

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0002122 (43) 공개일자 2011년01월07일
(51) Int. Cl. <i>C12N 15/82</i> (2006.01) <i>C12N 15/29</i> (2006.01) <i>A01H 1/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0059546 (22) 출원일자 2009년07월01일 심사청구일자 2009년07월01일	(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내 (72) 발명자 정현숙 광주광역시 북구 일곡동 롯데아파트 107동 404호 이창수 광주광역시 남구 진월동 삼익2차 202동 604호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 최규환	

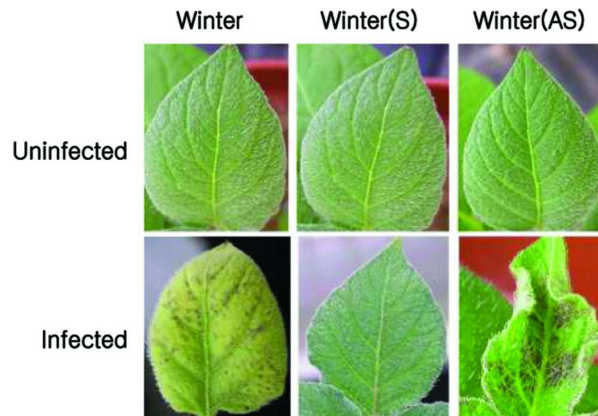
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) R y 유전자로 형질전환된 PVY에 내성이 있는 감자 식물체 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 골든밸리(Golden Valley) 감자 유래의 Ry(Resistance Potato virus Y) 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된, PVY(Potato virus Y)에 내성이 있는 형질전환 감자 식물체 및 상기 재조합 식물 발현 벡터로 감자 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 감자 식물체의 PVY(Potato virus Y)에 대한 내성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

박재영

광주광역시 남구 월산5동 광남연립주택 201호

황인덕

광주광역시 서구 치평동 우미아파트 101동 311호

박윤경

전라남도 장성군 장성읍 유탕리 부강아트빌 2차
1506호

특허청구의 범위

청구항 1

골든밸리(Golden Valley) 감자 유래의 Ry(Resistance Potato virus Y) 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된, PVY(Potato virus Y)에 내성이 있는 감자 식물체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Ry 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 감자 식물체는 윈터밸리(Winter valley) 품종인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 4

골든밸리(Golden Valley) 감자 유래의 Ry(Resistance Potato virus Y) 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 감자 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 감자 식물체의 PVY(Potato virus Y)에 대한 내성을 증가시키는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 Ry 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 감자 식물체는 윈터밸리(Winter valley) 품종인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Ry 유전자로 형질전환된 PVY에 내성이 있는 감자 식물체 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 골든밸리(Golden Valley) 감자 유래의 Ry(Resistance Potato virus Y) 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된, PVY(Potato virus Y)에 내성이 있는 형질전환 감자 식물체 및 상기 재조합 식물 발현 벡터로 감자 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 감자 식물체의 PVY(Potato virus Y)에 대한 내성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 감자는 인체에 필요한 영양소와 비타민을 가장 고루 함유하고 있는 알칼리성 식품이다. 감자는 국내에서만 아니라 전 세계 130여 개국에서 재배되고 있고 그 생산량이 많아 전략적 가치가 높은 작물이다. 또한, 감자는 생 감자를 조리해 먹는 것 외에도 가공식품으로도 널리 쓰이고 있다.

[0003] 감자는 많은 종류의 바이러스에 감염될 수 있고, 다음 세대로 쉽게 전이된다. 그러므로 감자의 바이러스 감염을 피하기는 쉽지 않다.

[0004] PVY(Potato virus Y)는 바이러스 그룹인 포티비리데(potyviriidae)에 속하는데, 감자(Solanum tuberosum)에 쉽게 감염되어 경제적으로 큰 손실을 유발하는 바이러스이다. PVY는 감자가 자랄 수 있는 모든 지역에서 기계, 운반체 또는 환경적 수단으로 쉽게 전이되며, 감자 재배종과 바이러스의 종류에 따라 감자 생산량에 대한 손실량은 30%에서 80%로 다양하게 나타난다.

[0005] 감자 바이러스 군주는 일반적으로 PVY⁰, PVY^C와 PVY^N으로 나뉜다. PVY⁰ 군주는 감자를 생산하는 나라에서 대부분 감염되는 종류이다. 이러한 PVY⁰의 감염으로 감자 식물체는 괴사, 얼룩, 잎의 황변을 나타낸다.

