품종과 감수성 품종이 확연히 구별되는 것을 확인하였을 뿐만 아니라, Cf-9과 유전자 서열이 상당히 유사한 Cf-4 저항성 유전자를 가진 품종도 구별할 수 있음을 확인하였다(도 3).
- [0019] 따라서, 본 발명의 SNP 마커의 유전자형을 증폭하고 HRM 분석을 수행하여, 상기 SNP 마커의 유전자형을 판독하면, 잎곰팡이병 저항성 토마토를 판단할 수 있을 것으로 기대되며, 상기 SNP 마커는 본 발명자들에 의해 최초로 규명된 것이다.
- [0020] 본 발명은 다른 양태로서, 상기 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 용어 "SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제"란, 상기와 같은 유전자의 다형성 부위를 증폭을 통해 확인하여 잎곰팡이병 저항성 토마토를 판단할 수 있는 조성물을 의미하며, 바람직하게는 상기 SNP 마커의 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 의미한다.
- [0022] 상기 SNP 마커 증폭에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시

DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드가 될 수 있는데, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 상기 프라이머 서열은 상기 SNP 마커와 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 상기 SNP 마커와 혼성화 할 정도로 충분히 상보적이어야 하고, 바람직하게는 서열번호 2 및 3으로 구성된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0023] 본 발명의 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 이때, PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0024] 본 발명의 프라이머는 포스포로아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0025] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 조성물을 포함하는 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 키트를 제공하는 것이다. 상기 키트는 HRM 분석 키트일 수 있다.

[0026] 본 발명의 키트는 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 마커인 SNP 마커의 유전자형을 증폭하여 판독하거나 PCR 해리곡선에서 작은 차이를 감지함으로써 잎곰팡이병 저항성 토마토를 판단할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 제공하는 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단용 키트는 HRM 분석을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 HRM 분석 키트일 수 있다. 상기 "고해상도 용해(high resolution melting, HRM) 분석" 기술은 핵산 서열에서의 변이를 확인하기 위해 사용된 상대적으로 새로운 포스트 PCR 분석 방법으로, 이 방법은 PCR 해리곡선에서 작은 차이를 감지하는 것을 기초로 한다. 이것은 PCR 기기와 연결되어 사용된 염료를 갖는 보다 개선된 이중가닥 DNA(dsDNA)에 의해 가능하게 된다. dsDNA의 온도에 따른 해리 정도의 차이를 HRM 분석을 위해, 특이적으로 고안된 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고 처리할 수 있다. 본 발명에서는 잎곰팡이병 저항성 토마토를 선별하기 위해서 HRM 분석을 사용하였다.

[0027] 상기 HRM 분석 키트는 상기 SNP 마커를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 대해 특이적인 한 쌍의 프라이머, DNA 중합효소, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), RNAase, DEPC-수(DEPC-water), 테스트 튜브 및 적절한 컨테이너 등을 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명은 또 다른 양태로서, (a) 개체로부터 분리된 시료의 DNA로부터 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오타이드의 SNP 마커 부위를 증폭시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 증폭된 SNP 마커 부위의 염기를 결정하는 단계를 포함하는, 잎곰팡이병 저항성 토마토 판단 방법을 제공하는 것이다. 이때, 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오타이드인 Cf-9 유전자의 806번째 염기의 대립유전자가 C이고, 847번째 염기의 대립유전자가 A인 경우, 잎곰팡이병 저항성이 일반 토마토보다 높은 것으로 판단할 수 있다.

[0029] 본 발명의 용어 "개체"란, 잎곰팡이병 저항성을 확인하고자 하는 대상인 토마토를 의미하며, 상기 토마토로부터 얻어진 검체를 이용하여, 상기 SNP 마커의 유전자형을 분석함으로써 상기 잎곰팡이병 저항성이 있는 토마토를 판단할 수 있다. 상기 검체로는 잎, 뿌리, 줄기, 꽃, 열매, 분리된 조직, 또는 분리된 세포와 같은 시료 등이 될 수 있으나, 이에 특별히 제한되지는 않는다.

