(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0050244
(43) 공개일자 2018년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/00* (2017.01)
C12R 1/07 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01N 63/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0146434
(22) 출원일자 2017년11월06일
심사청구일자 2017년11월06일
(30) 우선권주장
1020160146806 2016년11월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
유용만
대전광역시 서구 둔산로 223, 5동 408호 (청솔아파트)
윤영남
대전광역시 서구 도안동로 77, 1810동 2605호 (도안 18단지 린풀하우스)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

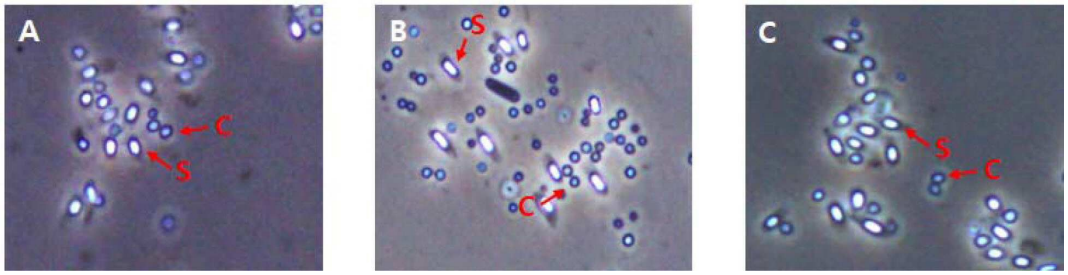
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주를 처리할 경우, 파리목 해충인 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*), 버섯파리(*Lycoriella ingenua*), 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*), 토고숲모기(*Aedes togoi*) 및 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*)에 대해 강력한 살충효과를 동시에 보이므로 이를 포함하는 본 발명의 조성물은 친환경적인 제제로서 작물에 미치는 영향을 최소화하고 작물에 발생하는 해충을 방제하는데 효과적이며, 속효성을 보임으로써 파리목 해충에 탁월한 살충효과를 얻을 수 있으므로, 무공해성 해충 방제용 제재의 개발 등에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12R 1/075 (2013.01)
(72) 발명자
김희지
대전광역시 서구 대덕대로 150, 116동 1508호
장현주
충청북도 청주시 흥덕구 직지대로751번길 9 (운천동)
이유경
경상북도 김천시 시청6길 27, 102동 601호 (신음동, 덕일아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

기탁번호가 KCTC13363BP이고, 파리 목 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주.

청구항 2

제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 파리 목 해충 살충용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 파리목 해충은 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*), 버섯파리(*Lycoriella ingenua*), 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*), 토고숲모기(*Aedes togoi*) 및 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항의 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주의 유효량을 식물, 토양 또는 파리 목 해충 서식지에 살포함으로써 파리 목 해충을 방제하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미생물 살충제로서 가장 많이 사용되는 바실러스 투린지엔시스의 주요 작용기작인 살충성 단백질은 비선택 유기체에 대하여 안전하기 때문에 친환경농업에서 주요 작물보호 농자재로 사용되며 전 세계 생물적 방제의 80~90%를 차지한다. 바실러스 투린지엔시스는 호기성 그람 양성의 간균으로 내생포자를 형성하며 내독소 단백질로 이루어진 살충성 결정체(crystal) 단백질을 생성한다. 내독소 단백질은 주로 cry와 cyt 독소로 구성되어 있다. Cry 단백질은 특히 나비목, 파리목 및 딱정벌레목 등의 곤충에 독성을 가지며(Bravo *et al.*, 2005 Elsevier BV, *Amsterdam* 175-806), 이외에도 벌목, 매미목, 메뚜기목, 응애, 선충, 원생동물에 대한 활성도 보고되고 있다(Schnepf et al. 1998 *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806).

[0003] 바실러스 투린지엔시스의 결정체 단백질은 곤충의 중장액과 반응하여 독성단백질로 분해되어 세포막에 작은 구멍을 형성해 패혈증을 일으켜 살충활성을 보이는 작용기작을 가지고 있다. 또한 바실러스 투린지엔시스의 독성이 활성을 갖기 위해서는 반드시 해충이 섭식해야하기 때문에 유충만을 죽이고 해충의 알, 번데기, 성충에는 영향을 줄 수 없는 단점이 있다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1649139호에서는 '살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566 균주 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제0420988호에서는 '파리유충 살충용 바실러스 츄린겐시스(*Bacillus thuringiensis*) 균제제의 제조방법'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이, '살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주 및 이의 용도'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 파리목 해충 방제를 목적으로 토양에서부터 바실러스 투린지엔시스를 분리동정하고 생물검정을 통하여 살충효과가 우수하게 나타나는 균주를 선발하였다. 본 발명에서 선발한 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주의 살충활성과 형태적 특

성 분석 등을 통해 특성을 알아본 결과, 기존에 알려진 바실러스 투린지엔시스보다 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*), 버섯파리(*Lycoriella ingenua*), 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*), 토고숲모기(*Aedes togoi*) 및 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*)의 해충에 대해 훨씬 방제 효과가 동시에 뛰어난 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 파리 목 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 파리 목 해충 살충용 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주의 유효량을 식물, 토양 또는 파리 목 해충 서식지에 살포함으로써 파리 목 해충을 방제하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주를 처리할 경우, 파리목 해충인 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*), 버섯파리(*Lycoriella ingenua*), 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*), 토고숲모기(*Aedes togoi*) 및 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*)에 대해 강력한 살충효과를 동시에 보이므로 이를 포함하는 본 발명의 조성물은 친환경적인 제제로서 작물에 미치는 영향을 최소화하고 작물에 발생하는 해충을 방제하는데 효과적이며, 속효성을 보임으로써 파리목 해충에 탁월한 살충효과를 얻을 수 있으므로, 무공해성 해충 방제용 제재의 개발 등에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명에서 분리한 바실러스 투린지엔시스 균주의 결정체의 위상차현미경(×1000) 사진이다. A, 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스(*B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*); B, 바실러스 투린지엔시스 아종 자포넨시스(*B. thuringiensis* subsp. *japonensis*); C, 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464.

