



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월06일

(11) 등록번호 10-2308359

(24) 등록일자 2021년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) *A01H 1/02* (2006.01)
A01N 37/40 (2006.01) *A01N 57/20* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
A01H 1/02 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2016-7027435
(22) 출원일자(국제) 2015년03월10일
심사청구일자 2020년03월06일
(85) 번역문제출일자 2016년10월04일
(65) 공개번호 10-2016-0134709
(43) 공개일자 2016년11월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/019663
(87) 국제공개번호 WO 2015/142571
국제공개일자 2015년09월24일
(30) 우선권주장
61/968,342 2014년03월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR101303110 B1
KR1020070059196 A
KR1020120089848 A

(73) 특허권자
몬산토 테크놀로지 엘엘씨
미합중국 미주리주 63167 세인트 루이스시 노쓰
린드버그 부라바드 800
(72) 발명자
번즈, 웬, 씨.
미국 63167 미주리주 세인트 루이스 노쓰 린드버
그 블러바드 800
폴리, 마이클, 이
미국 63167 미주리주 세인트 루이스 노쓰 린드버
그 블러바드 800
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 25 항

심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **형질전환 옥수수 이벤트 MON 87419 및 이의 사용 방법**

(57) 요약

본 발명은 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 독특한 재조합 DNA 분자 및 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물, 식물 부분, 종자, 세포, 및 재배 생성물, 뿐만 아니라 옥수수 MON 87419 이벤트를 사용하고 검출하는 방법을 제공한다. 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물은 디카바 및 글루포시네이트 제초제에 대해 내성을 나타낸다.

(52) CPC특허분류

A01N 37/40 (2013.01)

A01N 57/20 (2013.01)

C12N 15/8274 (2013.01)

C12Q 2600/13 (2013.01)

(72) 발명자

후앙, 진타이

미국 63167 미주리주 세인트 루이스 노쓰 린드버그
블러바드 800

맥칸, 멜린다, 씨.

미국 63167 미주리주 세인트 루이스 노쓰 린드버그
블러바드 800

샤오, 아이후아

미국 63167 미주리주 세인트 루이스 노쓰 린드버그
블러바드 800

스파르크스, 오스카, 씨.

미국 63167 미주리주 세인트 루이스 노쓰 린드버그
블러바드 800

스퇴커, 마르틴, 에이.

미국 63167 미주리주 세인트 루이스 노쓰 린드버그
블러바드 800

웨이, 리펑

미국 63167 미주리주 세인트 루이스 노쓰 린드버그
블러바드 800

명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 및 서열 번호: 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는, 재조합 DNA 분자.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

옥수수 MON 87419 이벤트(event)를 포함하는 형질전환 옥수수 식물 또는 종자로부터 유래되고,

상기 이벤트를 포함하는 종자의 대표적인 샘플은 ATCC 수탁번호 제PTA-120860호로 기탁된 것인

재조합 DNA 분자.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 옥수수 MON 87419 이벤트로부터의 DNA의 존재에 대해 진단성 증폭산물(amplicon)인 재조합 DNA 분자.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 옥수수로부터 유래한 옥수수 식물, 세포, 종자, 후대 식물, 또는 식물 부분에 존재하고,

상기 이벤트를 포함하는 종자의 대표적인 샘플은 ATCC 제PTA-120860호로 기탁된 것인

재조합 DNA 분자.

청구항 5

엄격한 혼성화 조건(stringent hybridization conditions) 하에서 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 및 서열 번호: 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DNA 서열과 혼성화하는 DNA 프로브로서 작용하기에 충분한 길이의 서열 번호: 10의 연속된 DNA 서열을 포함하고,

엄격한 혼성화 조건하에서 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 및 서열 번호: 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하지 않는 DNA 서열과는 혼성화하지 않으며,

서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2를 포함하는

DNA 분자.

청구항 6

제1의 DNA 분자 및 제2의 DNA 분자를 포함하고,

상기 제1의 DNA 분자는 서열 번호: 9의 단편이며 상기 제2의 DNA 분자는 옥수수 MON 87419 이벤트의 옥수수 게놈 DNA의 단편이고,

상기 제1 및 제2의 DNA 분자들 각각은 상기 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 DNA와의 증폭 반응에서 함께 사용되는 경우 DNA 프라이머로서 작용하기에 충분한 길이의 연속된 뉴클레오타이드들의 DNA 서열을 포함함으로써 샘플 내에서 상기 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 진단성인 증폭산물을 생산하고,

상기 증폭산물은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2를 포함하는 것인

DNA 분자들의 쌍.

청구항 7

DNA의 샘플 내에서 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재를 검출하는 방법이며,

- a) 상기 샘플을 청구항 5의 DNA 분자와 접촉시키는 단계,
- b) 상기 샘플과 상기 DNA 분자를 엄격한 혼성화 조건에 적용시키는 단계, 및
- c) 상기 샘플 내 표적 DNA 분자에 대한 상기 DNA 분자의 혼성화를 검출하는 단계

를 포함하며, 상기 표적 DNA 분자에 대한 상기 DNA 분자의 혼성화는 상기 DNA의 샘플 내에서 상기 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재를 나타내는 것인 방법.

청구항 8

DNA의 샘플 내에서 옥수수 MON87419 이벤트의 존재를 검출하는 방법이며,

- a) 상기 샘플을 청구항 6의 DNA 분자들의 쌍과 접촉시키는 단계,
- b) 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 및 서열 번호: 8로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는 DNA 증폭산물을 생산하기에 충분한 증폭 반응을 수행하는 단계, 및
- c) 상기 반응 내에서 상기 DNA 증폭산물의 존재를 검출하는 단계

를 포함하며, 상기 반응 내에서의 상기 DNA 증폭산물의 존재는 상기 DNA 샘플 내 상기 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재를 나타내는 것인 방법.

청구항 9

DNA 검출 키트이며,

- a) 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2를 포함하는 DNA 분자, 또는
 - b) 제1의 DNA 분자 및 제2의 DNA 분자를 포함하는 DNA 분자들의 쌍
- 을 포함하고, 여기서

상기 제1의 DNA 분자는 서열 번호: 9의 단편이고 상기 제2의 DNA 분자는 옥수수 MON 87419 이벤트의 옥수수 게놈 DNA의 단편이고,

상기 제1 및 제2의 DNA 분자들 각각은 상기 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 DNA와의 증폭 반응에서 함께 사용되는 경우 DNA 프라이머들로서 작용하기에 충분한 길이의 연속된 뉴클레오티드들의 DNA 서열을 포함함으로써 샘플 내에서 상기 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 진단성인 증폭산물을 생산하며,

상기 증폭산물은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2를 포함하는 것인

DNA 검출 키트.

청구항 10

서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 및 서열 번호: 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하는, 형질전환 옥수수 식물, 종자, 세포, 식물 부분, 또는 상품 생성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서 상기 식물, 종자, 또는 세포가 글루포시네이트(glufosinate) 또는 디캄바(dicamba), 또는 글루포시네이트와 디캄바 제초제에 대해 내성인, 형질전환 옥수수 식물, 종자, 세포, 식물 부분, 또는 상품 생성물.

청구항 12

옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하고,

상기 이벤트를 포함하는 종자의 대표적인 샘플이 ATCC 수탁번호 제PTA-120860호로서 기탁된 것인,

형질전환 옥수수 식물, 종자, 세포, 식물 부분, 또는 상품 생성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 옥수수 식물 또는 종자가 상기 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 적어도 하나의 친계(parent) 식물을 갖는 혼성체인, 형질전환 옥수수 식물, 종자, 세포, 식물 부분, 또는 상품 생성물.

청구항 14

지역에서 잡초를 방제하는 방법이며,

옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 옥수수를 지역에 식재하는 단계 및

유효 용량의 디캄바, 또는 글루포시네이트, 또는 디캄바와 글루포시네이트 제초제를 적용하여 상기 형질전환 옥수수에 손상을 입히지 않고 상기 지역 내의 잡초를 방제하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 유효 용량의 글루포시네이트 제초제가, 성장하는 계절에 걸쳐 에이커당 총 약 0.1 파운드 산 당량 내지 에이커당 약 16 파운드 산 당량의 글루포시네이트 제초제인 방법.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 유효 용량의 글루포시네이트 제초제가, 성장하는 계절에 걸쳐 에이커당 총 약 0.4 파운드 산 당량 내지 에이커당 약 1.59 파운드 산 당량의 글루포시네이트 제초제인 방법.

청구항 17

청구항 14에 있어서, 상기 유효 용량의 디캄바 제초제가, 성장하는 계절에 걸쳐 에이커당 총 약 0.1 파운드 산 당량 내지 에이커당 약 16 파운드 산 당량의 디캄바 제초제인 방법.

청구항 18

청구항 14에 있어서, 상기 유효 용량의 디캄바 제초제가, 성장하는 계절에 걸쳐 에이커당 총 약 0.5 파운드 산 당량 내지 에이커당 약 2 파운드 산 당량의 디캄바 제초제인 방법.

청구항 19

글루포시네이트 및 디캄바 제초제들에 대해 내성인 형질전환 옥수수 식물을 생산하는 방법이며,

a) 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 옥수수 식물을 그 자신(itself)과, 또는 제2의 옥수수 식물과 성적 교배(sexually crossing)시키는 단계,

b) 생산된 종자를 수집하는 단계,

c) 상기 종자를 성장시켜 후대 식물들을 생산하는 단계,

d) 상기 후대 식물들을 글루포시네이트, 또는 디캄바, 또는 글루포시네이트 및 디캄바 제초제들로 처리하는 단계, 및

e) 글루포시네이트 및 디캄바 제초제들에 대해 내성인 후대 식물을 선택하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 20

글루포시네이트 및 디캄바 제초제들에 대해 내성인 형질전환 옥수수 식물을 성장시키는 방법이며,

- a) 이벤트 MON 87419를 포함하는 옥수수 종자를 식재하는 단계,
- b) 상기 종자로부터 식물이 성장하도록 하는 단계, 및
- c) 상기 식물을 글루포시네이트, 또는 디캄바, 또는 글루코시네이트와 디캄바 제초제들로 처리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 21

글루포시네이트 및 디캄바 제초제들의 적용에 내성인 식물을 생산하는 방법이며,

- a) 도 1에 나타난 이식유전자 삽입체를 포함하는 DNA 작제물을 제공하는 단계,
- b) 상기 DNA 작제물을 옥수수 식물 세포내로 도입하는 단계, 및
- c) 상기 옥수수 식물 세포를 재생시켜 옥수수 식물을 생산함으로써 상기 식물이 글루포시네이트 및 디캄바 제초제들의 적용에 대해 내성이 되도록 하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 이식유전자 삽입체가 서열 번호: 9를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

청구항 21에 있어서, 상기 DNA 작제물의 상기 옥수수 식물 세포 내로의 도입이, 상기 옥수수 세포의 게놈의 부분으로서 서열 번호: 1 내지 8 및 서열 번호: 10으로부터 선택된 서열을 유발하는 것인 방법.

청구항 24

청구항 21의 방법에 의해 생산된 옥수수 식물.

청구항 25

청구항 24의 옥수수 식물의 후대 식물, 종자, 또는 부분.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 교차-참조

[0002] 본 출원은 2014년 3월 20일자로 출원된, 미국 가특허원 제61/968,342호에 대한 우선권의 이익을 청구한다.

[0003] 서열 목록의 도입

[0004] 29.4KB(MS-윈도우즈로 측정됨)이고 2015년 3월 9일자로 제작된, 파일 명 "MONS362W0.txt"에 포함된 서열 목록은 전자 제출에 의해 본 출원과 함께 출원되어 있고 본원에서 참고로 포함되어 있다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 형질전환 옥수수 이벤트 MON 87419에 대해 독특한 재조합 DNA 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물, 부분들, 종자, 세포, 및 농업 생산물 및 또한 이를 사용하는 방법에 관한 것이다. 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물은 디캄바(dicamba) 및 글루포시네이트 제초제에 대해 내성을 나타낸다.

배경 기술

[0007] 발명의 배경

[0008] 옥수수[제아 마이즈(*Zea mays*)]는 세계의 많은 지역에서 중요한 작물이다. 생명공학 방법을 당해 작물에 적용하

여 바람직한 특성을 갖는 옥수수를 생산하여 왔다. 한가지 이러한 바람직한 특성은 제초제 내성이다. 식물에서 제초제 내성을 위한, 이식유전자로 또한 알려진, 이중 유전자의 발현은 식물에 제초제 내성을 부여할 수 있다. 그러나, 이식유전자의 발현, 및 이에 따른 이의 효능은 식물 염색체 및 염색체 위치에 부여된 개별 이식유전자의 발현을 구동하는 카세트의 배향 및 조성 및 이식유전자 삽입의 계층 결과를 포함하는 많은 상이한 인자에 의해 영향받을 수 있다. 이는 다수의 분자적으로 연결된 이식유전자를 지닌 형질전환 식물에서 더 복잡하며, 각각은 별개의 특성을 부여한다. 이러한 상황에서, 식물에서 분자적으로 연결된 이식유전자 각각의 적절한 발현은 동일한 이식유전자 삽입(또한 다중-유전자 이벤트로 불림)으로부터 생성되어야만 한다. 이러한 경우에, 각각 이식유전자 및 발현 성분의 상이한 배열을 사용하여 다수의 발현 카세트를 설계하여 시험한 다음, 식물의 다수의 세대를 통해 다수의 개별 식물 형질전환 이벤트를 생성하고 분석함으로써 바람직한 특성 각각에 대해 상대적으로 우수한 특징 및 상업적 목적을 위해 적합하도록 제조하는데 필수적인 농업적 특징을 갖는 형질전환 이벤트를 선택하는 것이 필요하다. 이러한 선택은 수년에 걸쳐, 다수의 지역에서, 및 다양한 조건 하에서 집중된 분자 특성화 및 또한 온실 및 현장 시험을 필요로하므로 유의적인 양의 농업, 표현형, 및 분자 데이터가 수집될 수 있다. 이후에, 수득되는 데이터 및 관찰은 광범위한 생식질 및 다양한 현장 조건에 걸친 상업적인 농업 용도에 적합한 이벤트를 선택하려는 목적을 갖는 과학자 및 농학자의 팀들에 의해 분석되어야 한다. 일단 선택되면, 바람직한 특성을 부여하는 상업적인 이벤트를 식물 육종법을 사용하여 다른 유전적 배경내로 유전자가입시킴으로써 바람직한 특성을 함유하고 특이적인 지역 성장 조건에 적합하게 적응된 다수의 상이한 작물 변종을 생산할 수 있다.

[0009] 단일의 형질전환 이벤트를 포함하는 형질전환 식물을 제조하기 위하여, 재조합 DNA 작제물의 일부를 식물 형질전환 기술을 사용하여 옥수수 세포의 계층내로 형질전달한다. 당해 옥수수 세포를 후속적으로 사용하여 독특한 R₀ 식물을 생산한 후, 이를 형질전환 후대 식물을 생산하는데 사용할 수 있다. 후대 식물의 계층은 독특한 이벤트를 포함하며, 이들 식물을 바람직한 특성(들) 및 또한 농업적 수행능에 대해 시험할 수 있다. 이벤트의 효능은 형질전환 이벤트에서 통합 부위에 대해 시스(*cis*) 및/또는 트랜스(*trans*) 인자에 의해 영향받을 수 있다. 상기 이벤트에 의해 부여된 표현형은 또한 DNA 작제물의 크기 및 설계에 의해 영향받을 수 있으며, 이는 발현 카세트내 유전 성분의 조합, 이식유전자의 수, 발현 카세트의 수, 및 이러한 성분 및 이러한 카세트의 배열에 의해 변할 수 있다. 제공된 이벤트의 수행능은 식물 발달, 주형성, 이식유전자 발현의 일시적이거나, 공간적인 양식과 같은 요인; 또는 외적 요인, 예를 들면, 환경적인 식물 성장 조건, 물 이용능, 질소 이용능, 열, 또는 응력에 의해 더 복잡해질 수 있다. 따라서, 바람직한 표현형 특성 세트를 부여하는 이벤트를 만들어 내는 능력은 선뜻 예견할 수 없다.

[0010] 발명의 간단한 요약

[0011] 본 발명은 서열 번호: 1 내지 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 재조합 DNA 분자를 제공한다. 본 발명은 또한 형질전환 옥수수 식물로부터 기원한 재조합 DNA 또는 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 종자를 제공하며, 종자의 대표적인 샘플은 ATCC 수탁번호 제PTA-120860호로 기탁된 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함한다. 본 발명은 또한 옥수수 MON 87419 이벤트로부터 기원한 DNA의 존재에 대해 진단성인 증폭산물(amplicon)인, 재조합 DNA 분자를 제공한다. 본 발명은 또한 옥수수 MON87419 이벤트를 포함하는 형질전환 옥수수로부터 기원한 옥수수 식물, 세포, 종자, 후대 식물, 또는 식물 부분 속에 존재하는 DNA 분자를 제공한다.

[0012] 본 발명은 서열 번호: 1 내지 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 DNA 서열과 엄격한 혼성화 조건(stringent hybridization condition) 하에서 혼성화하고 서열 번호: 1 내지 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하지 않는 DNA 서열과 엄격한 혼성화 조건하에서 혼성화하지 않는 DNA 프로브로서 작용하기에 충분한 길이의 서열 번호: 10의 연속된 DNA 서열을 갖는 DNA 분자를 제공한다. 본 발명은 또한 제1의 DNA 분자 및 제2의 DNA 분자를 포함하는 DNA 분자의 쌍을 제공하며, 여기서 상기 제1의 DNA 분자는 서열 번호: 9의 단편이고 상기 제2의 DNA 분자는 옥수수 MON 87419 이벤트의 옥수수 계층 DNA의 단편이며, 여기서 상기 제1 및 제2의 DNA 분자 각각은 충분한 길이의 연속된 뉴클레오티드의 DNA 서열을 포함함으로써 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 DNA와의 증폭 반응에 함께 사용하는 경우 DNA 프라이머로서 작용하여 샘플내 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 진단성인 증폭산물을 생산한다.

