

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2015-0120011 (43) 공개일자 2015년10월27일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)	(71) 출원인 세종대학교산학협력단 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)	
(21) 출원번호 10-2014-0045381		
(22) 출원일자 2014년04월16일	(72) 발명자	
심사청구일자 2014년04월16일	이상협 서울 강남구 삼성로 151, 11동 1001호 (대치동, 선경아파트)	
	박명호 경기 포천시 일동면 화동로599번길 43-14	
	(74) 대리인 특허법인태백	

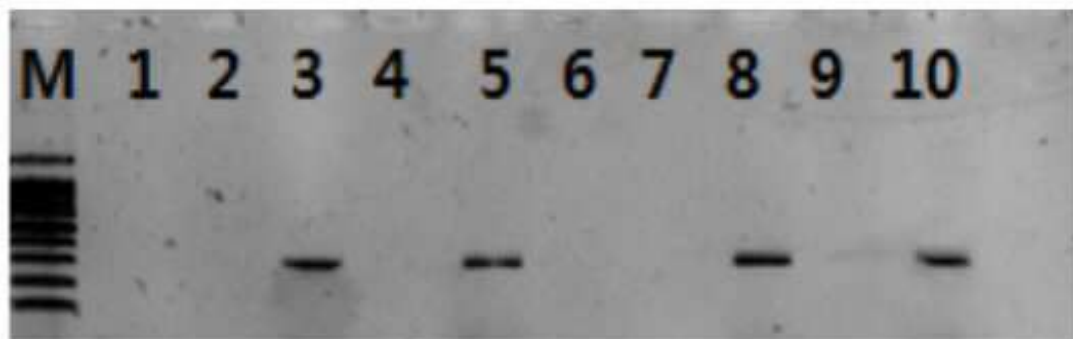
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **오이 노균병원체 검출용 단일염기다형성 마커 및 이를 이용한 오이 노균병원체 검출방법**

(57) 요약

본 발명은 오이 노균병원체 검출용 단일염기다형성(Single nucleotide polymorphism; SNP) 마커 및 이를 이용한 오이 노균병원체 검출방법에 관한 것으로서, 서열번호 1의 40번째 뉴클레오타이드, 88번째 뉴클레오타이드 및 151번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 오이 노균병원체 검출용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 슈도페로노스포라 쿠벤시스(Pseudoperonospora cubensis) 특이적 오이 노균병원체 검출방법 및 검출키트를 제공한다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545007038

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 생명산업기술개발

연구과제명 오이 노균병 마커 개발을 통한 노균병 저항성 품종 개발

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.23 ~ 2014.09.22

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 40번째 뉴클레오타이드, 88번째 뉴클레오타이드 및 151번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 오이 노균병원체 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 40번째 뉴클레오타이드의 대립유전자형은 A/G이고, 88번째 뉴클레오타이드의 대립유전자형은 A/G이며, 151번째 뉴클레오타이드의 대립유전자형은 T/C인 것을 특징으로 하는 오이 노균병원체 검출용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 오이 노균병원체는 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*Pseudoperonospora cubensis*)인 것을 특징으로 하는 오이 노균병원체 검출용 조성물.

청구항 4

시료로부터 DNA를 추출하는 단계;

상기 추출한 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 2 및 서열번호 4의 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 7의 프라이머 세트 및 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및

상기 PCR 증폭 산물을 검출하여 오이 노균병원체 감염 여부를 판단하는 단계를 포함하는 오이 노균병원체 검출 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 오이 노균병원체 검출 방법은 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*Pseudoperonospora cubensis*) 특이적인 것을 특징으로 하는 오이 노균병원체 검출방법.

청구항 6

서열번호 1의 40번째 뉴클레오타이드, 88번째 뉴클레오타이드 및 151번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 오이 노균병원체 검출키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 2 및 서열번호 4의 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 7의 프라이머 세트 및 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 오이 노균병원체 검출키트.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 오이 노균병원체는 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*Pseudoperonospora cubensis*)인 것을 특징으로 하는 오이 노균병원체 검출키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 오이 노균병원체 검출용 단일염기다형성(Single nucleotide polymorphism; SNP) 마커 및 이를 이용한 오이 노균병원체 검출방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 오이는 수천년 동안 재배되어 왔고, 전세계에서 재배되는 인기있는 식물 작물이다. 오이는 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 진균 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 영향받는다. 이 질병은 온실에서 성장한 식물, 및 노지에서 성장한 식물에서 발생한다. 노균병은 박과의 가장 중요한 잎 질병 중의 하나이고, 과실 수량 및 품질을 저하시킬 수 있고, 감수성 모종을 사멸시킬 수 있다. 초기에는 잎의 앞면에 퇴록된 부정형 반점이 생기고 엷은 황색을 띠며 잎 뒷면에는 수침상으로 나타난다. 아랫잎에서 먼저 발생되고 위로 번지는데 반점들이 합쳐지면 병반은 커지고 잎이 말라 죽는다.