[0006] 한국 감자 재배종은 PVY⁰ 감염에 민감도가 다양하게 나타난다. 단지 골든밸리와 같은 몇몇의 감자 재배종은 PVY⁰

에 내성을 보이거나, 윈터밸리와 같은 몇몇의 감자 재배종은 PVY에 감수성을 보이므로, PVY에 내성을 갖는 감자 품종의 개발이 필요하다.

- [0007] 한국특허등록 제10-0846174호에는 감자에서 발생하는 4종 바이러스의 동시 진단용 프라이머 세트 및 이를 이용한 진단 방법이 개시되어 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명은 PVY에 저항성이 높은 골든밸리(Golden valley) 감자에서 Ry(Resistance Potato virus Y) 유전자를 추출하여 PVY에 저항성이 낮은 윈터밸리(Winter valley) 감자를 형질전환시켰으며, 형질전환된 식물체가 제대로 활성을 가지고 있는지 확인하기 위하여 RT-PCR, 웨스턴 블롯팅 방법을 통하여 CP(PVY coat protein) 양을 체크하였고, ELISA 방법을 통하여 PVY 감염된 감자에서 바이러스의 양을 측정함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 골든밸리(Golden Valley) 감자 유래의 Ry(Resistance Potato virus Y) 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된, PVY(Potato virus Y)에 내성이 있는 형질전환 감자 식물체를 제공한다.
- [0010] 본 발명은 또한, 상기 재조합 식물 발현 벡터로 감자 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 감자 식물체의 PVY(Potato virus Y)에 대한 내성을 증가시키는 방법을 제공한다.

효 과

- [0011] 본 발명은 감자 바이러스 저항성에 관여하는 유전자를 이용하여 이를 분자적 수준에서 조절하여 바이러스 저항성이 증가된 감자 재배종을 육종함으로써 바이러스 질병으로 인한 감자 생산량의 감소를 극복하는데 기여할 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 골든밸리(Golden Valley) 감자 유래의 Ry(Resistance Potato virus Y) 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된, PVY(Potato virus Y)에 내성이 있는 감자 식물체를 제공한다.
- [0013] 골든밸리(Golden valley, *Solanum tuberosum* L. Golden valley)의 Ry 유전자는 3,545 bp로 이루어져 있으며, Ry 단백질을 코딩하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, Ry 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0014] 또한, 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 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 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에 따른 형질전환 감자 식물체는 윈터밸리(Winter valley) 품종일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 윈터밸리 품종은 PVY에 매우 감수성이거나, Ry 유전자의 형질전환에 의해 PVY에 내성이 있는 품종을 제조할 수 있는 것이다.
- [0016] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 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 현미주

사법(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 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 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.

[0017] 본 발명은 또한, 골든밸리(Golden Valley) 감자 유래의 Ry(Resistance Potato virus Y) 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 감자 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 감자 식물체의 PVY(Potato virus Y)에 대한 내성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, Ry 유전자는 Ry 단백질을 코딩하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함하며, 바람직하게는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 감자 식물체는 윈터밸리 (Winter valley) 품종일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0021] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 실시예 1: Ry 유전자 발현 벡터 제작

[0023] 1. Ry 유전자 PCR

[0024] Ry 유전자의 두 개의 절편은 PVY 감염된 골든밸리 감자에서 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하여 주형으로 이용하고, 다음의 프라이머를 이용하여 분리하였다; 정방향 (RyF10) 5'-ATCCCGGGATGGCATCATCTTCTTC-3'(서열번호 2), 역방향 (RyIR) 5'-AAGCATGCAATATCTAGAAATATCTCTTG A-3'(서열번호 3), 정방향 (RyIF) 5'-TTGCATGCTTCTTAAGAGGGAGAA AACAA-3'(서열번호 4), 역방향 (RyR10) 5'-TACCCGGGCTCACATTGT CAACATCTTCAGT-3'(서열번호 5). 20ul PCR 반응물은 0.25 mM dNTPs, 0.5uM 양방향 프라이머, 1x Taq 버퍼, 1ul cDNA 및 1 unit Taq DNA polymerase이 포함되어 있다. Thermocycler를 이용한 PCR 수행 조건은 다음과 같다(변성:94℃, 5분; 증폭 35회 94℃, 30초; 50℃, 1분; 72℃, 5분; 마지막 증폭 72℃, 5분).