[0030] 상기 (a) 단계의 DNA 시료로부터 폴리뉴클레오타이드를 증폭하는 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 예를 들면, 표적 핵산을 PCR을 통하여 증폭하고 이를 정제하여 얻을 수 있다. 그 외 리가제 연쇄 반응(LCR)(Wu 및 Wallace, Genomics 4, 560(1989), Landegren 등, Science 241, 1077(1988)), 전사증폭

(transcription amplification)(Kwoh 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173(1989)) 및 자가유지 서열 복제 (Guatelli 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874(1990)) 및 핵산에 근거한 서열 증폭(NASBA)이 사용될 수 있다.

[0031] 상기 방법 중 (b)단계의 증폭된 SNP 마커 부위의 염기를 결정하는 방법은 시퀀싱 분석, 마이크로어레이 (microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적인 PCR(allele specific PCR), 다이내믹 대립유전자 혼성화 기법(dynamic allele-specific hybridization, DASH), PCR 연장 분석, PCR-SSCP, PCR-RFLP 분석, HRM 분석 또는 TaqMan 기법, SNPlex 플랫폼(Applied Biosystems), 질량 분석법(예를 들면, Sequenom의 MassARRAY 시스템), 미니-시퀀싱(mini-sequencing) 방법, Bio-Plex 시스템(BioRad), CEQ and SNPstream 시스템(Beckman), Molecular Inversion Probe 어레이 기술(예를 들면, Affymetrix GeneChip), 및 BeadArray Technologies(예를 들면, Illumina GoldenGate 및 Infinium 분석법) 등을 이용하여 수행될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 상기 방법들 또는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 이용 가능한 다른 방법에 의해, 상기 SNP 마커에서의 하나 이상의 대립유전자를 확인할 수 있다.

[0032] "HRM 분석" 기술은 앞서 설명한 바와 같다.

[0033] 상기 시퀀싱 분석은 염기서열 결정을 위한 통상적인 방법을 사용할 수 있으며, 자동화된 유전자분석기를 이용하여 수행될 수 있다. 또한, 대립유전자 특이적 PCR은 변이 부위가 위치하는 염기를 3' 말단으로 하여 고안한 프라이머를 포함한 프라이머 세트로 상기 변이가 위치하는 DNA 단편을 증폭하는 PCR 방법을 의미한다. 상기 방법의 원리는, 예를 들어, 특정 염기가 A에서 G로 치환된 경우, 상기 A를 3' 말단염기로 포함하는 프라이머 및 적당한 크기의 DNA 단편을 증폭할 수 있는 반대 방향 프라이머를 고안하여 PCR 반응을 수행할 경우, 상기 변이 위치의 염기가 A인 경우에는 증폭반응이 정상적으로 수행되어 원하는 위치의 밴드가 관찰되고, 상기 염기가 G로 치환된 경우에는 프라이머는 주형 DNA에 상보결합할 수 있으나, 3' 말단 쪽이 상보결합을 하지 못함으로써 증폭 반응이 제대로 수행되지 않는 점을 이용한 것이다. DASH는 통상적인 방법으로 수행될 수 있고, 바람직하게는 프린스 등에 의한 방법에 의하여 수행될 수 있다.

[0034] 상기 TaqMan 방법은 (1) 원하는 DNA 단편을 증폭할 수 있도록 프라이머 및 TaqMan 탐침을 설계 및 제작하는 단계; (2) 서로 다른 대립유전자의 탐침을 FAM 염료 및 VIC 염료로 표지(Applied Biosystems)하는 단계; (3) 상기 DNA를 주형으로 하고, 상기의 프라이머 및 탐침을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; (4) 상기의 PCR 반응이 완성된 후, TaqMan 분석 플레이트를 핵산 분석기로 분석 및 확인하는 단계; 및 (5) 상기 분석결과로부터 단계 (1)의 폴리뉴클레오티드의 유전자형을 결정하는 단계를 포함한다.

