(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0022553
(43) 공개일자 2010년03월03일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01) *C12P 19/44* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0081117
(22) 출원일자 2008년08월20일
심사청구일자 2008년08월20일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
박연일
대전 유성구 지족동 919 열매마을 7단지 705동 401호
정석원
대전 유성구 노은동 559-10 205호
(74) 대리인
최규환

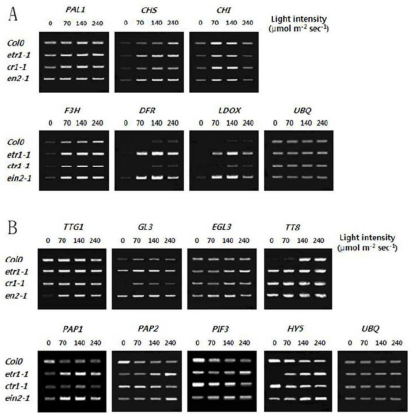
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 안토시아닌 생합성 조절 방법

(57) 요 약

본 발명은 안토시아닌 생합성 조절 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 에틸렌 수용체 유전자 돌연변이 애기장대 또는 에틸렌 신호 전달 관련 유전자 돌연변이 애기장대에 수크로스가 존재하는 배지에서 빛을 조사하여 키우는 단계를 포함하는 애기장대 안토시아닌 생합성 조절 방법; 및 야생형 애기장대에 에틸렌 감지 억제제를 처리한 조건에서 안토시아닌 생합성양이 증가하는 애기장대 안토시아닌 생합성 조절 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

에틸렌 수용체 유전자 돌연변이 애기장대 또는 에틸렌 신호 전달 관련 유전자 돌연변이 애기장대에 수크로스가 존재하는 배지에서 빛을 조사하여 키우는 단계를 포함하는 애기장대 안토시아닌 생합성 조절 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 에틸렌 수용체 유전자 돌연변이는 etr1-1, etr1-2, etr1-3, etr1-4, etr2-1 또는 ers2-1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 에틸렌 신호 전달 관련 유전자 돌연변이는 ein2-1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 빛의 세기에 비례하여 안토시아닌 생합성량이 야생형보다 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 빛은 광도 140 $\mu molm^{-2}s^{-1}$인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 배지 중의 수크로스 농도는 60 mM인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 에틸렌 수용체 유전자 돌연변이체 etr1-1은 *CHS* At5g13930, *DFR* At5g42800, *LDOX* At4g22870, *PAP1, HY5, GL3* 또는 *PIF3* 전사체 발현량이 야생형보다 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 ein2-1은 수크로스가 존재하는 배지에서 빛의 세기에 비례하여 PAP2, PIF3, CHS, DFR 또는 LDOX 전사체 발현양이 야생형보다 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

야생형 애기장대에 에틸렌 감지 억제제를 처리한 조건에서 안토시아닌 생합성양이 증가하는 것을 특징으로 하는 애기장대 안토시아닌 생합성 조절 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 에틸렌 감지 억제제는 100 μM $AgNO_3$인 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 안토시아닌 생합성 조절 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] **1. 당(sugar) 신호 전달과 설탕의 안토시아닌 유전자 전사 조절**

[0003] 당은 생존에 필요한 에너지원으로 사용될 뿐 아니라 여러 대사활동에 중요한 역할을 하고 있다. 또한 호르몬과 같은 기능을 갖고 있어, 식물의 일생 모든 단계에 걸쳐 다양한 메커니즘을 조절 하는 신호 전달 과정의 일차 전

달자로서 역할을 한다(Rook, F., and Bevan M.W. (2003) J. Exp. Bot. 54, 495-501). 당에 의한 신호전달은 광합성, 양분수송 및 저장과 같은 과정을 조절하며 생장을 촉진한다(Rolland et al., (2002) Plant Cell. 14, Suppl, S185-205). 애기장대에서 당의 함량이 증가할수록 발아 후 영양 생장 시기를 연장시켜 기관 및 조직의 발달을 억제하며, 이는 당의 신호전달에 장애가 있는 돌연변이를 선별하는데 중요한 표현형이 된다(Gibson, S.I. (2005) Curr. Opin. Plant Biol. 8, 93-102). 또한 당은 개화와 잎의 노화를 조절하고, 재스몬 산(jasmonic acid), 앱시스 산(abscisic acid), 스트레스와 병원체에 의해 유도되는 많은 유전자 발현을 조절한다. 당의 신호전달은 유전자의 발현 뿐만 아니라 mRNA의 안정성, 단백질의 번역과 안정성을 조절한다(Yanagisawa et al., (2003) Nature 425, 521-525).

[0004] 일부 식물에서 기관에 따라 설탕에 의해 안토시아닌의 생합성이 촉진된다는 사실이 이미 보고 되었다. 예를 들어 *Petunia hybrida*의 화관과 *Vitis vinifera* 세포, *Raphanus sativus* 의 하배축에서 설탕에 의해 *CHS*의 전사가 촉진된다(Hara et al.,(2003) Plant Sci. 164, 259-265). 애기장대는 설탕이 첨가된 배지에서 생장하는 동안 하배축과 잎에서 삼투압 효과와는 상관없이 안토시아닌 함량이 증가한다(Ohto et al., (2001) Plant Physiol. 127, 252-261). 설탕에 의해 β-아밀라아제의 전사 증가와 안토시아닌 함량 증가가 밀접한 상관이 있으며, 낮은 농도의 설탕에 민감하게 반응하는(*high sugar-response, hsr*) 돌연변이에서는 ADP-포도당 피로인산분해효소(ADP-glucose pyrophosphorylase)의 전사가 촉진됨과 동시에 안토시아닌 함량도 증가하였다(Baier *et al.*,(2004) Plant Physiol. 134, 81-91). 애기장대에 삽입된 *Petunia hybrid*의 *CHS*도 설탕에 의해 전사가 촉진되었는데 페튜니아와 애기장대의 *CHS*는 5' 인접 부위에 Suc box를 포함하고 있다. 설탕에 의해 유도되는 스포라민(sporamin)과 β-아밀라아제 유전자 또한 5' 상류(upstream)에 Suc box를 갖고 있으며 포도당도 헥소키나아제(hexokinase)를 경유하지 않는 신호 전달로 *CHS*의 전사를 촉진한다(Xiao *et al.*, (2000) Plant Mol. Biol. 44, 451-461).

[0005] 또한 설탕 운반체 1(*SUCROSE TRANSPORTER 1*; *SUC1*)이 정상적으로 발현하지 않는 돌연변이는 3% 설탕이 첨가된 배지에서 생장했을 때, 안토시아닌 생합성 유전자 발현과 안토시아닌 함량이 야생형보다 적게 축적되었다. 이는 외부에서 처리된 설탕에 의한 안토시아닌 축적에 *SUC1*를 통한 세포 내부로의 설탕의 유입이 필수적임을 시사한다.

[0006] **2. 에틸렌에 의한 안토시아닌 생합성 조절**

[0007] 화학적 신호 전달자로서의 호르몬은 생물이 생장과 발달하는 동안에 일어나는 분자적, 생화학적 그리고 생리적인 변화를 조절하는 역할을 한다. 식물 및 기타 고착 생물의 경우, 빛, 수분, 활용 가능한 영양물질 같은 환경적인 요인에 따라 개체 내부의 생화학적, 생리학적인 조절이야 말로 생존에 가장 필수적이며, 호르몬 역시 환경변화에 대한 조절 인자로서 중요한 역할을 한다.

[0008] 식물 호르몬 중에서 에틸렌은 기체 상태의 간단한 탄화 수소 구조(C_2H_4)로 되어있지만 종자의 발아에서부터 개화, 과일의 숙성, 노화에 이르는 식물 생애 전반의 다양하고 복잡한 생리학적 과정에 영향을 줌으로써 식물의 생장과 발달을 조절한다(Bleecker, A.B., and Kende, H. (2000) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16, 1-18). 식물의 형태를 조절하는 에틸렌의 역할은 암소에서 자라는 동안 에틸렌에 노출된 식물에서 나타나는 삼중 반응(triple response)을 통해 잘 알려져 있다(Guzman, P., and Ecker, J.R. (1990) Plant Cell 2, 513-523). 애기장대에서 볼 수 있는 에틸렌의 삼중반응은 하배축 말단 갈고리(hook)의 구부러짐이 심화되고, 하배축이 두터워지며, 하배축과 뿌리의 생장이 억제되는 현상을 의미한다. 에틸렌은 세균의 히스티딘 인산화효소(histidine kinase, O'Malley et al., (2005) Plant J. 41, 651-659)와 비슷한 수용체들에 의해 인식되어 Raf-유사 인산화효소인 *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1*(*CTR1*)을 억제한다. *CTR1*은 Nramp 금속-이온 운반체와 유사한 *ETHYLENE INSENSITIVE 2*(*EIN2*)에 신호를 전달하고, 이어서 전사 인자인 *EIN3*/*EIN3-like*(*EIL*)이 활성화된다.

[0009] 그러나 에틸렌의 신호 전달 과정에 관여하는 여러 유전자들이 밝혀졌음에도 불구하고 자세한 메커니즘은 알려져 있지 않다. *CTR1*이 Raf와 유사하기 때문에, *CTR1* 이후에 mitogen-activated protein kinase kinase kinase(MAPKKK)와 MAP-kinase(MAPK)의 신호 전달 과정이 연관되어 있는 것으로 제안되었다. 그리고, 에틸렌 수용체들은 히스티딘 인산화효소와 관련이 있으므로 *CTR1* 이외에는 알려져 있지 않지만 two-component 신호 전달 인자의 인산화 매개 신호 전달에 관여하는 반응 조절인자가 관련되어 있을 가능성이 있다. 이런 예상은 에틸렌의 선구물질인 1-아미노 시클로프로판-1-카르복실 산(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; ACC)를 처리했을 때 하배축의 신장이 억제되는 현상이 *CTR1*을 거치지 않는 에틸렌 신호 전달 과정이 애기장대 반응 조절인자 2(*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 2*; *ARR2*)를 통해 가능함을 보여주고 있다(Hass et al., (2004) EMBO J. 23,

3290-3302). 그러나 *ARR2*는 에틸렌보다는 시토키닌에 의한 신호 전달 과정에 우선적으로 관여한다는 보고도 있다(Mason et al., (2005) Plant Cell 17, 3007-3018).