[0025] 2. 벡터(pBI121)와 효소절단

[0026] 벡터 pBI121 (≒14.7 kb)은 제한효소 XmaI으로 절단하였다. 벡터의 절단을 위한 반응물 20ul에는 1x NEB buffer 4, 1x BSA, 제한효소 (XmaI)을 첨가하여 반응시켜 절단하였다. 상기 1에서 얻어진 두 개의 Ry 유전자 절편은 XmaI와 SphI으로 절단하였다. 효소 절단을 위한 반응물은 37℃에서 48시간 동안 반응시킨 후, 65℃에서 20분 동안 비활성화시켰다.

[0027] 3. 벡터(pBI121)와 삽입 절편의 연결

[0028] 상기 2에서 절단된 벡터 pBI121와 삽입될 절편은 T4 DNA ligase (New England Biolabs)로 연결하였다. 20ul 연결 반응물에는 1x ligation buffer, T4 DNA 라이게이즈, pBI121벡터와 두 개의 다른 절편을 포함한다.

[0029] 반응물은 16℃에서 24시간동안 반응시켜 pBI121::Ry를 완성시킨 후, 65℃에서 10분 동안 비활성화시킨다.

[0030] Winter(S)는 Ry 유전자가 센스 방향으로 삽입된 것이며, Winter(AS)는 Ry 유전자가 안티센스 방향으로 삽입된 것이므로, Winter(AS)의 제조는 Winter(S)의 제조에서 Ry 유전자의 방향만 바꾸어서 삽입한 것을 제외하고는 동일하게 수행하였다.

[0031] 실시예 2: Ry 유전자 발현 벡터의 윈터밸리 감자로의 형질전환

- [0032] Ry 유전자 발현 벡터의 윈터밸리 감자로의 형질전환은 통상적인 아그로박테리움 매개 형질전환 방법에 따라 수행하였으며, 상기 발현 벡터를 아그로박테리움 GV3101에 먼저 형질전환시킨 후, 이를 윈터밸리 품종에 형질전환하였다.
- [0033] **실시예 3: 형질전환체에서 CP(coat protein) 발현량**
- [0034] PVY에 감염된 형질전환된 감자 잎을 따서 액체질소로 얼린 뒤 막자사발을 통하여 갈아준 뒤, 100mg 정도를 따서 TRIzol reagent (Life Technologies)를 첨가한다. total RNA 분리 방법에 따라서 수행한 후 RNase-free water를 20ul 넣어서 녹인다. 뽑힌 RNA는 spectrophotometer (Bio-Rad, smart Spec TM 300)를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정한다.
- [0035] cDNA는 Superscript II 역전사 효소(Life technologies)를 이용하여 합성한다. total RNA 2ug과 oligo dT (500ug/ml) 1ul 넣고 섞어서 65℃에서 10분간 반응을 시킨 후 얼음에서 빠르게 불활성화를 시킨다. 5X first strand buffer 와 0.1M DTT를 추가한 후 섞어주고, 42℃에서 2 분간 incubation시킨다. Superscript II를 1ul (200 units) 넣어주고 42℃에서 50분간 배양한 후 70℃에서 15분간 열처리를 하여 반응을 멈춰준다. 합성된 cDNA는 -20℃에서 보관한다. RT-PCR 방법은 합성된 cDNA를 이용하였다. CP 유전자는 NCBI에 등록된 EF026074.1를 이용하였으며, 앞쪽은 CPF2로 명명한 정방향 프라이머 5'-GACACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTA-3'(서열번호 6)를 이용하고, 뒤쪽은 CPR2로 명명한 역방향 프라이머 5'-CATTCATCACAGTTGGCATCTCAGT-3'(서열번호 7)를 이용하였다. RT-PCR 반응은 total 20ul로 dNTPs 0.25 mM, 한 쌍의 프라이머 0.5uM, 1x Taq 버퍼, cDNA 1ul 그리고 Taq DNA polymerase 1 unit를 넣었다.
- [0036] 도 1은 Ry 유전자로 형질전환된 윈터밸리 감자에서 PVY의 CP 발현량을 RT-PCR로 확인한 결과이다. 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, PVY를 감염시키지 않은 경우에 형질전환되지 않은 대조구인 윈터밸리 품종인 Winter, 윈터밸리에 Ry 유전자 서열을 센스 방향으로 삽입한 형질전환체인 Winter(S) 및 윈터밸리에 Ry 유전자 서열을 안티센스 방향으로 삽입한 형질전환체인 Winter(AS) 모두 CP 가 발현되지 않았으나, PVY를 감염시킨 경우에는 Winter 및 Winter(AS)에는 CP가 많이 발현되었다는 것을 알 수 있다. 그러나, Winter(S)에는 PVY의 CP가 검출되지 않았는데, 이는 Ry 유전자의 형질전환으로 인해 형질전환 윈터밸리 감자의 PVY 저항성이 증가된 것으로 보여진다.
- [0037] **실시예 4: ELISA test**
- [0038] Agdia Inc 에서 나온 direct double-antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) (Agdia, Inc., Elkhart, IN) 키트를 이용하였으며, 감자로부터 잎을 잘라 GEB (Agdia general extract buffer)를 1:10의 비율로 넣은 후 mesh백을 이용하여 샘플을 채취 후 12,000rpm에서 5분간 원심분리한다. 상층액만 따로 옮겨준 후 정량하고, ELISA 설명법(Agdia, Inc)을 따른다. ELISA Reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 확인한다.
- [0039] 도 2는 Ry 유전자로 형질전환된 윈터밸리 감자에서 PVY 감염 여부를 ELISA로 확인한 결과이다. 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, PVY 감염된 Winter(S)PVY는 PVY로 감염되지 않은 것(Winter(S))과 비교해 보았을 때 흡광도가 거의 비슷한 수준인 것을 알 수 있으며, 다른 감염된 감자와 비교했을 때 CP 양이 현저하게 감소하는 것으로 보아 Ry 유전자로 형질전환된 윈터밸리 감자는 PVY에 대한 저항성이 현저하게 향상되었음을 알 수 있었다.
- [0040] **실시예 5: 형질전환된 Winter valley의 표현형**
- [0041] 골든밸리(Golden valley)의 Ry 유전자가 삽입된 형질전환된 윈터밸리(Winter valley)에 대해 PVY를 감염시킨 것과 감염을 시키지 않은 것의 표현형을 비교하였다. 도 3은 PVY 감염 여부에 따른 형질전환 감자의 표현형을 나타낸 결과이다. PVY에 감염된 감자는 검은 반점 및 황백화, 잎 끝이 말려 들어가는 특징이 있으며, 그 중 가장 주요한 검은 반점이 두드러지게 잘 나타나고 있으나, 형질전환된 감자에서는 그 특징이 보이지 않는다. 즉, Winter(S)는 PVY에 대한 저항성이 향상되었음을 확인할 수 있었다.
- [0042] **실시예 6: 웨스턴 블롯 (Western blot)**