[0035] 한편, PCR 연장 분석은 먼저 단일염기 다형성이 위치하는 염기를 포함하는 DNA 단편을 프라이머 쌍으로 증폭한 다음, 반응에 첨가된 모든 뉴클레오티드를 탈인산화시킴으로써 불활성화시키고, 여기에 특이적 연장 프라이머, dNTP 혼합물, 디디옥시뉴클레오티드, 반응 완충액 및 DNA 중합효소를 첨가하여 프라이머 연장반응을 수행함으로써 이루어진다. 이때, 연장 프라이머는 변이 부위가 위치하는 염기의 5' 방향의 바로 인접한 염기를 3' 말단으로 삼으며, dNTP 혼합물에는 디디옥시뉴클레오티드와 동일한 염기를 갖는 핵산이 제외되고, 상기 디디옥시뉴클레오티드는 변이를 나타내는 염기 종류 중 하나에서 선택된다. 예를 들어, A에서 G로의 치환이 있는 경우, dGTP, dCTP 및 TTP 혼합물과 ddATP를 반응에 첨가할 경우, 상기 치환이 일어난 염기에서 프라이머는 DNA 중합효소에 의하여 연장되고, 몇 염기가 지난 후 A 염기가 최초로 나타나는 위치에서 ddATP에 의하여 프라이머 연장반응이 종결된다. 만일 상기 치환이 일어나지 않았다면, 그 위치에서 연장반응이 종결되므로, 상기 연장된 프라이머의 길이를 비교함으로써 변이를 나타내는 염기 종류를 판별할 수 있게 된다.

[0036] 이때, 검출방법으로는 연장 프라이머 또는 디디옥시뉴클레오티드를 형광 표지한 경우에는 일반적인 염기서열 결정에 사용되는 유전자 분석기(예를 들어, ABI사의 Model 3700 등)를 사용하여 형광을 검출함으로써 상기 변이를 검출할 수 있으며, 무-표지된 연장 프라이머 및 디디옥시뉴클레오티드를 사용할 경우에는 MALDI-TOF(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) 기법을 이용하여 분자량을 측정함으로써 상기 변이를 검출할 수 있다.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 신규 SNP 마커 및 이를 이용한 HRM 분석 방법은 잎곰팡이병 저항성 토마토를 판단할 수 있는 수단으

로 사용될 수 있으므로, 육안으로 구별되지 않는 잎곰팡이병 저항성 토마토를 객관적으로 평가할 수 있는 수단으로 사용되므로, 잎곰팡이병에 대한 저항성 토마토를 구별할 수 있으며, 품종개량 및 개량된 품종에 대한 저항성을 평가할 수 있을 것이다.

[0038] 또한, 토마토 잎곰팡이병에 대한 Cf-9 저항성 품종과 감수성 품종을 구별할 수 있을 뿐만 아니라, Cf-9과 상당히 유사한 저항성 유전자인 Cf-4도 구별할 수 있음을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 Cf-9 유전자의 도메인 위치, Cf-9 특이적인 두 개의 SNP위치와 함께 서열번호 2 및 3의 염기서열로 구성된 프라이머 세트들이 PCR 산물이 증폭될 때 붙는 위치를 나타낸 도이다.

도 2는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 염기서열 정보를 이용해 Cf-9 저항성 유전자를 가진 *S. pimpinellifolium*(S.pim), *S. habrochaites*(S.hab)와 Cf-4 저항성 유전자를 가진 *S. lycopersicum*(S.lyc)과 *S. habrochaites*(S.hab), *S. peruvianum*(S.per), *S. parviflorum*(S.par), *S. chmielewskii*(S.chm), *S. chilense*(S.chi) 야생종들 그리고 감수성 품종 유전자 cf-9의 염기서열의 나열을 나타낸 도이다. 한 줄로 밑줄 친 두 개의 염기들은 Cf-9 저항성 유전자만 혹은 cf-9 감수성 대립유전자와 Cf-4 저항성 유전자들만이 가지는 단일염기 다형성 위치 표시를 나타낸 것이다. 두 줄로 밑줄 친 부분은 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머가 결합하는 위치를 나타낸 것이다.

도 3은 서열번호 2 및 3의 염기서열로 구성된 프라이머 세트를 이용하여 토마토 잎곰팡이병 저항성인 Cf-9과 Cf-4 그리고 감수성 유전자형 Cf-9을 HRM 방법을 이용하여 분석 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 실시예 1: Cf-9 저항성 유전자형 특이적인 SNP 분석