도 2는 본 발명에서 분리한 바실러스 투린지엔시스 균주의 내독소단백질 특성을 비교하기 위한 SDS-PAGE이다. M; 광범위 크기 마커, 레인 1: 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스 프로톡신, 레인 2: 트립신으로 절단한 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스, 레인 3: 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 프로톡신, 레인 2 및 4: 트립신으로 절단한 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464.

도 3은 본 발명에서 분리한 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주의 cry 유전자를 확인하기 위한 PCR 결과이다. M: 100bp 레더 마커, 레인 1: cry4Aa, 레인 2: cry4Ba, 레인 3: cry10Aa, 레인 4: cry11Aa, 레인 5: cyt1Aa, 레인 6: cyt2Aa, 레인 7: cyt2Ba.

도 4는 본 발명에서 분리한 바실러스 투린지엔시스 균주의 플라스미드 DNA를 확인하기 위한 전기영동이다. M: Lamda Hind 마커, 레인 1: 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스, 레인 4: 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464, 레인 2, 5: EcoR으로 절단한 바실러스 투린지엔시스, 레인 3, 6: Hind로 절단한 바실러스 투린지엔시스.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 파리목 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주를 제공한다.

[0012] 본 발명에서 분리한 상기 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주는 파리 목 해충에 대해 살충 활성을 가지는 균주로, 이를 한국생명공학연구원에 2017년 10월 17일자에 기탁번호 KCTC13363BP로 기탁하였다.

[0013] 본 발명에서는 또한 신규한 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주의 순수배양물을 유효성분으로 함유하는 파리목 해충의 살충용 조성물을 제공한다. 상기 조성물에서, 상기 파리목 해충은 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*), 버섯파리(*Lycoriella ingenua*), 흰줄숲

모기(*Aedes albopictus*), 토고숲모기(*Aedes togoi*) 및 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*)일 수 있고, 바람직하게는 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*) 및 버섯파리(*Lycoriella ingenua*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0014] 본 발명에서는 또한, 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 또는 이의 순수배양물을 함유하는 조성물의 유효량을 파리목 해충의 방제를 위하여 식물, 토양 또는 파리목 해충 서식지에 살포하는 것을 특징으로 하는 파리목 해충의 방제 방법을 제공한다.

[0015] 상기 방제 방법에서, 상기 파리목 해충은 본 발명에서는 또한 신규한 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주의 순수배양물을 유효성분으로 함유하는 파리목 해충의 살충용 조성물을 제공한다. 상기 조성물에서, 상기 파리목 해충은 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*), 버섯파리(*Lycoriella ingenua*), 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*), 토고숲모기(*Aedes togoi*) 및 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*)일 수 있고, 바람직하게는 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*) 및 버섯파리(*Lycoriella ingenua*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 이하, 본 발명의 설명에 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.

[0017] "살충성"은 위생해충이나 농작물해충의 사망률을 증가시키거나 성장률을 저해하는 물질의 능력을 의미한다.

[0018] "유효량"은 유익한 또는 원하는 결과를 일으키기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상으로 투여될 수 있다.

[0019] "조성물"은 비활성(예를 들어, 검출가능 약품 또는 표지 또는 액체 담체) 또는 활성(예를 들어, 보조제)인, 담체 또는 조성물과 같이 활성제 및 또 다른 화합물의 조합을 의미하도록 의도된다.

[0020] 본 발명의 파리목 살충용 조성물을 적용할 수 있는 식물은 특별히 제한되지는 않으며, 배추, 양배추, 오이, 무, 들깨, 고추, 결구상추(양상추), 딸기, 토마토, 파, 담배, 버섯 등의 경제작물 이외에도 화훼 또는 특용작물 등의 식물 표면이나 이들 식물이 생장하고 있는 토양에 처리될 수 있으며 또는 재배하여 수송 또는 저장 중인 채소 표면에도 처리될 수 있다.

[0021] 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주를 함유하는 파리목 해충 방제용 조성물, 더욱 바람직하게는 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*), 버섯파리(*Lycoriella ingenua*), 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*), 토고숲모기(*Aedes togoi*) 및 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*)인 해충 방제에 유용한 조성물은 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주의 배양액 또는 건조분말 5 내지 90 중량%에 계면활성제, 무기염류, 보조제, 결합제 및 증량제 등을 혼합하여 해충 살충용 조성물로 제조할 수 있다.

[0022] 상기 계면활성제는 분자 중에 친수성 분자단과 친유성 분자단을 동시에 갖는 양친매성 물질로서, 세정력, 분산력, 유화력, 가용화력, 습윤력, 살균력, 기포력 및 침투력이 우수하다는 특징을 갖는 것으로 이해되는 물질로서, 본 발명에 따른 해충 살충용 조성물 중의 BT(비티)가 효과적으로 약효를 발현하도록 수화, 현탁, 분산시키는 작용을 하는 것으로 이해될 수 있다.

