(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0138661
(43) 공개일자 2017년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8243 (2013.01)
A01H 5/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0070717
(22) 출원일자 2016년06월08일
심사청구일자 2016년06월08일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
한창덕
경상남도 진주시 강변길 31, 102동 901호(가좌동, 가호 에일린의 뜰 아파트)
현원호
경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 326호 (가좌동)
(74) 대리인
최규환

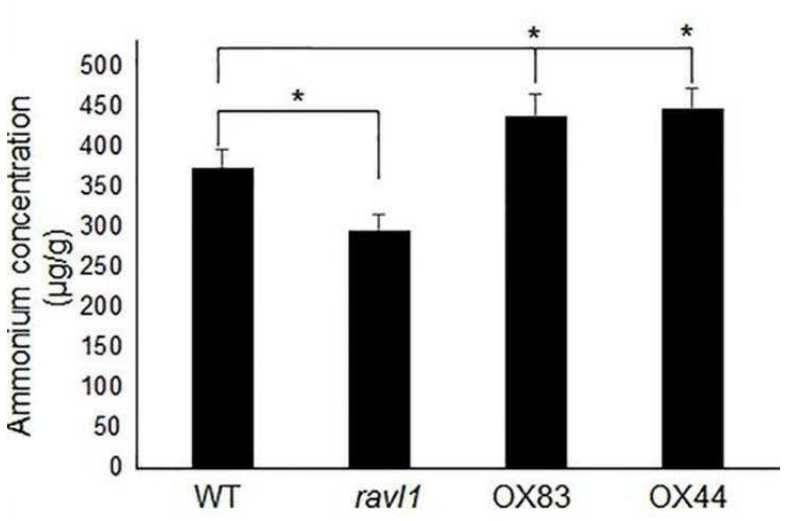
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **벼 유래의 OsRAVL1 전사조절인자를 이용한 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명의 암모늄 수송체 *AMT1;2*(ammonium transporter1;2) 프로모터의 활성을 조절하는 벼 유래의 OsRAVL1 전사조절인자는 식물체의 암모늄 흡수 효율을 증가시키므로, 식물체에서 상기 전사조절인자의 발현 조절을 통해 암모늄 흡수율이 증가된 식물체를 개발하는데 이용할 수 있으며, 본 발명을 통해 제조된 암모늄 흡수 능력이 향상된 식물체는 질소 결핍 스트레스를 극복할 수 있는 점이 확인되므로, 본 발명은 비료 투입량 절감에 따른 농업 생산 비용 감소 및 환경오염 방지 효과에 크게 기여할 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01103901
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 식물분자육종사업단
연구사업명 차세대 바이오그린21 사업
연구과제명 벼의 수량성 및 종자 수명 형질에 관여하는 유용 유전자 발굴 및 기능 연구
기 여 율 4/10
주관기관 경상대학교
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01114601
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 GM작물실용화사업단
연구사업명 차세대바이오그린21 사업
연구과제명 수도 초형 관련 고유 유전자 연구 및 글로벌 GM 작물 개발에 활용
기 여 율 4/10
주관기관 경상대학교
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A1A2055687
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (구)기본연구지원사업
연구과제명 벼에서 암모니움 특이적 발현 신호전달 및 전사인자에 관한 연구
기 여 율 2/10
주관기관 경상대학교
연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자 코딩 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 OsRAVL1 전사조절인자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 암모늄 흡수 효율을 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자는 암모늄 수송체 *AMT1;2*(ammonium transporter1;2) 프로모터의 활성을 조절하는 것을 특징으로 하는 식물체의 암모늄 흡수 효율을 조절하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 OsRAVL1 전사조절인자는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 식물체의 암모늄 흡수 효율을 조절하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 OsRAVL1 전사조절인자를 과발현시켜 야생형에 비해 식물체의 암모늄 흡수 효율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 식물체의 암모늄 흡수 효율을 조절하는 방법.

청구항 5

OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자 코딩 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 OsRAVL1 전사조절인자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 OsRAVL1 전사조절인자는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 OsRAVL1 전사조절인자를 과발현시켜 야생형에 비해 식물체의 암모늄 흡수 효율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 식물체의 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 식물체는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 식물체의 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체.

청구항 10

제8항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.

청구항 11

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 암모늄 흡수 효율 조절용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 벼 유래의 OsRAVL1 전사조절인자를 이용한 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전 세계적으로 급속한 인구 증가로 인해 식량 부족은 큰 문제가 되고 있으며, 이를 극복하기 위해 다수성 식량 작물의 육성이 요구되고 있다. 다수성 식량 작물을 육성하기 위해서는 작물에 충분한 영양소를 공급해야 한다. 이를 위해 비료를 투입하는데, 비료의 주요 성분 중 하나가 질소(N)이다. 질소는 식물에 대한 필수 다량 영양소로서, 식물 성장 및 작물 생산을 위한 주요 제한 요소이며, 질산염(NO_3)은 호기성 토양에서 식물에 대한 무기 질소의 주요 공급원이다.