[0042] NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 염기서열 정보를 이용해 Cf-9 저항성 유전자를 가진 *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites*와 Cf-4 저항성 유전자를 가진 *S. lycopersicum*과 *S. habrochaites*, *S. peruvianum*, *S. parviflorum*, *S. chmielewskii*, *S. chilense* 야생종들 그리고 감수성 품종 유전자 cf-9의 염기서열을 ClustalW2 프로그램을 이용하여 염기서열들을 비교, 나열하였고, Cf-9 유전자형만 가지고 있는 특이적인 non-synonymous substitution SNP 2개를 발견하였다. 두 개의 SNP는 도 1에 표시된 것처럼 Cf-9 저항성 대립유전자의 번역시작 위치에서부터 806-bp위치와 847-bp위치에 있다. 806-bp 위치의 경우는 C가 A로 바뀐 것이고, 847-bp 위치의 경우는 A가 G로 바뀐 경우이다. 두 개의 SNP를 중심으로 HRM용 프라이머를 제작하였고, 프라이머 염기서열은 표 1에, 프라이머의 위치는 도 1과 도 2에 나타내었다.

표 1

서열번호	명칭	염기서열
서열번호 2	Cf9_2-SNP_F	AATCCCCAGCTCACGGTTAGG
서열번호 3	Cf9_2-SNP-R	GCCCTGACAGATTACAACGA

[0044] 실시예 2: 잎곰팡이병에 Cf-9 유전자를 가진 저항성 품종과 감수성 품종 토마토의 전체 DNA 추출

[0045] 토마토 F1 시판 품종을 온실에서 파종 후 4주 정도 성장한 어린잎을 채취 후 순간 냉각하여 CTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide) 방법으로 DNA를 추출하였다. 분석에 사용된 토마토 F1 시판 품종은 표 2에 나타내었다. 보다 구체적으로, 순간 냉각한 어린 토마토 잎을 분쇄하고, 식물조직에 녹기 전에 CTAB buffer를 300μl 넣어 보텍스(vortex)를 이용해 분쇄된 조직과 잘 섞이도록 하였다. 그 후 수조에서 65℃로 30분 처리하였다. 여

기에 Chloroform 150 μ l 첨가하고 잘 섞었다. 13,000rpm, 4 $^{\circ}$ C 조건으로 1분간 원심분리하고, 상층액에 100% isopropanol 200 μ l 첨가하고 잘 섞었다. 13,000rpm 4 $^{\circ}$ C 조건으로 1분간 원심분리 후, DNA pellet에 상온 보관한 70% 에탄올 700 μ l를 첨가하고 잘 섞었다. 13,000rpm, 4 $^{\circ}$ C 조건으로 1분간 원심분리하고, 70% 에탄올을 제거한 후, 건조시켰다. 멸균수 100 μ l를 넣고, 수조에서 42 $^{\circ}$ C, 3분간 처리하였다. 이렇게 추출한 DNA를 나노드롭을 이용하여 농도를 측정하고, 최종농도를 10ng/ μ l로 희석하였다.

표 2

번호	품종명	종자회사	번호	품종명	종자회사
1	TY센스Q	농우종묘	21	티아라	농우종묘
2	미니마루		22	테이로스	신젠타 코리아
3	레드광		23	랩소디	
4	티티찰		24	마미리오	
5	큐피랑		25	메디슨	
6	미니찰		26	TP-7플러스	
7	골드미니찰		27	리코핀9	
8	TY알토랑		28	대프니스	
9	핑크탑		29	듀네	
10	베타티니		30	가야찰플러스	
11	프라임알렉산더		31	미니흑수	아시아 종묘
12	알렉산더디럭스		32	캐딜락	
13	TY티니		33	신희수	
14	13T510		34	TY250	
15	10T329		35	도태랑TY위너	다끼이코리아
16	Savera		36	오오야마	사카타코리아
17	Cerato		37	Hawaii7996	
18	Omnia		38	Hawaii7998	
19	Ajitesh		39	Moneymaker	
20	10T346		40	M82	

실시예 3: SNP 프라이머 세트를 이용한 HRM(High Resolution Melting) 분석

HRM 분석을 하기 위해 표 1에 제시한 Cf9_2-SNP_F/R(서열번호 2 및 3) 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 반응은 총량 20 μ l으로 멸균수 2 μ l, 2X Real-Time PCR Smart Mix 10 μ l, 프라이머(10pmole/ μ l) 2 μ l, DNA(10ng/ μ l) 5 μ l, 에바그린 염색제(Evagreen dye) 1 μ l 구성으로 PCR을 시행하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C 15분 처리 후 95 $^{\circ}$ C 20초, 55 $^{\circ}$ C 40초 72 $^{\circ}$ C 30초를 40번 반복하였다. PCR 증폭 후에 65 $^{\circ}$ C에서 95 $^{\circ}$ C로 0.2 $^{\circ}$ C씩 온도가 증가하면서 해리속도(Melting rate)에 의해 샘플의 형광 정도를 측정하였다. 이에 대한 결과는 도 3에 나타내었다.