[0043] 감자잎을 잘라 액체질소를 이용하여 막자사발에서 간 후에 단백질을 추출 버퍼를 이용하여 단백질을 추출한다. 이후 Bradford 방법을 이용하여 정량한 후, SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리한다. 분리된 단백질을 transfer 시킨 후 blocking한다. TBS 버퍼를 이용하여 두세 번 씻어준 뒤, 1차 항체 (Plant Viurs Gene Bank에서 얻은 PVY^o-항체)를 처리한다. 다시 TBS 버퍼를 통하여 두세 번 씻어준 뒤 2차 항체를 1시간 처리한다. 반응이 끝나면 TBS로 3번 정도 씻어주고 Western blue(Promega, USA)를 1ml 처리하여 확인한다.

[0044] 도 4는 Ry 유전자로 형질전환된 윈터밸리 감자에서 PVY 감염 여부를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다. 감염되지 않은 감자에서는 PVY의 CP 밴드가 나오지 않았고, 감염된 감자에서 30 kDa보다 약간 작은 위치에서 CP 밴드가 확인이 되었다. 그러나, PVY 감염된 형질전환 Winter(S)는 CP 밴드가 확인되지 않은 것으로 보아 Ry 유전자가 제대로 활성을 가지고 있다는 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 Ry 유전자로 형질전환된 윈터밸리 감자에서 PVY의 CP 발현량을 RT-PCR로 확인한 결과이다. 각 레인에 대한 설명은 하기와 같다: Winter: PVY를 감염시키지 않은 형질전환되지 않은 대조구인 윈터밸리 품종, Winter(S): PVY를 감염시키지 않은 윈터밸리에 Ry 유전자 서열을 센스 방향으로 삽입한 형질전환체, Winter(AS): PVY를 감염시키지 않은 윈터밸리에 Ry 유전자 서열을 안티센스 방향으로 삽입한 형질전환체, WinterPVY: PVY를 감염시킨 형질전환되지 않은 대조구인 윈터밸리 품종, Winter(S)PVY: PVY를 감염시킨 윈터밸리에 Ry 유전자 서열을 센스 방향으로 삽입한 형질전환체, Winter(AS)PVY: PVY를 감염시킨 윈터밸리에 Ry 유전자 서열을 안티센스 방향으로 삽입한 형질전환체.