[0023] 상기 계면활성제로는 알킬벤젠설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트, 디알킬설포석시네이트, 리그닌설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트포르마린축합물, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설포네이트와 같은 설포네이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설페이트와 같은 설페이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 나프탈렌설포석시네이트, 폴리옥시알킬렌석시네이트와 같은 석시네이트의 나트륨염 또는 칼슘염 등의 음이온성 계면활성제, 에톡실화 알킬에테르, 폴리옥시알킬렌알킬페닐폴리머, 다중 알코올과 같은 비이온성 계면활성제가 단독으로 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있으며, 이들은 모두 예시적으로 열거한 것들로서 이들 이외의 계면활성제가 사용될 수 있음은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 용이하게 이해될 수 있을 것이다.

[0024] 상기 증량제는 상기 계면활성제와 함께 사용되어 상기 계면활성제를 흡착, 분상화하고, 이 계면활성제, 약효 증진제, 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주의 배양액 또는 건조분말과 함께 비티제 조성물의 미립자 표면을 이루는 물질로 작용하며, 전분, 대두박, 밀기울, 입상 섬유질, 유안, 규조토, 제올라이트, 벤토나이트, 탈크, 카올린, 파이로필라이트, 화이트카본 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0025] 상기 결합제는 상기 활성성분인 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주의 건조분말을 포함하여 약효 증진제, 증량제 등을 서로 결합시키는 역할을 하는 것으로서, 수용성 전분, 덱스트린, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴산나트륨, 폴리비닐알코올, 아라비아검 또는 잔탄검 등이 단독 또는 2종 이상 혼합되어 사용될

수 있다.

[0026] 이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0027] **재료 및 방법**

[0028] **균주의 분리 및 배양**

[0029] 충남대학교 생물적해충제어 실험실에서 국내토양으로부터 분리 보관된 49개 균주로 선발시험을 하였다. 위상차현미경 1,000배로 관찰하여 내독소 단백질을 형성하는 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 멸균수에 희석하여 영양 아가 플레이트에 고르게 도말하였다. 이 플레이트를 27℃ 배양기에서 3~4일간 배양한 후, 자가분해(autolysis)가 일어난 것을 확인하고 15,000 rpm으로 15분간 원심분리기(Avanti J-E, Beckman)로 원심분리하여 집균하였다.

[0030] **균주의 형태적 관찰**

[0031] 영양 아가 플레이트 상에서 증식하여 포자형성기가 지난 바실러스 투린지엔시스 균주의 포자와 내독소결정성단백질의 형태를 알아보기 위해 위상차현미경(Olympus BX51)과 주사전자현미경(Quanta FEG MK2)을 이용하여 관찰하였다. 위상차현미경으로 관찰하기 위해 소량의 균주를 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후 1,000배로 다구형(spherical type)의 내독소결정성단백질 형태를 관찰하였다(Kim *et el.*, 1995 *Korean J. Seric. Sci.*, 37(1): 57-61).

[0032] **공시곤충**

[0033] 본 실험에서 사용된 파리목 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*)는 먹이를 감자로 하여 사용하였고, 버섯파리(*Lycoriella ingenua*)는 양송이버섯을 먹이로 사용하였다. 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*), 토고숲모기(*Aedes togoi*), 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*)는 질병관리본부 질병매개곤충과에서 분양받아 치어사료에 효모 추출물을 첨가한 먹이로 사육하여 사용하였다. 충남대학교 생물적해충제어 실험실에서, 온도 25±2℃, 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60% 조건(Kim et el., 2008 *Korean. J. Appl. Entomol.* 47(1): 87-93)에서 누대 사육하였다.

[0034] **생물활성 검정 및 반수치사농도**

[0035] 선발된 바실러스 투린지엔시스 균주를 영양 아가배지에 접종하고 27℃에서 5일 동안 배양 후 위상차현미경으로 내독소 결정체 단백질 형성을 관찰하면서 내독소 단백질을 형성하였을 때, 균을 모아 원심분리하였다. 상층액은 버리고 남은 펠렛에 멸균수 5㎖을 첨가하여 희석한 배양액을 생물검정에 사용하였다. 살충활성을 비교하기 위해 파리목 유충에 살충활성이 있다고 알려진 실험실에 보유하고 있는 다구형(spherical type)의 8개 균주로 실험하였다.

[0036] **1) 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*)에 대한 독성 검정**

[0037] 작은뿌리파리에 대한 생물활성 검정은 바실러스 투린지엔시스 균주를 멸균수와 희석하여 200㎕의 배양액을 1g의 감자에 첨가하여 검정하였다. 부화한지 3~4일 된 유충 20마리씩 페트리 디쉬에 넣고 3반복 실시하여 168시간 동안 치사율을 조사하였다.

[0038] **2) 버섯파리(*Lycoriella ingenua*)에 대한 독성 검정**

[0039] 버섯파리에 대한 생물활성은 바실러스 투린지엔시스 균주를 멸균수와 희석하여 200㎕를 1g의 양송이 버섯에 첨가하여 검정하였다. 부화한지 3~4일 된 유충 20마리씩 페트리 디쉬에 넣고 3반복 실시하여 168시간 동안 치사율을 조사하였다.

[0040] **3) 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*), 토고숲모기(*Aedes togoi*), 빨간집모기(*C. pipiens pallens*)에 대한 독성 검정**

[0041] 모기에 대한 생물활성 검정은 LARVICIDES (2005)의 실험방법을 일부 수정하여 실험하였다. 부화한지 3~4일 된 유충 10마리씩 30ml의 물이 담긴 90ml 플라스틱 컵에 넣고, 희석한 균액의 300㎕을 접종하였다. 72시간동안 치사율을 조사하였고, 3반복 실험하였다.