HRM 분석은 특정 염기서열에 SNP가 존재한다면, 그 부분을 증폭할 때 melting curve도 염기서열에 의한 물리화학적 성질 차이로 미묘한 변화가 발생하게 되는데, 형광을 검출하는 과정에서 염기서열 중, SNP에 해당하는 C가 존재하거나 또는 C 대신 A가 존재하는 경우, 그리고 또 다른 SNP에 해당하는 A가 존재하거나 또는 A 대신 G가 존재하는 경우 melting curve의 양상에 차이가 발생하는 것을 통해 저항성과 감수성을 구별하였다.

도 3은 본 실험에서 발견한 SNP를 기준으로 HRM 확인용 SNP 마커를 제작하여 HRM 분석을 실시한 결과를 나타낸 것이다. 본 실험에 사용된 이미 알려진 저항성 품종과 감수성 품종을 대상으로, 이들 품종의 용해 곡선(melting curve)을 확인하였는데, 실험 결과 79~84 $^{\circ}$ C 사이에서 용해 곡선(Melting curve)이 세 개로 분리되는 것을 확인하였으며, 이미 알려진 Cf-9 저항성과 Cf-9 감수성 품종 그리고 Cf-4 저항성 품종들이 각각 해당하는 용해 곡선으로 분리됨을 확인하였다. 따라서, 도 3에 나타낸 바와 같이, 본 개발의 Cf-9_2-SNP_F/R(서열번호 2 및 3) 프라이머 세트를 이용하여 토마토 잎곰팡이병에 대한 Cf-9 저항성 품종과 감수성 품종을 확연히 구분이 가능함을 확인하였다. 뿐만 아니라, Cf-9과 상당히 유사한 저항성 유전자인 Cf-4도 구별할 수 있음을 확인하였다.

또한, 본 실시예에서 사용된 SNP마커의 효용성 검정을 위해 HRM분석으로 판별된 품종을 표3에 나타내었으며, Cf-9 저항성 품종은 R, Cf-9 감수성 품종은 S, Cf-4 저항성 품종은 S(Cf-4)로 나타내었다.

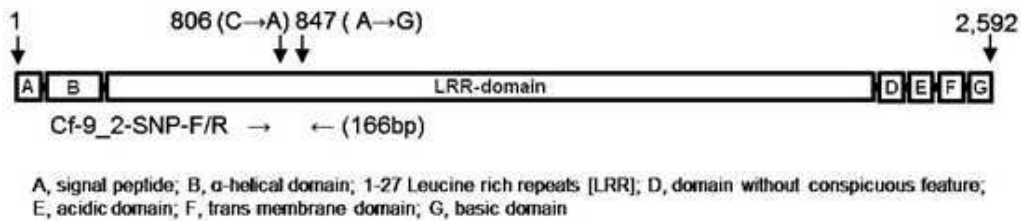
표 3

[0052]

번호	품종명	종자회사	SNP마커 검정결과	번호	품종명	종자회사	SNP마커 검정결과
1	TY센스Q	농우종묘	R	21	티아라	농우종묘	R
2	미니마루		R	22	데이로스	신젠타 코리아	R
3	레드광		R	23	랩소디		R
4	티티찰		R	24	마미리오		S
5	큐피랑		S(Cf-4)	25	메디슨		S
6	미니찰		R	26	TP-7플러스		S
7	골드미니찰		R	27	리코핀9		R
8	TY알토랑		R	28	대프니스		S
9	핑크탑		S(Cf-4)	29	듀네		S
10	베타티니		R	30	가야찰플러스		S
11	프라임알렉산더		R	31	미니흑수	아시아 종묘	S
12	알렉산더디럭스		R	32	캐딜락		S
13	TY티니		R	33	신흥수		S
14	13T510		R	34	TY250		S
15	10T329		R	35	도태랑TY위너	다끼이코리아	R
16	Savera		S	36	오오야마	사카타코리아	R
17	Cerato		S	37	Hawaii7996		S
18	Omnia		S	38	Hawaii7998		S
19	Ajitesh		S	39	Moneymaker		S
20	10T346		R	40	M82		S