[0046] 도 2는 Ry 유전자로 형질전환된 윈터밸리 감자에서 PVY 감염 여부를 ELISA로 확인한 결과이다. 각 레인에 대한 설명은 도 1의 설명과 동일하다.

[0047] 도 3은 PVY 감염 여부에 따른 형질전환 감자의 표현형을 나타낸 결과이다. Winter, Winter(S) 및 Winter(AS)에 대한 설명은 도 1의 것과 동일하다.

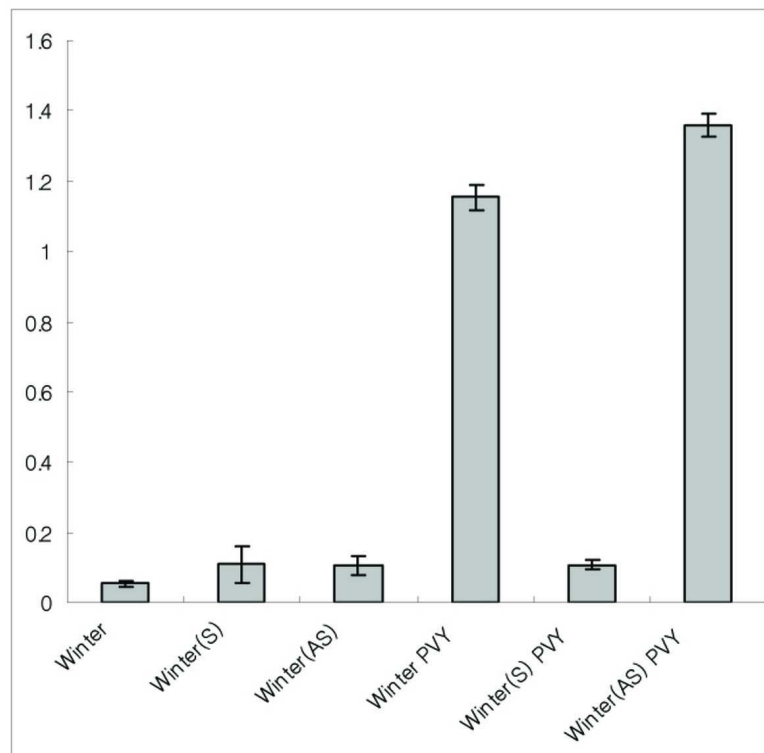
[0048] 도 4는 Ry 유전자로 형질전환된 윈터밸리 감자에서 PVY 감염 여부를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다. 각 레인에 대한 설명은 도 1의 설명과 동일하다.