[0010] 에틸렌과 결합함으로 신호 전달 과정을 시작할 수 있는 에틸렌 수용체는 다섯 종류가 있는 것으로 알려져 있으며, 구조적으로 박테리아의 two-component 조절인자와 유사한 형태를 갖추고 있다. 에틸렌이 결합하는 막 관통 부위(transmembrane region)가 감지기(sensor)의 기능을 하며, 기능이 알려지지 않은 GAF 부위 그리고 히스티딘 인산화효소 부위로 구분된다. 5종의 에틸렌 수용체는 계통 분류학적 그리고 염기 서열 분석에 근거하여 두 개의 그룹으로 구분된다(Bleecker, A.B. (1999) Trends Plant Sci. 4, 269-274). *ETHYLENE RESPONSE 1*(*ETR1*)과 *ETHYLENE RESPONSE SENSOR1*(*ERS1*)이 속한 아과(subfamily) I은 히스티딘 인산화효소 활성을 갖고 있지만, *ETR2*, *ERS2*, *EIN4*가 속한 아과 II의 경우 히스티딘 인산화효소 부위는 없고 잠재적인 세린(serine) 인산화효소 활성을 갖고 있다(Moussatche, P., and Klee, H.J. (2004) J. Biol. Chem. 279, 48734-48741). 비록 모든 에틸렌 반응이 일어나기 위해서 히스티딘 인산화효소가 필수적이지는 않지만, 최근에는 *ETR1*의 히스티딘 인산화효소 부위가 제거된 형질전환체가 신호 전달을 수행하지 못함을 보여주어 아과 I의 히스티딘 인산화효소 부위가 에틸렌에 대한 반응을 야기하는 것으로 알려졌다. *ERS1*과 *ERS2*가 카르복실 말단에 수신기(receiver) 부위를 갖고 있지 않는 등 수용체간에 구조가 다양한 것은 에틸렌 신호에 대한 다양한 기능을 맡고 있음을 기대할 수 있다.

[0011] 에틸렌이 안토시아닌 생합성에 영향을 준다는 사실은 콩에서 처음으로 보고 되었는데, 쿠마린 처리에 의해 에틸렌 함량이 증가하였으나 안토시아닌 생합성이 억제되었다(Morgan, P.W., and Powell, R.D. (1970) Plant Physiol. 45, 553-557). Sorghum(*Sorghum vulgare* L.)에서 안토시아닌 생합성은 빛에 의해서 유도되는데, 빛에 의해 안토시아닌의 생합성이 시작할 시점에 식물이 에틸렌에 노출되면 안토시아닌의 생합성을 촉진하고, 축적이 포화된 상태에서 에틸렌은 오히려 축적을 감소시킨다(Craker et al., (1971) Plant Physiol. 48, 349-352). 또한 암소에서 24시간 동안 에틸렌 처리된 적배추(*Brassica oleracea* L.)와 Sorghum을 빛에 노출시키면 에틸렌을 처리하지 않은 대조구에 비해 안토시아닌 생합성이 더욱 촉진 되었지만, 빛에 의해 안토시아닌이 포화된 적배추와 Sorghum을 암소로 옮겨 에틸렌을 처리하였을 때 안토시아닌 함량이 더 빨리 감소하였다(Craker, L.E., and Wetherbee, P.J. (1973) Plant Physiol. 51, 436-438).

[0012] **3. 빛에 의한 안토시아닌 생합성 조절**

[0013] 빛은 안토시아닌 생합성 유전자 발현을 조절하는 가장 중요한 환경적 요소 중 하나이다(Mol et al., (1996) Critical Reviews in Plant Sciences 15, 525-557), 암소에서 자란 Sorghum은 빛을 주었을 때 표피 세포에서 안토시아닌이 축적되었다. 애기장대는 광주기에 적응하였을 때 암조건에서 광조건으로의 전환 시에 가장 많은 안토시아닌 생합성 유전자가 발현되었고(Harmer et al., (2000) Science 290, 2110-2113), 옥수수 전사 조절인자 *PL1/C1 R2R3 MYB* 와 B/R bHLH의 발현은 빛에 의해 유도되어 *CHS, CHI, F3H*등의 전사를 촉진하고 안토시아닌의 함량을 증가시킨다(Tonelli et al.,(1991) Mol. Gen. Genet. 225, 401-410).

[0014] 안토시아닌 생합성을 조절하는 빛의 신호는 광량과 광주기 외에 광질에 의해서도 조절된다. 피토크롬 A(*phy*A)가 발현되지 않는 애기장대의 경우 UV-B, UV-A그리고 청색 광에 의해 유도되는 안토시아닌 축적이 약간 감소하였고, 피토크롬 B 돌연변이는(*phy*B) 축적하지 못하였다(Ahmad, M., and Cashmore, A.R. (1997) Plant J. 25, 421-427). 안토시아닌 생합성을 유도하는 청색 광과 UV에 의한 *CHS*의 발현을 피토크롬이 조절하지만 단지 어린 유식물에 한정되어 있다(Kaiser et al., (1995) Plant Mol. Biol. 28, 219-229). 애기장대에서UV-B, UV-A, 청색 광 그리고 적색 광을 인지하는 크립토크롬과 피토크롬 광수용체를 통한 신호가 복잡한 경로를 거쳐 *CHS* 발현을 촉진한다(Jenkins, G.I. (1997) Plant Cell Environ. 20, 773-778). 여러 광수용체로부터 시작된 신호 전달은 반응 조절인자를 통해 *HY5*를 안정화 시키게 되고 *PIF3*와 함께 핵으로 이동하여 안토시아닌 생합성 유전자 발현을 촉진한다(Shin et al., (2007) Plant J. 49, 981-994).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0015] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로써, 본 발명은 에틸렌 수용체 유전자 돌연변이 애기장대 및 에틸렌 신호 전달 관련 유전자 돌연변이 애기장대를 이용하여 에틸렌 신호 전달 경로의 조절을 통한 안토시아닌 축적과 그에 따른 안토시아닌 생합성 관련 유전자를 구명하고자 한다.

과제 해결수단

[0016] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 에틸렌 수용체 유전자 돌연변이 애기장대 또는 에틸렌 신호 전달 관련 유전자 돌연변이 애기장대에 수크로스가 존재하는 배지에서 빛을 조사하여 키우는 단계를 포함하는 애기장대 안토시아닌 생합성 조절 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 야생형 애기장대에 에틸렌 감지 억제제를 처리한 조건에서 안토시아닌 생합성양이 증가하는 애기장대 안토시아닌 생합성 조절 방법을 제공한다.

효 과

[0018] 본 발명의 애기장대 안토시아닌 생합성 조절 방법을 통하여 에틸렌 신호 전달 경로의 조절을 통한 안토시아닌 축적과 그에 따른 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 정보를 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 에틸렌 수용체 유전자 돌연변이 애기장대 또는 에틸렌 신호 전달 관련 유전자 돌연변이 애기장대에 수크로스가 존재하는 배지에서 빛을 조사하여 키우는 단계를 포함하는 애기장대 안토시아닌 생합성 조절 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에 따른 에틸렌 수용체 유전자 돌연변이는 etr1-1, etr1-2, etr1-3, etr1-4, etr2-1 또는 ers2-1이다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 따른 에틸렌 신호 전달 관련 유전자 돌연변이는 ein2-1이다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 따른 에틸렌 수용체 유전자 돌연변이 애기장대 또는 에틸렌 신호 전달 관련 유전자 돌연변이 애기장대는 빛의 세기에 비례하여 안토시아닌 생합성량이 야생형보다 증가되는 것을 특징으로 한다. 설탕이 함유된 배지에서 자란 식물은 생장 광도가 증가함에 따라 안토시아닌의 함량도 증가하여 70 $\mu molm^{-2}s^{-1}$에 비해 240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$의 광도에서 4배 이상의 안토시아닌이 축적되었다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 따른 빛은 광도 70~240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$이나, 바람직하게는 140 $\mu molm^{-2}s^{-1}$이다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 따른 배지 중의 수크로스 농도는 30~90mM이나, 바람직하게는 60 mM이다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에 따른 에틸렌 수용체 유전자 돌연변이체 etr1-1은 *CHS* At5g13930(*naringenin-chalcone synthase*), *DFR* At5g42800(*dihydroflavonol 4-reductase*), *LDOX* At4g22870(*leucoanthocyanidin dioxygenase*), *PAP1*(*production of anthocyanin pigment 1*), *HY5*(*elongated hypocotyl 5*), *GL3*(*glabra 3*) 또는 *PIF3*(*phytochrome interacting factor 3*) 전사체 발현량이 야생형보다 증가되는 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명의 일 구현예에 따른 ein2-1은 수크로스가 존재하는 배지에서 빛의 세기에 비례하여 *PAP2*(*production of anthocyanin pigment 2*), *PIF3*(*phytochrome interacting factor 3*), *CHS*(*naringenin-chalcone synthase*), *DFR*dihydroflavonol 4-reductase 또는 *LDOX*(*leucoanthocyanidin dioxygenase*) 전사체 발현양이 야생형보다 증가되는 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명은 또한, 야생형 애기장대에 에틸렌 감지 억제제를 처리한 조건에서 안토시아닌 생합성양이 증가하는 것을 특징으로 하는 애기장대 안토시아닌 생합성 조절 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 따른 에틸렌 감지 억제제는 100 μM $AgNO_3$이다. 100 μM $AgNO_3$ 처리로 에틸렌 수용체가 에틸렌을 인식하지 못하게 한 경우 안토시아닌 함량이 대조구에 비해서 6배 이상 증가하였다.

[0029] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0030] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] **1. 식물 재료 및 생장 조건**

[0032] 본 연구에서는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 야생형인 Columbia0 (Col0)과 Wassilewskija(Ws) 그리고, 돌연변이들 혹은 과량발현 형질전환 식물(표 1)을 사용하였다. 애기장대를 4.44 g/L Murashige and Skoog(MS) 염과 0.7 % 한천 분말, 60 mM 설탕 혹은 5.5 mM 포도당을 함유한 pH 5.7의 배지에서 생장시켰다. 모든 종자는 4 ℃에서 암소에서 5일 동안 저온 처리를 거친 뒤, 18시간의 광 조건과 6시간의 암 조건이 반복되는 광주기와 22 ℃의 배양실로 옮겨져 12일간 생장하였다. 필요에 따라 0, 70, 140, 240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$의 광도의 빛을 조사하였다. 필요

시 애기장대를 4.44 g/L MS 염과 0.7 % 한천 분말을 포함한 배지에 엿당, 포도당, 과당, 만니톨, 팔라티노스를 각각 60 mM 씩 첨가하거나, 포도당과 과당을 각각 30 mM 씩 혼합하여 첨가하여 pH 5.7로 맞춘 후 생장시켰다. 또한 에틸렌 생합성을 억제하거나 수용체 기능을 억제하기 위해서 60 mM 설탕이 첨가된 MS 배지에 10 μM ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)와 100 μM $AgNO_3$를 각각 첨가하였다.