도면

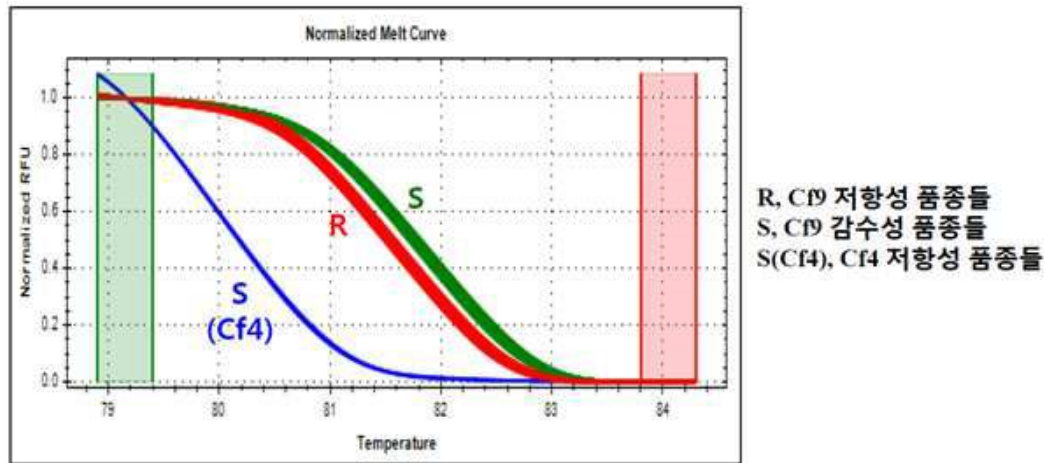
도면1



도면2

Cf9-S ₁ .pim	CTTTCCAACTTACAATCCCTTCATTTATCAGTCAATCCCAAGCTCAGGTTAGGTTCCC 771
Cf9-S ₁ .hab	CTTTCCAACTTACAATCCCTTCATTTATCAGTCAATCCCAAGCTCAGGTTAGGTTCCC 771
Cf9(감수성)	CTTTCCGACTTAGAATTTCTTCATTTATCATATAATCCCAAGCTCAGGTTAGGTTCCC 708
Cf4-S ₁ .hab	CTTTCCGACTTAGAATTTCTTCGATTTATCAAGCAATCCCAAGCTCAGGTTAGGTTCCC 738
Cf4-S ₁ .chi	CTTTCCGACTTAGAATTTCTTCGATTTATCAAGCAATCCCAAGCTCAGGTTAGGTTCCC 738
Cf4-S ₁ .per	CTTTCTGACTTAGAATTTCTTCGATTTATCAGGCAATCCCAAGCTCAGGTTAGGTTCCC 741
Cf4-S ₁ .par	CTTTCCGACTTAGAATTTCTTCGATTTATCAGGCAATCCCAAGCTCAGGTTAGGTTCCC 741
Cf4-S ₁ .chm	CTTTCCGACTTAGAATTTCTTCGATTTATCAGGCAATCCCAAGCTCAGGTTAGGTTCCC 741
Cf4-S ₁ .lyc	CTTTCCAACTTAGAATTGCTAGATTTATCATATAATCCCAAGCTCAGGTTAGGTTCCC 741
Cf9S ₁ .pim	ACAAACCAATGGAATAGCAGTGCATCACTCATGAAGTTATACGTGATAGTGTGAATATT 831
Cf9S ₁ .hab	ACAAACCAATGGAATAGCAGTGCATCACTCATGAAGTTATACGTGATAGTGTGAATATT 831
Cf9(감수성)	ACAAACCAATGGAATAGCAGTGCATCACTCATGAAGTTATATGTCCATAGTGTGAACATT 768
Cf4S ₁ .hab	ACAAACCAATGGAATAGCAGTGCATCACTCATGAAGTTATATCTCTATAATGTGAATATT 798
Cf4S ₁ .chi	ACAAACCAATGGAATAGCAGTGCATCACTCATGAAGTTATACGTGATAGTGTGAATATT 798
Cf4S ₁ .per	ACAAACCAATGGAATAGCAGTGCATTACTCATGAAGTTATACGTGATGGTGTGAATATT 801
Cf4S ₁ .par	ACAAACCAATGGAATAGCAGTGCATTACTCATGAAGTTATACGTGATGGTGTGAATATT 801
Cf4S ₁ .chm	ACAAACCAATGGAATAGCAGTGCATTACTCATGAAGTTATACGTGATGGTGTGAATATT 801
Cf4S ₁ .lyc	ACAAACCATATGGAATAGCAGTGCATCACTCGTGAAGTTATATCTCAGTCGTGTGAATATT 801
Cf9S ₁ .pim	GCTGATAGGATACCTGAATCATTTAGCCATCTAACTTCACCTTCATGAGTTGTACATGGG 891
Cf9S ₁ .hab	ACTGATAGGATACCTGAATCATTTAGCCATCTAACTTCACCTTCATGAGTTGTACATGGG 891
Cf9(감수성)	GCTGATAGGATACCTGAATCATTTAGCCATCTAACTTCACCTTCATGAGTTGTACATGGG 828
Cf4S ₁ .hab	GATGATAGGATACCTGAATCATTTAGCCATCTAACTTCACCTTCATGAGTTGTACATGAGT 858
Cf4S ₁ .chi	GCTGATAGGATACCTGAATCATTTAGCCATCTAACTTCACCTTCATGAGTTGTACATGGG 858
Cf4S ₁ .per	GCTGATAGGATACCTGAATCATTTAGCCATCTAACTTCACCTTCATGAGTTGTACATGGG 861