[0003] 암모늄(ammonium, NH_4^+)은 두 가지 경로를 통하여 식물체 내에 축적된다. 한가지 경로는 특정 운반체에 의해 식물 뿌리 내로 흡수된 질소(N)가 뿌리혹 세균에 의해 질산염의 형태로 변화되고 상기 질산염이 질산환원효소(nitrate reductase, NRs) 및 아질산환원효소(nitrite reductase, NiRs)의 환원작용에 의해 식물체 내에서 암모늄이 만들어지는 것이고, 다른 한가지 경로는 외부에서 직접적으로 암모늄을 흡수하는 것이다. 벼는 질소 비료로부터 암모늄을 이용하고 있기 때문에 암모늄 흡수 및 수송 유전자들을 통하여 외부의 질소를 내부로 이동하는 것은 벼의 질소 흡수에 주요한 경로이다. 이렇게 흡수된 암모늄은 글루타민(glutamine)의 아미드 그룹으로 동화되게 된다. 글루타민은 글루타민산염을 이용하여 다양한 아미노산의 합성에 사용된다. 또한, 글루타민산은 글루타민산 탈수소효소(GDH)에 의해 유기산 2-옥소글루타레이트(2-oxoglutarate)를 합성하는데 사용되므로 암모늄은 질소 동화뿐만 아니라 탄소 대사에도 큰 영향을 미치게 된다. 하지만, 암모늄 흡수 및 수송 유전자(AMTs) 및 질소 동화에 작용하는 유전자들의 전사를 조절하는 인자와 메커니즘에 관한 분자적 및 유전적 연구는 아직 많은 결과를 거두지 못했다.

[0004] 한편, 한국공개특허 제2016-0025824호에는 식물의 질소 이용 능력을 향상시키는 벼 유래 *OsNRT4* 유전자 및 이의 용도에 대해 개시하고 있으며, 한국공개특허 제2014-0143376호에는 니트레이트 수준에 관련된 식물에서의 전사인자 및 이를 사용하는 방법에 대해 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 벼 유래의 OsRAVL1 전사조절인자를 이용한 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법에 대해 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 암모늄 수송체 *AMT1;2*(ammonium transporter1;2) 프로모터의 활성을 조절하는 OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자를 식물체에서 과발현시킴으로써 *AMT1;2* 유전자의 발현량이 증가되고 이로 인해 식물체의 암모늄 흡수 효율이 증가된 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 암모늄 수송체 *AMT1;2*(ammonium transporter1;2) 프로모터의 활성을 조절하는 OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자 코딩 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 OsRAVL1 전사조절인자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 암모늄 흡수 효율을 조절하는 방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 암모늄 수송체 *AMT1;2*(ammonium transporter1;2) 프로모터의 활성을 조절하는 벼 유래의 *OsRAVL1*(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자 코딩 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 암모늄 흡수

효율 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 암모늄 수송체 *AMT1;2*(ammonium transporter1;2) 프로모터의 활성을 조절하는 벼 유래의 OsRAVL1 전사조절인자는 식물체의 암모늄 흡수 효율을 증가시키므로, 식물체에서 상기 전사조절인자의 발현 조절을 통해 암모늄 흡수율이 증가된 식물체를 개발하는데 이용할 수 있으며, 본 발명을 통해 제조된 암모늄 흡수 능력이 향상된 식물체는 질소 결핍 스트레스를 극복할 수 있는 점이 확인되므로, 본 발명은 비료 투입량 절감에 따른 농업 생산 비용 감소 및 환경오염 방지 효과에 크게 기여할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 벼 야생형(WT), OsRAVL1 돌연변이체(ravl1) 및 OsRAVL1 과발현체(RAVL1 OX)에서 *AMT1;2*(ammonium transporter1;2) 유전자의 발현 양상을 나타낸 결과이다.

도 2는 벼 야생형(WT), OsRAVL1 돌연변이체(ravl1), OsRAVL1 회복체(Rev) 및 OsRAVL1 과발현체(OX83 및 OX44)에 동위원소 ^{15}N을 함유한 $^{15}NH_4^+$을 처리하기 전(A)과 후(B)의 식물체 내에 존재하는 ^{15}N의 함량을 측정한 결과이다.

도 3은 벼 야생형(WT), OsRAVL1 돌연변이체(ravl1) 및 OsRAVL1 과발현체(OX83 및 OX44)를 식물 생장 배지인 MS(Murashige and Skoog) 배지에서 3일 키운 후 뿌리를 수확하여 암모늄의 함량을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명을 달성하기 위하여, 본 발명은 OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자 코딩 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 OsRAVL1 전사조절인자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 암모늄 흡수 효율을 조절하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열뿐만 아니라 상기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상동체는 염기서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기서열이다. 구체적으로, 상기 서열은 서열번호 1의 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자는 암모늄 수송체 *AMT1;2*(ammonium transporter1;2) 프로모터의 활성을 조절할 수 있으며, 상기 AMT1;2 프로모터는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 OsRAVL1 전사조절인자는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 OsRAVL1 전사조절인자를 과발현시켜 야생형에 비해 식물체의 암모늄 흡수 효율을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 용어 '전사조절인자'는 전사인자 중에 전사조절에 관여하는 것으로, 전사조절인자는 전사조절을 담당하고, 유전자 특이적으로 존재하는 전사조절배열(상류조절배열, 증폭자)로의 결합을 매개로 하여 전사반응을 촉진 또는 억제한다.

[0018] 본 발명의 OsRAVL1 전사조절인자는 암모늄 수송체 *AMT1;2*(ammonium transporter1;2) 프로모터에 결합하여 *AMT1;2* 유전자의 발현을 조절하므로, 상기 OsRAVL1 전사조절인자를 과발현시켜 상기 *AMT1;2* 유전자의 발현량을 증가시킴으로써 식물체의 암모늄 흡수 효율을 증가시키는 것이다.