[0033] **2. RNA 추출과 RT-PCR, Quantitative Real-Time PCR 분석**

[0034] 0.1 g의 전체 식물체를 액체 질소로 얼려 막자 사발에서 분쇄한 후, RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 추출하였다. cDNA를 합성하기 위하여 추출한 전체 RNA를 1 μg을 취하여 15개의 티민(thymine)이 연결된 올리고-dT 프라이머 그리고, dNTP와 함께 65 ℃ 항온수조에 5분간 단일 가닥으로 만든 뒤, 역전사효소인 SuperScript II Reverse Transcriptase(Invitrogen, USA)를 첨가하여 42 ℃ 항온수조에서 1시간 동안 역전사 시켰다. 총 20 ㎕의 반응 액을 끓는 물에 5분간 두어 역전사효소의 활성을 제거한 후, 핵산 분해 효소가 없는(nuclease-free) 물을 80 ㎕ 첨가하여 1/5로 희석하였다. mRNA 발현 정도를 비교하기 위한 RT-PCR은, 합성된 cDNA 중 2 ㎕를 취하여 주형으로 삼고, 각 유전자와 상보적인 10 pmole의 primer(표 2, 순서대로 서열번호 1~40) 1 ㎕를 Taq-중합효소 혼합물(Taq-polymerase Mixture, Bioneer, Korea)에 첨가하여 중합연쇄반응(PCR)을 수행하였다. PCR은 DNA Engene(Bio-RAD, USA)를 이용하여 각 PCR 산물이 포화되지 않는 조건으로 반복횟수를 결정하였다. 합성된 PCR 산물을 10 $\mu g m\ell^{-1}$ EtBr (ethidium bromide)이 포함된 1 % 아가로스 젤(agarose gel) 에서 전기영동 하여, GELDOC2000 농도계 (densitometer) 와 영상 분석 시스템(Bio-Rad, USA)으로 확인하였다. 정량 실시간 PCR (Quantitative Real-Time PCR)을 수행하기 위해, RT-PCR과 같이 주형이 될 cDNA와 프라이머를 섞어준 후, 10 ㎕의 iQ™SYBR® Green Supermix(Bio-Rad, USA)를 섞어 Exicycler 96(Bioneer, Korea)를 이용하여 threshold cycle(C_T)를 얻었다. 각 유전자의 C_T를 유비퀴틴의 C_T로 나눈 후, 그 역수를 취하여 mRNA 발현 정도를 비교하였다(Shin *et al.,* (2007) Plant J. 49, 981-994).

[0035] 표 1. 본 발명에서 사용된 애기장대 돌연변이체 목록

Mutant name	Gene name	Locus name	Mutagen	Source
etr1-1	*ETHYLENE RESPONSE 1*	AT1G66340	ethylmethane sulfonate	Dr. Shin J-S
etr1-2	*ETHYLENE RESPONSE 1*	AT1G66340	ethylmethane sulfonate	Dr. Binder B-M
etr1-3	*ETHYLENE RESPONSE 1*	AT1G66340	ethylmethane sulfonate	Dr. Shin J-S
etr1-4	*ETHYLENE RESPONSE 1*	AT1G66340	ethylmethane sulfonate	Dr. Binder B-M
etr1-7	*ETHYLENE RESPONSE 1*	AT1G66340	ethylmethane sulfonate	Dr. Binder B-M
ers1-2	*ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1*	AT2G40940	T-DNA insertion	Dr. Binder B-M
ein4	*ETHYLENE INSENSITIVE 3*	AT3G04580	diepoxybutane	Dr. Binder B-M
etr2-1	*ETHYLENE RESPONSE 2*	AT3G23150	unknown	Dr. Binder B-M
ers2-1	*ETHYLENE RESPONSE SENSOR 2*	AT1G04310	T-DNA insertion	Dr. Binder B-M
ctr1-1	*CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1*	AT5G03730	diepoxybutane	Dr. Jo M-J
ein2-1	*ETHYLENE INSENSITIVE 2*	AT5G03280	ethylmethane sulfonate	Dr. Hong S-W
ein3-1	*ETHYLENE-INSENSITIVE 3*	AT3G20770	ethylmethane sulfonate	Dr. Hong S-W
pif3-1	*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3*	AT1G09530	T-DNA insertion	Dr. Choi G
hy5-221	*ELONGATED HYPOCOTYL 5*	AT5G11260	ethylmethane sulfonate	Dr. Choi G
pif3-1/hy5-221	*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3* *ELONGATED HYPOCOTYL 5*	AT1G09530 AT5G11260	cross	Dr. Choi G
PIF3OX	*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3*	AT1G09530	overexpression	Dr. Choi G
HY5OX	*ELONGATED HYPOCOTYL 5*	AT5G11260	overexpression	Dr. Choi G
HY5OX/hy5-221	*ELONGATED HYPOCOTYL 5*	AT5G11260	overexpression	Dr. Choi G

[0036]

[0037]

gin2-1	*HEXOKINASE 1*	AT4G29130	substitution	Dr. Sheen J
PODOX#1	PEROXIDASE		overexpression	Dr. Kwon S-Y
PODOX#5	PEROXIDASE		overexpression	Dr. Kwon S-Y
SALK_132432	*ARR6*	AT5G62920	T-DNA insertion	TAIR
SALK_008866	*ARR6*	AT5G62920	T-DNA insertion	TAIR
CS838370	DNA binding protein	AT2G01280	T-DNA insertion	TAIR
SALK_041004	DNA binding protein	AT2G01280	T-DNA insertion	TAIR
SALK_091654	Ethylene response factor/AP2	AT1G22190	T-DNA insertion	TAIR
SALK_093652	Ethylene response factor/AP2	AT1G22190	T-DNA insertion	TAIR
SALK_110897	Ethylene response factor/AP2	AT1G22190	T-DNA insertion	TAIR
SALK_134024	Ethylene response factor/AP2	AT1G22190	T-DNA insertion	TAIR
SALK_139727	Ethylene response factor/AP2	AT1G22190	T-DNA insertion	TAIR
SALK_144305	Ethylene response factor/AP2	AT1G22190	T-DNA insertion	TAIR
SALK_091212	Ethylene response factor/AP2	AT1G36060	T-DNA insertion	TAIR
SALK_066681	Ethylene response factor/AP2	AT1G36060	T-DNA insertion	TAIR
SALK_070847	Ethylene response factor/AP2	AT1G68840	T-DNA insertion	TAIR
SALK_131565	Ethylene response factor/AP2	AT1G68840	T-DNA insertion	TAIR
SALK_003704	Ethylene response factor/AP2	AT1G72570	T-DNA insertion	TAIR
SALK_023056	Ethylene response factor/AP2	AT1G75490	T-DNA insertion	TAIR
SALK_103990	Ethylene response factor/AP2	AT1G79700	T-DNA insertion	TAIR
SALK_041331	Ethylene response factor/AP2	AT1G79700	T-DNA insertion	TAIR
SALK_046920	Ethylene response factor/AP2	AT1G79700	T-DNA insertion	TAIR
SALK_007015	Ethylene response factor/AP2	AT3G25730	T-DNA insertion	TAIR

[0038]

SALK_075761	Ethylene response factor/AP2	AT3G57600	T-DNA insertion	TAIR
SALK_075764	Ethylene response factor/AP2	AT3G57600	T-DNA insertion	TAIR
SALK_130727	*WRKY56*	AT1G64000	T-DNA insertion	TAIR
SALK_102982	*WRKY59*	AT2G21900	T-DNA insertion	TAIR
SALK_102984	*WRKY59*	AT2G21900	T-DNA insertion	TAIR
SALK_113059	*WRKY59*	AT2G21900	T-DNA insertion	TAIR
SALK_050011	*WRKY71*	AT1G29860	T-DNA insertion	TAIR
SALK_004954	*WRKY75*	AT5G13080	T-DNA insertion	TAIR
SALK_048763	*WRKY75*	AT5G13080	T-DNA insertion	TAIR
SALK_061304	*WRKY75*	AT5G13080	T-DNA insertion	TAIR
SALK_101367	*WRKY75*	AT5G13080	T-DNA insertion	TAIR

[0039] 표 2. 본 발명의 PCR 분석에서 사용한 프라이머 목록

Gene name	Direction	Sequence
ACO	FP	ATGGAGATGAACATTAAGTTTCCAG
	RP	CTGCATCTGTGTGAGCCCTAAGC
ETR1	FP	GCCGGTACCATGGAAGTCTGCAATTGTATTG
	RP	GCCGGATCCTTATCCAGTGAAATTTGAATGTCGGG
CTR1	FP	ATGGAAATGCCCGGTAGAAGATC
	RP	TAGCCTCCGACGAAAGCCTTAACG
EIN2	FP	ATGGAAGCTGAAATTGTGAATGTG
	RP	TAGAGAGTGGGATCTCAGACTGAC
PIF3	FP	TCTGTTTGAGCTTTTCAGGCTCAC
	RP	CTAGTAATTAGTGGTTCCTGCGTC
HY5	FP	AACAAGCGACTAGCTCTTTAGCTG
	RP	GGCTTGCATCAGCATTAGAACCAC
PAL1	FP	GGTGGTGAGACTCTGACCATTG
	RP	TAGCTTTGGAATTGGGACGACC
CHS	FP	AGAACCATGTGCTTCAGGCGG
	RP	CTGTGATCTCAGAGCAGACAAC
CHI	FP	GGCAAATCCTTGAATCGAGTTTC
	RP	CAGAAGATGGAGATTTGATTCTCGG
F3H	FP	ATCGTCTCTAGTCACCTCCA
	RP	GCTCGAGTTAGAGTTCACCA
DFR	FP	GATTTGCCAAACGCCAAGACGC
	RP	CGTTGTGATGAATGGACCGACC
LDOX	FP	GTTTGCAGCTTTTCTACGAGG
	RP	TGAGCAAAAGTCCGTGGAGG
TTG1	FP	TCATCCTCCGGTCACAGAATCG
	RP	GATCCTAACGGATCCATCAGCAG
GL3	FP	TGGTTGTGCAACGCTCATACGGCG
	RP	TCCCAGTTTCATCTCTGGCTTCTG
EGL3	FP	AACGCTGAAACCGCCGATAGC
	RP	TCTCTCCCAATGTTTTCACA
TT8	FP	TCGTCACAATGGGTGCTCAAAC
	RP	CGTAGTCTCTATACCAAGCTC
PAP1	FP	AGACATTACGCCCATTCCTACAACACC
	RP	GTCGCTTCAGGAACCAAAATATCTACC
PAP2	FP	CATGAGTCTTCGTGTTGTAAGTCT
	RP	GTGAGAAACACTAATCAAGTTCAA
SUC1	FP	GGTCATCTCTCATTTGGCTCTG
	RP	GTACGAACCAGCCGCATAACCC
UBQ	FP	CGTTAAGACGTTGACTGGGAAAACT
	RP	GCTTTCACGTTATCAATGGTGTCA