Cf4S ₁ .par	GCTGATAGGATACCTGAATCATTTAGCCATCTAACTTCACCTTCATGAGTTGTACATGGG 861
Cf4S ₁ .chm	GCTGATAGGATACCTGAATCAGTTAGCCATCTAACTTCACCTTCATGAGTTGTACATGGG 861
Cf4S ₁ .lyc	GCTGGTAATATACCTGAATTCATTTAGCTATCTAACTGCACCTTCATGAGTTGGACATGGT 861
Cf9S ₁ .pim	CGTTGTAATCTGTGAGGGCCTATTCTAAACCTCTATGGAATCTCACCAACATAGTGTT 951
Cf9S ₁ .hab	CGTTGTAATCTGTGAGGGCCCATTTCTAAACCTCTATGGAATCTCACCAACATAGTGTT 951
Cf9(감수성)	CGTTGTAATCTGTGAGGGCATAATTCTAAACCTCTATGGAATCTCACCAACATAGAGAGT 888
Cf4S ₁ .hab	CGTTCTAATCTGTGAGGGCCTATTCTAAACCTCTATGGAATCTCACCAACATAGTGTT 918
Cf4S ₁ .chi	TATACTAATCTATCAGGGCCTATTCTAAACCTTTATGGAATCTCACCAACATAGTGTT 918
Cf4S ₁ .per	TATACTAATCTATCAGGGCCTATTCTAAACCTCTATGGAATCTCACCAACATAGTGTT 921
Cf4S ₁ .par	TATACTAATCTATCAGGGCCTATTCTAAACCTCTATGGAATCTCACCAACATAGTGTT 921
Cf4S ₁ .chm	TATACTAATCTATCAGGGCCTATTCTAAACCTCTATGGAATCTCACCAAAATAGTGTT 921
Cf4S ₁ .lyc	TATACTAATCTATCAGGGCCTATTCTAAACCTTTATGGAATCTCACCAACATAGAGAGT 921

도면3



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> SNP marker for discriminating resistance to leaf mold and use thereof
- <130> KPA150118/KR
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 2592
- <212> DNA
- <213> Solanum pimpinellifolium
- <220><221> gene
- <222> (1)..(2592)
- <223> Cf-9
- <400> 1

```

atggattgtg taaaacttgt attccttatg ctatatacct ttctctgtca acttgcttta      60
tcctcatcct tgcctcattt gtgccccgaa gatcaagctc tttctcttct acaattcaag      120

aacatgttta ccattaatcc taatgcttct gattattggt acgacataag aacatacgta      180
gacattcagt catatccaag aactctttct tggaacaaaa gcacaagttg ctgctcatgg      240
gatggcgttc attgtgacga gacgacagga caagtgattg cgcttgacct ccgttgcagc      300
caacttcaag gcaagtttca ttccaatagt agcctctttc aactctcaa tctcaaaagg      360
cttgatttgt cttttaataa ttctactgga tcactcattt caccaaaatt tggtagattt      420
tcaaatttga cgcactcga tttgtcgcat tctagtttta caggtctaatt tccttctgaa      480
    
```