[0019] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한, 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으

로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0020] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0021] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 이용될 수 있는 바이너리 벡터는 아그로박테리움 튜머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)의 Ti 플라스미드와 함께 존재시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 RB(right border)과 LB(left border)을 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 자주 사용되는 pBI101(Cat#:6018-1, Clontech, 미국), pBIN19(Genbank 수탁번호 U09365), pBI121, pCAMBIA 벡터 등을 사용하는 것이 좋다. 본 발명에 따른 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래 될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0022] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신(phosphinotricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터 또는 히스톤 프로모터일 수 있으며, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "항시성(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 항시성 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 항시성 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0024] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 또한, 본 발명은 OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자 코딩 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 OsRAVL1 전사조절인자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 AMT1;2 프로모터는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 OsRAVL1 전사조절인자는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 OsRAVL1 전사조절인자를 과발현시켜 야생형에 비해 식물체의 암모늄 흡수 효율을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 식물 발현 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및(또는) 조직 배양기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식

물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된)입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 암모늄 흡수 효율이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0031] 본 발명의 상기 식물체로는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물 또는 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치 등의 쌍자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 단자엽 식물일 수 있으며, 더 바람직하게는 벼(*Oryza sativa*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 암모늄 흡수 효율 조절용 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명의 식물체의 암모늄 흡수 효율 조절용 조성물은 유효성분으로서, 암모늄 수송체 *AMT1;2*(ammonium transporter1;2) 프로모터에 결합하여 *AMT1;2* 유전자의 발현을 조절하는 OsRAVL1(*Oryza sativa* RAV-like 1) 전사조절인자 코딩 유전자를 포함하며, 상기 OsRAVL1 전사조절인자 코딩 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 암모늄 흡수 효율을 조절할 수 있는 것이다. 바람직하게는 OsRAVL1 전사조절인자를 과발현시켜 *AMT1;2*(ammonium transporter1;2)의 발현량을 증가시켜 야생형에 비해 식물체의 암모늄 흡수 효율을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0035] **실시예 1. OsRAVL1 과발현 형질전환 식물체에서 *AMT1;2* 유전자의 발현양상 검증**

[0036] 암모늄에 의한 *AMT1;2* 유전자의 유도를 확인하기 위해 OsRALV1 돌연변이체(ravl1), OsRALV1 과발현체(RAVL1 ox) 및 이들의 야생형(WT) 벼 식물체들을 물에서 2주간 키운 후 종자 속에 함유되어 있는 양분을 모두 소모시켰으며, 질소 양분이 없는 양액(7 μM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 16 μM KCl, 7 μM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15 μM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 36 μM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 9 μM $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 45 μM H_3BO_4, 3 μM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 μM $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 0.05 μM $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)에서 3일 동안 더 재배하여 3일 후 식물체들을 0.5mM$(NH_4)_2SO_4$을 함유한 용액에 침지시켜 3시간 후에 각 라인들에서 30개의 뿌리를 채취하였다.

[0037] 총 RNA는 RNeasy Plant Mini Kits(Qiagen, http://www.qiagen.com/)를 사용하여 분리하였으며, 정량적 RT-PCR을 위해, 제1가닥 cDNA는 MMLV(Moloney murine leukemia virus) 역전사효소 RNaseH(Toyobo, http://www.toyobo.co.jp/e/)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 합성하였다. 본 실시예에 사용한 프라이머 염기서열은 하기 표 1에 개시한 바와 같다. *AMT1;2* 유전자의 발현양상은 실시간 PCR(real time PCR)로 확인하여 3시간 뒤 OsRAVL1 돌연변이체(ravl1) 및 OsRAVL1 과발현체(RAVL1 ox)와 그들의 야생형(WT) 라인과 비교하였다. 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 야생형에 대비하여 OsRAVL1 돌연변이체(ravl1)에서 *AMT1;2* 유전자의 발현량이 감소하였으며, OsRAVL1 돌연변이체(ravl1)에 비해 본 발명의 OsRAVL1 과발현체(RAVL1 ox)에서 *AMT1;2* 유전자의 발현량이 뚜렷하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

표 1

[0038] 본 발명에 사용한 프라이머

프라이머	서열번호	염기서열
Ubiquitin F	6	CACGGTTCAACAACATCCAG
Ubiquitin R	7	TGAAGACCCTGACTGGGAAG
AMT1;2 F	8	TAGACATGGCCTCCCATCTC
AMT1;2 R	9	TAAGCATGATGTTCATGGTG
RAVL F	10	TCCTCACCAACTCCACATTACGGT
RAVL R	11	CAGATCGAGATCCAACGAGGA