[0040]

[0041]

[0042] **3. 안토시아닌 추출 및 정량**

[0043] 각 조건에서 12일간 자란 식물을 처리구 당 20개의 유식물을 취하여 600 ㎕의 추출 용액(1 % HCl이 포함된 methanol)에 담궈 4 ℃ 암소에서 6시간 동안 보관하였다. 이후 증류수 200 ㎕와 클로로포름 200 ㎕를 순서대로 첨가하고 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 얻어진 상징액을, UV-VIS 분광기(Shimadzu, Japan)를 이용하여 530 ㎚와 657 ㎚에서의 흡광도를 측정하였다. A_{530}-0.33A_{657}의 수식에 대입하여 얻어진 안토시아닌의 양을 추출에 이용된 식물 개체의 수로 나누어 주었다(Shin et al., (2007) Plant J. 49, 981-994).

[0044] **4. 에틸렌 함량 측정**

[0045] 생장 10일이 되는 식물이 담긴 페트리디쉬를 열어 기내의 공기를 환기시키고 셉타 캡(septa cap)이 부착된 페트리디쉬 뚜껑으로 교체하여 1일 동안 식물체에서 발생하는 에틸렌 기체를 포집하였다. 포집된 에틸렌을 1 ㎖ 주사기를 이용하여 뽑아낸 후 가스 크로마토그래피 GC-14B(Shimadzu, Japan)에 주입한지 1.17분에 보이는 피크의 면적을 표준 면적과 비교하여 농도를 측정하였다. 이 값을 포집 시간과 식물 개체의 수로 나누어 주었다.

[0046] **5. 설탕 함량 측정**

[0047] 설탕 함량 측정을 위해 10 개체의 유식물을 1.5 ml 튜브 안에서 액체 질소를 이용하여 분쇄한 후, 수용성 당을 추출하기 위해 300 ㎖의 80 % 에탄올을 첨가하였다. 100 ℃에서 1분간 방치한 후 에탄올 추출물을 다른 시험관에 모았다. 다시 300 ㎖의 80 % 에탄올을 첨가하여 65 ℃에서 30분 동안 방치하였다. 이 과정을 3회 반복하여 추출한 당을 위 시험관에 모았다. 이 에탄올 추출물에 동일 부피의 클로로포름을 첨가하여 엽록소를 제거하였다. 엽록소가 제거된 에탄올 추출물에 1.0 N NaOH를 1:1(v/v)로 첨가하여 5분 동안 끓여서 케토스 당(ketose sugar)을 분해하였다. 이 추출물 1 ml을 취하여 0.5 ml의 레조르시놀 용액(1% (w/v) 에탄올에 녹인 레조르시놀)과 1.5 ml의 30 % HCl을 첨가한 다음 80 ℃에서 10분 동안 반응시켰다. 그 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 설탕 표준곡선으로부터 설탕함량을 산출하였다.

[0048] **6. DNA Microarray 분석**

[0049] Microarray 분석은 워싱톤 주립대학에 의뢰하여 그 결과를 얻었다. 3 % 설탕이 포함된 MS 배지에서 10일간 자란 야생형과 *etr1-1* 의 전체 RNA 30 ㎍에 각각 Cy5와 Cy3를 혼합하여 표지 하였고, 22K cDNA 칩을 이용하여 혼성화 하여 Cy3/Cy5의 신호 강도를 정량 하였다.

[0050] **<실시예 1. 설탕, 빛 그리고 에틸렌 신호전달 경로와 안토시아닌 함량 변화>**

[0051] **1.1. 생장 광도 별 안토시아닌 함량**

[0052] 안토시아닌 생합성은 빛의 색깔(Cominelli et al., (2007) J. Plant Physiol. 165, 886-894) 이외에도 빛의 세기(Kurata et al., (2000). Enzyme Microb. Technol. 26, 621-629)에 의해서도 조절된다. 설탕 의존적 안토시아닌 함량 축적에 빛이 반드시 필요한지 그리고 광도 의존적인 지를 알아보기 위해 야생형 종자를 애기장대의 정상적인 생장과 발달에 최소로 필요로 하는 포도당을 5.5 mM 첨가한 대조구와 60 mM 설탕이 함유된 MS 배지에 파종한 후 각각 0, 70, 140 그리고 240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$의 광도에서 12일간 생장시킨 후 안토시아닌 함량을 측정하였다(도 1). 암소에서 자란 식물에서는 배지에 설탕이 처리되어 있음에도 불구하고 안토시아닌 축적을 볼 수 없었다. 설탕이 없는 배지에서 자란 식물은 빛의 세기에 상관없이 안토시아닌이 전혀 축적되지 않았다. 그러나 설탕이 함유된 배지에서 자란 식물은 생장 광도가 증가함에 따라 안토시아닌의 함량도 증가하여 70 $\mu molm^{-2}s^{-1}$에 비해 240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$의 광도에서 4배 이상의 안토시아닌이 축적되었다. 따라서 안토시아닌 축적에는 설탕과 빛이 동시에 필요하며, 각각 농도와 광도에 포화되는 모습임을 알 수 있었다.

[0053] **1.2. 에틸렌 선구물질과 에틸렌 감지 억제제에 의한 안토시아닌 생합성 변화**

[0054] 안토시아닌 함량에 미치는 에틸렌 효과는 식물에 따라서 촉진되기도 하지만 억제되기도 한다(Kang, B.G., and Burg, S.P. (1972). Plant Physiol. 49, 631-633). 애기장대의 경우 에틸렌이 안토시아닌 축적에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보기 위하여, 에틸렌의 선구물질인 ACC를 MS 배지에 삼중 반응을 유도하기에 충분한 농도인 10 μM(Olmedo et al., (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 13286-13293)을, 에틸렌 수용체와 에틸렌의 결합을 방해하는 $AgNO_3$를 100 μM 첨가(Beyer, Jr. E. (1976) Plant Physiol. 58, 268-271) 하여 에틸렌을 인식하지 못하게 하였다(도 2). 설탕이 첨가되지 않는 MS 배지에서 자란 식물에서는 ACC나 $AgNO_3$의 존재와는 상관없이 안토시아닌 축적을 볼 수 없었다. 그러나 60 mM 설탕이 첨가된 배지에 ACC를 처리하게 되면 대조구에 비해 안토

시아닌 생합성이 10% 억제되었다. 반면에 $AgNO_3$ 처리로 에틸렌 수용체가 에틸렌을 인식하지 못하게 한 경우 안토시아닌 함량이 대조구에 비해서 6배 이상 증가하였다.

[0055] **1.3. 에틸렌 수용체 돌연변이 식물에서 안토시아닌 함량 변화**

[0056] ACC와 $AgNO_3$가 안토시아닌 함량을 상이하게 조절한 위의 결과는 에틸렌 신호전달 경로가 안토시아닌 함량 조절에 관여함을 의미한다. 따라서 에틸렌 수용체 돌연변이체를 이용하여 안토시아닌 함량 변화를 조사하였다. 먼저 에틸렌 삼중 반응에서 우성형질을 나타내는 *ETR1* 돌연변이체들을 조사하였다. *ETR1*에는 *etr1-1* 외에 *etr1-2*(Chen, G.Q., and Bleecker, A.B. (1995) Plant Physiol. 108: 597-607), *etr1-3*(Guzman, P., and Ecker, J.R. (1990). Plant Cell 2, 513-523) 그리고 *etr1-4*(Chang et al., (1993) Science 262, 539-544)의 네 종류의 에틸렌을 인식하지 못하는 돌연변이가 알려져 있다. 이 돌연변이체들은 Ala-31 → Val(*etr1-3*), Ile-62 → Phe(*etr1-4*), Cys-65 → Tyr(*etr1-1*) 그리고 Ala-102 → Thr(*etr1-2*)로 단백질의 막 관통 부위에 위치한 아미노산이 치환되어 있다. 그리고 Trp74가 정지 코돈(stop codon)으로 치환된 점돌연변이체인 *etr1-7*은 막 관통 부위만 남아있지만 야생형과 비슷한 에틸렌 반응성을 보인다(Hua, J., and Meyerowitz, E.M. (1998) Cell 94, 261-271). 이러한 돌연변이들을 60 mM 설탕이 첨가된 MS 배지에서 생장시켜, *ETR1*을 통한 에틸렌 신호가 빛과 설탕 농도 의존적인 안토시아닌 생합성을 조절하는지 알아보았다(도 3). 삼중반응에 있어서 에틸렌에 전혀 반응을 보이지 않는 *etr1-1*과 *etr1-4*(Hall et al., (1999) Plant Physiol. 121, 291-300)는 야생형에 비해 3배 이상 높은 안토시아닌 함량을 보였고, 에틸렌에 약하게 반응하는 *etr1-2*와 *etr1-4*(Hall et al., (1999) Plant Physiol. 121, 291-300)는 야생형에 비해 2배 이상 높은 함량을 보였다. 야생형과 비슷한 정도의 에틸렌 반응성을 보이는 *etr1-7*은 야생형과 비슷한 안토시아닌 함량을 보여주었다.