[0042] **4) 반수치사농도(LC_{50})**

[0043] 모든 실험은 3반복 실시하였으며 실험 유충이 전부 사망하는 농도와 생존하는 농도까지 5-7 범위를 조사한 사충률로 Finney(Finney, D. J. 1971 Cambridge University Press. *London*. pp 19-47)의 probit 계산법에 기초한 PC 프로그램을 이용하여 반수치사농도(LC_{50})을 산출하였다.

[0044] **SDS-PAGE**

[0045] 실험에 사용된 각각의 균주를 영양 아가 배지에 접종하고 27℃에서 5일 동안 배양하여 위상차현미경으로 자가소화(autolysis)가 일어나는 것을 확인한 후, PBS 버퍼를 사용하여 원심튜브에 15,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액은 버리고 세척 버퍼 I(500mM NaCl, 2% Triton X-100)은 3번, 세척 버퍼(500mM NaCl)는 2번 세척하였다. 세척된 부아포봉입체(parasporal inclusion)는 멸균수를 첨가한 후 -20℃에 보관하였다. SDS-PAGE는 12% 분리 젤과 5% 스택킹 젤을 사용했다. 전기영동이 끝난 젤은 0.5% 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하였다. 각 균주의 부아포봉입체를 50mM NaOH 수용액을 상온에서 5분간 반응시킨 후 원심분리하여 상층액을 버리고 1mg/ml 트립신을 10:1(w/w)로 처리한 후 37℃에서 30분간 배양하였다. 트립신에 의해 용해된 단백질은 SDS-PAGE를 통해 결과를 확인하였다.

[0046] **PCR 분석**

[0047] 선발된 바실러스 투린지엔시스 균주의 내독소 유전자의 Cry형 유전자를 동정하기 위하여 유전자 특이적 프라이머 세트(표 1)를 사용하였다. PCR의 증폭은 Thermal Cycle C1000™(BIO-RAD)을 사용하였다. 반응액은 완충액 성분과 dNTP 등이 함유된 premix(Bioneer)에 주형 DNA 1.0㎕, 프라이머 세트 각각 1.0㎕, 증류수 17㎕를 혼합하여 최종볼륨을 20㎕로 하여 수행하였다. PCR 조건은 95℃에서 3분 총 30회로 95℃에서 1분, 어닐링 57℃에서 1분, 72℃에서 1분, 72℃에서 5분으로 진행하여 PCR 산물 DNA를 생산하였으며 1% 아가로스 젤에서 전기영동 하였다.

표 1

Cry genes	Primer sequences(서열번호)		PCR products (bp)
cry2A	5'	CAGATACCCTTGCTGGTGTAA(1)	1073
	3'	ATAGGCCCGTGCTCCACCAGG(2)	-
cry3A	5'	CCGAACAATCGAAGTGAA(3)	1964
	3'	ATAGATGGTCCTACTT(4)	-
cry3B	5'	CCGAACAATCGAAGTGAA(5)	1359
	3'	GAATCCTGTGCACCTAA(6)	-
cry3C	5'	CCTGAAAATTACAGGCC(7)	1135
	3'	AATTGATCAATAGAATC(8)	-
cry3D	5'	CCGAACAATCGAAGTGAA(9)	1074
	3'	ATTGTTGCCGTCAACAA(10)	-
cry4Aa	5'	GAACTGGGTATGGCACTCAAC(11)	777
	3'	CTCACAACGATTAGACCCTTC(12)	-
cry4Ba	5'	GCGAGGTTTCCCATGTCTAC(13)	347
	3'	GTTGTAGGGTGGAATTGTTATC(14)	-
cry5	5'	ATGGAAGATAGTTCTTTAGAT(15)	2174
	3'	GGTAGATTTTAATTCTAC(16)	-
cry9A	5'	ATCATGCCATGGATCAAAATAAACACGGAATTATTGG(17)	571
	3'	CCGCTTCCAATAACATCTTTT(18)	-
cry9B	5'	TCATTGGTATAAGAGTTGGTCTATAGAC(19)	402
	3'	CCTCCTAGACACAGGGATGATTTCAATTC(20)	-
cry9C	5'	CTGCTCCCTTTCAATCC(21)	306
	3'	CCTCCTAGACACAGGGATGATTTCAATTC(22)	-
cry9D	5'	CCGAGCTCTATGAATCGAAATAATCAAAATGAAT(23)	1917
	3'	CCTCCTAGACACAGGGATGATTTCAATTC(24)	-
Cry10Aa	5'	ACGCAAATAAGCCAAATCAACC(25)	257
	3'	CCAAACATTTGCAGGGTCAG(26)	-
Cry11Aa	5'	TGCTGATAACAATGGCAATGAAA(27)	254
	3'	TGGTGGTATTGTTCCGGTTC(28)	-
cry11Ba	5'	GAATCAGCGCCTGAACAATG(29)	615
	3'	TAATGCGAGTTGCTGCGATA(30)	-
Cyt1Aa	5'	GATGGGTGCTGTAGTGAGTT(31)	221
	3'	TAGCAGTTTCCTTGCCCCA(32)	-
Cyt2Aa	5'	ACGGTTCCATCCAGTGATTTA(33)	494
	3'	TCAACATCCACAGAAACCTCA(34)	-
Cyt2Ba	5'	GGCATATTGCATTAACAGTTCCA(35)	401
	3'	AGCTGATAAATTACGCCAAACAA(36)	-

[0048]