[0039] **실시예 2. OsRAVL1 과발현 형질전환 식물체의 암모늄 흡수 능력 검증**

[0040] 암모늄의 흡수능력을 알아보기 위해, OsRALV1 돌연변이체(ravl1), 회복체(Rev), 과발현체(OX83 및 OX44) 및 이들의 야생형 대조구 식물체들을 물에서 2주간 키워 종자 속에 함유되어 있는 양분을 모두 소모시켰으며, 질소 양분이 없는 양액(7 μM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 16 μM KCl, 7 μM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15 μM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 36 μM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 9 μM $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 45 μM H_3BO_4, 3 μM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 μM $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 0.05 μM $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)에서 3일 동안 더 키웠다. 3일 후 식물체들을 200 μM의 $^{15}NH_4^+$을 함유한 용액에 침지시켜 3시간 후에 각 라인들에서 30개 식물체의 뿌리를 채취하였다. 상기 식물체들은 배양실에서 37℃, 14시간 빛과 30℃, 10시간 암실 조건으로 키웠으며 습도는 약 60%를 유지하였다. 직접적인 암모늄 흡수를 측정하기 위해 식물체 뿌리를 1mM의 $CaSO_4$으로 1분간 씻은 뒤 질소가 결핍된 배양액(pH 5.8)에 200 μM의 $^{15}NH_4^+$(95 atom % ^{15}N)를 첨가한 후 6분간 식물체를 침지시켰다. 뿌리는 1mM $CaSO_4$으로 1분간 씻은 후 아포플라스트(apoplast)에 있는 $^{15}NH_4^+$을 제거하였으며, 동결건조된 1.5mg의 뿌리 표본에 대해 동위원소 비율 질량분석기(DELTAplus XP, Thermo-Finnigan)를 이용하여 ^{15}N을 측정하였다. 식물체에 $^{15}NH_4^+$를 처리하기 전에 뿌리에 존재하는 ^{15}N 양을 우선적으로 측정하였으며, ^{15}N 흡수량은 식물체 라인들의 총 질소(N) 풀(pool)에서 ^{14}N 대비 ^{15}N의 비율로 나타내는 ^{15}N 흡수율을 비교하거나 하기 식을 이용하여 ^{15}N 유입량을 계산하는 방법으로 측정하여 확인하였다.

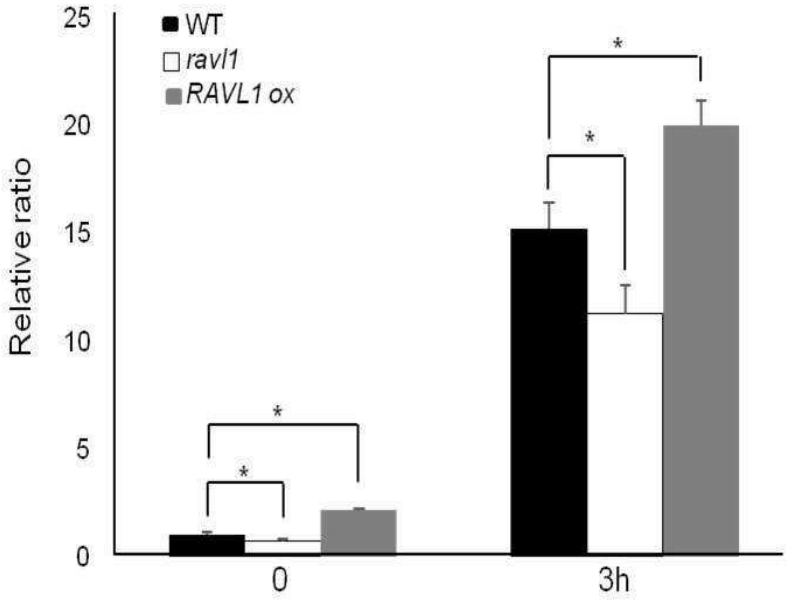
[0041] ^{15}N의 몰(mole) = ^{15}N 부존량(abundance) × 총 N 농도 × 뿌리 건조중량/^{15}N 분자량

[0042] 각 라인들에서 식물체 뿌리의 ^{15}N 함량을 측정한 결과, 도 2에 개시한 바와 같이 $^{15}NH_4^+$를 처리하기 전(A)에는 OsRALV1 돌연변이체(ravl1), OsRALV1 과발현체(OX83 및 OX44) 및 야생형 식물체 뿌리의 ^{15}N의 함량이 같은 반면, $^{15}NH_4^+$를 처리한 후(B)에는 야생형(WT)에 대비하여 OsRALV1 돌연변이체(ravl1)의 ^{15}N 흡수 능력이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한, OsRALV1 돌연변이체(ravl1) 및 야생형(WT)에 대비하여 본 발명의 OsRALV1 과발현체(OX83 및 OX44)의 ^{15}N 흡수 능력이 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