도면

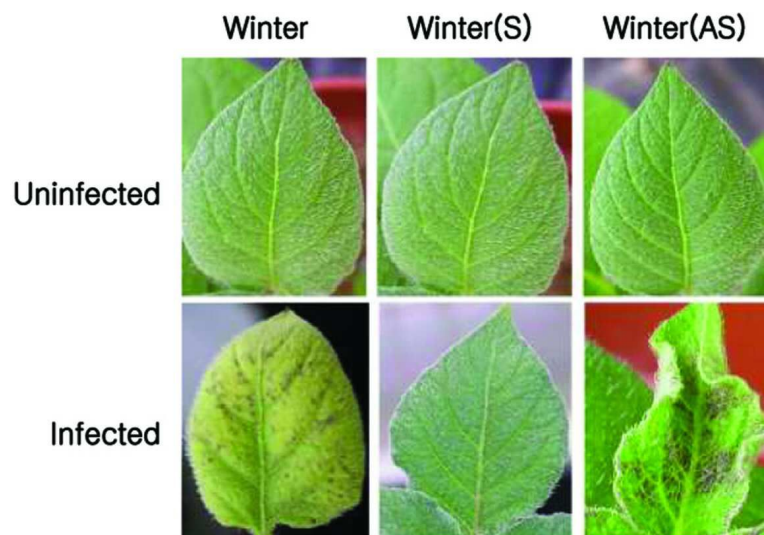
도면1



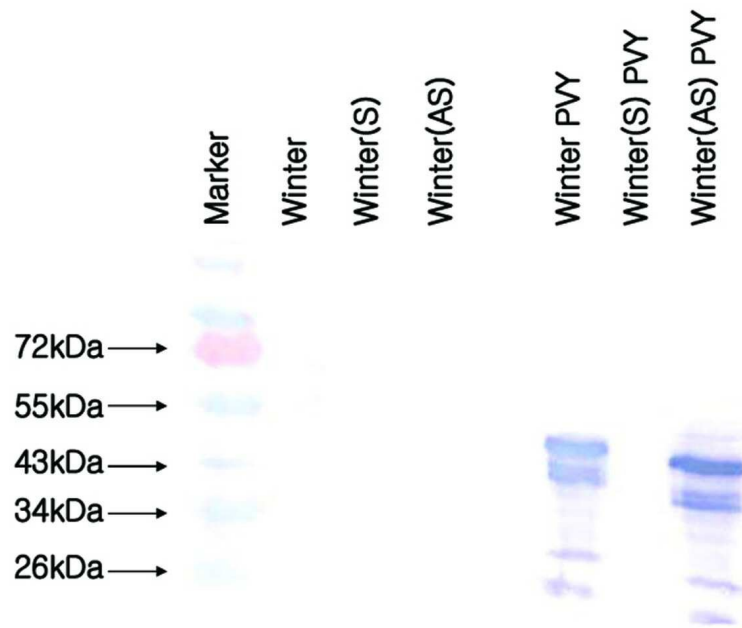
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
 <120> Potato plant resistant to PVY which is transformed with Ry gene
 and production method thereof

<130> PN09116

<160> 7

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 3402

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<400> 1

atggcatcat catcttcttc ttcttctgag agtaattcac agtattcatg tcttcaacgg 60

aagtacaagt acgatgtctt tctaagtttt agaggcatag atactcgag aaattttaca 120

agtcacttgc acaaagcttt gacaaacagg ggaatattca cttttctaga tgatgaaagg	180
ctagagagtg gtgattccct ctcgaaagaa ctagtgaag ctatagaaga gtctcaagtt	240
gctgtaatca tcttctcaaa gaattatgct acgtcgaggt ggtgcttgaa tgaactagt	300
aagattatgg aatgcaagga gaaagaaaat ggacaattag tcataccagt cttctatgat	360
gtggatccat cacatgttcg gaagcaaacg gagagctttg caaaagcctt agccgagcac	420
gaatcaaaga ataaggatga tgttgaagga atgcagaagg tcgaaggatg gaggactgct	480
ctaagtgaag ctgcagatct aaaaggatat gatatccgtg aaaggattga atcacactgt	540
attgaggatc ttgttaatga aatttcgcc aaattatgca cgacttcttt atcttctttg	600
aaagatattg tgggaataga tgctcattta gagaaagtca actaccttct agagatgaca	660
agcaatgatg tccggagggt gtggatctgg ggaatggtgg gagttggtaa aacgagaata	720
gcaagagcta tttttgatit acttctcatct agatttaaat ttgatggtgc ttgtttcctt	780
cccgtcagta atgaaataca ttctcttcaa agtattcttc tctctaaact ggtaggggga	840
aaagaaaatt gtgtgcttga taaggaggac gggaagcacc ggatgggtcg tagacttcag	900
ttgaagaaag ttctagtgtg gctagataac atagatcatg acgaccaact gaaatacctt	960
gcaggggatc ttggttggtt tggcaatggc agcagaatta ttgcaacaac gagagacaag	1020
catttcatat ggaaaaatga tgccgtatat cgtatgacta cactatttga acatgatgca	1080
gttaagtgtg tcaaccaata tgccttcaaa gataaagttc cagataagtg tttcgaggag	1140
atgacgttgg aggtagtacg tcaggtctca ggccttcctt tagccctgga agtgtggggt	1200
tcttccttac atgagaagga tatacatgag tggagaagtg ctgttgatcg aataaagagg	1260
aactctagtt caaaagttgt tgaatatctc aaagtaattt atgatgggtt ggagcgtgaa	1320