[0004] 오이 노균병은 발병 후 방제가 어려운 단점이 있고, 일단 초기 방제에 실패하면 급속히 확산되어 막대한 피해를 발생시켜, 오이에 심각한 문제를 일으키는 질병이지만 마땅한 방제법이 없는 상태이고 초기 방제나 예방이 최선의 방법이다. 하지만 포자 상태로 바람에 날려 이동하므로 이들의 전파를 효율적으로 예측하거나 병발생 이전 단계에서 노균병의 감염 여부를 판별하는 방법이 없는 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 미국공개특허 2011-0126309A1(2011.05.26 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 단일염기다형성(SNP) 마커를 이용한 오이 노균병원체 검출용 조성물을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 오이 개체로부터 추출한 DNA로 PCR을 수행하고, PCR 증폭 산물을 검출하여 오이 노균병원체 감염 여부를 판단하는 오이 노균병원체 검출방법을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 오이 노균병원체 검출키트를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 서열번호 1의 40번째 뉴클레오티드, 88번째 뉴클레오티드 및 151번째 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 오이 노균병원체 검출용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 오이 개체로부터 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출한 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 2 및 서열번호 4의 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 7의 프라이머 세트 및 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 상기 PCR 증폭 산물을 검출하여 오이 노균병원체 감염 여부를 판단하는 단계를 포함하는 오이 노균병원체 검출방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 40번째 뉴클레오티드, 88번째 뉴클레오티드 및 151번째 뉴클레오티드로 이루어진

군에서 선택된 어느 하나 이상의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 오이 노균병원체 검출 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명은 오이 노균병원체 검출용 단일염기다형성(Single nucleotide polymorphism; SNP) 마커 및 이를 이용한 오이 노균병원체 검출 방법에 관한 것으로서, 정기적인 모니터링을 통한 오이 재배지 근처의 포충망에서 수집된 포자나 병징이 나타나지 않은 오이 잎에서 추출한 DNA에서 본 발명의 SNP 마커를 이용하여 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*) 존재 여부를 진단하여 노균병에 대한 피해를 최소화시킬 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1a는 베타-튜블린(beta-tubulin) 유전자에 있어서, 쿠벤시스(*P. cubensis*)와 휴물리(*P. humuli*)를 dendrogram 상에서 다른 그룹으로 그룹화(grouping)한 결과이다. CDM은 다양한 *P. cubensis* isolates이고, H로 시작되는 것은 *P. humuli* isolates이다.

도 1b는 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*)(첫 번째 및 두 번째 줄)와 슈도페로노스포라 휴물리(*P. humuli*)(세 번째 줄)의 서열 간 SNP를 나타낸다.

도 2는 PCR을 통한 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*) 및 슈도페로노스포라 휴물리(*P. humuli*) 특이적 검출 결과를 나타낸다. M: Molecular Marker, 1: 오이 식물체 DNA + (프라이머 A + B 조합), 2. 오이 식물체 DNA + (프라이머 D + E 조합), 3. *P. cubensis* DNA + (프라이머 A + C 조합), 4. *P. cubensis* DNA + (프라이머 B + C 조합), 5. *P. cubensis* DNA + (프라이머 D + F 조합), 6. *P. cubensis* DNA + (프라이머 E + F 조합), 7. *P. humuli* DNA + (프라이머 A + C 조합), 8. *P. humuli* DNA + (프라이머 B + C 조합), 9. *P. humuli* DNA + (프라이머 D + F 조합), 10. *P. humuli* DNA + (프라이머 E + F 조합)

도 3은 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*) 및 슈도페로노스포라 휴물리(*P. humuli*) 간의 SNP 서열을 Realtime PCR 기기를 활용하여 한 번의 PCR 반응을 통해서 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*)를 검출하는 방법을 나타낸다. 본 발명의 SNP 영역을 포함하여 제작된 프라이머 세트(서열번호 8 및 서열번호 9)를 이용한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명자들은 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*Pseudoperonospora cubensis*) 특이적인 염기서열을 확보하고, 이렇게 확보된 SNP 마커를 이용한 PCR 프라이머를 통해 슈도페로노스포라 쿠벤시스를 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

- [0015] 본 발명은 서열번호 1의 40번째 뉴클레오티드, 88번째 뉴클레오티드 및 151번째 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 오이 노균병원체 검출용 조성물을 제공한다.