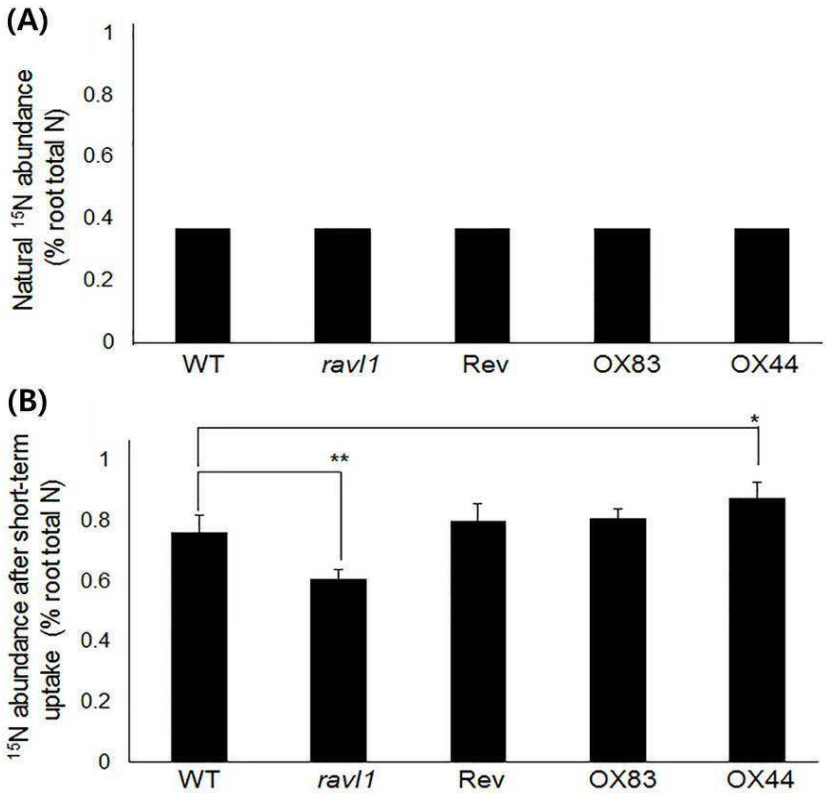
[0043] 또한, OsRALV1 돌연변이체(ravl1), 과발현체(OX83 및 OX44) 및 이들의 야생형(WT) 식물체들을 식물 생장 배지인 0.5×MS(Murashige and Skoog) 배지에서 3일간 키운 후 뿌리를 수확하여 F-kit(Roche)를 사용하여 제조사에서 제공한 실험방법 및 올리베이라 등(Oliveira *et al*., 2002., Plant Physiol., 129:1170-1180)의 논문을 참고하여 암모늄의 함량을 측정하였다. 그 결과, 도 3에 개시한 바와 같이 야생형(WT)에 대비하여 OsRALV1 돌연변이체(ravl1) 뿌리에서 암모늄 함량이 유의하게 감소하였으며, OsRALV1 돌연변이체(ravl1) 및 야생형에 대비하여 본 발명의 OsRALV1 과발현체(OX83 및 OX44) 뿌리에서 암모늄 함량이 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

도면

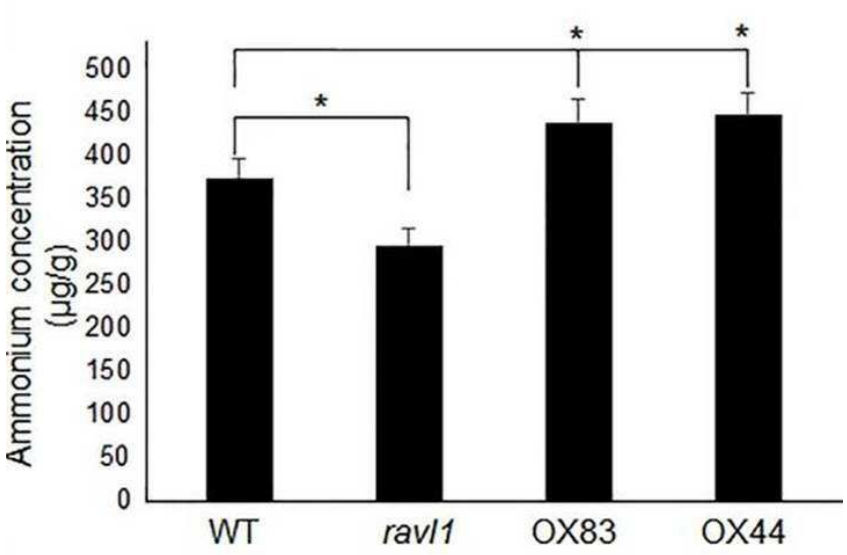
도면1


WT
ravl1
RAVL1 ox
Relative ratio
25
20
15
10
5
0
*
*
*
0
3h

도면2


(A)
Natural 15N abundance (% root total N)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
WT
ravl1
Rev
OX83
OX44
(B)
15N abundance after short-term uptake (% root total N)
**
*
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
WT
ravl1
Rev
OX83
OX44

도면3



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Method for producing transgenic plant with controlled ammonium uptake efficiency using OsRAVL1 transcription factor from Oryza sativa

<130> PN16043

<160> 11

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1203

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

atggagcagg agcaggatga agaggaggag gaggcggagg cctcgccccg cgagatcccc 60

ttcatgacgt cggcggcggc ggcggccacc gcctcatcgt cctccccaac atcggtctcc 120

ccttccgcca ccgcttccgc ggcggcgtcc acgtcggcgt cgggctctcc cttccggtcg 180

agcgacggtg cgggagcgtc ggggagtggc ggcggcggtg gcggcgagga cgtggaggtg 240

atcgagaagg agcacatgtt cgacaaggtg gtgacgccga gcgacgtggg gaagctgaac 300

cggctggtga tcccgaagca gcacgccgag aagtacttcc cgctggactc ggcggcgaac 360

gagaagggcc ttctcctcag cttcgaggac cgaaccggca agctatggcg cttccgctac 420

tcctactgga acagcagcca gagctacgtc atgaccaagg gttggagccg cttcgtcaag 480

gagaagcgcc tcgacgccgg ggacaccgtc tccttctgcc gcggcgccgc ccaggccacc 540

cgcgaccgcc tcttcatcga ctggaagcgc cgcgccgacg tccgcgaccc gcaccgcttc 600

cagcgcctac cgctccccat gacctcgccc tacggcccgt ggggcggcgg cgcgggcgcc 660

ttcttcatgc cgcccgcgcc gcccgccacg ctctacgagc atcaccgctt tcgccagggc 720

ttcgacttcc gcaacatcaa ccccgctgtg ccggcgaggc agctcgtctt cttcggctcc 780

ccagggacgg ggattcatca gcacccgccc ttgccaccgc cgccgtcgcc acctccgcct 840

cctcaccaac tccacattac ggtgcaccac ccgagccccg tagtcaccgc cggcctgccc 900

atggttgtcg actcggtgcc gcacgtcaac aacccagcgg cggcatcgaa gcgcgtccgg 960

ctgttcggag tcaacctcga taacccacat ccggacggcg gccagtcgtc gagcggccac 1020

gacgccaatg cattgtcgct acggatgccc gggtggcaaa ggcctgcacc attgaggtcg 1080

ctggaattgc ctccacacat gccggctggt gcagctggag cggagtcctc tgccgcgtcg 1140

tcgccgtcgt catcgtcgtc atccaagaga gaggcgcact cctcgttgga tctcgatctg 1200

tga 1203

<210> 2

<211> 400

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Glu Gln Glu Gln Asp Glu Glu Glu Glu Glu Ala Glu Ala Ser Pro