[0013] 본 발명은 DNA의 샘플을 DNA 프로브와 접촉하는 단계, 상기 샘플과 DNA 프로브를 엄격한 혼성화 조건에 적용시키는 단계, 및 상기 샘플 내의 DNA 분자에 대한 DNA 프로브의 혼성화를 검출하는 단계에 의해 DNA의 샘플 내의 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재를 검출하는 방법을 제공하며, 여기서 DNA 분자에 대한 DNA 프로브의 혼성화는 DNA의 샘플 내의 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재를 나타낸다.

- [0014] 본 발명은 DNA의 샘플을 DNA 프라이머의 쌍과 접촉시키는 단계, 서열 번호: 1 내지 8 및 서열 번호: 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는 DNA 증폭산물을 생산하기에 충분한 증폭 반응을 수행하는 단계, 및 반응 내에서 DNA 증폭산물의 존재를 검출하는 단계에 의해 DNA의 샘플 내에서 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재를 검출하는 방법을 제공하며, 여기서, 반응 내의 DNA 증폭산물의 존재는 DNA 샘플 속에 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재를 나타낸다.
- [0015] 본 발명은 DNA의 샘플 내에서 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재를 검출하는데 특이적인 프라이머 또는 프로브로서 작용하는데 충분한 길이의 서열 번호: 10의 연속된 뉴클레오티드의 DNA 서열을 포함하는 적어도 하나의 DNA 분자를 함유하는 DNA 검출 키트를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 서열 번호: 1 내지 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하는 재조합 옥수수 식물, 종자, 세포, 식물 부분, 또는 상품 생성물을 제공한다. 본 발명은 또한 글루포시네이트 또는 디캄바, 또는 글루포시네이트 및 디캄바 제조제에 대해 내성인 형질전환 옥수수 식물, 종자, 또는 세포를 제공한다. 본 발명은 또한 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 옥수수 식물, 종자, 세포, 식물 부분, 또는 상품 생성물을 제공한다. 본 발명은 또한 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함한 적어도 하나의 친계(parent) 식물을 갖는 혼성체인 형질전환 옥수수 식물 또는 종자를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 지역에 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 옥수수를 식재하는 단계 및 유효 용량의 디캄바 또는 글루포시네이트 또는 디캄바 및 글루포시네이트 제조제를 적용하여 이식유전자 옥수수를 손상시키지 않고 지역내 잡초를 방제하는 단계를 포함하여, 지역내 잡초를 방제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 성장하는 계절에 걸쳐 에이커당 약 0.1파운드 산 당량의 글루포시네이트 제조제 내지 에이커당 약 16 파운드 산 당량의 글루포시네이트 제조제 유효 용량을 적용함으로써 잡초를 방제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 성장하는 계절에 걸쳐 에이커당 약 0.4 파운드 산 당량의 글루포시네이트 제조제 내지 약 1.59 파운드 산 당량의 글루포시네이트 제조제의 유효 용량을 적용함으로써 잡초를 방제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 성장하는 계절에 걸쳐 에이커당 약 0.1 파운드 산 당량의 디캄바 제조제 내지 에이커당 약 16 파운드 산 당량의 디캄바 제조제의 유효 용량을 적용함으로써 잡초를 방제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 성장하는 계절에 걸쳐 에이커당 약 0.5 파운드 산 당량의 디캄바 제조제 내지 에이커당 약 2 파운드 산 당량의 디캄바 제조제의 유효 용량을 적용함으로써 잡초를 방제하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 옥수수 식물을 제2의 옥수수 식물과 성적 교배하는 단계, 생산된 종자를 수집하는 단계, 상기 종자를 성장시켜 후대 식물을 생산하는 단계, 후대 식물을 글루포시네이트 또는 디캄바, 또는 글루포시네이트 및 디캄바 제조제로 처리하는 단계, 및 글루포시네이트 및 디캄바 제조제에 대해 내성인 후대 식물을 선택하는 단계에 의해 글루포시네이트 및 디캄바 제조제에 대해 내성인 형질전환 옥수수 식물을 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 옥수수 식물을 자가수정하는 단계, 생산된 종자를 수집하는 단계, 상기 종자를 성장시켜 후대 식물을 생산하는 단계, 후대 식물을 글루포시네이트 또는 디캄바, 또는 글루포시네이트 및 디캄바 제조제로 처리하는 단계, 및 글루포시네이트 및 디캄바 제조제에 대해 내성인 후대 식물을 선택하는 단계에 의해 글루포시네이트 및 디캄바 제조제에 대해 내성인 형질전환 옥수수 식물을 생산하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 옥수수 이벤트 MON 87419를 포함하는 옥수수 식물의 게놈내 이식유전자 삽입체의 구조를 나타낸다. 평행선은 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 서열 번호: 10의 상대적인 위치에 상응하고; SQ26644 및 SQ26645로 표시된 두꺼운 화살표는 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수를 확인하는데 사용된 프라이머의 쌍의 적절한 위치를 나타내며; 14 내지 22로 번호 매겨진 단선은 각각 DNA 삽입체(서열 번호: 9)내의 독특한 재조합 작제물 서열의 상대적인 위치를 나타내고 숫자는 각각의 서열 번호를 말하며; 얇은 평행 화살표는 옥수수 MON 87419 이벤트의 이중 이식유전자가 삽입된 DNA의 2개의 별개의 발현 카세트의 상대적인 구조를 나타내고 박스는 2개의 발현 카세트의 별개의 성분을 나타내며, 선두의 'P'는 프로모터 성분을 나타내고, 선두의 'L'은 리더 성분을 나타내며, 선두의 'I'는 인트론을 나타내며, 선두의 'TS'는 염록체 수송 펩티드를 나타내며, 선두의 'T'는 3' 전사 종결인자 및 폴리아데닐화 성분(3' UTR)을 나타내고, *pat*는 포스포노트리신 아세틸 트랜스퍼라제(*pat*) 단백질에 대한 암호화 영역을 나타내며 *dmo*는 디캄바 모노-옥시게나제(DMO) 단백질에 대한 암호화 영역을 나타낸다.

서열의 간단한 설명

서열 번호: 1은 옥수수 게놈 DNA 및 이식유전자 삽입체의 5' 연결부를 나타내는 30개의 뉴클레오타이드 DNA 서열이다. 서열 번호: 1은 서열 번호: 10의 1232 내지 1261번 뉴클레오타이드 위치에 상응한다.

서열 번호: 2는 옥수수 게놈 DNA 및 이식유전자 삽입체의 3' 연결부를 나타내는 30개 뉴클레오타이드 DNA 서열이다. 서열 번호: 2는 서열 번호: 10의 7994 내지 8023번 뉴클레오타이드 위치에 상응한다.

서열 번호: 3은 옥수수 게놈 DNA 및 이식유전자 삽입체의 5' 연결부를 나타내는 60개의 뉴클레오타이드 DNA 서열이다. 서열 번호: 3은 서열 번호: 10의 1217 내지 1276번 뉴클레오타이드 위치에 상응한다.

서열 번호: 4는 옥수수 게놈 DNA 및 이식유전자 삽입체의 3' 연결부를 나타내는 60개의 뉴클레오타이드 DNA 서열이다. 서열 번호: 4는 서열 번호: 10의 7979 내지 8038번 뉴클레오타이드 위치에 상응한다.

서열 번호: 5는 옥수수 게놈 DNA 및 이식유전자 삽입체의 5' 연결부를 나타내는 100개의 뉴클레오타이드 DNA 서열이다. 서열 번호: 5는 서열 번호: 10의 1197 내지 1296번 뉴클레오타이드 위치에 상응한다.

서열 번호: 6은 옥수수 게놈 DNA 및 이식유전자 삽입체의 3' 연결부를 나타내는 100개의 뉴클레오타이드 DNA 서열이다. 서열 번호: 6은 서열 번호: 10의 7959 내지 8058번 뉴클레오타이드 위치에 상응한다.

서열 번호: 7은 5' 플랭킹 옥수수 게놈 DNA의 1246개 뉴클레오타이드 및 이식유전자 삽입체의 5' 말단의 525개 뉴클레오타이드를 나타내는 1771개 뉴클레오타이드 DNA 서열이다.

서열 번호: 8은 이식유전자 삽입체의 3' 말단의 516개 뉴클레오타이드 및 3' 플랭킹 옥수수 게놈 DNA의 1251개 뉴클레오타이드를 나타내는 1767개 뉴클레오타이드 DNA 서열이다.

서열 번호: 9는 옥수수 MON 87419 이벤트의 이식유전자 삽입체에 상응하는 6762개 뉴클레오타이드 DNA 서열이다.

서열 번호: 10은 옥수수 MON 87419 이벤트에 상응하는 9259개 뉴클레오타이드 DNA 서열이며; 당해 서열은 1 내지 1246번 위치로부터의 5' 플랭킹 게놈 DNA 서열, 1247 내지 8008번 위치로부터의 형질전환 DNA 삽입체, 및 8009 내지 9259번 위치로부터의 3' 플랭킹 게놈 DNA 서열을 함유한다.

서열 번호: 11은 SQ26644로서 언급되고 샘플 내에서 옥수수 MON 87419 이벤트 DNA를 확인하기 위해 사용된 프라이머에 상응하는 33개 뉴클레오타이드 DNA 서열이며; 이는 서열 번호: 10의 7966 내지 7998번 위치에 상응한다.

서열 번호: 12는 SQ26645로서 언급되고 샘플 내에서 옥수수 MON 87419 이벤트 DNA를 확인하기 위해 사용된 프라이머에 상응하는 24개 뉴클레오타이드 DNA 서열이며; 이는 서열 번호: 10의 8022 내지 8045번 위치에 상응한다.

서열 번호: 13은 PB11207로서 언급되고 샘플 내에서 옥수수 MON 87419 이벤트 DNA를 확인하기 위해 사용된 프로브에 상응하는 19개 뉴클레오타이드 DNA 서열이며; 이는 서열 번호: 10의 8002 내지 8020번 위치에 상응한다.

서열 번호: 14 내지 22는 옥수수 MON 87419 이벤트의 이식유전자 삽입체내의 독특한 서열에 상응하는 DNA 서열이다.

발명의 상세한 설명

다음의 정의 및 방법은 본 발명을 보다 잘 정의하고 본 발명을 실시하는데 있어서 당해 분야의 통상의 기술자를 안내하기 위해 제공된다. 달리 나타내지 않는 한, 용어들은 관련 분야의 통상의 기술자에 의한 통상적인 사용에 따른 것으로 이해되어야 한다.

현대의 식물 형질전환 기술은 유전적으로 가공된 식물을 생성하는데 사용한다. 용어 '형질전환'은 또한 유전적으로 가공된 식물을 언급하기 위해 사용될 수 있다. 형질전환 식물을 생성하는 공정 동안, 외부 DNA는 식물 세포의 게놈내로 무작위로 삽입된다. 변형 과정 동안에, 많은 개별 세포가 형질전환된다. 무작위 통합으로 인하여, 별도의 및 독특한 DNA 재조합 이벤트는 각각의 개별 변형된 식물 세포의 게놈 내에서 일어날 것이다. 이후에, 전체 형질전환 식물은 이의 게놈의 안정한 일부분으로서 유일하게 삽입된 DNA를 함유하는 형질전환 식물의 모든 세포를 필수적으로 생성하는 단일의 개별 형질전환 세포로부터 생성된다. 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 제초제 내성 옥수수는 형질전환 DNA의 옥수수 생식질의 염색체/게놈내로의 단일 삽입을 포함한다. 옥수수 MON 87419 이벤트는: (i) 목적한 이식유전자를 포함하는 핵산 작제물을 사용한 수천개의 옥수수 식물 세포의 형질전환, (ii) 독특한 형질전환 이벤트를 각각 함유하는 옥수수 식물의 집단의 재생, 및 (iii) 바람직한 작물 특성을 가진 이벤트, 옥수수 MON 87419 이벤트를 선택하기 위한 선택으로 생산되었다. 옥수수 MON 87419 이벤트는 옥수수 식물 게놈의 특수 위치내로 이식유전자의 삽입의 독특한 DNA 서열에 의해 특화된다.

옥수수 식물의 게놈내에 형질전환 DNA를 삽입하는 작용은 식물 형질전환의 작용으로 달성되며 "이벤트"로서 알려진, 새로운 형질전환 게놈 분자 서열을 생성한다. 당해 서열은 이벤트에 대해 유일하고 특이적이며 원래의 옥수수 게놈 서열 또는 다른 형질전환 옥수수 이벤트와 비교하여 용이하게 확인될 수 있다. 옥수수 MON 87419 이벤트의 분자 분석은 삽입된 DNA(서열 번호: 9)의 게놈 삽입 부위 및 삽입된 DNA(서열 번호: 7 및 서열 번호: 8)의 한쪽 측면에 바로 인접한 플랭킹 옥수수 게놈 DNA 서열을 확인한다. 따라서, 주변의 옥수수 식물 게놈 DNA와 관련하여 삽입된 DNA의 배열은 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 제초제 내성 옥수수에 대해 특이적이고 유일하다. 이러한 새로운 게놈 분자 서열(서열 번호: 10)은 또한 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 제초제 내성 옥수수 식물의 염색체의 통합 부위이며 자체로 식물내에서 고정적이고 식물의 후대로 전달될 수 있다.

본 발명은 또한 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 원래의 형질전환체의 후대를 제공한다. 이러한 후대는 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 옥수수 식물의 자가수정 또는 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 옥수수 식물과 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하거나 함유하지 않는 다른 식물 사이의 성적 이종교배에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다른 식물은 동일하거나 상이한 이벤트(들)를 포함하는 형질전환 식물 또는 상이한 다양성으로부터의 식물과 같은, 비형질전환 식물일 수 있다. 반복된-역-교배 이후에서조차, 변형된 친계로부터의 옥수수 MON 87419 이벤트는 동일한 게놈 위치에서 교배의 후대에 존재한다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "옥수수"는 제아 마이스(*Zea mays*)[또한 콘(corn)으로 언급됨]를 의미하며 옥수수와 교배될 수 있는 모든 식물 품종을 포함한다.

본 발명은 다캄바(3,6-디클로로-2-메톡시벤조산)제초제 및 글루포시네이트(2-아미노-4-(하이드록시메틸포스포닐)부탄산) 제초제에 대해 내성인 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 제초제 내성 옥수수 식물을 제공한다. 다캄바는 활엽 잡초를 방제하는데 유용한 합성 옥신 제초제이다. 글루포시네이트는 광범위한 스펙트럼의 일년생 및 다년생 풀 및 활엽 잡초를 방제하는데 유용한 유기인 제초제이다. 옥수수 MON 87419 이벤트는 다캄바 모노-옥시게나제(DMO) 단백질을 발현하여 다캄바 제초제에 대한 내성을 부여하는 스테노트로포모나스 말토틸리아(*Stenotrophomonas maltophilia*)로부터의 데메틸라제(*dmo*) 유전자 및 포스포노트리신 N-아세틸트랜스퍼라제(PAT) 단백질을 발현하여 글루포시네이트 제초제에 대한 내성을 부여하는 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(*Streptomyces viridochromogenes*)로부터의 비알라포스 내성(*pat*) 유전자를 함유한다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "제조합"은 일반적으로 천연에서 발견되지 않을 수 있으며 인간 개입에 의해 생성된 비-천연 DNA, 단백질, 또는 유기체를 말한다. 본원에 사용된 것으로서, "제조합 DNA 분자"는 함께 천연적으로 존재할 수 없으며 인간 개입의 결과인 DNA 분자, 예를 들면, 이식유전자를 포함하고 이식유전자에 인접한 식물 게놈 DNA를 포함하는 DNA 분자와 같이, 서로에 대해 이중인 적어도 2개의 DNA 분자의 조합으로 이루어진 DNA 분자의 조합을 포함하는 DNA 분자이다. 제조합 DNA 분자의 예는 서열 번호: 1 내지 10으로부터 선택된 적어도 하나의 서열을 포함하는 DNA 분자이다. 본원에 사용된 것으로서, "제조합 식물"은 일반적으로 천연에서 존재하지 않을 수 있는 식물이며, 인간 개입의 결과이고, 형질전환 DNA 분자를 함유한다. 이러한 게놈 변경의 결과로서, 제조합 식물은 신규하고 관련된 야생형 식물과는 명백하게 상이한 것이다. 제조합 식물의 예는 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 옥수수 식물이다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "이식유전자"는 식물 형질전환 방법에 의한 것과 같이, 인간 개입의 결과로서 유기체의 게놈내로 인공적으로 혼입된 DNA 분자를 말한다. 이식유전자는 유기체에 대해 이중일 수 있다. 본원에 사용된 것으로서 용어 "이식유전자 삽입체"는 옥수수 게놈내로 식물 형질전환 기술에 의해 삽입되어 옥수수 이벤트 MON 87419를 생산하는 이식유전자를 말한다. 이러한 이식유전자 삽입체에 대한 서열은 서열 번호: 9로서 제공된다. 용어 "형질전환"은 이식유전자를 포함함을 말하는데, 예를 들면, "형질전환 식물"은 이식유전자를 포함하는 식물을 말한다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "이종"은 천연에서 제2의 분자 또는 유기체와 일반적으로 관련되지 않은 제1의 분자를 말한다. 예를 들면, DNA 분자는 제1의 종으로부터 기원하며 제2의 종의 게놈내로 삽입될 수 있다. 따라서, DNA 분자는 게놈 및 유기체에 대해 이중일 수 있다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "키메라"는 제1의 DNA 분자를 제2의 DNA 분자에 융합시켜 생산된 단일의 DNA 분자를 말하며, 여기서 제1 및 제2의 DNA 분자 어느 것도 구조가 다른 것에 융합되어 있다는 점에서 일반적으로 발견되지 않을 수 있다. 따라서, 키메라 DNA 분자는 천연에서 일반적으로 발견되지 않는 새로운 DNA 분자이다.