[0049] **플라스미드 DNA 추출**

[0050] 바실러스 투린지엔시스 균주로부터 플라스미드 DNA를 추출하기 위하여 Qiagen midi kit의 프로토콜을 일부 수정하여 사용하였다. 균주를 LB 배지 5ml에 접종하여 27℃ 180rpm으로 8시간 배양하였다. 배양액을 LB 배지 50ml에 넣고 동일한 조건으로 16시간 배양하였다. 배양된 균은 6,000g, 15분, 4℃의 조건으로 원심분리하였다. 상층액을 버리고 P1 버퍼(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA, 50㎍/ml of RNase A) 4ml을 넣고 볼텍싱하여 펠렛을 풀어주었다. P2 버퍼 (0.2M NaOH, 1% SDS) 4ml을 넣고 튜브를 4~6번 뒤집어 주어 혼합하고 15~25℃ 배양기에서 5분간 배양하였다. 냉각한 P3 버퍼(4M 구아니딘 히포클로라이드, 0.5M 포타슘 아세테이트, pH 4.2) 4ml을 넣고 4~6번 뒤집어 주어 혼합하고 얼음에서 15분간 배양하였다. 30분간 15,000rpm, 4℃로 원심분리한 후, 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 15분간 15,000rpm, 4℃로 원심분리한 후, Qiagen-tip 100을 수평으로 놓고 QBT 버퍼(50mM NaCl, 50mM MOPS, pH 7.0, 15% 이소프로판올, 0.15% Triton X-100) 4ml을 넣어 통과시킨 컬럼에 원심분리한 상층액을 넣었다. 상층액이 컬럼을 완전히 통과하면 QC 버퍼 20ml로 Qiagen-tip 100을 세척하였다. QF buffer

5ml로 DNA를 녹여서 분리하였다. 상온의 이소프로판올 3.5ml을 첨가하여 DNA를 침전시키고 30분간 15,000rpm, 4℃로 원심분리하였다. 상층액을 버리고 70% 에탄올 2ml을 첨가하여 DNA 펠렛을 세척한 후 10분간 15,000rpm, 4℃로 원심분리하였다. 상층액을 버리고 5~10분간 공기건조시키고 3차 증류수 200㎕를 넣어 플라스미드 DNA를 다시 녹였다. 플라스미드 DNA를 3차 증류수와 혼합시킨 후 멸균한 에펜도르프 튜브에 넣고 실험에 시용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다. 전기영동은 아가로스 젤을 1×TAE 버퍼에 1% 비율로 혼합하여 열을 가해 녹인 후 젤 트레이에 붓고 20분간 굳힌 아가로스 젤을 사용하였다. 전기영동장치에 젤과 동일한 1×TAE 버퍼를 젤 위로 3~5mm 정도 올라오게 붓고 로딩 다이(dye)와 로딩 스타(loading star)를 5:1의 비율로 섞은 혼합액과 플라스미드 DNA 샘플을 1:5의 비율로 혼합하여 각각의 웰에 넣고 50V에서 60분간 전기영동한 후 UV를 쬐어 밴드 패턴을 확인하였다.

[0051] **실시예 1. 바실러스 투린지엔시스 균주의 분리 및 선발**

[0052] 충남대학교 생물적해충제어 실험실에서 보관 중인 49개 균주를 NA 배지에 27℃에서 배양하여 이들이 생성하는 부아포봉입체(parasporal inclusion)를 위상차현미경을 통해 관찰하였다. 49개 균주 중 양추 타입(bipyramidal type)의 부아포봉입체를 형성하는 28개 균주와 다구형(Spherical type)의 부아포봉입체를 생성하는 9개 균주를 확인하였다. 이 중 다구형의 부아포봉입체는 일반적으로 파리목에 효과가 있다고 알려져 있기 때문에 다구형의 부아포봉입체를 형성한 9개 균주를 선발하였다(표 2). 다구형의 부아포봉입체를 형성하는 9개 균주를 파리목인 작은뿌리파리에 활성검정을 하였다(표 3). 작은뿌리파리에 대해서 CAB464 균주가 90% 이상의 높은 살충활성을 나타내었으며, CAB117, 469 균주가 70% 이상의 살충활성을 나타내었고, CAB459, 462, 490 균주는 50% 이상의 살충활성을 나타내었다. 버섯파리에 대해서 CAB464 균주가 90% 이상의 높은 살충활성을 나타내었으며, CAB117, 459, 469 균주가 70% 이상의 살충활성을 나타내었고, CAB490, 492 균주는 50% 이상의 살충활성을 나타내었다. CAB463, 467 균주는 두 해충에 대해서 50% 이하의 낮은 살충활성을 나타내었다. 따라서 작은뿌리파리와 버섯파리의 두 해충에 대해서 90% 이상의 높은 살충활성을 나타내는 CAB464 균주를 선발하였다.

표 2

[0053] 본 발명에서 분리한 바실러스 투린지엔시스 균주의 형태학적 분류

Morphological groups	No. of *B. thuringiensis* isolates
Non crystal	12
Bipyramidal type	28
Spherical type	9
Total	49

표 3

[0054] 본 발명에서 분리한 바실러스 투린지엔시스 균주의 선발을 위한 작은뿌리파리와 버섯파리에 대한 살충활성검정

Strain	Tested insects		Strain	Tested insects	
	Bradysia agrestis	*Lycoriella ingenua*		*Bradysia agrestis*	*Lycoriella ingenua*
Control	-	-	CAB464	+++	+++
CAB117	++	++	CAB467	-	-
CAB459	+	++	CAB469	++	++
CAB462	+	-	CAB490	+	+
CAB463	-	-	CAB492	-	+

[0055] +++: 효과 높음, 90% 살충률

[0056] ++: 효과 있음, 70~89% 살충률

[0057] +: 효과 낮음, 50~69% 살충률

[0058] -: 효과 없음, 0~49% 살충률

[0059] **위상차현미경 관찰**

[0060] 작은뿌리파리와 버섯파리에 대해 살충활성이 높은 CAB464 균주의 결정체(crystal)의 형태를 확인하기 위하여 위상차현미경으로 결정체와 포자(spore)를 관찰하였다. 바실러스 투린지엔시스 균주의 내독소단백질 형태는 살충활성을 나타내는 곤충숙주범위와 밀접한 관계를 나타내는 정보를 주기 때문에 위상차현미경 하에서의 내독소 단백질 형태 관찰은 중요한 정보로 제공된다. 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주는 위상차현미경으로 관찰 결과 파리목 해충에 살충활성을 나타낸다고 알려져 있는 전형적인 다구형의 크리스탈 단백질(crystal protein)을 형성하는 것으로 나타내었다(도 1).