1 5 10 15

Arg Glu Ile Pro Phe Met Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ser

20 25 30

Ser Ser Ser Pro Thr Ser Val Ser Pro Ser Ala Thr Ala Ser Ala Ala

35 40 45

Ala Ser Thr Ser Ala Ser Gly Ser Pro Phe Arg Ser Ser Asp Gly Ala

50 55 60

Gly Ala Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Asp Val Glu Val

65 70 75 80

Ile Glu Lys Glu His Met Phe Asp Lys Val Val Thr Pro Ser Asp Val

85 90 95

Gly Lys Leu Asn Arg Leu Val Ile Pro Lys Gln His Ala Glu Lys Tyr

100 105 110

Phe Pro Leu Asp Ser Ala Ala Asn Glu Lys Gly Leu Leu Leu Ser Phe

115 120 125

Glu Asp Arg Thr Gly Lys Leu Trp Arg Phe Arg Tyr Ser Tyr Trp Asn

130 135 140

Ser Ser Gln Ser Tyr Val Met Thr Lys Gly Trp Ser Arg Phe Val Lys

145 150 155 160

Glu Lys Arg Leu Asp Ala Gly Asp Thr Val Ser Phe Cys Arg Gly Ala

165 170 175

Ala Gln Ala Thr Arg Asp Arg Leu Phe Ile Asp Trp Lys Arg Arg Ala

180 185 190

Asp Val Arg Asp Pro His Arg Phe Gln Arg Leu Pro Leu Pro Met Thr

195 200 205

Ser Pro Tyr Gly Pro Trp Gly Gly Gly Ala Gly Ala Phe Phe Met Pro

210 215 220

Pro Ala Pro Pro Ala Thr Leu Tyr Glu His His Arg Phe Arg Gln Gly

225 230 235 240

Phe Asp Phe Arg Asn Ile Asn Pro Ala Val Pro Ala Arg Gln Leu Val

245 250 255

Phe Phe Gly Ser Pro Gly Thr Gly Ile His Gln His Pro Pro Leu Pro

260 265 270

Pro Pro Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro His Gln Leu His Ile Thr Val

275 280 285

His His Pro Ser Pro Val Val Thr Ala Gly Leu Pro Met Val Val Asp

290 295 300

Ser Val Pro His Val Asn Asn Pro Ala Ala Ala Ser Lys Arg Val Arg

305 310 315 320

Leu Phe Gly Val Asn Leu Asp Asn Pro His Pro Asp Gly Gly Gln Ser

325 330 335

Ser Ser Gly His Asp Ala Asn Ala Leu Ser Leu Arg Met Pro Gly Trp

340 345 350

Gln Arg Pro Ala Pro Leu Arg Ser Leu Glu Leu Pro Pro His Met Pro

355 360 365

Ala Gly Ala Ala Gly Ala Glu Ser Ser Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser
370 375 380
Ser Ser Ser Ser Lys Arg Glu Ala His Ser Ser Leu Asp Leu Asp Leu
385 390 395 400