키메라 DNA 분자의 예는 서열 번호: 1 내지 10으로부터 선택된 적어도 하나의 서열을 포함하는 DNA 분자이다.

본 발명은 DNA 분자 및 이들의 상응하는 DNA 서열을 제공한다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "DNA" 및 "DNA 분자"는 데옥시리보핵산(DNA) 분자를 말한다. DNA 분자는 게놈 또는 합성 기원일 수 있으며, 통상적으로 5' (상류) 말단 내지 3' (하류) 말단이다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "DNA 서열"은 DNA 분자의 뉴클레오타이드 서열을 말한다. 사용된 명명법은 미연방규정집(the United States Code of Federal Regulations) §1.822의 37조에 의해 요구되고 WIPO 표준 ST.25 (1998), 부록 2, 표 1 및 3에 설정된 것이다. 통상적으로, 본 발명의 DNA 서열 및 이의 단편은 2개의 상보성 DNA 서열 가닥의 단지 하나의 가닥에 대해 참조로 개시되어 있다. 결과적으로 및 의도적으로, 당해 분야에서 역 상보성 서열로 또한 언급된, 본원에 제공된 서열의 상보성 서열(상보성 가닥의 서열)은 본 발명의 영역내에 있으며 청구된 요지의 영역 내에 존재하는 것으로 표시하여 의도된다. 따라서, 본원에 사용된 것으로서, 서열 번호: 1 내지 10 및 서열 번호: 14 내지 22 및 이의 단편에 대한 참조는 상보성 가닥 및 이의 단편의 서열을 말한다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "단편"은 전체적으로 보다 작은 조각을 말한다. 예를 들면, 서열 번호: 10의 단편은 서열 번호: 10의 완전한 서열의 적어도 약 20개의 연속된 뉴클레오타이드, 적어도 약 25개의 연속된 뉴클레오타이드, 적어도 약 30개의 연속된 뉴클레오타이드, 적어도 약 35개의 연속된 뉴클레오타이드, 적어도 약 40개의 연속된 뉴클레오타이드, 적어도 약 45개의 연속된 뉴클레오타이드, 적어도 약 50개의 연속된 뉴클레오타이드, 적어도 약 60개의 연속된 뉴클레오타이드, 적어도 약 70개의 연속된 뉴클레오타이드, 적어도 약 80개의 연속된 뉴클레오타이드, 적어도 약 90개의 연속된 뉴클레오타이드, 또는 적어도 약 100개의 연속된 뉴클레오타이드인 서열을 포함할 수 있다.

이식유전자 삽입체의 완전한 DNA 서열 및 이식유전자 삽입체의 한쪽 말단에 플랭킹하는 옥수수 게놈 DNA의 실제적인 분절에 상응하는 DNA 서열이 서열 번호: 10으로 제공된다. 포스포디에스테르 결합 연결에 의해 물리적으로 연결됨으로써 이식유전자 삽입체의 5' 말단에 플랭킹된 옥수수 게놈 DNA의 DNA 서열은 서열 번호: 1, 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 및 서열 번호: 7로서 제공된다. 포스포디에스테르 결합 연결에 의해 물리적으로 연결되어 이식유전자 삽입체의 3' 말단에 플랭킹된 옥수수 게놈 DNA의 DNA 서열은 서열 번호: 2, 서열 번호: 4, 서열 번호: 6, 및 서열 번호: 8로 제공된다.

옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수는 연결부(junction)로 언급된 2개의 영역을 포함한다. "연결부"는, 이식유전자 삽입체의 하나의 말단이 게놈 DNA에 연결된 것이다. 연결부는 이식유전자 삽입체 및 인접한 플랭킹 게놈 DNA의 부위를 가로질러 확장되거나 연장되며, 예를 들면 하나의 연속된 분자와 같은 이들 2개의 연결점이다. 하나의 연결부는 이식유전자 삽입체의 5' 말단이고 하나는 이식유전자 삽입체의 3' 말단이며, 본원에서 각각 5' 및 3' 연결부로 언급된다. "접합 서열(junction sequence)"은 이벤트의 5' 또는 3' 연결부로 확장하는 어떠한 길이의 DNA 서열을 말한다. 옥수수 MON 87419 이벤트의 접합 서열은 서열 번호: 10을 사용하는 당해 분야의 숙련가에게 용이하게 명백하다. 옥수수 MON 87419 이벤트의 접합 서열의 예는 서열 번호: 1 내지 8로서 제공된다. 도 1은 5'로부터 3'까지 배열된 서열 번호: 1 내지 10의 물리적 배열을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 서열 번호: 1 내지 8에 설정된 바와 같은 DNA 서열 중의 적어도 하나를 함유하는 DNA 분자를 제공한다.

옥수수 MON 87419 이벤트의 접합 서열은 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물, 종자, 또는 세포의 게놈의 일부분으로서 존재할 수 있다. 형질전환 옥수수 식물, 식물 부분, 종자, 또는 세포로부터 기원한 샘플 내에서 서열 번호: 1 내지 8 중 어느 하나 이상의 것의 확인은, DNA가 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수로부터 획득되었으며 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재에 대해 진단성임을 나타낸다.

옥수수 MON 87419 이벤트는 이식유전자 삽입체에 대해 독특한 서열, 구체적으로 서열 번호: 14 내지 22를 함유한다. 이들 서열은 다양한 프로모터, 인트론, 염색체 표적화 펩티드(CTP), 3' 말단 신호, 이벤트의 이식유전자 삽입체내의 *pat* 및 *dmo* 유전자의 특이적인 키메라 구조에 대해 유일하다. 도 1은 서열 번호: 9와 관련하여 이들 독특한 이식유전자 삽입체 서열 각각의 관련 위치를 나타낸다.

샘플내에서 옥수수 MON 87419 이벤트로부터 기원한 DNA의 존재를 진단하기 위한 프로브 또는 프라이머로서 사용될 수 있는 예시적인 DNA 분자가 제공된다. 이러한 프라이머 또는 프로브는 표적 핵산 서열에 대해 특이적이며 보통 본원에 기술된 방법에 의해 옥수수 MON 87419 이벤트를 확인하는데 유용하다.

"프라이머"는 증폭 반응을 포함하는 어닐링(annealing) 또는 혼성화 방법에 사용하기 위해 설계된 DNA 분자이다. 증폭 반응은 주형 DNA를 증폭시켜 증폭산물(amplicon)을 생산하는 시험관내(*in vitro*) 반응이다. 본

원에 사용된 것으로서, "증폭산물"은 증폭 기술을 사용하여 합성된 DNA 분자이다. 본 발명의 증폭산물은 서열 번호: 1 내지 10 중의 하나 이상을 포함하는 DNA 서열, 또는 이의 단편을 갖는다. 프라이머의 쌍은 폴리머라제쇄 반응(PCR)과 같은 증폭 반응에서 옥수수 게놈 DNA의 샘플과 같은 주형 DNA와 함께 사용되어 증폭산물을 생산할 수 있으며, 여기서 생산된 증폭산물은, 프라이머가 주형에 혼성화된 2개의 부위 사이에 위치한 주형 DNA의 서열에 상응하는 DNA 서열을 가질 수 있다. 프라이머는 전형적으로 상보성 표적 DNA 가닥에 혼성화하여 프라이머와 표적 DNA 가닥 사이에서 혼성체를 형성하도록 설계된다. 프라이머의 존재는 주형으로서 표적 DNA 가닥을 사용하여 프라이머의 연장을 개시하는 폴리머라제에 의한 인식의 지점이다. 프라이머 쌍은 이들 사이에 뉴클레오티드 분절을 증폭시킬 목적으로 이중 가닥 뉴클레오티드 분절의 반대 가닥을 결합시키는 2개의 프라이머의 용도를 지칭한다. 프라이머 서열의 예는 서열 번호: 11 및 서열 번호: 12로서 제공된다. 서열 번호: 11 및 서열 번호: 12로서 제공된 프라이머 쌍은 제1의 DNA 분자 및 제2의 DNA 분자로서 유용하며, 여기서 제1의 DNA 분자는 서열 번호: 9의 단편이고 제2의 DNA 분자는 서열 번호: 10의 옥수수 게놈 DNA 서열의 단편이며, 각각은 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 DNA와의 증폭 반응에서 함께 사용된 경우 DNA 프라이머로서 작용하여 샘플 내에서 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 진단성인 증폭산물을 생산하기에 충분한 길이이다. 옥수수 MON 87419 이벤트의 옥수수 게놈 DNA 서열은 서열 번호: 10의 1 내지 1246번 및 8009 내지 9259번 위치로서 제공된다.

"프로브"는 표적 핵산의 가닥에 대해 상보성이고 혼성화 검출 방법에서 유용한 핵산 분자이다. 본 발명에 따른 프로브는 데옥시리보핵산 또는 리보핵산을 포함할 뿐 아니라 표적 DNA 서열에 특이적으로 결합하는 다른 프로브 물질을 포함하며 이러한 결합의 검출은 표적 DNA 서열의 존재 또는 부재를 검출하는데 유용할 수 있다. 프로브는 방사선 동위원소, 리간드, 화학발광제, 또는 효소와 같은, 통상적인 검출가능한 표지 또는 리포터 분자에 부착될 수 있다. 옥수수 MON 87419 이벤트를 검출하기 위한 프로브로서 유용한 예시적인 DNA 서열은 서열 번호: 13로서 제공된다.

프라이머 및 프로브를 진단하고 사용하는 방법은 당해 분야에 잘 공지되어 있으며, 서열 번호: 1 내지 10의 단편을 포함하고 옥수수 MON 87419 이벤트를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브로서 유용한 DNA 분자는 당해 분야의 숙련가에 의해 용이하게 설계될 수 있다.

본원에 제공된 DNA 분자 및 상응하는 DNA 서열은 형질전환 옥수수 식물, 세포, 종자, 또는 식물부분에서 옥수수 MON 87419 이벤트를 확인하고; 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 옥수수 변이체 또는 혼성체를 선택하며; 샘플 내에서 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재 또는 부재를 검출하는데 유용하다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "분리된"은 이의 천연 또는 자연 상태에서 이와 정상적으로 관련된 다른 분자로부터 분자를 분리하는 것을 말한다. 따라서, 용어 "분리된"은 일반적으로 이의 자연 상태 또는 천연 상태에서 이와 관련된 다른 DNA 분자(들)로부터 분리된 DNA 분자를 말할 수 있다. 이러한 DNA 분자는 재조합된 상태, 예를 들면, 재조합 DNA 분자로 존재할 수 있다. 따라서, 이들이 예를 들면, 재조합 기술의 결과로서 정상적으로 관련되지 않은 조절 또는 암호화 서열에 융합된 DNA 분자는, 이식유전자로서 세포의 염색체내로 통합되거나 다른 DNA 분자와 함께 존재하는 경우에서 조차, 분리된 것으로 고려된다.

본 발명은 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 옥수수 식물, 후대, 종자, 식물 세포, 및 식물 부분을 제공하며, 이들을 이용하여 생산된 상품 생성물을 제공한다. MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 제초제 내성 옥수수 종자의 대표적인 샘플은 부다페스트 조약에 따라 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)(ATCC®)에 기탁되어 있다. ATCC 기탁기관은 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 제초제 내성 옥수수 식물의 종자에 대해 특허 기탁 지정번호 제PTA-120860호를 지정하였다. 본 발명의 식물, 후대, 종자, 식물 세포, 식물 부분, 및 상품 생성물은 서열 번호: 1 내지 10 및 서열 번호: 14 내지 22로서 제공된 서열 중의 적어도 하나를 갖는 검출가능한 양의 DNA를 함유한다. 본 발명의 식물, 후대, 종자, 식물 세포, 및 식물 부분들은 또한 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 옥수수 식물을 하나 이상의 추가의 형질전환 특성, 특히 추가의 형질전환 특성(들)을 함유하는 다른 식물과 교배하여 도입된 특성들을 함유할 수 있다. 이러한 특성은 증가된 곤충 내성, 증가된 물 사용 효율, 증가된 수율 성능, 증가된 내가뭄성, 증가된 종자 품질, 개선된 영양 품질, 혼성체 종자 생산, 및/또는 증가된 제초제 내성을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 여기서 상기 특성은 이러한 형질전환 특성을 결여한 옥수수 식물과 관련하여 측정된다.

본 발명의 식물은 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 후대를 생산하는데 사용될 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, "후대"는 서열 번호: 1 내지 10으로부터 선택된 적어도 하나의 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하는 식물에 의해 나타난, 선조 식물로부터 유전된 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 어떠한 식물, 종자, 및 식물 세포도 포함한다. 식물, 후대, 및 종자는 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 동형접합성이거나 이형접합성일 수 있

다. 후대 식물은 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 옥수수 식물에 의해 생산된 종자로부터 또는 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 화분(pollen)으로 수정된 옥수수 식물에 의해 생산된 종자로부터 성장될 수 있다.

본원에 사용된 것으로서, 본 발명의 "식물 부분"은 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물로부터 기원한 어느 부분일 수 있다. 식물 부분은 화분, 배주(ovule), 꼬투리, 꽃, 뿌리, 줄기, 섬유, 및 잎을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 식물 부분들은 생존성이거나 비생존성일 수 있다.

본 발명은 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수로부터 생산된 상품 생성물을 제공한다. 본 발명의 상품 생성물은 서열 번호: 1 내지 10으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 검출가능한 양의 DNA를 함유한다. 본원에 사용된 것으로서, "상품 생성물"은 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 옥수수 식물, 옥수수 종자, 옥수수 식물 세포, 또는 옥수수 식물 부분으로부터 기원한 물질로 구성된 어떠한 조성물 또는 생성물도 말한다. 상품 생성물은 가공된 종자, 낱알, 식물 부분, 및 식사를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수를 사용하여 옥수수로부터 전형적으로 획득된 어떠한 상품 생성물도 제조할 수 있다. 본 발명의 상품 생성물은 옥수수 MON 87419 이벤트에 상응하는 검출가능한 양의 DNA를 함유할 것이다. 샘플 내에서 하나 이상의 이러한 DNA의 검출은 상품 생성물의 함량 또는 공급원을 측정하는데 사용될 수 있다. 본원에 개시된 검출 방법을 포함하는, DNA 분자에 대한 어떠한 표준 검출 방법도 사용할 수 있다.

본 발명은 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수에게 글루포시네이트 또는 디캄바, 또는 글루포시네이트 및 디캄바 제초제를 사용하는 잡초의 방제 방법을 제공한다. 지역내에서 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물을 식재하는 단계 및 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물을 손상시키지 않고 상기 지역내에서 잡초를 방제할 목적으로 상기 지역에 글루포시네이트 또는 디캄바, 또는 글루포시네이트 및 디캄바 제초제의 제초적 유효 용량을 적용시키는 단계를 포함하는, 들판과 같은, 지역내 잡초를 방제하는 방법이 제공된다. 글루포시네이트 또는 디캄바, 또는 글루포시네이트 및 디캄바 제초제의 이러한 적용은 출현-전(옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 종자를 식재한 후 그리고 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물이 나타나기 전 임의의 시기) 또는 출현-후(옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물이 나타난 후 임의의 시기)일 수 있다. 잡초를 방제하기 위해 상기 지역에서 사용하기 위한 글루포시네이트의 제초 유효 용량은 성장하는 계절에 걸쳐 에이커당 약 0.1 파운드 산 당량(ae/ac) 내지 약 16 파운드 ae/ac 만큼의 범위의 글루포시네이트로 이루어져야 한다. 잡초를 방제하기 위해 상기 지역에서 사용하기 위한 디캄바의 제초 유효 용량은 성장하는 계절에 걸쳐 에이커당 약 0.1 파운드 ae/ac 내지 약 16 파운드 ae/ac 만큼의 범위의 디캄바로 이루어져야 한다. 디캄글루포시네이트 또는 디캄바, 또는 글루포시네이트 및 디캄바 제초제의 다수의 적용, 예를 들면, 2회 적용(예를 들면, 식재 전 적용 및 출현 후 적용 또는 출현-전 적용 및 출현-후 적용) 또는 3회 적용(예를 들면, 식재-전 적용, 출현-전 적용 및 출현-후 적용)을 성장하는 계절에 걸쳐 사용할 수 있다.

본원에 사용된 것으로서, "활성 성분" 또는 "ai"는 흔히 갤론(gallon)당 파운드로 측정되거나 에이커당 파운드로서 적용된, 제초제 활성에 관여하는 제초제 제형의 성분이다. 산(예를 들면, 이들의 구조의 일부로서 카복실 그룹을 갖는 분자)인 제초제의 경우, 산성 그룹은 흔히 제형 공정 동안 염(바람직한 이온에 의해 대체되어 염을 형성할 수 있음) 또는 에스테르(알코올과 반응하여 에스테르를 형성함)로 전환된다. 이는 특수한 제초제 분자의 화학 특징뿐 아니라 질량도 변경시킬 수 있다. 그러나, 상응하는 산은 제형의 제초적으로 활성인 부위이며 상이한 활성 성분들 사이의 제초 활성의 등가는 측정의 표준 단위로서 산 당량을 사용하여 계산할 수 있다. 용어 "산 당량" 또는 "ae"는 상응하는 산으로 이론적으로 다시 전환될 수 있는 제형내의 활성 성분의 부위를 의미한다. 제초제 적용율은 "에이커당 산 당량"("ae/ac"로 약술함) 또는 "에이커당 활성 성분"("ai/ac"로 약술함)으로 나타낼 수 있다.

옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 제초제 내성 형질전환 옥수수 식물을 생산하는 방법이 제공된다. 이들 방법에 의해 생산된 후대는 변종 식물 또는 혼성체 식물일 수 있고; 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물에 의해 생산된 종자로부터 또는 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물로부터의 화분으로 수정된 옥수수 식물에 의해 생산된 종자로부터 성장될 수 있으며; 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 동종접합성 또는 이종접합성일 수 있다. 식물은 자가-수분(또한 "자가수정"으로 공지됨) 또는 타가-수분(또한 "교배"로서 공지됨)일 수 있다. 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물은 자가-수분되어 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 동종인 식물의 실제 육종 계통을 생성할 수 있다. 자가수정은 "동계교배"로 공지된 후대를 생성하며 유전적으로 균일한 교배 계통을 생산하는데 사용된다. 달리, 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물을 이종교배하여(형질전환성 또는 비형질전환성인 다른 식

물과 교배함) 변종 또는 혼성체 종자를 생산할 수 있다. 본 발명의 방법으로 제조된 종자 및 후대 식물은 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유할 수 있으며 이후에 글루포시네이트 또는 디캄바, 또는 글루포시네이트 및 디캄바 제초제로 처리할 수 있다. 글루포시네이트 또는 디캄바, 또는 글루포시네이트 및 디캄바 제초제로 처리하여 이에 대해 내성인 후대를 선택할 수 있다. 달리는, 이들 후대 식물을 진단 방법을 사용하여 분석함으로써 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 식물 또는 종자에 대해 선택할 수 있다.

본 발명의 식물, 후대, 종자, 식물 세포, 및 식물 부분은 또한 하나 이상의 추가의 옥수수 형질전환 특성, 특히 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 옥수수 식물을 추가의 형질전환 특성(들)을 함유하는 다른 옥수수 식물과 교배함으로써 도입된 것들을 함유할 수 있다. 이러한 옥수수 형질전환 특성은 증가된 곤충 내성, 증가된 물 사용 효율, 증가된 수율 수행능, 증가된 내가뭄성, 증가된 종자 품질, 개선된 영양 품질, 혼성체 종자 생산, 및 제초제 내성을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 여기서 상기 특성은 이러한 형질전환 특성을 결여하고 있는 옥수수 식물과 관련하여 측정된다. 이러한 옥수수 형질전환 특성은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있는데; 예를 들면, 이러한 특성의 목록은 미국 농무성 동식물 검역국[the United States Department of Agriculture's (USDA) Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)]에 의해 제공되며 이들의 웹사이트 <http://www.aphis.usda.gov>에서 찾을 수 있다. 따라서, 2개의 형질전환 식물을 교배하여 2개 이상의 독립된 분리 형질전환 특성을 함유하는 후대를 생산할 수 있다. 친계 식물로의 역-교배 및 비-형질전환 식물과의 이중-교배가 영양 번식에서와 같이, 고려된다. 상이한 특성 및 작물을 위해 일반적으로 사용되는 육종 방법의 설명은 수개의 참고문헌, 예를 들면, Fehr, in Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987) 중 하나에서 찾을 수 있다.

본 발명의 식물, 종자, 세포, 식물 부분, 및 상품 생성물은 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재의 지표인 DNA 및 단백질 분자의 검출을 위해 사용될 수 있다. 이러한 검출은 본원에 제공된 DNA 서열 및 서열 번호: 9로서 제공된 이식유전자 삽입체에 의해 암호화된 각각의 DMO 및 PAT 단백질을 사용하여 이를 수 있다. 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재의 검출은 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들면, 핵산, 핵산 혼성화 기술(예를 들면, 노던 블롯팅 및 서던 분석), 단백질 검출 기술(예를 들면, 웨스턴 블롯팅, 면역-침전, 및 효소-연결된 면역흡착성 검정-계(ELISA) 기술) 또는 본원에 제공된 검출 방법 및/또는 검출 키트를 사용함으로써 수행할 수 있다. 한가지 방법은 DNA 샘플을 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수의 DNA로부터의 증폭산물을 생산할 수 있는 프라이머 쌍과 접촉시키는 단계, 증폭 반응을 수행함으로써 서열 번호: 1 내지 10 및 서열 번호: 14 내지 22로 제공된 DNA 서열 중의 적어도 하나를 포함하는 DNA 증폭산물을 생산한 후 증폭산물 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 단계 및 임의로 서열 번호: 1 내지 10 및 서열 번호: 14 내지 22로 제공된 서열 중의 적어도 하나를 포함하는 서열을 증폭산물의 서열 내에서 확인하는 단계를 제공한다. 이러한 증폭산물의 존재는 옥수수 MON87419 이벤트를 함유하는 이식유전자 옥수수에 특이적인 DNA의 존재에 대하여 진단성이고 그래서 옥수수 MON87419 이벤트를 함유하는 이식유전자 옥수수에서 유래된 것으로서 샘플에 함유된 생물학적 물질이다. 다른 방법은 DNA 샘플 DNA 프로브와 접촉시키는 단계, 상기 프로브 및 DNA 샘플을 엄격한 혼성화 조건에 적용시키는 단계, 및 이후에 상기 프로브와 상기 표적 DNA 샘플 사이의 혼성화를 검출하는 단계를 제공한다. 혼성화의 검출은 DNA 샘플 내에서 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수에 대해 특이적인 DNA의 존재에 대해 진단성이다.

옥수수 MON 87419 이벤트에 대한 DNA 검출 키트가 제공된다. 이러한 키트의 변형은 또한 본원에 개시된 조성물 및 방법 및 DNA 검출의 당해 분야에 잘 공지된 방법을 사용하여 개발할 수 있다. DNA 검출 키트는 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 식물과의 교배를 위한 방법에 적용될 수 있다. 이러한 키트는 서열 번호: 1 내지 10의 단편을 함유하는 DNA 프라이머 또는 프로브를 포함한다. 이러한 키트의 한가지 예는 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 제초제 내성 옥수수 식물로부터 기원한 DNA의 샘플 내에서 존재 및/또는 부재를 검출하는데 유용한 DNA 프로브로서 작용하기 위한 충분한 길이의 서열 번호: 10의 연속된 뉴클레오타이드의 적어도 하나의 DNA 분자를 포함한다. 옥수수 MON 87419 이벤트 DNA를 함유하는 형질전환 제초제 내성 옥수수의 샘플 내에서 존재 및/또는 부재를 측정, 검출, 또는 진단하는데 유용한 DNA 프로브로서 사용하기에 충분한 DNA 분자는 서열 번호: 13으로 제공된다. 다른 프로브도 당해 분야의 숙련가에 의해 용이하게 설계될 수 있으며, 서열 번호: 10의 적어도 약 15개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있고 옥수수 MON 87419 이벤트 DNA를 함유하는 형질전환 제초제 내성 옥수수에 대해 충분히 유일하여 옥수수 MON 87419 이벤트로부터 기원한 DNA를 확인할 수 있다. 다른 유형의 키트는 옥수수 MON 87419 이벤트의 샘플 내에서 존재 또는 부재를 검출하는데 유용한 증폭산물을 생산하는데 유용한 프라이머 쌍을 포함한다. 이러한 키트는 표적 DNA 샘플을 프라이머 쌍과 접촉하는 단계에 이어서, 서열 번호: 1 내지 10으로부터 선택된 적어도 하나의 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하는 증폭산물을 생산하기에 충분한 핵산 증폭 반응을 수행하는 단계에 이어서, 상기 증폭산물의 존재 또는 부재를 검출

하는 단계를 포함하는 방법을 사용할 수 있다. 이러한 방법은 또한 증폭산물 또는 이의 단편의 서열분석을 포함할 수 있다. 다른 프라이머 쌍은 당해 분야의 숙련가에 의해 용이하게 설계될 수 있으며 서열 번호: 10의 적어도 20개의 뉴클레오티드를 포함하여야 하고 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 제초제 내성 옥수수에 대해 충분이 유일하여 옥수수 MON 87419 이벤트를 검출할 수 있어야 한다. 본 발명의 키트는 임의로 또한 본원에 기술된 검출 또는 진단 반응을 수행하기 위한 시약 또는 상기 키트 및 이의 성분의 사용을 위한 지시사항을 포함할 수 있다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "함유하는"은 "포함하지만 이에 제한되지 않는"을 의미한다.

기탁 정보

옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 형질전환 옥수수 종자의 대표적인 샘플의 기탁은 부다페스트 조약에 따라 주소가 미국 우편번호 20110 버니지아주 마나사스, 유니버시티 볼러바드 10801인 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)에서 이루어졌다. 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 종자에 대한 ATCC 특허 기탁 지정번호(수탁번호)는 제PTA-120860호이고 기탁일은 2014년 1월 17일이다. 상기 기탁은 상기 기탁기관에서 30년 이상의 기간 동안, 마지막 요청 후 5년 이상 동안, 또는 특허의 유효 기간 이상 동안 유지될 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

다음의 실시예는 본 발명을 보다 충분히 설명하기 위해 포함된다. 당해 분야의 숙련가는, 많은 변형이 개시된 구체적인 실시예에서 이루어질 수 있으며 여전히 유사한 결과를 수득할 수 있음을 인식하여야 한다. 화학적으로 및 생리학적으로 둘 다 관련된 특성의 제제는 동일하거나 유사한 결과를 달성하면서, 본원에 기술된 제제로 치환될 수 있다. 당해 분야의 숙련가에 명백한 모든 이러한 치환 및 변형은 본 발명의 영역내에 있는 것으로 고려되어야 한다.

실시예 1: MON 87419 이벤트 생산 및 선택

본 실시예는 디캄바 및 글루포시네이트 제초제 둘 다에 대해 내성을 제공할 수 있는 이벤트 MON 87419를 함유하는 형질전환 옥수수의 생산, 분석, 및 선택을 설명한다. 옥수수 MON 87419 이벤트의 궁극적인 선택을 위해 필요한 엄격한 분자, 표현형, 및 현장 시험(field testing)을 통해 수년에 걸쳐 수천개의 개별 식물의 생산 및 분석을 요약한다.

다양한 상이한 발현 카세트를 함유하는 형질전환 벡터를 설계하여 시험함으로써 *dmo* 및 *pat* 유전자를 발현하기 위한 이들의 용도를 확인하였다. 당해 데이터를 사용하여, 발현 성분 조합을 선택하고 8개의 상이한 형질전환 벡터를 작제하여 옥수수 내로 변형시켰다. 이들 벡터를 *pat* 유전자 및 *dmo* 유전자에 대한 2개의 암호화 영역과의 다양한 조합으로 프로모터 및 종결인자(terminator)를 시험하였다(표 1). 수득되는 식물을 단백질 발현에 대해 분석하고 2개의 벡터(표 1에서 A 및 B로 나타냄)를 상업적인 옥수수 형질전환을 위해 선택하였다.

표 1

형질전환 벡터의 카세트 배열

벡터	카세트 1 (PAT)			카세트 2 (DMO)		
	프로모터	목적 유전자	종결인자	프로모터	목적 유전자	종결인자
A	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	PCSV/I-Act1	CTP4/DMO	Hsp17.5
B	P-1	PAT	T-1	PCSV/I-Act1	CTP4/DMO	Hsp17.5
C	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-1	CTP4/DMO	Hsp17.5
D	P-1	PAT	T-1	AND.ge.Ubq1	CTP4/DMO	Hsp17.5
E	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-2	CTP4/DMO	Hsp17.5
F	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-3	CTP4/DMO	Hsp17.5
G	P-1	PAT	T-1	P-2	CTP4/DMO	Hsp17.5
H	P-1	PAT	T-1	P-3	CTP4/DMO	Hsp17.5

13000개 이상의 독특한 변형된 옥수수 식물을 선택된 2개의 벡터(A 및 B)를 사용하여 생산하였다. 식물에서 개별 이벤트 속에 도입된 유전자의 발현 수준에 있어 광범위한 변화가 존재하며, 유전자 발현은 상기 이벤트를 함

유하는 식물의 표현형과 긍정적으로 또는 부정적으로 직접 관련시킬 수 있다. 식물에서 외부 유전자의 발현은 다른 것들 중에서도, 이들의 염색체 위치에 의해 영향받는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로, 수년 및 여러 지역을 통해 무작위적인 삽입 이벤트를 함유하는 다수의 개별 식물을 스크리닝하여 최적의 이벤트를 확인하는 것이 필수적이었다. 형질전환 옥수수 MON 87419 이벤트는 LH244 옥수수 미성숙 배아의 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)-매개된 형질전환을 통해 생성시켰다. 옥수수를 형질전환시키기 위한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 옥수수 세포를 변형시키고 완전한 옥수수 식물로 재생시켰다. 정상의 표현형적 특성을 지닌 뿌리내린 식물을 선택하였다. 이후에, 수천개의 개별의, 독립적인 이벤트를 성장 및 추가의 평가를 위해 토양으로 이주시켰다.

[표 2] 이벤트 선택 공정

	마일스톤	진전된 벡터 A 이벤트	진전된 벡터 B 이벤트	진전된 총 유일한 이벤트
R0 평가	생산된 유전자이식 이벤트	5236	8413	13649
	제 1 통과 단일 카피 분석	1300	1698	2998
	R0 분무	642	798	1440
	초기의 상세한 분자 분석	85	99	184
	R0 서던	54	58	112
조기 스크리닝 (R1 및 R2)	R1 시험 및 분자 분석	22	22	44
	R2 시험 및 분자 분석	20	22	42
진전된 현장 시험 및 분자 분석	SA 1 년	7	10	17
	US 1 년	5	6	11
	SA 2 년	2	3	5
	상세한 평가	2	0	2
	최종 이벤트 선택	1	0	1

이벤트 선택 공정 전반에 걸쳐서, 표현형, 재배법, 및 이벤트의 효능을 평가하기 위한 분자 분석 및 또한 현장 시험을 종종 동시에 수행하였다(표 2). 13,000개의 개별의, 독특한 변형된 옥수수 R0 식물을 PCR로 우선 분석하여 이식유전자 삽입체의 단일 카피(제1의 통과 단일 카피: First Pass Single Copy)를 지닌 이벤트를 선택하였다. 이는 2,998개 이벤트의 진전을 생성하였다. 다음의 선택은 온실에서 수행된 R0 제초제 분무 내성이었다. 식물을 글루포시네이트(Ignite® 280 제초제) 및 디캄바(Clarify® 제초제) 둘 다에 대한 내성에 대해 V1/V2 성장 단계에서 분무된 글루포시네이트(0.9 lb ai/ac) 및 디캄바(2.0 lb ae/ac)의 탱크 혼합을 사용하여 시험하였다. >15% 손상을 나타낸 식물을 버리고, 1,440개의 이벤트를 추가의 분석을 위해 선택하였다. 초기의 상세한 분자 분석을 수행하며 서열 확인 및 확증, 및 카피 수 및 골격의 부재의 제2 점검을 포함하였다. 당해 분석으로 진전에 대해 선택된 이식유전자 삽입체의 단일 카피만을 함유하는 184개의 이벤트를 생성하였다. R0 이벤트로부터 추출된 DNA에서의 서던 분석을 수행하여 이식유전자 삽입체 카피 수를 추가로 확인하고 형질전환 골격의 부재를 확인하였다. 이를 기초로 하여, 112개의 이벤트를 추가의 분석을 위해 R1에 대한 진전을 위해 선택하였다. R0 식물을 자가-수분시키고 종자를 R1 시험을 위해 선택하였다.

모든 현장 시험과 동시에, 추가의 분자 분석을 진행하였다. 노던 분석을 수행하여 *pat* 및 *dmo* 유전자의 mRNA 전사체를 검출하고 측정하였다. 선택 이벤트를 함유하는 형질전환 식물로부터 정제한 PAT 및 DMO 단백질의 N-말단 단백질 서열분석을 수행하여 재조합 단백질 서열을 확인하였다. PAT 및 DMO 단백질을 검출하기 위한 웨스턴 분석을 형질전환 식물 샘플을 사용하여 수행하였다. 전체 이식유전자 및 삽입체의 5' 및 3' 말단 둘 다의 서열 분석을 수행하고 후속적으로 사용하여 개별의 이벤트를 검출하는 방법을 개발하였다. 상세한 서던 분석을 R1 식물에서 수행하여 골격의 부재 및 카피 수를 확인하였다.

R1 현장 시험 초기 스크리닝을 위해, R0로부터 선택된 112개의 이벤트 중에서, 스크리닝된 82개의 이벤트를 중

자 회수 및 묘판(nursery) 크기 고려를 기준으로 하여 선택하였다. R1 식물을 분리하였으므로, 이벤트에 대해 널(null), 반접합성, 또는 동종접합성이었다. R1 식물에서 82개의 이벤트를 높은 비율의 제초제 적용을 사용하여 현장 효능 스크리닝에서 평가하였다. 식물 손상을 글루포시네이트(Ignite 280) 및 디캄바(Clarity)(현장 적용율로 표지된 20X 이하의 글루포시네이트 및 16X 이하의 디캄바)의 다양한 조합을 사용한 처리 및 V1/V2 내지 V8/V10의 다양한 성장 단계에서 적용 시기를 사용한 처리 후 평가하였다. 손상율(injury rating)은 제초제 적용 후 10 내지 14일째에 취하였다. 표준 손상율은 황백화 퍼센트, 기형, 및 번식에 대한 점수매김을 포함한다. 동일한 이벤트를 함유하는 다수의 식물에 대한 전체적인 평균을 사용하여 진전에 대해 이벤트를 선택하였다. 2X 비율에서 제초제 적용은 일반적으로 10% 미만의 손상율을 생산하였으며, 16X 및 20X 비율에서 제초제 적용은 10% 이상의 손상율을 생산하였다. 효능 시험 외에도, 재배 점수를 각각의 식물에 대해 수집하여 이것이 함유한 이벤트와 관련시켰다. 평가한 재배 점수매김 기준은 식물 높이, 이고(ear height), 습도 퍼센트, 시험 중량, 50% 화분까지의 일수, 및 50% 누에까지의 일수를 포함하였다. R1 현장 시험으로부터 수집한 데이터의 분석 및 분자 분석을 기준으로 하여, 44개의 이벤트를 추가의 분석을 위해 R2에 대한 진전에 대해 선택하였다. R1 식물을 자가-수분시키고 종자를 R2 시험을 위해 수집하였다.