[0057] *ETR1*외의 다른 에틸렌 수용체들도 안토시아닌 생합성에 관여하는지 알아보았다(도 4). Wassilewskija 2(WS2)는 *ers1-2*의 야생형이다. 에틸렌이 있더라도 전혀 삼중 반응을 보이지 않는 *etr1-1*, *etr2-1*(Sakai et al.,(1998) Plant Cell Physiol. 39, 1232-1239), *ers2-1*(Hua, J., and Meyerowitz, E.M. (1998) Cell 94, 261-271)는 야생형에 비해 6배 이상 높은 안토시아닌 함량을 보였다. 그러나 돌연변이화 되었더라도 에틸렌을 인식하는 *ers1-2*와 *ein4*에서는 다른 수용체 돌연변이체에 비하여 적은 안토시아닌을 축적하였다. 즉 *ETR1* 돌연변이체들 간에도 에틸렌에 대한 반응 정도에 따라 안토시아닌 함량 또한 달랐다. 이로써 에틸렌 반응성과 안토시아닌 함량간에는 반비례 관계가 있음을 알 수 있었다.

[0058] **1.4. 에틸렌 신호 전달 관련 돌연변이체에서 안토시아닌 함량 비교**

[0059] 에틸렌 수용체와 하위 단계 신호 전달 관련 돌연변이체에서 안토시아닌 축적이 야생형에서와 같이 설탕 및 엿당 특이성을 보이는지를 조사하고자 하였다. 야생형을 포함한 돌연변이 종자들을 설탕, 엿당, 포도당, 과당, 만니톨, 팔라티노스 등 다양한 종류의 단당류와 이당류가 각각 60 mM 포함된 MS 배지에서 12일간 생장시킨 후 안토시아닌을 추출하였다(도 5). *etr1-1*과 *ein2-1*은 설탕과 엿당이 첨가된 식물에서 안토시아닌의 축적이 야생형, *ctr1-1* 및 *ein3-1*에 비해 6배 이상 높아진 반면, 만니톨과 팔라티노스를 처리한 식물의 경우 야생형과 모든 돌연변이주에서 안토시아닌이 전혀 축적되지 않았다. 포도당의 처리는 대조구에 비해 *etr1-1*과 *ein2-1*에서 안토시아닌이 소량 축적되었지만, 설탕과 엿당의 처리와 비교할 때 현저히 낮은 안토시아닌이 축적되었다. 또한 과당, 포도당과 과당을 섞어 처리하였을 때도 상대적으로 미미한 안토시아닌 함량을 보였으며, 설탕의 이성질체인 팔라티노스는 안토시아닌 생합성에 전혀 영향을 미치지 못하였다. 이러한 결과는 빛과 설탕 및 엿당에 의해 축적되는 안토시아닌이 에틸렌 신호전달 경로에 의해서 억제(repression) 되고 있음을 의미한다. 그러나 안토시아닌 생합성을 억제하는 에틸렌 신호전달 경로는 삼중반응과 달리 *EIN3*를 거치지 않으며, *EIN2* 하위단계의 전달자에 의해서 매개됨을 알 수 있다.

[0060] **1.5. 에틸렌 신호 전달 관련 돌연변이체에서 빛의 세기에 따른 안토시아닌 함량 비교**

[0061] 에틸렌에 의한 안토시아닌 생합성 억제가 빛의 세기에 의해서 조절되는 지를 알아보고자 에틸렌 신호 전달 관련 돌연변이주에서 생장광도에 따른 안토시아닌 함량 변화를 측정하였다. 야생형을 포함한 에틸렌 신호전달 관련 돌연변이 종자들을 60 mM 설탕이 첨가된 MS 배지에 파종하여 70, 140 그리고 240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$의 광도에서 12일간 생장시켰다(도 6A). 설탕이 없는 배지에서 자란 식물들은 광도가 높아짐에 따라 광저해로 인한 생장 억제와 엽록소의 감소를 볼 수 있었다. 반면 설탕이 첨가된 배지에서 자란 식물들은 생장과 발달이 양호했지만 광도가 높아질수록 엽록소 함량의 감소를 보였고, 안토시아닌 축적에 의해서 점점 더 진한 붉은 빛을 보였다. *etr1-1*과 *ein2-1*은 빛의 세기에 비례해서 안토시아닌 함량이 증가하였으나, 야생형, *ctr1-1*, *ein3-1*에서는 빛의 세기에

비례하였으나 *etr1-1*과 *ein2-1*에 비하여 현저히 낮았다(도 6B). 이러한 결과는 에틸렌에 의한 안토시아닌 합성 억제능이 일정하지 않고, 빛의 세기에 의해서 조절됨을 의미한다.

[0062] **<실시예 2. 당, 빛, 그리고 에틸렌에 의한 안토시아닌 생합성 관련 유전자 조절>**

[0063] **2.1. 에틸렌 신호 전달 경로 돌연변이 식물에서 안토시아닌 생합성 관련 유전자 발현**

[0064] 설탕과 빛은 안토시아닌 축적을 촉진하지만 에틸렌은 억제하는 길항작용(antagonism)을 보였다. 그런데 안토시아닌 함량은 생합성 관련 유전자의 전사수준에 의해서 조절(Cominelli et al., (2007) J. Plant Physiol. 165, 886-894)되므로 안토시아닌 생합성에 관련된 유전자와 조절 유전자의 발현을 조사하고자 DNA microarray 분석을 실시하였다. 야생형과 *etr1-1* 돌연변이주 종자를 60 mM 설탕이 첨가된 MS 배지에 파종 후 140 μmolm^{-2}s^{-1}의 광도에서 12일간 자란 식물의 전체 RNA를 가지고 Affymetrix DNA microarray(22K)를 수행하였다. *etr1-1*에서 안토시아닌 생합성에 관여하는 유전자(Shirley et al., (1992) Plant Cell 4, 333-347)들이 대체로 같거나 증가하였다(표 3). 애기장대에서 발현하는 5개의 *CHS(CHANLCONE SYNTHEASE)* 중에서 At5g13930는 야생형에 비해 *etr1-1*에서 2.45배 많이 발현하였다. *CHI(CHANLCONE ISOMERASE)* 중 At3g55120는 1.6배, *F3H*(FLAVANONE 3-HYDROXYLASE F3H) 중 At3g51240는 1.74배, *F3'H*(FLAVONOID 3'-HYDROXYLASE)는 1.56배, *DFR*(DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE) 중 At5g42800는 14.62배 증가하여 가장 큰 차이를 보였다. *LDOX*(*LEUCOANTHOCYANIDIN OXYGENASE*) 중 At4g22870는 9.36배, UDP-포도당:플라보노이드 3-*O*-포도당 전달효소(UDP-glucose:flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase; UF3GT) 중 At5g54060는 *etr1-1*에서 8.01배 많이 발현하였다. 안토시아닌 생합성 유전자를 조절한다고 알려진 전사 조절인자 중 *TT8*은 야생형에 비해 *etr1-1*에서 3.85배, *PAP1*은 3.4배 많이 발현하였다.

[0065] DNA microarray 결과를 설탕이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에서 자란 야생종과 에틸렌 신호 전달 경로 돌연변이주에서 안토시아닌 생합성 유전자 발현을 RT-PCR 기법으로 확인하였다(도 7A). 이때 유비퀴틴(*UBIQUITIN*; *UBQ*)을 양적인 기준으로 삼아 동량의 cDNA를 주형으로 사용하였다. 야생종에서 페닐알라닌 암모니아 분해효소(*PHENYLALANINE AMMONIALYASE*; *PAL*)을 제외한 *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *LDOX*는 광도가 높아짐에 따라 발현량이 증가하였다. 그러나 *CHI*는 240 μmolm^{-2}s^{-1}에서 발현이 억제되었다. 이는 빛의 세기에 의해 안토시아닌 생합성 유전자의 발현이 조절 되고 있음을 의미한다. 빛의 세기에 의존하는 안토시아닌 생합성 관련 유전자들의 발현은 에틸렌 신호전달 경로 돌연변이 식물에서도 영향을 받았다. 즉, *etr1-1*과 *ein2-1*의 경우 Col0와 *ctr1-1*에 비해 *CHS*, *F3H*, *DFR LDOX*가 빛에 의해 더 많은 양이 발현되었다.

[0066] 안토시아닌 생합성 유전자의 발현을 조절하는 전사 인자 그리고 광수용체를 통해 안토시아닌 생합성을 조절하는 전사 인자 *PIF3*(*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3*)와 *HY5*(*ELONGATED HYPOCOTYL 5*)(Shin et al., (2007) Plant J. 49, 981-994)의 발현 정도를 RT-PCR을 이용하여 비교하였다(도 7B). *TTG1, GL3, EGL3, PAP1*은 광도가 높아짐에 따라 유전자의 발현이 증가하거나 증가 후 감소하였으며, Col0와 *ctr1-1*에 비해 *etr1-1*과 *ein2-1*에서의 발현량이 상대적으로 많았다. *TT8*은 설탕 배지에서 Col0만이 빛에 의해 발현이 유도되었으며, *PAP2*의 경우 설탕 배지에서 Col0와 *ctr1-1*은 빛에 의해 발현이 억제되었으나 *etr1-1*과 *ein2-1*은 증가하는 차이를 보였다. *PIF3*는 설탕이 없는 배지에서 야생형과 모든 돌연변이들이 광도가 높아질수록 발현량이 감소하였으나 Col0와 *ctr1-1*에서 더 많이 발현되었다. 그러나 설탕 배지에서는 Col0와 *ctr1-1*의 발현 양상은 변함이 없으나 *etr1-1*과 *ein2-1*의 발현량은 광도에 따라 증가하여 240 μmolm^{-2}s^{-1}의 광도에서는 상대적으로 많이 발현되었다. *HY5*의 경우 설탕이 없을 때 Col0와 돌연변이주 모두 빛에 의해 발현이 유도가 되었고, 설탕이 있더라도 *etr1-1*과 *ein2-1*은 발현 양상에는 변함이 없었지만 Col0와 *ctr1-1*은 빛에 의해 오히려 감소하였다.

[0067] 당 특이성과 에틸렌 신호전달 경로를 조사하고자 본 실험 조건에서 현저하게 변화하는 안토시아닌 생합성 유전자의 발현 정도를 quantitative RT-PCR 기법을 이용하여 전사 수준에서 비교하였다(도 8). 안토시아닌의 축적과 비례하여 주로 설탕과 엿당이 첨가되었을 때 *etr1-1*과 *ein2-1*에서 *CHS*, *DFR* 그리고 *LDOX* 유전자 발현이 야생형에 비해 최소 2배 이상 집적되었다. 반면 *ctr1-1* 그리고 *ein3-1*에서 동 유전자 발현은 야생형과 유사하였다.