[0061] **생물활성 검정**

[0062] 선발된 바실러스 투린지엔시스 균주와 파리목 유충에 살충활성이 있다고 알려진 8개의 바실러스 투린지엔시스 아종을 사용하여 파리목 해충인 버섯파리, 작은뿌리파리, 흰줄숲모기, 토고숲모기, 빨간집모기 등 5종류의 해충에 대해 살충활성을 검정하였다. 그 결과, 검정한 총 9개 균주들의 활성범위 중 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스(*B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*)와 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주가 작은뿌리파리와 버섯파리에 대해 높은 살충활성을 나타내었으며, 흰줄숲모기와 토고숲모기, 빨간집모기에 대해서도 높은 살충활성을 나타내었다(표 4). 따라서 두 해충에 대해 살충활성이 가장 높은 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스(*B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*)와 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) CAB464 균주를 선발하여 농도별로 생물검정을 진행하였다. 그 결과, 작은뿌리파리에 대한 LC_{50}값은 CAB464 균주에서 8.0×10^{5}(cfu/ml)이며, 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스 균주의 1.6×10^{6}(cfu/ml)에 비해서 높은 살충활성을 나타내었다. 버섯파리에 대한 LC_{50}값은 CAB464 균주에서 1.9×10^{5}(cfu/ml)이며, 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스 균주의 2.8×10^{5}(cfu/ml)에 비해서 높은 살충활성을 나타내었다(표 5).

표 4

[0063] 본 발명에서 선발한 바실러스 투린지엔시스 CAB464 균주와 파리목 해충에 살충활성을 나타내는 8개 바실러스 투린지엔시스 균주의 5종 해충에 대한 살충활성 검정

Strains	Tested insects				
	Lycoriella ingenua	*Bradysia agrestis*	*Aedes albopictus*	*Aedes togoi*	*Culex pipiens pallens*
Control	-	-	-	-	-
B. thuringiensis subsp. *canadensis*	++	++	+++	+++	+++
B. thuringiensis subsp. *darmstadiensis*	+++	+++	+++	+++	+++
B. thuringiensis subsp. *fukuokaensis*	++	++	-	-	++
B. thuringiensis subsp. *higo*	++	++	-	++	+++
B. thuringiensis subsp. *japonensis*	-	-	-	-	-
B. thuringiensis subsp. *kyushuensis* CAB464	+++	+++	++	+++	+++
B. thuringiensis subsp. *morrisoni*	+	+	+++	+++	+++
B. thuringiensis subsp. *sotto*	+	++	+++	++	-
B. thuringiensis subsp. *tohokuensis*	++	++	+++	+++	++

[0064] +++: 효과 높음, 90% 살충률

[0065] ++: 효과 있음, 70~89% 살충률

[0066] +: 효과 낮음, 50~69% 살충률

[0067] -: 효과 없음, 0~49% 살충률

표 5

[0068] 본 발명에서 선발한 바실러스 투린지엔시스 균주의 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*)와 버섯파리(*Lycoriella ingenua*)에 대한 반수치사농도(LC_{50}) 검정

Strain	Tested insects	
	Bradysia agrestis	*Lycoriella ingenua*
B. thuringiensis subsp. *darmstadiensis*	1.6×10^{6}	2.8×10^{5}
B. thuringiensis subsp. *kyushuensis* CAB464	8.0×10^{5}	1.9×10^{5}

[0069] SDS-PAGE

[0070] 파리목 해충에 살충활성이 있는 다구형(spherical type)의 내독소 단백질을 구성하는 Cry 단백질의 분자량은 약 65kDa에 해당하며, cyt 단백질의 분자량은 약 22-30kDa을 가지는 것으로 보고되어 있다(Ibarra and Federici, 1986. *J. Bacteriol*. 165(2): 527-533). 파리목 해충에 살충활성을 나타내는 바실러스 투린지엔시스 아종 이스라엘렌시스(*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*) 균주는 유충 중장에서 부아포봉입체(parasporal body)가 가수 분해되면 분자량이 27, 65, 128, 135kDa인 4개의 주요 단백질이 생성된다. 135, 128 및 65kDa 단백질은 Cry4 단백질이며 27kDa 단백질은 세포용해 인자 CytA이다. 독성은 27kDa의 단백질 분해 생성물인 25kDa 단백질과 더 높은 분자량을 가진 하나 이상의 단백질 사이의 상승 작용에 의해 유발된다.