[0032] R2 현장 시험 초기 스크리닝에서, R2 및 F1 이벤트(R1 이종교배로부터의 것)를 3개 지역(2개의 주 및 푸에르토리코)에서 현장 효능 스크리닝으로 평가하였다. 식물 손상은 글루포시네이트 및 디캄바 적용율 및 적용 시기의 다양한 조합을 사용한 처리 후 평가하였다. R2 식물은 상기 이벤트에 대해 동종접합성이며, 제초제 적용 후 제초제 내성 실패율은 낮았고, 이는, R1 결과를 확증한다. 재배 데이터를 수집하고 R1 현장 시험에서와 같이 점수를 매겼다. 유전자 발현 분석을 포함하는 추가의 분자 분석을 또한 사용하여 가장 우수한 이벤트를 함유하는 식물을 선택하였다. R2 및 F1 현장 시험 및 분자 분석으로부터 수집한 데이터의 분석을 기초로 하여, 42개 이벤트를 추가의 분석을 위한 R3로의 진전을 위해 선택하였다. R2 식물을 자가수분하고 종자를 R3 시험을 위해 수집하였다.

[0033] 진전된 현장 시험을 위해, 혼성체 및 근친교배한 효능과 혼성체 및 근친교배한 재배 현장 시험 둘 다를 수행하였다. 재배 현장 시험을 효능 현장 시험과 동일한 계절 동안 수행하였다. 모든 현장 시험은 무작위적으로 완료된 차단 설계를 사용하였으며 다수의 지역에서 수행하였다. 효능 및 재배 현장 시험 둘 다의 경우, 재배 점수를 현장 시험 계절 전체에서 수집하고 계절 말기에 수율을 측정하였다(효능 수율 또는 재배 수율). 효능 현장 시험을 수행하여 제초제 적용 후 10 내지 14일째에 작물 손상, 작물 손상 비율, 및 수율을 평가하였다. 표적 작물 손상 비율은 이벤트의 진전인 경우 10% 미만의 점수였다. 재배 현장 시험을 위해, 대지를 잡초가 없도록 유지시키고, 글루포시네이트 또는 디캄바 제초제를 성장하는 계절 동안 적용하지 않았다. 비교가능한 혼성체의 대조군(혼성체 대조군)을 포함한 혼성체 재배 현장 시험은 형질전환 혼성체 교배를 이루는데 사용된 동일한 친계 옥수수 계통을 사용하나, 형질전환 이벤트를 함유하지 않도록 생산하였다. 근친교배한 대조군은 형질전환 근친교배한 계통에 대하여 비교가능한 근친 교배물이다.

[0034] 메타-분석을 다-계절, 다-지역 현장 시험 데이터의 합계를 사용하여 수행하였다. 표 3은, 관찰을 상기 이벤트들 중 하나를 함유하는 식물에 대한 특수한 현장 시험 유형에 대해 반복한 다수의 반복물을 나타낸다. 2개의 이벤트 각각에 대해, 혼성체 재배 수행능에 대해 기록된 135개의 데이터 점, 혼성체 효능에 대한 933개의 데이터 점, 근친교배된 재배물에 대한 179개 데이터 점, 근친교배 효능에 대한 30개의 데이터 점, 및 상기 이벤트를 함유하는 옥수수에 대한 제초제 적용율의 압력 시험을 기본으로 한 이벤트에 대한 16개의 데이터 점이 존재하였다.

표 3

[0035] 2개의 최종 이벤트에 대한 현장 시험 적용

설명	이벤트당 반복물
혼성체 재배학	135개 반복물
혼성체 효능	933 개 반복물
근친교배 재배학	179 개 반복물
근친교배 효능	30 개 반복물
이벤트계 압력 시험	16 개 반복물
이벤트당 총 반복물	1293

[0036] 23개의 선택된 이벤트 중의 하나(R2 현장 시험으로부터의 42개의 이벤트의 소세트)를 함유하는 혼성체 식물을

남 아메리카(SA) 1년의 반대-계절 효능 현장 시험 및 재배 현장 시험에서 평가하였다. 시험을 4회 처리 및 처리당 2회 반복물을 사용한 무작위처리된 완전한 블록 설계로 6개의 위치에서 수행하였다. 효능 현장 시험에서, 디캄바 제형은 Banvel® 4SL 제초제이고 글루포시네이트 제형은 Liberty® 1.67SL이었다. 제초제 처리는 다음으로 이루어졌다: (1) 처리되지 않은 대조군; (2) PRE(여기서 PRE는 식재시 또는 작물이 나타나기 전으로 정의된다)에서 2lbs ae/acre (ac)에서의 디캄바 및 이후 VE-V2에 이어 V4 및 이후 V8까지 각각에서 적용된 1lb ae/ac에서의 디캄바; (3) VE-V2에 이어 V4 및 이어서 V8까지 0.8 lb ai/ac에서 적용된 글루포시네이트; 및 (4) VE-V2에 이어서 V4 및 이후 V8까지 0.8 lb ai/ac에서 적용된 글루포시네이트 및 1 lb ae/ac에서 적용된 디캄바. 손상 등급은 제초제 적용 후 10 내지 14일째에 취하였다. 동일한 이벤트를 함유하는 다수의 식물에 대한 전체적인 평균을 사용하여 진전에 대한 이벤트를 선택하였다. 표적 작물 손상 등급은 10% 미만의 점수이었고 관찰된 손상 등급은 1% 이하이었다. 혼성체 손상 점수매김, 재배 점수매김, 효능 수율, 재배 수율, 및 추가의 분자 분석을 기본으로 하여, 17개 이벤트를 진전을 위해 선택하였다.

[0037] SA 1년의 대조되는 계절 현장 시험으로부터 진전된 17개의 이벤트로부터의 근친교배된 식물 및 혼성체 식물을 이후에 미국(US) 1년의 효능 현장 시험 및 재배 현장 시험에서 평가하였다. 이들 시험은 2012년에 수행하였으며, 이는 미국에서 심각한 가뭄의 계절이었다. 혼성체 효능 현장 시험을 6개의 처리 및 처리당 3회의 반복물을 지닌 무작위처리된 완전한 블록 설계로 2개 주의 12개의 지역에서 수행하였다. 형질전환 이벤트를 함유하는 혼성체 식물은 작물에서 수컷 친계로부터의 글리포세이트 내성을 유도하였다. 이들 효능 현장 시험에서, 글리포세이트 제형은 Roundup PowerMAX® 4.5SL이었으며, 디캄바 제형은 Clarity 4SL이었고, 글루포시네이트 제형은 Ignite 280 2.34SL이었다. 제초제 처리는 다음으로 이루어졌다: (1) 처리되지 않은 대조군; (2) V4에 이어서 V8에 의해 적용된 3 lbs ae/ac에서의 글리포세이트; (3) V2에 이어서 V4 및 이후 V8에 의해 적용된 0.8 lb ai/ac에서의 글루포시네이트; (4) PRE 적용 및 이후 V4에 이어서 V8에 의해 적용된 2 lbs ae/ac에서의 디캄바; (5) V2에 이어서 V4 및 이후 V8까지 적용된 3lbs ae/ac에서의 글리포세이트 및 1.5 lbs ae/ac에서의 디캄바; (6) V2까지 적용된 2 lbs ae/ac에서의 디캄바에 이어서 성장 단계 V4까지 적용된 0.8 lbs ai/ac에서의 글루포시네이트 및 1 lb ae/ac에서의 디캄바에 이어 성장 단계 V8까지 적용된 3 lbs ae/ac에서의 글리포세이트 및 1.5 lbs ae/ac에서의 디캄바. 손상 등급은 제초제 적용 후 10 내지 14일째에 취하였다. 동일한 이벤트를 함유하는 다수의 식물에 대한 전체 평균을 사용하여 진전에 대해 이벤트를 선택하였다. 표적 작물 손상 등급은 10% 미만의 점수이었고, 관찰된 손상 등급은 1% 미만이었다. 혼성체 손상 점수매김, 재배 점수매김, 효능 수율, 재배 수율, 및 추가의 분자 분석을 기본으로 하여, 11개의 이벤트를 진전을 위해 선택하였다.

[0038] 혼성체 효능 및 근친교배된 재배 수율을 평가하기 위한 남아메리카(SA) 2년의 반대의 계절 현장 시험을 이들 11개의 이벤트를 함유하는 식물로 수행하였다. 형질전환 이벤트를 함유하는 혼성체 식물은 교배시 수컷 친계로부터의 글리포세이트 내성으로부터 기원하였다. 혼성체 효능 현장 시험을 필수적으로 남아메리카(SA) 1년의 반대의 계절 현장 시험에서 기술한 바와 같지만 다음의 제초제 처리를 사용하여 수행하였다: (1) 처리되지 않은 대조군; (2) V4에 이어서 V8에 의해 적용된 3 lbs ae/ac에서의 글리포세이트; (3) V4에 이어서 V8에 의해 적용된 0.8 lb ai/ac에서의 글루포시네이트; (4) PRE 적용 및 이후 V4에 이어서 V8까지 적용된 2 lbs ae/ac에서의 디캄바; (5) V4에 이어서 V8까지 적용된 3 lbs ae/ac에서의 글리포세이트 및 1.5 lbs ae/ac에서의 디캄바; (6) V4까지 적용된 0.8 lbs ae/ac에서의 글루포시네이트 및 1 lbs ae/ac에서의 디캄바에 이어서 V8까지 적용된 3 lbs ai/ac에서의 글리포세이트 및 1.5 lbs ae/ac에서의 디캄바. 손상 등급은 제초제 적용 후 10 내지 14일째에 취하였다. 동일한 이벤트를 함유하는 다수의 식물에 대한 전체 평균을 사용하여 진전에 대해 이벤트를 선택하였다. 혼성체 손상 점수매김, 재배 점수매김, 혼성체 효능 수율, 근친교배 재배 수율, 및 추가의 분자 분석을 기본으로 하여, 5개의 이벤트를 진전을 위해 선택하였다.

[0039] 이후에, 추가의 분자 분석을 이들 5개의 이벤트에 대해 완료하였다. 혼성체 특성 효능 현장 시험, 혼성체 및 근친교배된 수율 측정, 재배 점수매김, 및 분자 정보를 포함하는, 5개의 이벤트 각각에 대한 다중-년도 현장 및 분자 데이터를 이후에 검토하고, 2개의 이벤트를 추가의 분석을 위해 선택하였다. 이들 이벤트 둘 다는 동일한 형질전환 벡터를 사용하여 수행하였으며, 이에 따라 동일한 이식유전자 삽입체를 가지지만 동일한 게놈 위치 또는 플랭킹 서열을 가지지 않았다.

[0040] 미국(US) 2년의 혼성체 및 근친교배된 효능 현장 시험, 및 혼성체 및 근친교배된 재배 현장 시험을 수행하여 이들 2개의 이벤트를 평가하였다. 혼성체 효능 시험은 1년의 미국 현장 시험과 유사하였지만, 상이한 분무 요법을 포함하였다. 효능은 손상 등급 및 혼성체 효능 수율로 측정하였다. 이벤트에 대한 추가의 분자 분석을 또한 수행하였다. 형질전환 이벤트를 함유하는 혼성체 식물은 교배시 수컷 친계로부터 글리포세이트 내성을 유도하였다. 혼성체 효능 1 및 2 현장 시험을 2개 주에 걸친 12개의 지역에서 수행하였으며 혼성체 효능 3개 현

장 시험은 4개 주에 걸친 33개의 지역에서 수행하였다. 이들 현장 시험에서, 글리포세이트 제형은 Roundup PowerMAX® 4.5SL이었으며, 디캄바 제형은 Clarity 4SL이었고, 글루포시네이트 제형은 Ignite 280 2.34SL이었다. 효능 1 및 효능 2 시험(2개의 별도로 근친교배된 계통에 대해 교차 교배됨)에 대한 제초제 적용은 다음과 같았다: (1) 처리되지 않은 대조군; (2) VE-V2에 이어서 V6까지 적용된 0.4 lbs ai/ac에서의 글루포시네이트; (3) VE-V2에 이어서 V6까지 적용된 0.8 lb ai/ac에서의 글루포시네이트; (4) V4에 이어서 V8까지 적용된 0.5 lbs ae/ac에서의 디캄바; (5) V4에 이어서 V8까지 적용된 1.0 lbs ae/ac에서의 디캄바; (6) V4에 이어서 V8까지 적용된 2.25 lbs ae/ac에서의 글리포세이트 및 1.0 lbs ae/ac에서의 디캄바. 효능 3 시험(제3의 근친교배된 계통과의 교배로부터의 혼성체를 나타냄)을 위한 제초제 적용은 다음과 같았다: (1) 처리되지 않은 대조군; (2) VE-V2에서 적용된 0.5 lbs ae/ac에서의 디캄바에 이어서 V6에서 적용된 0.4 lb ai/ac에서의 글루포시네이트; 및 (3) VE-V2에서 적용된 1.0 lbs ae/ac에서의 디캄바에 이어서 V6에서 적용된 0.8 lb ai/ac에서의 글루포시네이트; 손상 등급 제초제 적용 후 10 내지 14일째에 취하였고 동일한 이벤트를 함유하는 다수의 식물을 사용하여 진전을 위한 이벤트를 선택하였다. 수율 및 재배 데이터를 수집하였다.

[0041]

2개의 이벤트에 대한 혼성체 손상 등급을 비교하기 위하여, 다수의 혼성체 효능 현장 시험의 메타-분석을 완료하였다(표 4). 손상 등급은 V8(여기서, V8 분석은 V2, V4, V6, 및 V8 제초제 적용으로부터의 누적된 손상을 포함한다)에서 통계적인 최저 유의성 차이($p < 0.05$ 에서 LSD)로 점수매겼다. 테스터 1, 테스터 2 및 테스터 3은 3개의 독립된 근친교배된 옥수수 친계 계통과의 교배를 나타내며, 이를 사용하여 나타난 현장 시험을 위한 혼성체를 생성시켰다. 시험 각각의 경우, 손상 등급에 있어서 통계적인 차이는 2개의 이벤트 중 어느 것도 함유하는 형질전환 옥수수 친계를 사용하여 생성된 혼성체 사이에서 발견되지 않았다.

표 4

[0042]

혼성체 효능 현장 시험으로부터의 손상 등급의 메타-분석

현장 시험	형질전환 옥수수	V8 손상	LSD ($P < 0.05$)
1년의 조합된 SA 및 US	MON 87419	0.43	0.3
1년의 조합된 SA 및 US	이벤트 2	0.49	0.3
SA 2년의 혼성체 효능	MON 87419	2.58	3
SA 2년의 혼성체 효능	이벤트 2	1.98	3
US 2년의 혼성체 테스터 1	MON 87419	0	0
US 2년의 혼성체 테스터 1	이벤트 2	0	0
US 2년의 혼성체 테스터 2	MON 87419	0	0
US 2년의 혼성체 테스터 2	이벤트 2	0	0
US 2년의 혼성체 테스터 3	MON 87419	0.31	0.42
US 2년의 혼성체 테스터 3	이벤트 2	0.12	0.42

[0043]

다수의 효능 현장 시험으로부터의 혼성체 효능 수율(부셸/에이커)의 메타-분석은 2개의 이벤트 각각을 함유하는 혼성체로부터의 수율을 비교하여 완료하였다. (표 5). 시험 각각에 대해, 혼성체 효능 수율에 있어서 통계적인 차이는 2개의 이벤트 중 하나를 함유하는 형질전환 옥수수 친계를 사용하여 생성된 혼성체 사이에서 발견되지 않았다.

표 5

[0044]

혼성체 효능 현장 시험으로부터의 수율의 메타-분석

현장 시험	혼성체 옥수수	수율 (Bu/ac)	LSD ($p < 0.05$)
1년의 조합된 SA 및 US	MON 87419	171.07	4
1년의 조합된 SA 및 US	이벤트 2	172.90	4
SA 2년	MON 87419	233.66	14
SA 2년	이벤트 2	231.59	14
US 2년 테스터 1	MON 87419	217.43	10
US 2년 테스터 1	이벤트 2	220.06	10
US 2년 테스터 2	MON 87419	219.68	7
US 2년 테스터 2	이벤트 2	221.21	7

US 2년 테스트 3	MON 87419	208.76	5.67
US 2년 테스트 3	이벤트 2	213.02	5.67

[0045]

압력 시험 현장 시험을 2개의 이벤트 중 어느 하나를 함유하는 혼성체 형질전환 옥수수 사용 하여 수행하였다. 압력 시험에서, 글루포시네이트(Ignite 280, 2.34SL) 또는 디캄바(Clarity 4SL) 제초제를 비-상업적인 고 비율로 적용하였다. 대표적인 현장 시험을 위해, 글루포시네이트에 대한 1X 비율은 0.4 lb ai/ac이었고 디캄바에 대한 1X 비율은 0.5 lb ae/ac이었다. 글루포시네이트 압력 시험 현장 시험을 위해, 글루포시네이트를 VE-V2에 이어서 V4 및 이후 V8까지 다음의 비율로 적용하였다: (1) 1 lb ai/ac (2.5X); (2) 2 lb ai/ac (5X); (3) 4 lb ai/ac (10X); 및 (4) 8 lb ai/ac (20X). 디캄바 압력 시험 현장 시험을 위해, 디캄바를 VE-V2에 이어서 V4 및 이후 V8까지 다음의 비율로 적용하였다: (1) 2 lb ae/ac (4X); (2) 4 lb ae/ac (8X); (3) 8 lb ae/ac (16X); 및 (4) 16 lb ae/ac (32X). 계절 말기에, 혼성체 압력 시험 현장 시험을 수거하고 수율(부셴/에이커 또는 bu/ac)을 측정하였다. 수율 데이터의 분석을 2개의 이벤트 중 하나를 함유하는 혼성체를 비교하였다. 시험 각각에 대해, 제초제 적용 중 어느 것에서 수율에 있어 통계적 차이는 2개의 이벤트 중 어느 하나를 함유하는 형질전환 옥수수 친계를 사용하여 생성된 혼성체 사이에서 발견되었다.