[0068] 이상의 결과로부터 안토시아닌 축적은 유전자 발현 정도와 밀접한 양의 상관관계를 가짐을 알 수 있으며, 이미 알려진 바와 같이(Shin et.al., (2007). Plant J. 49, 981-994) 전사수준에서 조절됨을 알 수 있었다. 또한 *etr1-1*과 *ein2-1*에서의 안토시아닌 생합성 관련 유전자 발현 증가는 에틸렌 신호가 안토시아닌 생합성 억제를 전사 수준에서 조절함을 시사한다.

[0069] 표 3. 애기장대 야생형과 etr1-1 돌연변이체에서 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 발현

	Description	Probe ID[a]	AGI code[b]	col	etr1-1	Fold[c]
Anthocyanin Biosynthesis	*PHENYLALANINE AMMONIALYASE (PAL)*	245690_at	At5g04230	71.97±6.00	53.60±2.00	0.74
		251084_at	At3g53260	1030.23±129.47	1079.03±58.35	1.05
		259149_at	At3g10340	72.30±9.41	67.63±1.88	0.94
		263845_at	At2g37040	566.03±84.05	618.10±61.36	1.09
	CINNAMATE 4-HYDROXYLASE (C4H)	267470_at	At2g30490	583.13±19.55	818.23±36.56	1.40
	4-COUMAROYL CoA LIGASE (4CL)	247380_at	At5g63380	97.47±3.64	94.30±2.58	0.97
		249540_at	At5g38120	13.27±0.61	13.43±5.74	1.01
		252293_at	At3g48090	2682.40±99.02	1589.13±107.38	0.59
		254600_at	At4g19010	39.80±6.35	40.00±3.65	1.01
		255263_at	At4g05160	442.97±16.78	489.87±17.71	1.11
		256186_at	At1g51680	542.20±92.01	1003.83±71.38	1.85
		258037_at	At3g21230	52.47±5.27	81.17±6.09	1.55
		258047_at	At3g21240	207.77±30.39	204.57±4.76	0.98
		261096_at	At1g62940	8.67±4.35	7.23±2.73	0.83
		261907_at	At1g65060	51.27±5.65	79.03±5.29	1.54

[0070]

CHALCONE SYNTHASE (CHS)	250207_at	At5g13930	779.90±104.24	1914.00±252.26	2.45
	253222_at	At4g34850	2.13±0.88	6.13±4.83	2.88
	255703_at	At4g00040	43.77±3.16	48.30±1.19	1.10
	264175_at	At1g02050	13.90±3.75	12.27±5.21	0.88
CHALCONE ISOMERASE (CHI)	247133_at	At5g66220	11.60±5.44	7.97±1.86	0.69
	250794_at	At5g05270	88.53±21.44	91.53±6.64	1.03
	261827_at	At3g55120	162.20±16.29	244.27±21.02	1.50
	260082_at	At1g53520	194.63±14.53	199.77±9.07	1.03
FLAVANONE 3-HYDROXYLASE (F3H)	249754_at	At5g24530	143.07±13.73	115.33±13.30	0.81
	252123_at	At3g51240	191.40±20.92	332.90±20.79	1.74
	254974_at	At4g10490	4.13±1.59	7.37±2.82	1.78
	256892_at	At3g19000	298.33±49.46	237.67±7.34	0.80
	263135_at	At1g78550	50.10±4.82	47.77±4.49	0.95
FLAVONOID 3' -HYDROXYLASE (F3' H)	250558_at	At5g07990	31.80±2.52	49.60±8.38	1.56
DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE (DFR)	249215_at	At5g42800	24.47±8.62	357.77±58.93	14.62
	253195_at	At4g35420	24.30±4.00	30.97±1.88	1.27
	255730_at	At1g25460	3.03±1.37	12.07±2.64	3.98
	260260_at	At1g68540	44.53±7.10	42.07±1.30	0.94

[0071]

LEUCOANTHOCYANIDIN OXYGENASE	254283_s_at	At4g22870	25.67±2.85	240.17±56.22	9.36
(*LDOX*)	267147_at	At2g38240	26.57±13.05	23.87±4.88	0.90
FLAVONOL SYNTHASE (*FLS*)	247354_at	At5g63590	48.97±2.82	47.67±10.27	0.97
	247358_at	At5g63580	6.27±1.90	3.20±0.72	0.51
	250633_at	At5g08640	171.87±12.19	240.17±43.40	1.40
	256922_at	At3g19010	358.50±27.34	306.93±7.41	0.86
	262416_at	At1g49390	11.97±3.85	9.20±5.60	0.77
	266875_at	At2g44800	3.73±1.84	6.00±3.25	1.61
FLAVONOID 3' 5' -HYDROXYLASE	254834_at	At4g12300	74.33±3.96	84.70±9.28	1.14
(*F3' 5' H*)	254835_s_at	At4g12310	228.07±52.18	161.17±35.10	0.71
	254836_at	At4g12330	21.10±1.31	14.43±4.69	0.68
UDP-GLUCOSE:FLAVONOID	248185_at	At5g54060	13.17±5.73	105.40±17.50	8.01
3-O-GLUCOSYLTRANSFERASE	248209_at	At5g53990	1.50±0.17	2.37±0.90	1.58
(*UF3GT*)	248211_at	At5g54010	4.07±2.80	2.93±1.39	0.72
	255622_at	At4g01070	68.53±9.61	182.53±24.84	2.66
	256953_at	At3g29630	12.30±0.90	14.93±8.37	1.21
	261046_at	At1g01390	10.73±4.95	9.10±0.32	0.85
	261048_at	At1g01420	27.67±9.37	26.43±5.62	0.96
	265929_s_at	At2g18570	71.87±4.73	63.60±9.48	0.88
	266843_s_at	At2g29730	49.60±2.20	65.03±7.87	1.33

[0072]

	Transcription factors					
266669_at	*TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1)*	249739_at	At5g24520	214.07±7.90	153.80±2.65	0.72
	ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3)	260242_at	At1g63650	8.77±2.44	24.27±2.15	2.77
	TRANSPARENT TESTA 8 (TT8)	255056_at	At4g09820	1.03±0.12	3.70±1.28	3.58
	PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1 (PAP1)	245628_at	At1g66650	10.77±4.67	36.57±7.60	3.40
	PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 2 (PAP2)	260140_at	At1g66390	2.40±0.47	1.23±0.20	0.51
	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3)	264510_at	At1g09530	135.07±17.10	43.47±5.64	0.32
	ELONGATION HYPOCOTYL 5 (HY5)	250420_at	At5g11260	53.63±8.93	40.73±10.42	0.76
	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 2 (ARR2)	245477_at	At4g16110	35.27±8.47	44.17±7.04	1.25
	WRKY75	245976_at	At5g13080	21.67±2.89	4.83±3.22	0.22

a Describes name of probe set on Affymetrix GeneChip 22K.
b *Arabidopsis* Genome Initiative number.
c Relative gene transcript level compared with the same gene in wild-type plants.

[0073]

도면의 간단한 설명

[0074] **도 1**은 애기장대 야생형(Col0)에서 광도에 따른 안토시아닌 축적 효과를 나타내는 그림이다. 식물은 60 mM 수크로스가 있는 MS 배지(채워진 사각형) 또는 수크로스가 없는 MS배지(빈 사각형)에서 다양한 광도(0, 70, 140 및 240 μmol$m^{-2}s^{-1}$) 조건으로 12일 동안 키운 것이다.

[0075] **도 2**는 애기장대 야생형(Col0)에서 에틸렌 선구물질(ACC) 및 에틸렌 감지 억제제($AgNO_3$)에 따른 안토시아닌 축적 효과를 나타내는 그림이다. 식물은 10 μM ACC 또는 100 μM $AgNO_3$을 포함하는 60 mM 수크로스가 있는 MS 배지(검은색 막대) 또는 수크로스가 없는 MS배지(회색 막대)에서 광도 140 mol $m^{-2}s^{-1}$인 조건으로 12일 동안 키웠다.

[0076] **도 3**은 애기장대 *ETR1* 돌연변이체에서 안토시아닌 축적을 나타낸다. 야생형(Col0), 에틸렌 돌연변이체(*etr1-1*, *etr1-2*, *etr1-3* 및 *etr1-4*) 및 야생형과 비슷한 정도의 에틸렌 반응성을 보이는 *etr1-7*은 60 mM 수크로스를 포함하는 MS 배지 또는 수크로스를 포함하지 않는 MS 배지에서 광도 140 mol $m^{-2}s^{-1}$인 조건으로 12일 동안 키웠다.

[0077] **도 4**는 애기장대 에틸렌 수용체 돌연변이에서 안토시아닌 생합성을 나타내는 그림이다. 야생형(Col0 및 Ws), 에틸렌 수용체 돌연변이(*etr1-1*, *etr2-1*, *ers2-1*) 및 야생형과 비슷한 돌연변이(*ers1-2* 및 *ein4*)은 60 mM 수크로스가 있는 MS 배지(검은색 막대) 또는 수크로스가 없는 MS배지(회색 막대)에서 광도 140 mol $m^{-2}s^{-1}$인 조건으로 12일 동안 키웠다.

[0078] **도 5**는 애기장대 에틸렌 신호 전달 관련 돌연변이체에서 안토시아닌 축적에서 다양한 설탕의 효과를 나타내는 그림이다. 야생형(Col0), 에틸렌 수용체 돌연변이(*etr1-1*), 연속성 에틸렌 반응 및 *ETR1* 상호성 Raf-유사 키나아제 돌연변이(*ctr1-1*), *CTR1* 하단 단백질 *EIN2* 및 *EIN3* 에틸렌 돌연변이(*ein2-1* 및 *ein3-1*)는 수크로스(Suc), 말토스(Mal), 글루코스(Glc), 프럭토스(Fruc),만니톨(Man) 및 팔라티노스 (Pal)와 같은 60 mM 당을 포함하는 MS 배지 또는 30 mM 글루코스 + 30 mM 프럭토스 혼합물을 포함하는 MS 배지에서 광도 140 mol $m^{-2}s^{-1}$인 조건으로 12일 동안 키웠다.