<210> 3

<211> 1491

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 3

atggcaacgt gcgcggatac cctcggcccg ctgctgggca cggcggcggc gaacgcgacg 60

gactacctgt gcaaccagtt cgcggacacg acgtcggccg tggactcgac gtacctgctc 120

ttctcggcgt acctcgtgtt cgccatgcag ctcggcttcg ccatgctctg cgccgggtcc 180

gtccgcgcca agaacaccat gaacatcatg cttaccaacg tgctcgacgc cgccgccggc 240

gcgctcttct actacctctt cggcttcgcc ttcgccttcg gggcgccgtc caacggcttc 300

atcgggaagc acttcttcgg cctcaagcag gtcccacagg tcggcttcga ctacagcttc 360

ttcctcttcc agtgggcctt cgccatcgcc gccgcgggca tcacgtccgg ctccatcgcc 420

gagcggaccc agttcgtggc gtacctcatc tactccgcct tcctcaccgg cttcgtctac 480

ccggtggtgt cccactggat ctggtccgcc gacgggtggg cctcggcttc ccggacgtcg 540

gggtcgctgc tcttcgggtc cggcgtcatc gacttcgccg ggtcaggggt tgtccacatg 600

gtgggcggcg tggccggact ctggggcgcc ctcatcgagg gcccccgcat tgggcggttc 660

gaccacgccg gccgctcggt ggcgctgcgc ggccacagcg cgtcgctcgt cgtgctcggc 720

agcttccttc tgtggttcgg gtggtacggg tttaaccccg gctcgttcct caccatcctc 780

aaatcctacg gcccgcccgg tagcatccac gggcagtggt cggcggtggg acgcaccgcc 840

gtgaccacca ccctcgccgg cagcacggcg gcgctcacga cgctcttcgg gaagaggctc 900

cagacggggc actggaacgt gatcgacgtc tgcaacggcc tcctcggcgg cttcgcggcg 960

atcaccgccg gttgctccgt cgtcgacccg tgggccgcga tcatctgcgg gttcgtctcg 1020

gcgtgggtgc tcatcggcct caacgcgctg gcggcgaggc tcaagttcga cgacccgctc 1080

gaggcggcgc agctgcacgg cgggtgcggc gcgtgggggg tcatcttcac ggcgctgttc 1140

gcgcgcaagg agtacgtgga ccagatcttc ggccagcccg ggcgcccgta cgggctgttc 1200

atgggcggcg gcggccggct gctcggggcg cacatagtgg tcatcctggt catcgcggcg 1260

tgggtgagct tcaccatggc gccgctgttc ctggtgctca acaagctggg cttgctgcgc 1320

atctcggccg aggacgagat ggccggcatg gaccagacgc gccacggcgg gttcgcgtac 1380

gcgtaccacg acgacgacgc gagcggcaag ccggaccgca gcgtcggcgg gttcatgctc 1440

aagtcggcgc acggcacgca ggtcgccgcc gagatgggag gccatgtcta g 1491

<210> 4

<211> 496

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 4

Met Ala Thr Cys Ala Asp Thr Leu Gly Pro Leu Leu Gly Thr Ala Ala
1 5 10 15

Ala Asn Ala Thr Asp Tyr Leu Cys Asn Gln Phe Ala Asp Thr Thr Ser
20 25 30

Ala Val Asp Ser Thr Tyr Leu Leu Phe Ser Ala Tyr Leu Val Phe Ala
35 40 45

Met Gln Leu Gly Phe Ala Met Leu Cys Ala Gly Ser Val Arg Ala Lys
50 55 60

Asn Thr Met Asn Ile Met Leu Thr Asn Val Leu Asp Ala Ala Ala Gly
65 70 75 80

Ala Leu Phe Tyr Tyr Leu Phe Gly Phe Ala Phe Ala Phe Gly Ala Pro
85 90 95

Ser Asn Gly Phe Ile Gly Lys His Phe Phe Gly Leu Lys Gln Val Pro
100 105 110

Gln Val Gly Phe Asp Tyr Ser Phe Phe Leu Phe Gln Trp Ala Phe Ala

115 120 125

Ile Ala Ala Ala Gly Ile Thr Ser Gly Ser Ile Ala Glu Arg Thr Gln
130 135 140

Phe Val Ala Tyr Leu Ile Tyr Ser Ala Phe Leu Thr Gly Phe Val Tyr
145 150 155 160

Pro Val Val Ser His Trp Ile Trp Ser Ala Asp Gly Trp Ala Ser Ala
165 170 175

Ser Arg Thr Ser Gly Ser Leu Leu Phe Gly Ser Gly Val Ile Asp Phe

180 185 190

Ala Gly Ser Gly Val Val His Met Val Gly Gly Val Ala Gly Leu Trp
195 200 205

Gly Ala Leu Ile Glu Gly Pro Arg Ile Gly Arg Phe Asp His Ala Gly
210 215 220

Arg Ser Val Ala Leu Arg Gly His Ser Ala Ser Leu Val Val Leu Gly
225 230 235 240

Ser Phe Leu Leu Trp Phe Gly Trp Tyr Gly Phe Asn Pro Gly Ser Phe
245 250 255

Leu Thr Ile Leu Lys Ser Tyr Gly Pro Pro Gly Ser Ile His Gly Gln

260 265 270

Trp Ser Ala Val Gly Arg Thr Ala Val Thr Thr Thr Leu Ala Gly Ser
275 280 285

Thr Ala Ala Leu Thr Thr Leu Phe Gly Lys Arg Leu Gln Thr Gly His
290 295 300

Trp Asn Val Ile Asp Val Cys Asn Gly Leu Leu Gly Gly Phe Ala Ala
305 310 315 320

Ile Thr Ala Gly Cys Ser Val Val Asp Pro Trp Ala Ala Ile Ile Cys
325 330 335

Gly Phe Val Ser Ala Trp Val Leu Ile Gly Leu Asn Ala Leu Ala Ala

340 345 350

Arg Leu Lys Phe Asp Asp Pro Leu Glu Ala Ala Gln Leu His Gly Gly
355 360 365

Cys Gly Ala Trp Gly Val Ile Phe Thr Ala Leu Phe Ala Arg Lys Glu
370 375 380

Tyr Val Asp Gln Ile Phe Gly Gln Pro Gly Arg Pro Tyr Gly Leu Phe
385 390 395 400

Met Gly Gly Gly Gly Arg Leu Leu Gly Ala His Ile Val Val Ile Leu

405 410 415

Val Ile Ala Ala Trp Val Ser Phe Thr Met Ala Pro Leu Phe Leu Val
420 425 430

Leu Asn Lys Leu Gly Leu Leu Arg Ile Ser Ala Glu Asp Glu Met Ala
435 440 445

Gly Met Asp Gln Thr Arg His Gly Gly Phe Ala Tyr Ala Tyr His Asp