- [0016] 상세하게는, 상기 서열번호 1의 40번째 뉴클레오티드의 대립유전자형은 A/G이고, 88번째 뉴클레오티드의 대립유전자형은 A/G이며, 151번째 뉴클레오티드의 대립유전자형은 T/C일 수 있다.

- [0017] 상기 서열번호 1은 다중염기기재 방식에 따라 작성하였으며, 서열번호 1의 40번째 및 88번째 뉴클레오티드는 A 또는 G일 수 있으므로 "r"라고 기재하고, 151번째 뉴클레오티드는 T 또는 C일 수 있으므로 "y"라고 기재하였다.

- [0018] 상세하게는, 상기 오이 노균병원체는 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*Pseudoperonospora cubensis*)일 수 있다.

- [0019] 본 발명의 다형성(polymorphism)은 단일 유전자 좌위에 두 가지 이상의 대립유전자가 존재하는 경우를 의미하며, '다형성부위(polymorphic site)'란 상기 대립유전자가 존재하는 유전자 좌위를 의미한다. 다형성 부위 중에서, 단일 염기만이 상이한 것을 '단일염기다형성', 즉 SNP(single nucleotide polymorphism)라고 한다.

- [0020] 본 발명은 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출한 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 2 및 서열번호 4의 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 7의 프라이머 세트 및 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 상기 PCR 증폭 산물을 검출하여 오이 노균병원체 감염 여부를 판단하는 단계를 포함하는 오이 노균병원체 검출방법을 제공한다.
- [0021] 상세하게는, 상기 오이 노균병원체 검출 방법은 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*Pseudoperonospora cubensis*) 특이적인 방법이다.
- [0022] 상기 시료로부터 DNA를 추출하는 단계에서, 시료는 오이 노균병원체의 감염이 의심되는 시료는 모두 포함될 수 있는데, 그 예로는 오이 재배지 근처의 포충망에서 수집된 포자나 병징이 나타나지 않은 오이 잎 등이다. 시료로부터 DNA를 추출하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 기술 또는 시판되고 있는 DNA 추출용 키트를 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명은 서열번호 1의 40번째 뉴클레오타이드, 88번째 뉴클레오타이드 및 151번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 오이 노균병원체 검출 키트를 제공한다. 상세하게는, 상기 오이 노균병원체는 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*Pseudoperonospora cubensis*)일 수 있다.
- [0024] 바람직하게는, 상기 프라이머는 서열번호 2 및 서열번호 4의 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 7의 프라이머 세트 및 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내
- [0026] 지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0027] 상기 "프라이머"란 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 올리고뉴클레오타이드를 말한다. 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. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화 할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.
- [0028] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0029] < 실시예 >
- [0030] 염기서열 분석 결과, 병원성인 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*Pseudoperonospora cubensis*)와 비병원성인 슈도페로노스포라 휴물리(*Pseudoperonospora humuli*)는 염기서열이 가장 유사하고 병원체 분류에 주로 사용하는 ITS-rRNA 서열은 100% 동일하므로 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*)를 특이적으로 증폭할 새로운 서열을 확보해야 한다. 그래서 NCBI에서 다양한 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*) 개체와 슈도페로노스포라 휴물리

리(*P. humuli*) 개체의 염기서열을 다운받아서 다형성을 보이는 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*) 특이적인 염기서열을 확보하는 작업을 진행하였다.

[0031]

그 결과, ITS-rRNA, rRNA, ITS, COXII 서열 등에서 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*) 개체 간에 차이가 나타나는 서열이 발견되었지만, 슈도페로노스포라 휴물리(*P. humuli*) 개체에서도 동일한 서열의 차이가 발견되었다. 그래서 상대적으로 다양한 종 간에서도 매우 잘 보존된(highly conserved) 서열을 지닌 유전자 서열을 다운받아서 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*) 개체와 슈도페로노스포라 휴물리(*P. humuli*) 개체와 비교하니 하나의 유전자(beta-tubulin)에서 쿠벤시스(*P. cubensis*)와 휴물리(*P. humuli*)를 dendrogram 상에서 다른 그룹으로 그룹화(grouping)할 수 있었고 (도 1a), 두 그룹의 서열 간에서 몇 군데의 SNP 차이를 발견할 수 있었다 (도 1b).