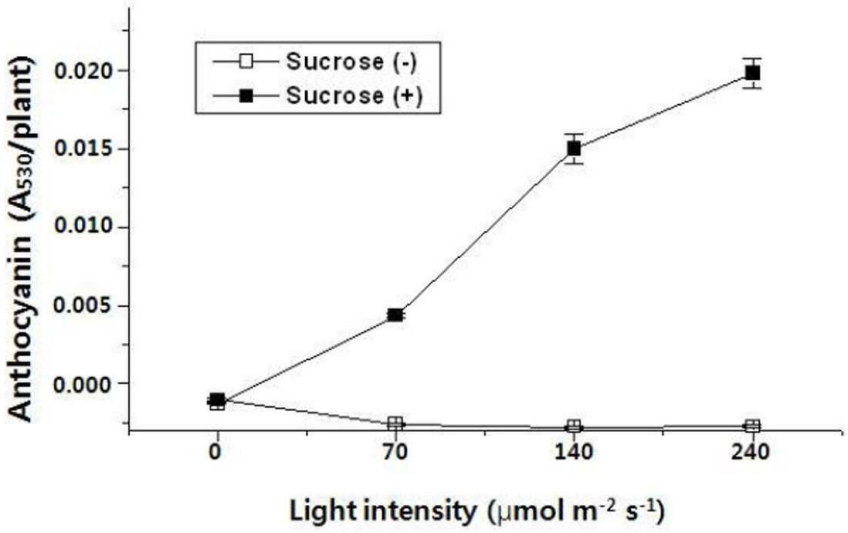
[0079] **도 6**은 에틸렌 신호 전달 관련 애기장대 돌연변이체에서 안토시아닌 축적에서 광도의 효과를 나타내는 그림이다. (A) 야생형(Col0), 에틸렌 수용체 *ETR1* 돌연변이(*etr1-1*), 연속성 에틸렌 반응 및 *ETR1* 상호성 Raf-유사 키나아제 돌연변이(*ctr1-1*), *CTR1* 하단 단백질 *EIN2* 및 *EIN3* 에틸렌 돌연변이(*ein2-1* 및 *ein3-1*)는 60 mM 수크로스를 포함하는 MS 배지에서 다양한 광도(0, 70, 140 및 240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$) 조건으로 12일 동안 키웠다. 축적된 안토시아닌은 붉은 색과 보라색으로 나타내었다. (B) 안토시아닌 축적은 식물마다 530 nm에서 식물 추출물의 흡광도를 측정하였다.

[0080] **도 7**은 야생형 애기장대 및 에틸렌 신호 전달 관련 돌연변이체의 안토시아닌 생합성(A) 및 조절(B) 유전자의 전사체 발현양에서 빛의 효과를 나타내는 그림이다. 야생형(Col0), 에틸렌 수용체 돌연변이(*etr1-1*), 연속성 에틸렌 반응 및 *ETR1* 상호성 Raf-유사 키나아제 돌연변이(*ctr1-1*), *CTR1* 하단 단백질 *EIN2* 및 *EIN3* 에틸렌 돌연변이(*ein2-1* 및 *ein3-1*)는 60 mM 수크로스가 포함된 MS 배지에서 다양한 광도(0, 70. 140 및 240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$) 조건으로 12일 동안 키웠다. 각각의 식물체로부터 총 RNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하였다.

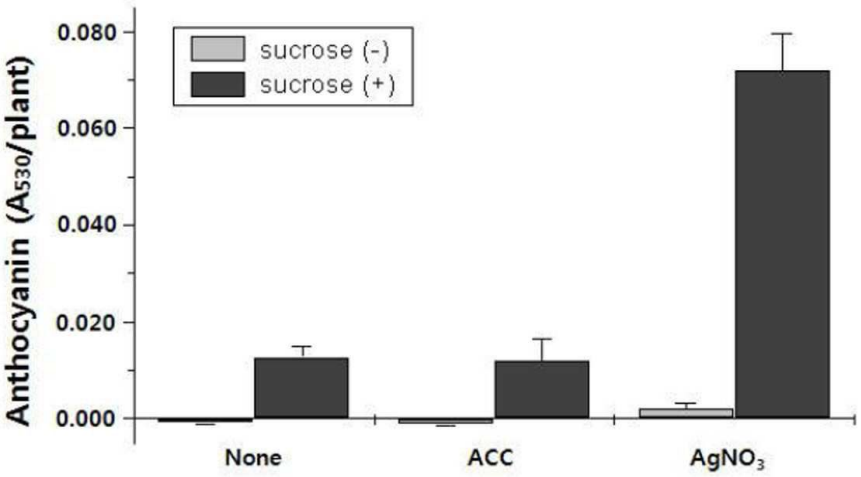
[0081] **도 8**은 야생형 애기장대 및 에틸렌 신호 전달 관련 돌연변이체의 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 전사체 발현양에서 당의 효과를 나타내는 그림이다. 야생형(Col0), 에틸렌 수용체 돌연변이(*etr1-1*), 연속성 에틸렌 반응 및 *ETR1* 상호성 Raf-유사 키나아제 돌연변이(*ctr1-1*), *CTR1* 하단 단백질 *EIN2* 및 *EIN3* 에틸렌 돌연변이(*ein2-1* 및 *ein3-1*)는 수크로스(Suc), 말토스(Mal), 글루코스(Glc), 프럭토스(Fruc),만니톨(Man) 및 팔라티노스 (Pal)와 같은 60 mM 당을 포함하는 MS 배지 또는 30 mM 글루코스 + 30 mM 프럭토스 혼합물을 포함하는 MS 배지에서 광도 140 mol $m^{-2}s^{-1}$인 조건으로 12일 동안 키웠다. 각각의 식물로부터 추출한 총 RNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하였다.

도면

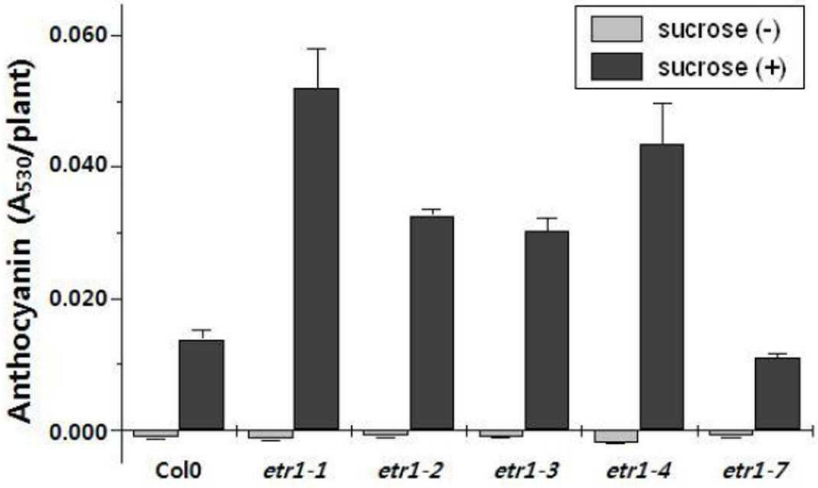
도면1



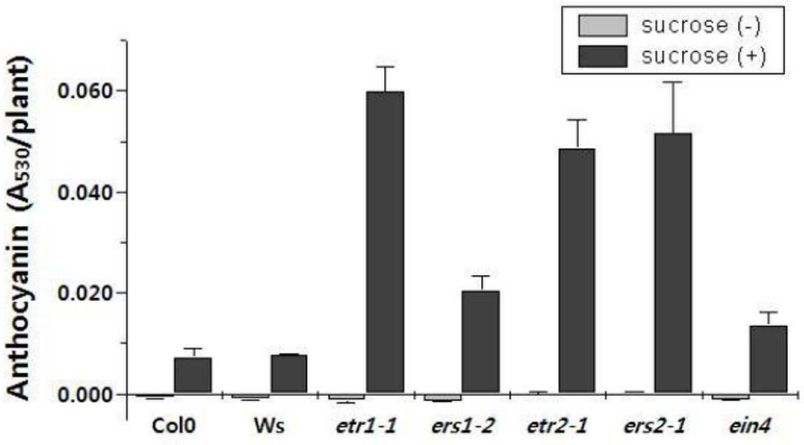
도면2


Anthocyanin (A530/plant)
0.080
0.060
0.040
0.020
0.000
sucrose (-)
sucrose (+)
None
ACC
AgNO3

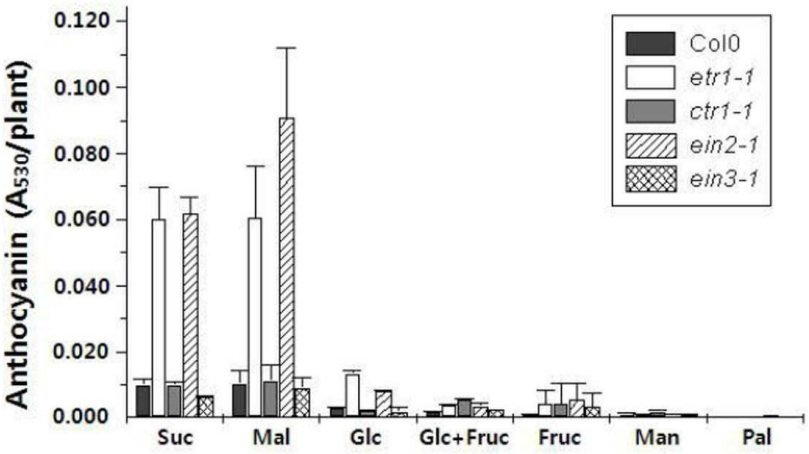
도면3


Anthocyanin (A530/plant)
0.060
0.040
0.020
0.000
sucrose (-)
sucrose (+)
Col0
etr1-1
etr1-2
etr1-3
etr1-4
etr1-7