표 6

[0046]

혼성체 압력 시험 효능 현장 시험으로부터의 수율

현장 시험	형질전환 혼성체 옥수수	수율 (Bu/ac)	LSD (p<0.05)
글루포시네이트 압력 시험 2.5-20X	MON 87419	207.31	40
글루포시네이트 압력 시험 2.5-20X	이벤트 2	201.65	40
디캄바 압력 시험 4-32X	MON 87419	239.93	40
디캄바 압력 시험 4-32X	이벤트 2	234.60	40

[0047]

혼성체 재배 현장 시험을 3개 주에 걸쳐 21개의 위치에서 세트당 15개의 지역을 사용하여 3개 세트로 수행하고 혼성체 효능 현장 시험을 사용하여 동일한 계절 동안 수행하였다. 재배 측정을 현장 시험 계절 전체에서 수집하고, 계절 말기에 재배 수율을 측정하였다. 다중-계절에 걸친 메타-분석, 다중-지역 혼성체 재배 현장 시험을 사용하여 혼성체 대조군 및 2개의 이벤트 중의 하나를 함유하는 혼성체의 수율을 비교하였다. 혼성체 재배 수율에 있어서 통계적인 차이는 형질전환 혼성체 사이에서 또는 혼성체 대조군과 비교한 것으로서 발견되지 않았다(표 7).

표 7

[0048]

혼성체 재배 현장 시험으로부터의 수율의 메타-분석

현장 시험	혼성체 옥수수	수율 (Bu/ac)	LSD (p<0.05)
1년의 조합된 SA 및 US	대조군	180.28	6
1년의 조합된 SA 및 US	MON 87419	179.01	6
1년의 조합된 SA 및 US	이벤트 2	184.88	6
SA 2년	대조군	231.70	10
SA 2년	MON 87419	232.47	10
SA 2년	이벤트 2	225.07	10
US 2년 테스트 1	대조군	185.80	17.40
US 2년 테스트 1	MON 87419	187.09	17.40
US 2년 테스트 1	이벤트 2	192.28	17.40
US 2년 테스트 2	대조군	219.12	12.83
US 2년 테스트 2	MON 87419	219.56	12.83
US 2년 테스트 2	이벤트 2	221.22	12.83
US 2년 테스트 3	대조군	197.62	8.66
US 2년 테스트 3	MON 87419	191.49	8.66
US 2년 테스트 3	이벤트 2	195.48	8.66

[0049] 근친교배된 효능 현장 시험을 1개 주의 6개 지역에서 무작위처리된 완전한 블록 설계를 사용하여 수행하였다. 이들 현장 시험에서, 디캄바 제형은 Clarity 4SL이었고, 글루포시네이트 제형은 Ignite 280 2.34SL이었다. 근친교배된 효능 현장 시험을 위한 제초제 적용은 VE-V2에서 적용된 0.8 lb ai/ac에서의 글루포시네이트 및 2.0 lbs ae/ac에서의 디캄바에 이은 V8에서 적용된 0.8 lb ai/ac에서의 글루포시네이트 및 2.0 lbs ae/ac에서의 디캄바이었다. 계절의 말기에, 수율을 측정하였다. 시험 각각에 대해, 근친교배된 효능 수율에 있어서의 통계학적 차이가, 2개의 이벤트들 중 하나를 함유하는 형질전환 옥수수로부터의 이들 시험으로부터 수거된 근친교배된 수율을 비교하는 경우에 발견되었다(표 8). 이들 데이터는, 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수의 우수한 성능을 나타낸다.

표 8

[0050] 근친교배된 효능 현장 시험으로부터 수율의 메타-분석

현장 시험	근친교배된 옥수수	수율 (Bu/ac)	LSD (p<0.05)
2년간 US에서 근친교배됨	MON 87419	110.95	7
2년간 US에서 근친교배됨	이벤트 2	98.89	7

[0051] 근친교배된 재배 현장 시험을 US 1년의 효능 현장 시험, SA 1년의 효능 현장 시험, 및 US 2년의 효능 현장 시험 (1개 주, 11개 지역)을 사용하여 동일한 계절 동안 수행하였다. 대지를 다수의 지역에서 수행된 무작위처리된 완전한 블록 설계로 설정하고, 시험은 형질전환 근친교배된 계통에 대한 비교가능한 근친교배물의 대조군을 포함하였다. 다수의 계절에 걸친 메타-분석, 다수의 지역 근친교배된 재배 현장 시험을 수행하여 쌍을 이룬 대조군 및 2개의 이벤트 중 어느 하나를 사용하여 생성된 형질전환 근친교배군에 대한 수율을 비교하였다. 근친교배된 재배 수율에 있어서의 통계적인 차이는 대조군과 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 사이에서 발견되지 않았다(표 9). 대조적으로, 대조군 또는 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수에 대해 비교하는 경우 이벤트 2를 함유하는 형질전환 옥수수에서 수율에 있어 통계적으로 유의적인 감소가 존재하였다. 이들 데이터는, 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수의 우수한 성능을 추가로 나타내었다.

표 9

[0052] 근친교배된 재배 현장 시험으로부터의 수율의 메타-분석

현장 시험	근친교배된 옥수수	합계 (Bu/ac)	LSD (p<0.05)
1년간 US에서 근친교배됨	대조군	65.87	31
1년간 US에서 근친교배됨	MON 87419	60.33	31
1년간 US에서 근친교배됨	이벤트 2	43.10	31
2년간 US에서 근친교배됨	대조군	95.88	7
2년간 US에서 근친교배됨	MON 87419	98.77	7
2년간 US에서 근친교배됨	이벤트 2	75.85	7
2년간 US에서 근친교배됨	대조군	108.90	6
2년간 US에서 근친교배됨	MON 87419	109.22	6
2년간 US에서 근친교배됨	이벤트 2	96.88	6

[0053] 실시예 2: 옥수수 MON 87419 이벤트의 DNA 서열의 특성화

[0054] 본 실시예는 옥수수 MON 87419 이벤트에서 수행된 집중된 분자 특성화를 설명한다. 옥수수 MON 87419 이벤트의 이식유전자 삽입체는 5' 내지 3' 배향으로 하기를 함유한다: (i) 글루포시네이트 제초제에 대한 내성을 부여하는 포스포노트리신 N-아세틸트랜스퍼라제(PAT)를 암호화하는 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스 (*Streptomyces viridochromogenes*)로부터의 *pat* 유전자(CR-STRvi.pat)에 작동가능하게 연결되고; 오리자 사티바(*Oryza sativa*)의 RA5B 전구체 유전자로부터의 폴리아데닐화 신호(또한 mRNA의 폴리아데닐화를 지시하는 종결 인자로서 공지됨)(T-0s.Ara5)에 작동가능하게 연결된; 안드로포곤 게라르디이(*Andropogon gerardii*)로부터의 우비퀴틴 유전자(Ubq)의 프로모터(P-ANDge.Ubq1), 리더, 및 인트론(L-I-ANDge.Ubq1) 및 (ii) 트리티쿰 아에스티쿰(*Triticum aestivum*)으로부터의 광 수거 복합체 b1 유전자(L-Ta.Lhcb1)의 리더에 작동가능하게 연결되고; 오

리자 사티바로부터의 액틴 1 유전자(I-Os.Act1)로부터의 제1의 인트론에 작동가능하게 연결되며; 페투니아 (Petunia) x 하이브리다 5-에놀피루빌쉬키메이트-3-포스페이트 신타제 유전자(TS-Ph.ShkG-CTP4)로부터의 N-말단엽록체 일시적인 펩티드에 작동가능하게 연결되고; 디캄바 제초제에 대해 내성을 부여하는 디캄바 모노옥시게나제(DMO)를 암호화하는 모노코트(monocot) 발현에 대해 최적화된 스테노트로포모나스 말토펠리아 (*Stenotrophomonas maltophilia*)의 *dmo* 유전자(CR-STema.DMO)에 작동가능하게 연결되며; 트리티쿰 아에스티붐 (*Triticum aestivum*)으로부터의 열 쇼크 단백질 17 폴리아테닐화 신호(T-Ta.Hsp17)에 작동가능하게 연결된 중복된 인헨서 영역(PCISV)을 지닌 피넛 클로로틱 스트리크 바이러스(Peanut Chlorotic Streak Virus)의 전장 전사체에 대한 프로모터. 이식유전자 삽입체의 5' 말단은 아그로박테리움 투마파시엔스의 우측 경계에 의해 플랭킹되었고, 이식유전자 삽입체의 3' 말단은 아그로박테리움 투마파시엔스의 좌측 경계에 의해 플랭킹되었다.

[0055] 서던 블롯 분석을 수행하여 형질전환 옥수수가 어떠한 벡터 골격없이 전체 이식유전자 삽입체의 단일의, 완전한 카피를 함유한 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유함을 확증하였다. 플랭킹 서열(Flank sequence)을 삽입체의 5' 및 3' 말단 둘 다로부터 분리하고, 각각의 연결부를 역 PCR 및/또는 게놈 워킹 기술(genome walking technique)을 사용하여 측정하였다. 옥수수 MON 87419 이벤트의 삽입체의 염색체 위치를 역 PCR을 사용하여 측정함으로써 목적인 부위 외부로 게놈 DNA를 증폭시켰다. 옥수수 MON 87419 이벤트에 대한 플랭킹 서열을 공지된 옥수수 게놈 물리적 어셈블리에 맵핑하고 옥수수 MON 87419 이벤트가 어떠한 공지된 유전자내에 존재하지 않음을 확증하였다. 당해 서열 정보를 사용하여 이벤트 특이적인 종점 TAQMAN® 검정을 설계함으로써 샘플 내에서 옥수수 MON 87419 이벤트의 존재를 확인하였다. 삽입 부위 서열 정보를 또한 이벤트의 염색체 위치의 생물정보학 분석에 사용하였다. 삽입 부위 통합성을 옥수수 MON 87419 이벤트의 플랭킹 영역에 대해 특이적인 프라이머를 사용하여 야생형 대립형질에 걸쳐 PCR로 측정하였다. 야생형 삽입체 부위를 사용하여 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 이식유전자 통합의 독특한 부위를 옥수수 참고 게놈에 맵핑하였다. 형질전환 동안 이식유전자의 어떠한 영역에 변형 또는 돌연변이가 도입되지 않았음을 보증하기 위하여, 옥수수 MON 87419의 전체 이식유전자 삽입체를 심지어 식물로부터 분리하여 서열분석하였다.

[0056] 발현된 PAT 및 DMO 단백질의 N-말단 단백질 서열분석을 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수 난알로부터의 면역정제된 단백질 추출물을 사용하여 수행하였다. 이후에, 당해 서열을 사용하여 정확한 N-말단 아미노산 서열을 확증하였다. 웨스턴 분석을 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수의 난알로부터의 단백질 추출물에서 수행하였다. 이는, 단일의 예상된 크기의 단백질이 PAT 및 DMO 각각에 대해 생산되고 있었음을 확증하였다. ELISA를 진행시켜 옥수수 MON 87419 이벤트로부터 발현된 PAT 또는 DMO 단백질에 대한 다양한 형질전환 옥수수 조직형(잎, 종자, 뿌리, 및 화분)에서 단백질 수준을 측정하였다. 노던 분석을 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수의 난알로부터 분리된 폴리-A RNA에서 수행하였다. 이는, *pat* 및 *dmo* mRNA 생성물에 대한 전사체 크기 및 수를 확증하였다. RNA 발현 수준을 또한 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수로부터의 샘플을 사용하여 실시간 PCR로 측정하였다.

[0057] 실시예 3: 이벤트 특이적인 종점 TAQMAN® 검정

[0058] 본 실시예는 샘플 내에서 옥수수 MON 87419 이벤트를 함유하는 형질전환 옥수수를 확인하기 위해 개발된 이벤트 특이적인 종점 TAQMAN® 말단 증폭 방법을 설명한다. 본 종점 검정에서 사용된 DNA 프라이머는 프라이머 SQ26644(서열 번호: 11), SQ26645(서열 번호: 12), 및 6-FAMTM 표지된 프로브 PB11207(서열 번호: 13)이다. 6-FAMTM은 DNA 프로브에 부착된 Applied Biosystems(캘리포니아주 포스터 시티 소재)의 형광성 염료 생성물이다. TAQMAN® MGBTM 프로브의 경우, Taq DNA 폴리머라제의 5' 엑소뉴클레아제 활성은 형광단과 퀀처(quencher) 사이의 5' 말단으로부터의 프로브를 절단한다. 표적 DNA 가닥에 혼성화한 경우, 퀀처 및 형광단을 형광 신호를 생산하기에 충분하게 분리되어서 형광단을 방출한다. 이들 반응 방법을 사용하는 경우 SQ26644 및, SQ26645 및 PB11207은 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 진단성인 DNA 증폭산물을 생산한다. 당해 분석을 위한 대조군은 옥수수 MON 87419 이벤트, 비-형질전환 옥수수로부터의 음성 대조군, 및 주형 DNA를 함유하지 않는 음성 대조군을 함유하는 양성 대조군을 함유하여야 한다. 추가로, PCR 반응에 대한 대조군은 옥수수 게놈내에 단일 카피 유전자에 대해 특이적인, 내부 대조군 프라이머(Internal Control Primer) 및 내부 대조군 프로브(Internal Control Probe)를 최적으로 함유하여야 한다. 이들 검정을 Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700(최대 속도에서 수행함) 또는 MJ Research DNA Engine PTC-225 thermal cycler를 사용하여 최적화시키지만, 다른 장치도 사용할 수 있다.

[0059] 옥수수 MON 87419 이벤트를 검출하는데 유용한 종점 TAQMAN® 검정 방법을 사용하기에 유용한 조건의 예는 다음과 같다: 단계 1: 18 메그옴 수(megohm water)를 10 µl의 최종 용적으로 조절하였다. 단계 2: 5.0 µl의 2X

유니버설 마스터 믹스(Universal Master Mix)(dNTPs, 효소, 완충제)를 1X의 최종 농도로 조절하였다. 단계 3: 0.5 µl의 이벤트 프라이머-1(SQ26644) 및 이벤트 프라이머-2(SQ26645). 1.0 µM의 최종 농도로 혼합(18 메그옴 수 내에서 각각의 프라이머에 대하여 20 µM의 농도로 희석시킴)(예를 들면, 미세원심분리 튜브 내에서, 다음을 가하여 20 µM의 최종 농도로 500 µl를 달성하여야 한다: 100 µM의 농도에서 100 µl의 프라이머 SQ26644; 100 µM의 농도에서 100 µl의 프라이머 SQ26645; 300 µl의 18 메그옴 수). 단계 4: 0.2 µl 이벤트 6-FAMTM MGB 프로브 PB11207(10µM)(18 메그옴 수 속에 각각의 프라이머에 대해 10 µM내지 0.2 µM의 최종 농도로 재현탁시킴). 단계 5: 1.0 µM의 최종 농도까지의 0.5 µl의 내부 대조군 프라이머(Internal Control Primer)-1 및 내부 대조군 프라이머-2 혼합물(18 메그옴 수 속에 각각의 프라이머에 대해 20 µM 농도로 재현탁시킴). 단계 6: 0.2 µM의 최종 농도(10 µM의 농도까지 18 메그옴 수 속에 재현탁시킴)까지의 0.2 µM의 내부 대조군 VICTM 프로브(10µM). 단계 7: 1. 분석될 잎 샘플; 2. 음성 대조군(비-형질전환 DNA); 3. 음성 물 대조군(주형 없음); 4. 옥수수 MON 87419 이벤트 DNA를 함유하는 양성 대조군 형질전환 옥수수를 포함하는 것들 중 각각 하나를 지닌 각각의 샘플에 대해 3.0 µl의 추출된 DNA(주형). 단계 8: 다음과 같은 써모사이클러(Thermocycler) 조건: 50℃에서 2분 동안 1주기; 95℃에서 10분 동안 1 주기; 95℃에서 15초 동안에 이어서 64℃에서 1분 동안 (-1℃/주기)를 사용하는 10주기; 95℃에서 15초 동안에 이어서 54℃에서 1분 동안 30회 주기, 임의로 추가의 10 내지 20회 주기(95℃에서 15초에 이어서 64℃에서 1분(-1℃/주기)은 종점 TaqMan® 분석 동안 보다 명백한 집단 분리를 제공할 수 있다; 10℃의 최종 주기).

[0060] 실시예 4: 접합성 검정

[0061] 접합 검정을 사용하여 옥수수 MON 87419 이벤트를 포함하는 식물이 상기 이벤트 또는 야생형 대립형질에 대해 이종인지 또는 동종인지를 측정할 수 있다. 증폭 반응 검정을 본원에 제공된 서열 정보를 사용하여 설계할 수 있다. 예를 들면, 이러한 PCR 검정은 적어도 3개의 프라이머의 설계를 포함할 수 있다: 프라이머-1, 프라이머-2, 및 프라이머-3, 여기서 프라이머-1은 옥수수 MON 87419 이벤트의 3' 플랭킹 상에 옥수수 게놈 DNA에 대해 특이적이고; 프라이머-2는 옥수수 MON 87419 이벤트 이식유전자 삽입체에 대해 특이적이며; 프라이머-3은 야생형 대립형질에 대해 특이적이다. 증폭 반응에서 프라이머 쌍으로서 사용하는 경우, 프라이머-1과 프라이머-2는 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 특이적인 PCR 증폭산물을 생산할 것이다. 증폭 반응에서 프라이머 쌍으로서 사용하는 경우, 프라이머-1과 프라이머-3은 야생형 대립형질에 대해 특이적인 PCR 증폭산물을 생산할 것이다. 옥수수 게놈 DNA에서 수행된 PCR 반응에서, (프라이머-1 + 프라이머-2) 및 (프라이머-1 + 프라이머-3)으로부터 생성된 각각의 PCR 증폭산물은 증폭산물의 서열 및 크기에 있어서 상이할 것이다. 3개의 프라이머가 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 동종인 식물로부터 추출된 DNA와의 PCR 반응 속에 포함되는 경우, 프라이머-1 + 프라이머-2 증폭산물 만이 생성될 것이다. 3개의 프라이머가 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 이형접합성인 식물로부터 추출된 DNA를 사용한 PCR 반응에 포함되는 경우, 프라이머-1 + 프라이머-2 증폭산물 및 프라이머-1 + 프라이머-3 증폭산물 둘 다 생성될 것이다. 3개의 프라이머를 PCR 반응에서 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 널(null)인 식물(이는 야생형이다)로부터 추출된 DNA와 함께 혼합하는 경우, 프라이머-1 + 프라이머-3 증폭산물 만이 생성될 것이다.