atctgtcacc ttcttaaact acacgttctt cgtatatgtg atcaatatgg gcttagtctt	540
gtaccttaca attttgaact gtcctttaag aacttgaccc aattaagaga gctcaacctt	600
gaatctgtaa acatctcttc cactattcct tcaaatttct cttctcattt aacaactcta	660
caactttcag gcacagagtt acatgggata ttgcccgaag gagtttttca cttttccaac	720
ttacaatccc ttcatatttc agtcaatccc cagctcacgg ttaggtttcc cacaacccaa	780
tggaatagca gtgcatcact catgacgtta tacgtcgata gtgtgaatat tgctgatagg	840
atacctaaat catttagcca tctaacttca ctcatgagt tgtacatggg tcgtttgaat	900
ctgtcagggc ctattcctaa acctctatgg aatctacca acatagtgtt ttgacacctt	960
ggtgataacc atcttgaagg accaatttcc catttcacga tatttgaaaa gctcaagagg	1020
ttatcacttg taaataacaa ctttgatggc ggacttgagt tcttaccctt taacacccaa	1080
cttgaacggc tagatttate atccaattcc ctaactggtc caattccatc caacataagc	1140
ggacttcaaa acctagaatg tctctacttg tcatcaaac acttgaatgg gagtatacct	1200
tcctggatat tctcccttcc ttactgggtt gagtttagact tgagcaataa cactttcagt	1260
ggaaaaatc aagatttcaa gtccaaaaca ttaagtgccg ttactctaaa acaaaataag	1320
ctgaaaggtc gtattccgaa ttactccta aaccagaaga acctacaatt acttctcctt	1380
tcacacaata atatcagtg acatatttct tcagctatct gcaatctgaa aacattgata	1440
ttgttagact tgggaagtaa taatttgag ggaacaatcc cacaatgcgt ggttgagagg	1500
aacgaatacc ttctgcattt ggatttgagc aaaaacagac ttagtgggac aatcaataca	1560
acttttagtg ttggaacat tttaagggtc attagcttgc acgggaataa gctaacgggg	1620
aaagtccac gatctatgat caattgcaag tatttgacac tacttgatct aggttaacaat	1680
atgttgaatg acacatttcc aaactgggtg ggatacctat ttcaattgaa gattttaagc	1740
ttgagatcaa ataagttgca tggteccatc aaatcttcag ggaatacaaa cttgtttatg	1800
ggtcttcaaa ttcttgatct atcatcta at ggatttagtg ggaatttacc cgaaagaatt	1860
ttggggaatt tgcaaacat gaaggaaatt gatgagagta caggattccc agagtatatt	1920
tcgatccat atgatattta ttacaattat ttgacgaca tttctacaaa gggacaagat	1980
tatgattctg ttcgaaattt ggattctaac atgattatca atctctcaa gaacagattt	2040
gaaggtcata ttccaagcat tattggagat ctgtgtggac ttctgtacgt gaacttgtct	2100
cacaatgtct tgggaaggta tataccggca tcatttcaaa atttatcagt actcgaatct	2160
ttggatctct catctaataa aatcagcgga gaaattccgc agcagcttgc atccctcaca	2220

ttccttgaag tcttaaactc ctctcacaat catcttggtg gatgcatccc caaaggaaaa	2280
caatttgatt cgctcgggaa cacttcgtac caagggaatg atgggttacg cggatttcca	2340
ctctcaaaac tttgtggtgg tgaagatcaa gtgacaactc cagctgagct agatcaagaa	2400
gaggaggaag aagattcacc aatgatcagt tggcaggggg ttctcgtggg ttacggttgt	2460
ggacttgta ttggactgtc cgtaataatac ataatgtggt caactcaata tccagcatgg	2520
ttttcgagga tggatttaaa gttggaacac ataattacta cgaaaatgaa aaagcacaag	2580
aaaagatatt ag	2592

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cf9_2-SNP_F

<400> 2

aatccccagc tcacggttag g	21
-------------------------	----

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cf9_2-SNP_R

<400> 3

gccctgacag attacaacga	20
-----------------------	----