[0032]

이렇게 발견된 SNP 서열을 이용해서 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*)와 슈도페로노스포라 휴물리(*P. humuli*)를 특이적으로 증폭할 수 있는 대립유전자-특이 프라이머(allele-specific primer)를 디자인하였다. 표 1에 나타난 것처럼 종간에 나타난 SNP (* 표시된 부분) 서열을 3' 말단에 위치하게 프라이머를 하나 디자인하고, 나머지 하나는 두 종 간에 공통적으로 발견되는 서열로 프라이머를 디자인해서 PCR 증폭을 실시하면 종 특이적인 PCR 산물을 얻을 수 있다.

표 1

[0033]

유전자	프라이머 이름	프라이머 기호	염기서열
beta-tubulin	cubensis_A_R	A	CTCTACGACCGTGTCGTT* (서열번호 2)
	humuli_A_R	B	CTCTACGACCGTGTCGTC* (서열번호 3)
	coommon_A_F	C	CAGGGTTTCCAGATCACTCA (서열번호 4)
	cubensis_B_R	D	ACTGTAGAATAACACACAATTAGGA* (서열번호 5)
	humuli_B_R	E	ACTGTAGAATAACACACAATTAGGG* (서열번호 6)
	common_B_F	F	GATTGTACGATGTGCAGCTA (서열번호 7)

[0034]

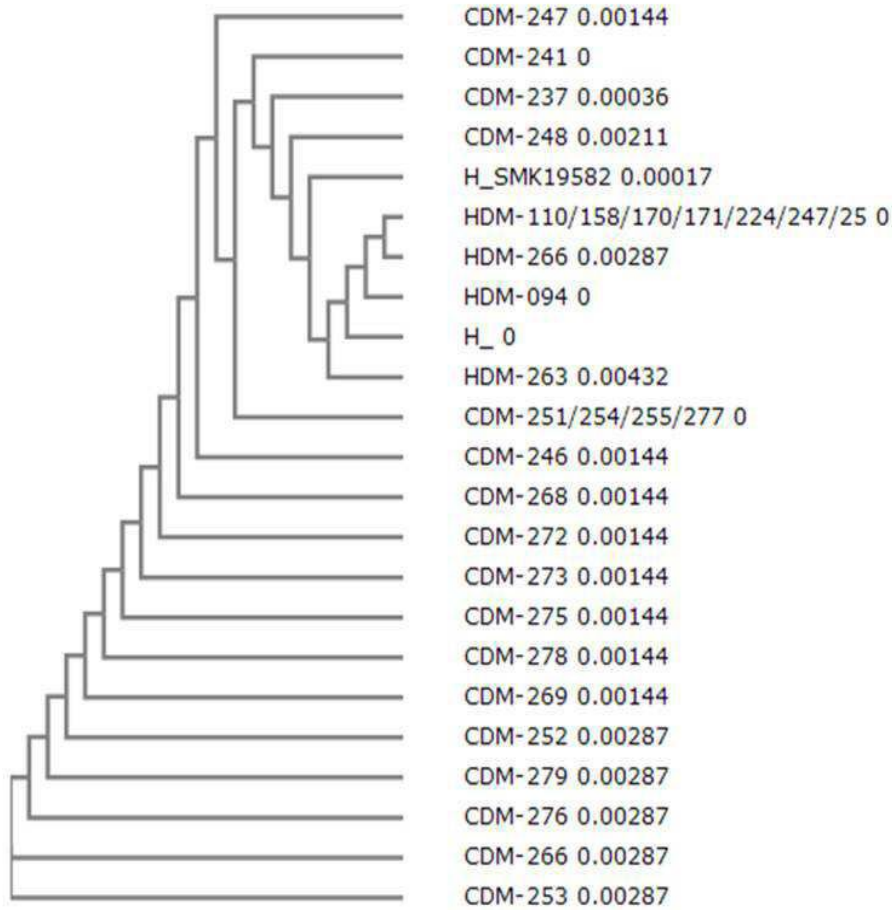
상기의 프라이머 조합을 이용하여 PCR 반응[96도 변성(denature), 55도 결합(annealing), 74도 신장(extension), 30회]을 실시한 결과, 도 2와 같이 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*)와 슈도페로노스포라 휴물리(*P. humuli*)를 특이적으로 검출할 수 있었다.