450 455 460

Asp Asp Ala Ser Gly Lys Pro Asp Arg Ser Val Gly Gly Phe Met Leu
465 470 475 480

Lys Ser Ala His Gly Thr Gln Val Ala Ala Glu Met Gly Gly His Val
485 490 495

<210> 5

<211> 2825

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 5

ttcaggcata gtttactcgg gagcagctct tcgggacacg gaagatgcac actggatggc 60

atggaggtca gggggaataa tcgaacatgc gaaatggaaa ttggctagtt gtggagcgtc 120

aactgggagc ttatcttatt actaattagt attaccattg ccattacgtc tgaaacagac 180

ggggctccca tttctttttg atgtcgttag tacagccggc ttcgtttttc ttttctggct 240

gtctcggctg tcacctgtca gtctcgtcag caactggggt gttccgccga cgagggcgcc 300

gtggacttcg cgggctcgcg gcgatggcga tgcgcgctcc aactgcggcg ggtctcaccg 360

ggctgcgtgc gtacgccgat atgcctgccc atctcgggat cggttgtttt tatgcctctc 420

gccgtggtct cgcggtcggc acgatggtcg catcgtcgtg cgtgagctgc ctatcgacag 480

gtggtgtgcc aatgaggaga tacgttgatc tgtggtttcc aaaagtccgg tgcaaaatgg 540

gagatagctg cgatggctta tttacttggg tggtgcacac ttgtacaggt tagcttgaca 600

gttagagaag tacgtactcc tataaaagat ttccaggaat tctcgtgctg gacttttcg 660

cgagcacctg cactttgagc atgaggtgca acggctgatc ttcttcgatg atagacaacg 720

aaaatttcag gtgggtagag aagtaccatg aacgataata ctacctccgt tttttaatat 780

atgacgccgt tgacttttc tcacgtgttt gatcattcgt cttattcaaa aattttatac 840

aaatatataa gatataagtc acacttaaag tattataagt gataaaacaa ctcataacaa 900

aataaattat aattacgtaa atttttttga ataaaataaa tgatcaaaca tgtgagaaaa 960

agtcaacagc gtcatctatt aaaaaacaga gggagtacat gttcaacagg gacgcggttt 1020

ttctacacct aggtgcagct gcacctaggg cgtctgccgc ccgatcgatt aagcgattcg 1080

tgatgatttc tcaggtttct cacatatagc aggtgggtat cgtgtacgtc cgaatcttga 1140

ggcgcatcta gcggtaatga gcctaggtgc agctcaccta ggttcagaaa atactttccc 1200

gttcaaccag caccagccgc ttaaaaaggc agagcgacaa tcattacatg atggtagagt 1260

tacaggaaaa acacaacatt aatcattggg ttcaattcgt agccctgtgt tttggtgaaa 1320

gcttcaaaag tactccatga ataccaaaat ataaggattt ttagaattca attgcatcac 1380

aatataagta gtagtttcca tcattccgat tatctcaatg atttcatagc taatcatatg 1440

cttggaaggg tttagggaat ccaagcaatt caaaattcaa aaaattaact atactaaagt 1500

aaaaaaagac tatgacctaa cctcaatgtt tgttaaacaa tttaggcctt gtttgattcc 1560

acttagaatt attataatct gattattatt aggagtaagc tgaaacaaac agataactta 1620

ttatgataga ttattataat ctataagcca gattactata atctggtaat ccactctaaa 1680

ggtgcttttt ttaattattg gatagctaat aactagcaaa cagctaataa tccagataaa 1740

caaacagcta acaacttatt ctatatcggt ttattataat cttattataa ttcagtttat 1800

agtaatctag ctcaataata tatattataa taatcttaaa ctgaaacaaa cagggcctta 1860

gaaattcata tgttttgaaa tggagatagt accactcaga aagcttgaag gatttcatgt 1920

gttttggtta acatattcat gtgtgtcttt tcgtgcaacc aaaattttct ttagaaacat 1980

ggtgaaccaa ttagatttag aaattataaa atatttccaa gtgttacaag tggaaatata 2040

ataaaaataa tattgttaaa aaagtaaaga aagtttaagt acaaacagag gaggaaatat 2100

aacaagtgct tcactataga caaatataga ggaggacgaa atgtacaaac agtcgttttt 2160

acttttaaa agaaagtaca aaccactgta ttgcgactca ggcgttgttt agatcccaga 2220

aaattttagc caaaaatatc acatcaaatg tttggacaca tgcataaggc attaaatatg 2280

ggattgcgag acaaatcttt tgagtctaat tacgtcatga tttgaccatg tgatgctata 2340

gtaaacattt actaatgaca tattgattag gcttaataaa ttcatctcgc aatttataag 2400

cagaatctat aatttatttt attattagtc tatatttaat acttcaaaat atgtatgcgt 2460

gtacttcaaa aactttatat caaaaaacta aacacagcct ccaggccgca gcctacagta 2520

ggcctataga gagattccac gggattcgat gaactacgac cacgaacagg agggggacaa 2580

atcaacaagc aaatcatagg ggtcccacat ttcagaggta gccaaagatt cactggcagg 2640

tgggcccttc acactttgaa ggaatcaaca acgacacccc ccaagtcatg gattccttct 2700

cgctccctct ccacgtcgcc tataaatccg acgcggccgc tccccactcc acccacagcc 2760

cacacttcca ttgctcctcc cctctcctct acagtctgtg ttgagcgcgc gtcgaggcgg 2820

cgagg 2825

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

cacggttcaa caacatccag 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

tgaagaccct gactgggaag 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

tagacatggc ctcccatctc 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

taagcatgat gttcatggtg 20

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

tcctcaccaa ctccacatta cggt 24

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

cagatcgaga tccaacgagg a 21