[0071] 파리목 해충에 대한 생물활성 검정에서 높은 살충활성을 나타낸 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스와 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 균주의 내독소단백질 특성을 비교하기 위하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스 균주는 약 150, 125, 70, 50, 25kDa, 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주는 약 150, 70, 66, 50, 27kDa 크기의 주요 단백질 밴드 패턴을 확인하였다(도 2). 두 균주가 생성하는 부아포봉입체의 활성독소 양상을 확인하기 위해 소화효소인 트립신을 처리하였다. 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스 균주는 약 150kDa의 단백질이 트립신에 의해 분해되어 약 65, 60kDa의 새로운 단백질 밴드가 형성 되었으며, 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주에서도 약 150kDa의 단백질이 트립신에 의해 분해되어 약 65, 60kDa과 50kDa의 단백질 밴드를 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

[0072] Cry-type 유전자 동정

[0073] 바실러스 투린지엔시스 균주는 포자 형성 단계에서 Cry (Crystal 단백질) 및 Cyt(세포 용해 독소) 단백질을 포함하여 2종류의 살충성 단백질을 생산하였다. 파리목 해충에 살충활성이 높다고 알려진 바실러스 투린지엔시스 아종 이스라엘렌시스 균주는 cry4Aa, cry4Ba, cry10, cry11Aa와 cyt1Aa, cyt2Ba 유전자를 가지고 있으며, 바실러스 투린지엔시스 아종 모리소니 균주는 cry4A, cry4B, cry10A, cry11A와 cyt1A 유전자를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다(Ibarra *et el*., 1986. FEMS Microbiol Letters, 34(1):79-84). 모기 유충에 살충활성을 가지는 많은 바실러스 투린지엔시스 균주가 cyt1A와 유사한 유전자와 단백질을 보유하고 있는 것으로 나타났다. cyt 독소는 바실러스 투린지엔시스의 일부 균주에 의해 생산되는 단백질 그룹이며, 아미노산 동질성에 기초하여 cyt1, cyt2, cyt3의 3가지로 분류된다. 이 단백질은 파리목 해충의 유충에 치명적인 활성을 가지며 체외에서 적혈구를 포함하여 광범위한 세포에 대해 세포 용해 활성을 가진다고 보고되어 있다(Thomas *et el*., 1983. FEBS Letters, 154(2):362-368). 다양한 cyt 독소는 모기 유충에 살충활성을 가지는 바실러스 투린지엔시스 균주에서 발견되었으며, 이 독소를 암호화하는 유전자가 밝혀졌고 서열이 규명되었다(Crickmore *et el*., 1998. Microbiol Mol Biol Rev, 62(3):807-813).

[0074] 본 발명에서는 선발된 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주의 cry 유전자들을 확인한 결과, cyt2Aa 유전자를 가지고 있으며 cyt2Aa 유전자는 모기 유충에 살충활성을 일으키는 유일한 단백질로 보고되어 있으며, 두 균주가 cyt2Aa 유전자로 인해 작은뿌리파리와 버섯파리에 대한 살충활성이 높음을 추측할 수 있었다(도 3).

[0075] 플라스미드 DNA 분석

[0076] 바실러스 투린지엔시스 대상해충에 살충활성을 나타내는 크리스탈 단백질을 형성하는데 관여하는 *cry* 유전자는 주로 플라스미드 DNA상에 존재하였다. 바실러스 투린지엔시스 내에서 존재하는 플라스미드 DNA는 최대 17개로 이루어져 있고, 길이는 2~250kbp 정도이다. 균주마다 보유하고 있는 플라스미드 DNA의 개수와 길이는 다양하게 나타난다. 이와 마찬가지로 *cry* 유전자 또한 모든 균주에서 항상 같은 크기의 플라스미드 DNA에 존재하는 것이 아니라 균주마다 서로 다른 위치의 플라스미드 DNA에 존재하였다. 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주의 대조균주로서 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스 균주를 사용하여 플라스미드 DNA 패턴을 확인하였다(도 4). 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주는 2개의 23.1kb보다 큰 플라스미드 DNA 밴드를 포함하여 9개의 플라스미드 DNA 밴드를 확인할 수 있었다. 또한 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스 균주와 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주는 3개의 동일한 밴드양상을 보이고 있는 것으로 나타났다(도 4).

[0077] 본 발명에서는 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주와 작은뿌리파리와 버섯파리에 살충효과가 높은 바실러스 투린지엔시스 아종 다름스타디엔시스 균주 간에 외형적 특성이나 단백질의 특성만으로는 구별하기가 어려웠으나 생물검정과 분자생물학적 실험을 통해 차이가 있음을 확인하였다. 바실러스 투린지엔시스 아종 규슈엔시스 CAB464 균주는 작은뿌리파리와 버섯파리에 대해 높은 살충효과를 나타내므로 두 해충을 방제할 수 있는 신규 미생물살충제로서 유용하게 이용될 수 있다.

수탁번호

[0078]

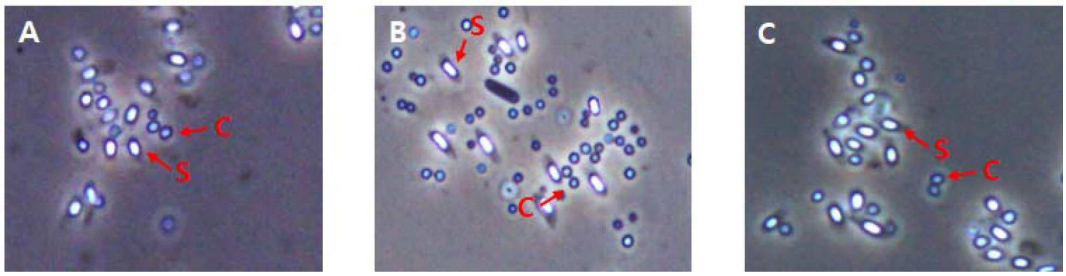
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13363BP