[0062] 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 옥수수 식물의 접합성을 측정하는 다른 방법은 종점 TAQMAN® 열 증폭 반응이다. 이러한 유형의 검정을 위해, 위에서 기술한 바와 같은 프라이머 외에도, 상기 검정은 2개의 형광적으로 표지된 프로브를 포함할 수 있다. 프로브-1은 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 특이적일 수 있고, 프로브-2는 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 널(null)인 옥수수 식물(야생형)에 대해 특이적일 수 있으며, 여기서 2개 프로브는 상이한 형광성 표지, 예를 들면, 6-FAMTM-표지 또는 VICTM 표지를 함유한다. 종점 TAQMAN® 열 증폭 반응에서 사용하는 경우, 프라이머-1 + 프라이머-2 + 프로브-1은 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 특이적인 제1의 형광성 신호를 생산할 것이다. 종점 TAQMAN® 열 증폭 반응에서 사용하는 경우, 프라이머-1 + 프라이머-3 + 프로브-2는 야생형 옥수수에 대해 특이적인 제2의 형광성 신호를 생산할 것이다. 3개의 프라이머 및 2개의 프로브가 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 동종인 식물로부터 추출된 DNA와의 종점 TAQMAN® 열 증폭 반응에 포함된 경우, 제1의 형광성 신호(프라이머-1 + 프라이머-2 + 프로브-1에 대해 특이적임) 만이 생성될 것이다. 3개의 프라이머가 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 이종인 식물로부터 추출된 DNA와의 종점 TAQMAN® 열 증폭 반응에 포함된 경우, 제1의 형광성 신호(프라이머-1 + 프라이머-2 + 프로브-1에 대해 특이적임) 및 제2의 형광성 신호(프라이머-1 + 프라이머-3 + 프로브-2에 대해 특이적임)이 생성될 것이다. 3개의 프라이머가 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 널(null)인 식물(야생형)로부터 추출된 DNA와의 종점 TAQMAN® 열 증폭 반응과 함께 혼합되는 경우, 제2의 형광성 신호(프라이머-1 + 프라이머-3 + 프로브-2에 대해 특이적임)이 생성될 것이다.

[0063] 옥수수 MON 87419 이벤트에 대한 식물의 접합성을 측정하기 위한 다른 방법은 서던 분석일 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 특이적인 서던 혼성화 프로브(들) 및 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 널(null)인 옥수수 식물(야생형)에 대해 특이적인 서던 혼성화 프로브를 설계하는 방법을 이해할 것이다. 서던 분석을 사용하여, 하기일 것이다: 오직 제1의 서던 혼성화 프로브로부터 검출된 신호는 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 동형접합성인 식물의 지표일 것이고; 제1의 서던 혼성화 프로브 및 제2의 서던 혼성화 프로브 둘 다로부터 검출된 신호는 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 이형접합성인 식물의 지표일 것이며; 오직 제2의 서던 혼성화 프로브로부터 검출된 신호는, DNA가 옥수수 MON 87419 이벤트에 대해 널(null)인 식물(야생형)으로부터 추출되었다는 것의 지표일 것이다.

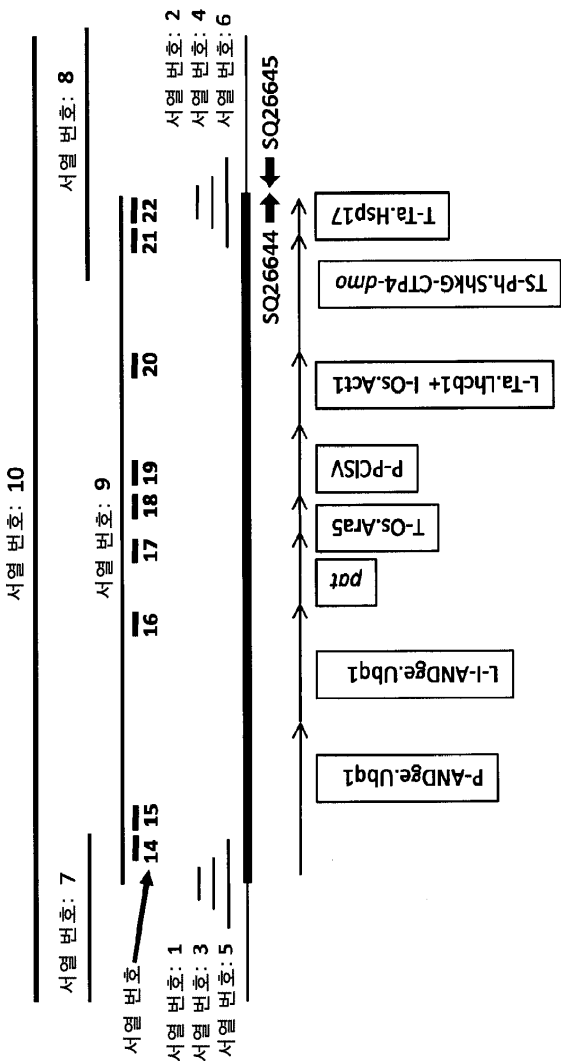
수탁번호

[0064]

기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 컬렉션
수탁번호 : 제PTA-120860호
수탁일자 : 20140117

도면

도면1



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Monsanto Technology LLC

<120> Transgenic Maize Event MON 87419 and Methods of Use Thereof

<130> MONS:362WO

<140> Unknown

<141> 2015-03-10

<150> 61/968,342

<151> 2014-03-20

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant

<400> 1

caggtattga tgtgcgccag tcagcatcat 30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Recombinant

<400> 2

ttctttttct ccatagcatt cgcaatacag 30

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant

<400> 3

gcaggcggtc gctgccaggt attgatgtgc gccagtcagc atcatcacac caaaagttag 60

<210> 4

<211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 4
 attggttaatt actctttctt tttctccata gcattcgcaa tacagttaga tgcgagtga 60
 <210> 5
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 5
 aggggggggt tggcgggggtg gcaggcggtc gctgccaggt attgatgtgc gccagtcagc 60
 atcatcacac caaaagttag gcccgaaatag ttgaaatta 100
 <210> 6
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 6
 catttttgaa ttgaaaaaa attggttaatt actctttctt tttctccata gcattcgcaa 60
 tacagttaga tgcgagtga gcacgataag tcacaacct 100
 <210> 7
 <211> 1771
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 7
 gttgatattt tgacccaaag acatgccatt ctcatgtttt tcagttttat cctaccaatg 60
 tagtaacca aacagtttaa ttacaagtga atcaactgga aacaagatct acagactgca 120
 cacagcacat taacaattct gcgccaaatg aatgacagag tgatttatag gcactaagct 180
 ggttttcatc atgaattttg atcagagcat aaaccttggt gacaacagaa tagaatcaaa 240
 caagctgctc agctcagatg gacaaaata atgaacgcgc gcacagtata ttgaacaaa 300

atagtgaacg cacagtagaa aacagacgga gaagctagtg cactactaaaa atagaactca 360
 ctgatgcatt ttttaaccgaa tcattaaaaa acagaccaac atgattagac cagctatcaa 420

 aagacacact gctgagaatc aacaactgct atatgtgtga tctacctgaa ataaacagat 480
 gcagtttttt gtcctacag accaacaatgt tttaatcaga atgccaatga taaatcctta 540
 gagatctgga gagcaaaacta attaaccact gagaatcaac aactgctata atccttagag 600
 atctggagag cactactaatt aaccactgag cctcttttgt cagcatgcag aaatecccaa 660
 aactatactg taattcgaaa ccataagcg cacatcaaag caactccatt gttgatggtt 720
 gggaatgtta aaaatatggt tgtggacacc aattgccgta aacaaacca cagggagaac 780
 atgagtatga acaatcaaaa ctaacatgaa taagtggatg ttcagattaa gtaaggaaaa 840

 tgggtgcacag attaagaaca gagcaatgta tagcacaagt ggaaattaca aacctttttt 900
 cacaaaaatta caatctctag acagcacaca gcaagatctt ggaatggatg aggggtgatga 960
 atcggtgaaa aaagacagca cacagcaaga tctctagaac agaacatgaa atgttggaga 1020
 gtgggggatgg gttgtagacc taacctctgt ccatcctttt aatagccgtc gctgccaggt 1080
 atggaatagg gcgcctgag tgccgtcgag ggcgcgcgca gggcgcggtt ttggtgtggg 1140
 cgggatacc ggcgcggtcg ggaaaccca cgcgcggtcat caggcgagc cgggggaggg 1200
 gggggttggc ggggtggcag gcggtcgtg ccaggtattg atgtgcgcca gtcagcatca 1260

 tcacacaaaa agttaggccc gaatagtgtg aaattagaaa gctcgcaatt gaggtctgtc 1320
 gaggaggtta acctaggtac tgaattacc tgttatccct aactagatat cgaattctaa 1380
 ctataacggt cctaaggtag cgaatcgtt tctttggcgc gccaaagacgc aaactcggac 1440
 cggttcaagc cgicaaggca cttctatgca accacagtca acttgaatgc cgcttgagtg 1500
 ccttctcaag tttttttttc ttgcaaaaat catttctttt ttttaaaaaa agtataattt 1560
 ggatcgtgca aatttctctc taggtgtgtg tgtgactgtg tgagtaacaa tttctctagt 1620
 tgtgcgcgac tgctgcttac tttggagatt acaatatctt tctaaaatgc ttcgattact 1680

 tatttataaa ccgtctctaa ggccaattgc tcaagattca ttcaacaatt gaaacgtctc 1740
 acatgattaa atcatataaa gtttctaagt c 1771

 <210> 8
 <211> 1767
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 8

gcgagtctga tgagacatct ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtacttgtg 60
 taatcggtcta atcgccaaca gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgttctgatt 120
 ttgagtcaa aaaaaaagga attagatctg tgtgtgtttt ttggatcccc ggggcggccg 180
 cacaacaaac gaatacgtcc tgcttggcct actaggccaa cgcaggcgct ggccgtgacg 240

 gccacgagcg aactgatatc gaattctagg gataacaggg taatccacgt gtagctaaac 300
 gcgcctcat ctaagccccc atttggacgt gaatgtagac acgtcgaaat aaagatttcc 360
 gaattagaat aatttgttta ttgctttcgc ctataaatac gacggatcgt aatttgtcgt 420
 tttatcaaaa tgtactttca ttttataata acgtgcgga catctacatt ttgaattga 480
 aaaaaaattg gtaattactc tttctttttc tccatagcat tcgcaatata gttagatgcg 540
 agtgaagcac gataagtcac aaccataata catactatta gaatccggct ctttgccgag 600
 tgcttttttt gggcactcgg caaagacttc tttaccggca aagtcctact ctcggtaacg 660

 accacgttta ccgagagcag gacgctcggc acagggagac actcggcaaa gacctctttg 720
 tcgagtgcc aacgctcggc aaagggccgt cagcagccgt ctatagcaga tgtttattat 780
 ctttgccgag cgccaagcgt tggcactcgg caaacaagt gttgccgagt gcttaaatg 840
 gacactcggc aaaatatatt tttctttttt ctttttgcaa ccaaactttc tgtggtttgt 900
 tcctacacta tgtagacata catgttccat ttggcacia ttataaaagt gtttgcata 960
 aatattagat ttgttcgtt taattgaatt ttctcgata attcagattt gaactacaag 1020
 tcactcaaaa aatggaaaac catgaatgca aaaatgatat ccatgttatt tagcacaagt 1080

 tacggccgat ttcaggagta gaccgaatt tttgagcacc atgtcacga aacatgactg 1140
 tgaacttgtc atccagttgt tttaaaattg tataaacac aaacaaaatc aaaaaatcat 1200
 gaaacttgtc cacatgtcat gatatcatca tatgtagagg ttgtgataaa aagttgaaaa 1260
 tatttcgtga aagttgtcca tagttcactg agcctctttg tcgagtgtca cactcggcaa 1320
 agcctttgtc gagtgcitca gacactcggc aaataagttg tttccagtag tgacattaat 1380
 agaaaaagag tgcatagtcc gtccacatag ctaactaatt ggttcattac aaagaaacat 1440
 tagaacaagc ataatgatga cttggacata atgaaataaa atacataggt tgagggaacc 1500

 aaacataatg gaacacagaa caaatagagg acaacatcat agaaaacgac ataacttcac 1560
 atgggtttta cgccaattgc tccacgcaa gtccataagt gctcgatgag atcatgttga 1620
 agttggttgt atcatttgag actagtgatg ttgtggtggg agcatagcca ctctgtacga 1680
 acttcaggga ttgigatgag agatccacgt gcactccaat tgcggcaaac tcaacattac 1740
 ttgcacgtgg gaccttgtcc tcgacaa 1767

<210> 9

<211> 6762

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant

<400> 9

```

gccagtcagc atcatcacac caaaagttag gcccgaaatag tttgaaatta gaaagctcgc      60

aattgaggtc tgtcaggag gttaacctag gtactgaatt accctgttat ccctaactag      120
atatcgaatt ctaactataa cggtcctaag gtagcgaatc gttcttcttg gcgcgccaag      180
acgcaaaactc ggaccggttc aagccgtcaa ggcacttcta tgcaaccaca gtcaacttga      240
atgccgcttg agtgccttct caagtttttt tttcttgcaa aaatcatttc ttttttttaa      300
aaaaagtata atttggatcg tgcaaatctt tctctagggtg tgtgtgtgac tgtgtgagta      360
acaatttctc tagttgtgcg cgactgctgc ttacttttga gattacaata tctttctaaa      420
atgcttcgat tacttattta taaaccgtct ctaaggccaa ttgctcaaga ttcattcaac      480

aattgaaacg tctcacatga ttaaatcata taaagtttct aagtcttggt tgacaagatt      540
tttttagatt ttcattctaa ttggatgaaa ctatcaaca ctaattttta aaaatataag      600
agaagctccg gagataaaag gtcgtctatg ttattataag agtaaagtcg tctattctct      660
tcgtcccaac atatataatt ctaagcatga attgctttct ttttgacaa aaggagcatg      720
ccacaacaca agaattgatg caccgtcatg ctggatcct tttatggtaa agcttcacct      780
tctataatct aacaatagag aaatcaggga aaaatcatgt tttggttggt tttatttcta      840
acctccacaa taacttttgt ttaccatttt ttgtttgatt ttagtttttag agaagcgttt      900

ataacaggac ctaaaatctt ttttcagtac acagtacaac gcagacgctc atacacgcac      960
gcacactcac ctctatgaac acacgtaaga aaacctaca ccttgagcac cttcgaagga      1020
ctgagccggt aatatagag attctcgaag tcactattag cgcctcgttg tcaacgggaa      1080
tgctgcttac cacttaaagc ataacgccga gaaatcccgt aataaatcca gtaaaatacg      1140
agcacccgtg ccaagttgaa tatttgaacc cgagtgggta gattccaccg caaaggacct      1200
aaccagatca tttcgcaaac aggaactaaa atcggtagag agcccagaca aaagcctttc      1260
ctaagagcca ctccagtga agcccctact ttaggtataa aatgcaatac tagtggggct      1320

cctaaataaa ctctattttt tcatggcctt ctaaaattca ctcccaaacc cctagctata      1380
gaagtctctt atccatcctc taaataaaaa tgggagtcta ttttatttca ccagagttga      1440
tcgtaaatat agtctctcaa attttataag ttgagggtag aggatgactg gagttgctct      1500
aaacggacct atcttcaagt gacctcagt agcccgttta acggcgctga caagttaat      1560