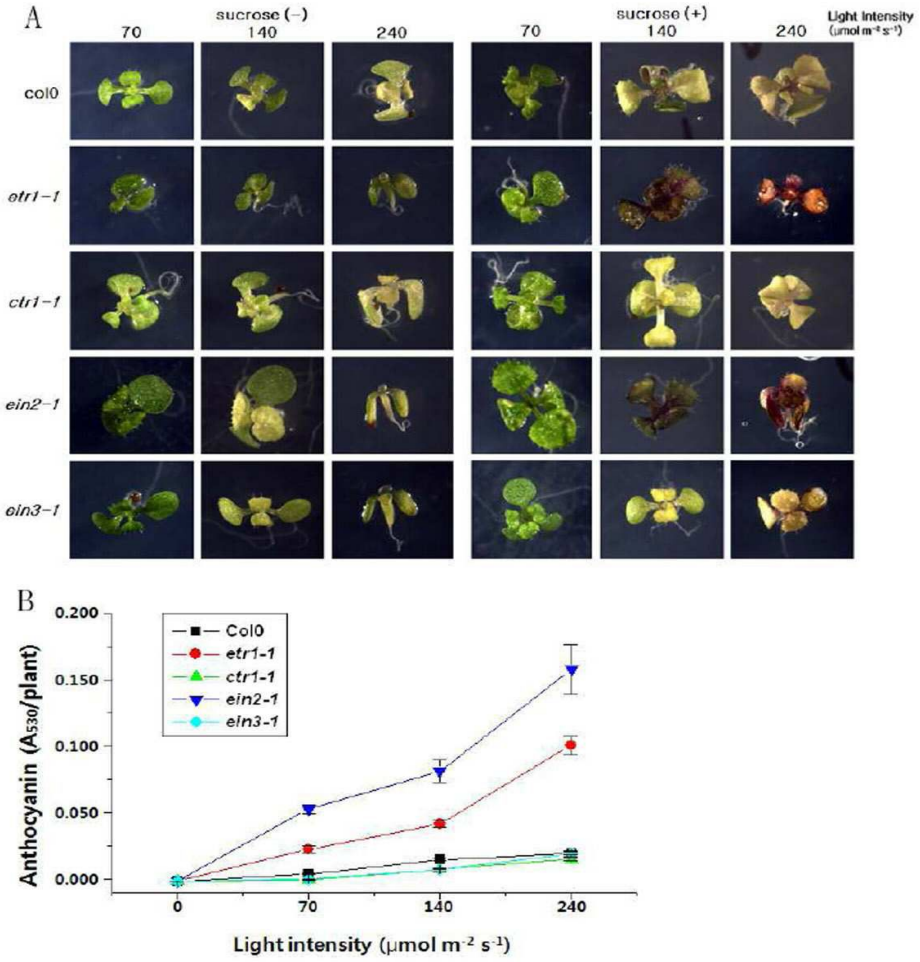
도면4


sucrose (-)
sucrose (+)
Anthocyanin (A530/plant)
0.060
0.040
0.020
0.000
Col0
Ws
etr1-1
ers1-2
etr2-1
ers2-1
ein4

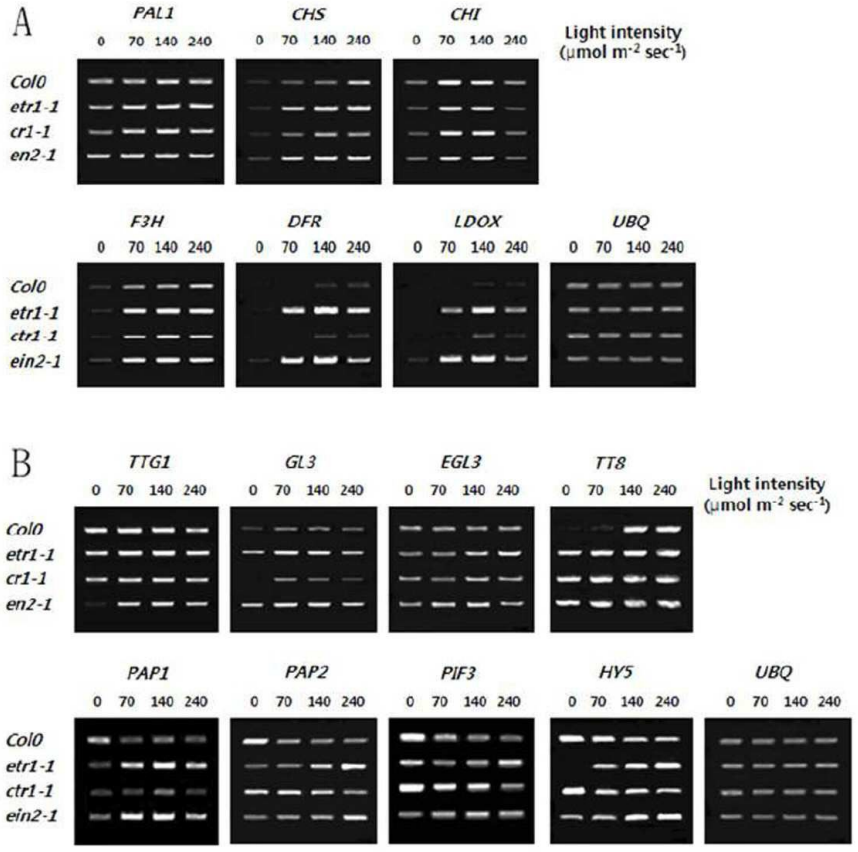
도면5


Col0
etr1-1
ctr1-1
ein2-1
ein3-1
Anthocyanin (A530/plant)
0.120
0.100
0.080
0.060
0.040
0.020
0.000
Suc
Mal
Glc
Glc+Fruc
Fruc
Man
Pal

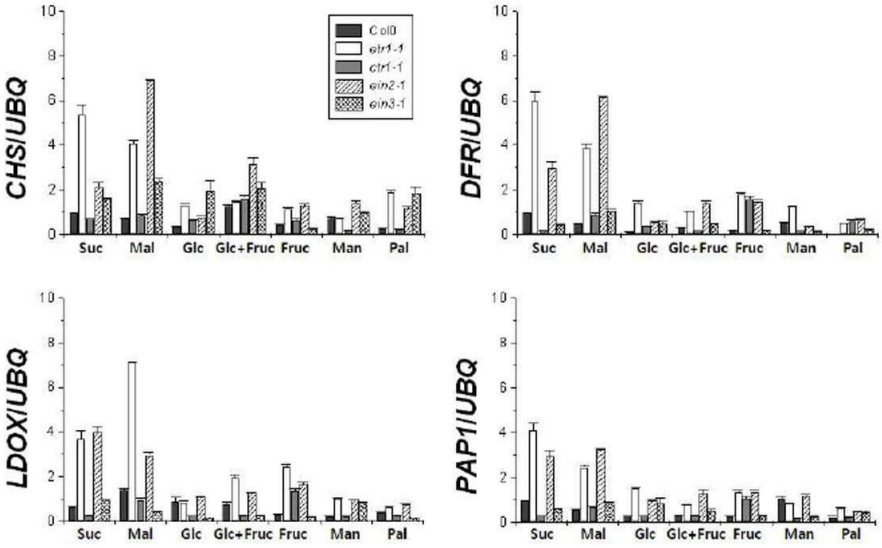
도면6


A
sucrose (−)
sucrose (+)
70
140
240
Light intensity
col0
etr1-1
ctr1-1
ein2-1
ein3-1
B
Anthocyanin (A530/plant)
0.200
0.150
0.100
0.050
0.000
Col0
etr1-1
ctr1-1
ein2-1
ein3-1
0
70
140
240
Light intensity (μmol m-2 s-1)

도면7


A
PAL1
CHS
CHI
0 70 140 240
Light intensity
(μmol m-2 sec-1)
Col0
etr1-1
cr1-1
en2-1
F3H
DFR
LDOX
UBQ
Col0
etr1-1
ctr1-1
ein2-1
B
TTG1
GL3
EGL3
TT8
Light intensity
(μmol m-2 sec-1)
Col0
etr1-1
cr1-1
en2-1
PAP1
PAP2
PIF3
HY5
UBQ
Col0
etr1-1
ctr1-1
ein2-1

도면8


CHS/UBQ
DFR/UBQ
LDOX/UBQ
PAP1/UBQ
Col0
etr1-1
ctr1-1
ein2-1
ein3-1
Suc Mal Glc Glc+Fruc Fruc Man Pal

서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
<120> Regulation method of anthocyanin biosynthesis

<160> 40

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 1
atggagatga acattaagtt tccag 25

<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
ctgcatctgt gtgagcccta agc 23

<210> 3
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
gccggtacca tggaagtctg caattgtatt g 31

<210> 4
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
gccggatcct tatccagtga aatttgaatg tcggg 35

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
atggaaatgc ccggtagaag atc 23

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
tagcctccga cgaaagcctt aacg 24

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 7
atggaagctg aaattgtgaa tgtg 24

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
tagagagtgg gatctcagac tgac 24

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 9
tctgtttgag cttttcaggc tcac 24

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 10
ctagtaatta gtggttcctg cgtc 24

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 11
aacaagcgac tagctcttta gctg 24

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 12
ggcttgcatc agcattagaa ccac 24

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 13
ggtggtgaga ctctgaccat tg 22

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 14
tagctttgga attgggacga cc 22

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 15
agaaccatgt gcttcaggcg g 21

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 16
ctgtgatctc agagcagaca ac 22

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 17
ggcaaatcct tgaatcgagt ttc 23

<210> 18

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

<220>
<223> primer

<400> 18
cagaagatgg agatttgatt ctcgg 25

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 19
atcgtctcta gtcacctcca 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 20
gctcgagtta gagttcacca 20

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 21
gatttgccaa acgccaagac gc 22

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 22
cgttgtgatg aatggaccga cc 22

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 23
gtttgcagct tttctacgag g 21

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 24
tgagcaaaag tccgtggagg 20

<210> 25
<211> 22

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 25
tcatcctccg gtcacagaat cg 22

<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 26
gatcctaacg gatccatcag cag 23

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 27
tggttgtgca acgctcatac ggcg 24

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 28
tcccagtttc atctctggct tctg 24

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 29
aacgctgaaa ccgccgatag c 21

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 30
tctctcccaa tgttttcaca 20

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 31
tcgtcacaat gggtgctcaa ac 22

<210> 32
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 32
cgtagtctct ataccaagct c 21

<210> 33
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 33
agacattacg cccattccta caacacc 27

<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 34
gtcgcttcag gaaccaaaat atctacc 27

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 35

catgagtctt cgtgttgtaa gtct 24

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 36
gtgagaaaca ctaatcaagt tcaa 24

<210> 37
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 37
ggtcatctct catttggctc tg 22

<210> 38
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 38
gtacgaacca gccgcataac cc 22

<210> 39
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 39
cgttaagacg ttgactggga aaact 25

<210> 40
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 40
gctttcacgt tatcaatggt gtca 24