gatcaagaga tatttctaga tattgcatgc ttcttaagag ggagaaaaca aaccgaaatc	1380
aagcaaattc ttgagtgcig tcatcttgga gcagattacg gattgagggt gctaattgac	1440
aagtctcttg tgttcatctc tgaagatgtg attcaaatgc atgacttaat acaagagatg	1500
ggaaaatgca tagtgacaaa gcaaaaggaa aggggagaac tcagcagact atggctcact	1560
gaagatttcg aaaaattctt aaaagcaaaa atacaaggga ccaaggcaat cgaagcaatc	1620
tggataccag aaattcaaga cctaagcttt agaaaaaagg ccatgaaaga tgtggaaaag	1680
cttaggatat tatacatcaa aggttttcat acacatgatg gttccaatga tcagtacctt	1740
cccagcaact tgcgttggtt tgactgttgt aaatatcctt gggaatcatt gccagcaaaa	1800
tttgatcctg atgagcttgt tcatcttgat ctccagcaga gttcactgct tcattcatgg	1860
actgcaaaaa agaaatttcc ttccctacgg aggctatata tcagcggctg tgaaaacctc	1920
acgcgaacac caaatttcac gaatatgcca aatttagagt atttgggtct gaaagagtgt	1980
agtaatctta aagaggttca ccattcccta aaagattcca aaaaactcat gaagttaaat	2040
ttgagagatt gtaaaagcct tgagaggttt gaatgtgtca gcggggaatc tcttgaatat	2100
ctatatatac aaggttgctc tagtttagag aaatttccaa ggatcaaggg aaaagggaag	2160
ccggagataa tgattcgtgt gcaattttct gggttaagtg aactaccatc agctatcatt	2220
cagcaccaat ctagtcttac agagctagat ttgagtggca tgaaaaacct tgaaaaactt	2280
aaaagcagca ttggcaagtt gaaacatttg gtgatgctaa aagtgtccta ctgctcaaaa	2340
ctcggtagct tgccagtaga gataggatgat ttagaaaact tagagatact tgaggccaga	2400
tatactctaa tctcacaacc tccgtcttcc atcatccgct tgaacagget taaattattg	2460

acttttgaaa aacaaaaatc agaagtaggc ctggaagatg gagtgactt tgtcttcct 2520

caagtggatg gagggctaca ctcatggaa gatctggatc tcagttactg caatttaata 2580

ggacttcgg aagacattga ctcttatcc tcattgaaaa agtngaattc caggggaaat 2640

aattttgagc atttgcctca aagaatggcc cgacttgggt ctcctcagtt ctggaactta 2700

ttagattgca ggagtcttac acagctgcca gaattaccac ggcaattaga cacagtatac 2760

gccgattgga gcaatgattc gatctgtaa tcgttggttc aaaatatctc atcattccag 2820

catggcatct gtgcttcaga ttccttgta ctaagagtgt ttaccaatga gtggaaaaat 2880

atccaagat ggttcacca taagggaag ggtaaaagt tatcagttgc attgcctgaa 2940

aattggtatg catgtgataa cttcttgggg ttgctgtat gttactctgg ctgcttaata 3000

ggcaccacag ctcaattgtt atgtgataaa aggataccgt gtatcataca gaatcttgc 3060

ttatgcagcc attcagaaga atttcagaa tctgtatta cttcatcaa aaaaaatcca 3120

gaatctattc atttttctt ggtacctctt gctggcttat gggatatac caaggcaaaa 3180

ggaaaaacac caaatgatta taggcacatg gagttatctt tttcgaaga gttgaaggag 3240

tttggacttc gtttgcgtg taaagatgaa tctaagctta aggccttggt tcaaatgagg 3300

gaaaataatg atgaaccaac agaacactgc atcgtgaaaa ggaggggtca atatgatgaa 3360

gccatatgct cttcttctaa gaaacaaagg tcacagctct aa 3402

<210> 2
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RyF10 primer

<400> 2
atccccgggat ggcatcatca tcttcttc 28

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RyIR primer

<400> 3
aagcatgcaa tatctagaaa tatctcttga 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RyIF primer

<400> 4
ttgcatgctt cttaagaggg agaaaacaaa 30

<210> 5
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RyR10 primer

<400> 5
taccgggct cacattgtca acatcttcag t 31

<210> 6
<211> 29

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPF2 primer

<400> 6
gacacatact gtgccgagaa tcaaggcta

29

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPR2 primer

<400> 7
cattcatcac agttggcatc tcagt

25