[0035]

한편, 상기의 프라이머를 이용한 방법으로 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*)를 검출하기에는 최소한 2가지 PCR 반응을 실시하여야 하는데, 이런 점을 개선하기 위하여 한 번의 PCR 반응으로 재현성 있게 검출이 가능한 프라이머 세트를 개발하였다. TubulinR2 프라이머(AGGCACATGACTTCATCGGC; 서열번호 8) 및 TubulinF2 프라이머(AGAGCCTACAACGCTACGT; 서열번호 9) 조합을 이용한 실시간 PCR(Real-time PCR) 방법을 통해 슈도페로노스포라 쿠벤시스(*P. cubensis*)를 검출할 수 있었다(도 3).

도면

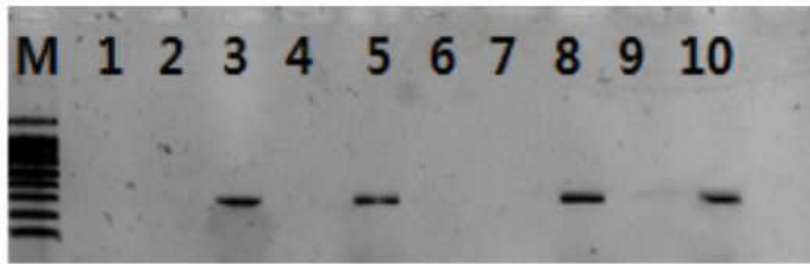
도면1a



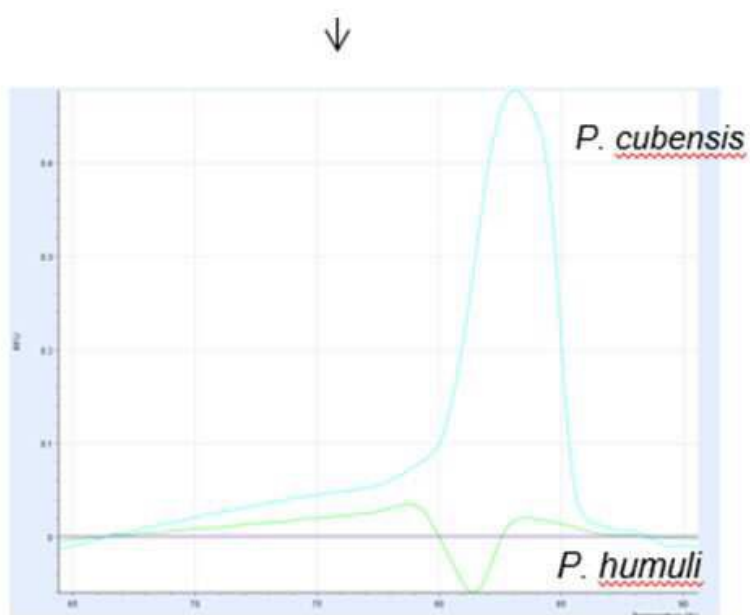
도면1b



도면2



도면3



서 열 목 록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIA COOPERATION GROUP OF SEJONG UNIVERSITY
- <120> Single nucleotide polymorphism marker for detecting
Pseudoperonospora cubensis and method for detecting
Pseudoperonospora cubensis using the same
- <130> ADP-2013-0527
- <160> 9
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 240
- <212> DNA
- <213> Pseudoperonospora cubensis
- <400> 1

cattatgtgc acgtactcgg tatgtccatc ccctaaggtr tcggacacgg tcgtagagcc 60
ctacaacgct acgttgtctg tgcaccarct tgtcgaaaat gccgatgaag tcatgtgcct 120

ggacaacgaa gccctgtacg acatttgctt ycgcacactt aagctcacga cccctacgta 180
cgggtgacttg aaccatttgg tgtgtgccgc catgtctggt atcaccactt gtctacgatt 240
240

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 2
ctctacgacc gtgtccgtt 19

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 3
ctctacgacc gtgtccgtc 19

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 4
cagggtttcc agatcactca 20

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 5
actgtagaat aacacacaat tagga 25

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 actgtagaat aacacacaat taggg 25
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 gattgtacga tgtgcagcta 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 aggcacatga cttcatcggc 20

 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 agagccctac aacgctacgt 20