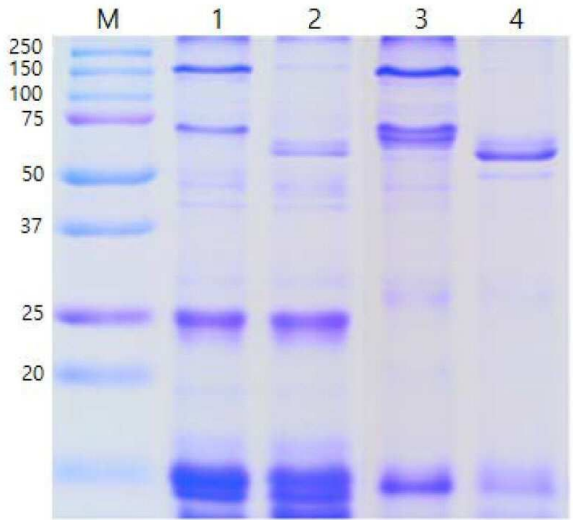
수탁일자 : 20171017

도면

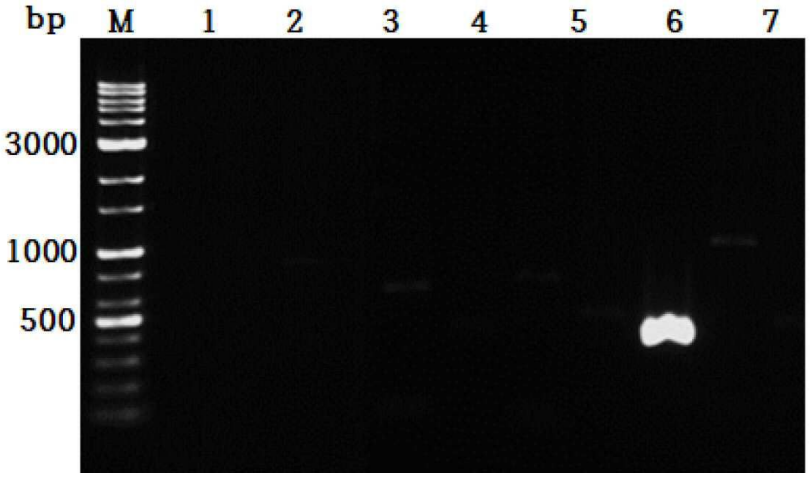
도면1



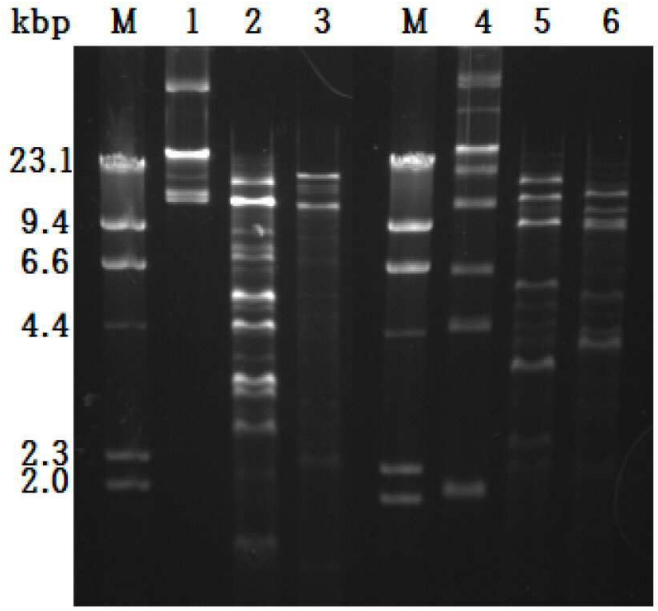
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Bacillus thuringiensis subsp. kyushuensis strain CAB464 having insecticidal activity and uses thereof

<130> PN17421

<160> 36

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

cagataccct tgctggtgta a 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ataggcccgt gctccaccag g 21

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ccgaacaatc gaagtgaa 18

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

atagatggtc ctactt 16

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ccgaacaatc gaagtgaa 18

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gaatcctgtg cacctaa 17

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

cctgaaaatt acaggcc 17

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

aattgatcaa tagaatc 17

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

ccgaacaatc gaagtgaa 18

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

attgttgccg tcaacaa 17

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

gaactgggta tggcactcaa c 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

ctcacaacga ttagaccctt c 21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gcgaggtttc ccatgtctac 20

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

gttgtagggt ggaattgtta tc 22

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

atggaagata gttctttaga t 21

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

ggtagatttt aattctac 18

<210> 17

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

atcatgccat ggatcaaaat aaacacggaa ttattgg 37

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

ccgcttccaa taacatcttt t 21

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

tcattggtat aagagttggt ctatagac 28

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

cctcctagac acagggatga tttcaattc 29

<210> 21

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

ctgctccctt tcaatcc 17

<210> 22

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

cctcctagac acagggatga tttcaattc 29

<210> 23

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

ccgagctcta tgaatcgaaa taatcaaaat gaat 34

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

cctcctagac acagggatga tttcaattc 29

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 25

acgcaaataa gccaaatcaa cc 22

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 26

ccaaacattt gcagggtcag 20

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 27

tgctgataac aatggcaatg aaa 23

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 28

tggtggtatt gttccggttc 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 29

gaatcagcgc ctgaacaatg 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 30

taatgcgagt tgctgcgata 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 31

gatgggtgct gtagtgagtt 20

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 32

tagcagtttc cttgcccca 19

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 33

acggttccat ccagtgattt a 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 34

tcaacatcca cagaaacctc a 21

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 35

ggcatattgc attaacagtt cca 23

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 36

agctgataaa ttacgccaaa caa 23