```

ctaaccgaca ccaaccagag aagagaacca ccgccagcgc cgagccaagc gacgttgaca	1620
tcttggcgcg gcacggcatc tccctggcgt ctggcccccct ctcgagactt ccgtccacc	1680
tcccaccggt ggcggtttcc aagtccgttc cgcctcctct cacacggcac gaaaccgtga	1740
cgggcaccgg cagcacgggg ggattccttt cccaccgtc cttccctttc cttcctctc	1800
ccgccgtat aaatagccag ccccatcccc agcttctttc cccaacctca tcttctctcg	1860
tgttgttcgg cacaaccga tcgatcccca actccctcgt cgtctctcct cgcgagcctc	1920
gtcgatcccc cgcttcaagg tacggcgatc gattatcttc cctctctcta cttctctct	1980
cttatagggc ctgctagctc tgttctgtt tttccatggc tgcgaggtac aatagatcgg	2040
cgatccatgg ttagggcctg ctagtgtgt tctgttttt ccatggctgc gaggcacaat	2100
agatctgatg gcgttatgat ggttaacttg tcatactctt gcgatctatg gtccctttag	2160
gagtttagga catctattta atttcggata gttcgagatc tgtgatccat ggttagtacc	2220
ctaggcagtg gggtagatc cgtgctgtta tggttcgtag atggattctg attgctcagt	2280
aactgggaat cctgggatgg ttctagctgg ttcgcagata agatcgattt catgatatgc	2340
tatatcttgt ttggttgccg tggttccgtt aaatctgtct gttatgatct tagtctttga	2400
taaggttcgg tcgtgctagc tacgtcctgt gcagactta attgtcaggt cataatttt	2460
agcatgcctt tttttattg gtttggttt gtctgactgg gctgtagata gtttcaatct	2520
ttgtctgact gggtctaga tagtttcaat ctacctgtcg gtttatttta ttaaatttgg	2580
atctgtatgt gtgcatata tcttcacttt ttagatatat cgataggttt atatgttgct	2640
gtcggttttt tactgttctt ttatgagata tattcatgct tagatacatg aaacaacgtg	2700
ctgttacagt ttaatagttc ttgtttatct aataaacaaa taaggatagg tatatgctgc	2760
agttagtttt actggacttt ttttgacat gaacctacgg cttaataatt agtcttcac	2820
aaataaaaag catatttttt aattatttcg atatacttga atgatgtcat atgcagcatc	2880
tgtgtgaatt ttggccctg tcttcataat ctgtttatct gtttgggact gtttctttgg	2940
ttgataactc atctgttgt ttggtgatcc ttttcaggt gcaaccatgt ctccggagag	3000
gagaccagtt gagattagc cagctacagc agctgatatg gccgcggttt gtgatatcgt	3060
taaccattac attgagacgt ctacagtga ctttaggaca gagccacaaa caccacaaga	3120
gtggattgat gatctagaga ggttgcaaga tagataccct tggttggttg ctgaggttga	3180
gggtgttgtg gcigtatttg cttacgtctg gccctggaag gctaggaacg cttacgattg	3240
gacagttgag agtactgttt acgtgtcaca taggcatcaa aggttgggcc taggatccac	3300
attgtacaca catttgccta agtctatgga ggcgcaaggt ttttaagtctg tggttgctgt	3360

tataggcctt ccaaacgac catctgttag gttgcatgag gctttgggat acacagcccc	3420
gggtacattg cgcgacgtg gatacaagca tggatggatgg catgatgttg gtttttggca	3480
aagggatttt gatttgccag ctctccaag gccagttagg ccagttaccc agatctgatt	3540
aattaactag gctactgtag ctactgtgc atgtatgtgg tgtggttact aaaataatta	3600
gtgttttctt tttgtttgga agcatatgtg tggatgaata atgatgaact ccgatgttcc	3660
tctctataaa tcttgatgat tcgctagcta tccgtacgtc gttgttcttt gatattgatga	3720
tgagattgaa aaatggaatg tcatgctaag gaggggtgccg cgccccggcc gtgacggcca	3780
cgagcgaact cctgcaggac aacggagcag cctctcagc aaatcctacc acctcattta	3840
aatagagtga ggttgatttg ctgaggtagc ggccgcgtta acaagcttct gcagaattcg	3900
tcaacgagat cttgagccaa tcaaagagga gtgatgtaga cctaaagcaa taatggagcc	3960
atgacgtaag ggcttacgcc catacgaaat aattaaaggc tgatgtgacc tgtcggcttc	4020
tcagaacctt tactttttat gtttggcgtg tttttttaa tttccacggc aatgacgatg	4080
tgaccaacg agatcttgag ccaatcaaag aggagtgatg tagacctaaa gcaataatgg	4140
agccatgacg taagggtcta cgccatacg aaataattaa aggctgatgt gacctgtcgg	4200
tctctcagaa cttttacttt ttatatattg cgtgtatttt taaatttcca cggcaatgac	4260
gatgtgacct gtgcatccgc ttgacctata aataagtttt agtttgtatt gatcgacacg	4320
gtcgagaaga cacggccatt ctagaacctt ctccacaca ctcaagccac actattggag	4380
aacacacagg gacaacacac cataagatcc aaggagggcc tccgccgccg ccggtaacca	4440
cccccccc ctctcttttc tttctccgtt tttttttccg tctcggcttc gatctttggc	4500
cttggttagtt tgggtgggag agaggcggct tcgtgcgcgc ccagatcggg gcgcgggagg	4560
ggcgggatct cgcggctggg gctctcgccg gcgtggatcc ggcccggatc tcgcggggaa	4620
tggggctctc ggatgtagat ctgcgacccg ccgttgttgg gggagatgat ggggggttta	4680
aaatttccgc cgtgctaacc aagatcagga agaggggaaa agggcactat ggtttatatt	4740
tttatatatt tctgtgctt cgtcaggctt agatgtgcta gatctttctt tcttcttttt	4800
gtgggtagaa ttgaaatccc tcagcattgt tcacggtag tttttctttt catgatttgt	4860
gacaaatgca gcctcgtgcg gagctttttt gtaggtagaa gtgatcaacc atggcccaga	4920
tcaacaacat ggcccagggc atccagacc tgaacctaa ctctaacttc cacaagccgc	4980
aagtgcccaa gtctagctcc ttctcgtgt tcggctccaa gaagctcaag aatagcgcca	5040
attcatgct ggtcctgaag aaagactcga tcttcatgca gaagtctgc tcctttcgca	5100

tcagtgccttc gggttgcgact gcctgcatgc tcaccttcgt taggaacgcc tggtagctcg 5160
ccgctctccc tgaggagctg agcgagaagc ccttgggtcg caccatccta gacactccgt 5220
tagcccttta ccgccagcct gacggcgtag tggcggccct gcttgacatc tgcccgcata 5280
ggttcgtccc gctcagcgac ggcatcctcg tcaacgggca tcttcagtgc ccgtaccacg 5340
ggctggaatt tgacggcggg gggcagtgtg tccacaaccc gcacggcaac ggcgcacggc 5400
cagcttccct caacgttagg tcgttccctg ttgtcgagcg cgacgactg atctggatct 5460
ggcctggcga ccagctctg gccgatccag gagccattcc cgacttcggg tgccgcgtgg 5520

accagccta tcggacggtc ggcggttacg ggcacgtcga ttgtaactat aagtccttg 5580
tggaacact tatggatttg ggccacgtc agtacgtgca ccgggctaac gctcagactg 5640
acgcctttga ccgtctcga agggagggtca tcgtcggcga cggagagatt caggcgtga 5700
tgaagatccc tggaggcacg ccctctgtgc tcatggcgaa gtttctcaga ggcgcgaaca 5760
cgcccggtga cgcttggaac gacatccgt ggaataaggt ctccgcgatg ctgaacttca 5820
tcgccgttgc gcccgagggc acacccaaag agcagtcaat ccacagcaga gggaccata 5880
ttcttacacc ggaaaccgag gctagtggc actacttctt cggtcgtca cggaatttcg 5940

ggatagacga tccggagatg gacggtgttc ttcgatcttg gcaagcgca gctctcgtca 6000
aggaagataa ggtggctgtg gaggctatcg agcgtaggcg cgcctacgtt gaggcgaacg 6060
gtattaggcc cgcgatgctg tcctgcgacg aggccgcagt tagagtgtcg cgcgagatag 6120
aaaagctgga gcagctagag gccgcctgag gtaccgagct cgtcaatcac tagtgaattc 6180
tgcatgcgtt tggacgtatg ctcatcagg ttggagccaa tttggttgat gtgtgtgcga 6240
gttcttgca gtctgatgag acatctctgt attgtgtttc tttcccaggt gttttctgta 6300
cttgtgtaat cggctaactg ccaacagatt cggcgatgaa taaatgagaa ataaattgtt 6360

ctgattttga gtcaaaaaa aaaggaatta gatctgtgtg tgttttttgg atccccgggg 6420
cggccgcaca aaaaacgaat acgtcctgct tggcctacta ggccaacgca ggcgctggcc 6480
gtgacggcca cgagcgaact gatatcgaat tctaggata acagggtaat ccacgtgtag 6540
ctaaacgcgc cctcatctaa gccccattt ggacgtgaat gtagacacgt cgaaataaag 6600
atttccgaat tagaataatt tgtttattgc tttgcctat aaatcgacg gatcgtaatt 6660
tgtcgtttta tcaaatgta ttttcattt ataataacgc tgcggacatc tacatttttg 6720
aattgaaaaa aaattggtaa ttactctttc ttttttcca ta 6762

<210> 10

<211> 9259

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant

<400> 10

gttgatattt tgacccaaag acatgccatt ctcatgtttt tcagttttat cctaccaatg	60
tagtaacca aacagtttaa ttacaagtga atcaactgga aacaagatct acagactgca	120
cacagcacat taacaattct gcgccaaatg aatgacagag tgattttatag gcactaagct	180
ggttttcatc atgaattttg atcagagcat aaaccttggt gacaacagaa tagaatcaaa	240
caagctgctc agctcagatg gacaaaaata atgaacgcgc gcacagtata ttgaacaaaa	300
atagtgaacg cacagtagaa aacagacgga gaagctagtg cactactaaa atagaactca	360
ctgatgcatt tttaacgaa tcattaaaaa acagaccaac atgattagac cagctatcaa	420
aagacacact gctgagaatc aacaactgct atatgtgtga tctacctgaa ataaacagat	480
gcagtttttt gtccctacag accaactatg tttaatcaga atgccaatga taaatcctta	540
gagatctgga gagcaaaacta attaacactgagaatcaac aactgctata atccttagag	600
atctggagag cactactaatt aacctgag cctctttggt cagcatgcag aaatcccaa	660
aactatactg taattcgaaa ccataagcg cacatcaaag caactccatt gttgatggtt	720
gggaatgtta aaaatatggt tgtggacacc aattgccgta acaaaacca cagggagaac	780
atgagtatga acaatcaaaa ctaacatgaa taagtggatg ttcagattaa gtaaggaaaa	840
tgggtgcagag attaagaaca gagcaatgta tagcacaagt ggaaattaca aacctttttt	900
cacaaaatta caatctctag acagcacaca gcaagatctt ggaatggatg agggatgatga	960
atcggtgaaa aaagacagca cacagcaaga tctctagaac agaacatgaa atgttggaga	1020
gtggggatgg gttgtagacc taacctctgt ccctcctttt aatagccgct gctgccaggt	1080
atggaatagg gcgccgtgag tgccgtcgag ggcgcgcgca gggcgcggtt ttggtgtggg	1140
cgggataccg gcgcggtcgc ggaaacccca cggcggcatc cacggcgagc cgggggaggg	1200
gggggttggc ggggtggcag gcggtcgctg ccaggtattg atgtgcgcca gtcagcatca	1260
tcacacaaaa agttaggccc gaatagtttg aaattagaaa gctcgcaatt gaggtctgtc	1320
gaggaggtta acctaggtac tgaattaccg tttatccct aactagatat cgaattctaa	1380
ctataacggt cctaaggtag cgaatcgctt tctttggcgc gccaaagacgc aaactcggac	1440
cggttcaagc cgtaaggca cttctatgca accacagtca acttgaatgc cgcttgagt	1500
ccttctcaag ttttttttc ttgcaaaaat catttctttt ttttaaaaa agtataattt	1560
ggatcggtga aatttctctc taggtgtgtg tgtgactgtg tgagtaacaa tttctctagt	1620
tgtgcgcgac tgctgcttac tttggagatt acaatatctt tctaaatgc ttcgattact	1680

tatttataaa ccgtctctaa ggccaattgc tcaagattca ttcaacaatt gaaacgtctc	1740
acatgattaa atcatataaa gtttctaagt cttgtttgac aagatttttt tagattttca	1800
tctaaattgg atgaaactat caaacactaa ttttaaaaaa tataagagaa gctccggaga	1860
taaaaggctg tctatgttat tataagagta aagtcgtcta ttcctctcgt cccaacatat	1920
ataattctaa gcatgaattg ctttcttttt ggacaaaagg agcatgccac aacacaagaa	1980
tgatgtcacc gtcattgttg gatcctttta tggtaaagct tcaccttcta taatctaaca	2040
atagagaaat cagggaaaaa tcatgttttg gttgttttta tttctaacct ccacaataac	2100
tttggtttac cattttttgt ttgatttttag ttttagagaa gcgtttataa caggacctaa	2160
aatctttttt cagtacacag tacaacgcag acgctcatac acgcacgcac actcacctct	2220
atgaacacac gtaagaaaac cctacacctt gagcaccttc gaaggactga gccggtaaat	2280
atagagattc tcgaagtcac tattagcgcc tcgttgtcaa cgggaatgtc gcttaccact	2340
taaagcataa cgccgagaaa tcccgtataa aatccagtaa aatacgagca cccgtgccaa	2400
gttgaatatt tgaacccgag tgggtagatt ccaccgcaa ggacctaacc agatcatttc	2460
gcaaacagga actaaaatcg gtagagagcc cagacaaaag cctttcctaa gagccactcc	2520
agtggaagcc cctactttag gtataaaatg caatactagt ggggctccta aataaacttc	2580
tatttttcat ggccttctaa aattcactcc caaaccccta gctatagaag tctcttatec	2640
atcctctaaa taaaatggg agtctatttt atttcaccag agttgatcgt aaatttagtc	2700
tctcaaattt tataagtga gggtagagga tgactggagt tgctctaaac ggacctatct	2760
tcaagtgacc tcagtgagcc cgtttaacgg cgtcgacaag tttaatctaa cggacaccaa	2820
ccagagaaga gaaccaccgc cagcgccgag ccaagcgacg ttgacatctt ggcgcggcac	2880
ggcatctccc tggcgtctgg cccctctcgc agacttcgc tccacctccc accggtggcg	2940
gtttccaagt ccgttccgcc tcctctcaca cggcacgaaa ccgtgacggg caccggcagc	3000
acgggggggat tcctttccca ccgtccttc cctttccctt cctctccgc cgctataaat	3060
agccagcccc atccccagct tctttccca acctcatctt ctctcgtgtt gttcggcaca	3120
accgatcgga tccccaactc cctcgtcgtc tctcctcgcg agcctcgtcg atccccgct	3180
tcaaggtacg gcgatcgatt atcttccctc tctctacctt ctctctctta tagggcctgc	3240
tagctctgtt cctgtttttc catggctgcg aggtacaata gatcggcgat ccatggttag	3300
ggcctgctag ttgtgttctt gtttttccat ggctgcgagg cacaatagat ctgatggcgt	3360
tatgatggtt aacttgtcat actcttgca tctatgttcc ctttaggagt ttaggacatc	3420
tatttaattt cggatagttc gagatctgtg atccatggtt agtaccctag gcagtggggt	3480
tagatccgtg ctgttatggt tcgtagatgg attctgattg ctacagtaact gggaatcctg	3540

ggatggttct agctggttcg cagataagat cgatttcatg atatgctata tcttgtttgg 3600
 ttgccgtggt tccgttaaat ctgtctgtta tgatcttagt ctttgataag gttcggtcgt 3660
 gctagctacg tccgtgacag cacttaattg tcaggtcata attttagca tgcctttttt 3720

 ttattggttt ggttttgtct gactgggctg tagatagttt caatctttgt ctgactgggc 3780
 tgtagatagt ttcaatctac ctgtcggttt attttattaa atttgatct gtatgtgtgt 3840
 catatatctt catcttttag atatatcgat aggtttatat gttgctgtcg gtttttact 3900
 gttcctttat gagatatatt catgcttaga tacatgaaac aacgtgctgt tacagttaa 3960
 tagttcttgt ttatctaata aacaaataag gataggtata tgctgcagtt agttttactg 4020
 gtactttttt tgacatgaac ctacggctta ataattagtc ttcacaaat aaaaagcata 4080
 tttttaatt atttcgatat acttgaatga tgcacatgc agcatctgtg tgaattttg 4140

 gccctgtctt catatgctgt ttatttgttt gggactgttt ctttggttga taactcatcc 4200
 tgttgtttgg tgatcctttt gcaggtgcaa ccatgtctcc ggagaggaga ccagttgaga 4260
 ttaggccagc tacagcagct gatatggccg cggtttgtga tatcgtaac cattacattg 4320
 agacgtctac agtgaacttt aggacagac cacaacacc acaagagtgg attgatgatc 4380
 tagagagggt gcaagataga tacccttggg tggttgctga ggttgagggt gttgtggctg 4440
 gtattgctta cgtcgggccc tggaaggcta ggaacgctta cgattggaca gttgagagta 4500
 ctgtttacgt gtcacatagg catcaaaggt tgggcctagg atccacattg tacacacatt 4560

 tgcttaagtc tatggaggcg caagttttta agtctgtggt tgctgttata ggccttccaa 4620
 acgatccatc tgttaggttg catgaggctt tgggatacac agcccggggt acattgcgcg 4680
 cagctggata caagcatggt ggatggcatg atgttggttt ttggcaaagg gatattgagt 4740
 tgccagctcc tccaaggcca gttaggccag ttaccagat ctgattaatt aactaggcta 4800
 ctgtagctag ctgtgcatgt atgtggtgtg gttactaaaa taattagtgt tttccttttg 4860
 tttggaagca tatgtgtggt gaataaatga tgaactccga tgttcctctc tataaatctt 4920
 gatgattcgc tagctatccg tacgtcgttg ttctttgatt tgatgatgag attgaaaaat 4980

 ggaatgtcat gctaaaggagg gtgccgcggc ccggccgtga cggccacgag cgaactcctg 5040
 caggacaacg gacgagcctc ctacgaaat cctaccacct catttaaata gagttaggtt 5100
 gatttgctga ggttagcgcc gcgttaacaa gcttctgcag aattcgtcaa cgagatcttg 5160
 agccaatcaa agaggagtga tgtagacctt aagcaataat ggagccatga cgtaagggt 5220
 tacgcccata cgaataaatt aaaggctgat gtgacctgtc ggtctctcag aacctttact 5280
 ttttatgttt ggctgttatt tttaaatttc cacggcaatg acgatgtgac ccaacgagat 5340

cttgagccaa tcaaagagga gtgatgtaga cctaaagcaa taatggagcc atgacgtaag 5400

ggcttacgcc catacgaat aattaaaggc tgatgtgacc tgtcggcttc tcagaacctt 5460

tactttttat atttggcgtg tattttttaa tttccacggc aatgacgatg tgacctgtgc 5520

atccgctttg cctataaata agtttttagt tgtattgac gacacggctg agaagacacg 5580

gccattctag aaccatcttc cacacactca agccacacta ttggagaaca cacagggaca 5640

acacaccata agatccaagg gaggcctccg ccgcccggg taaccacccc gcccctctcc 5700

tctttctttc tccgtttttt tttccgtctc ggtctcgatc tttggccttg gtagtttggg 5760

tgggcgagag gcggcttcgt gcgcgcccag atcgggtcgc gggaggggcg ggatctcgcg 5820

gctggggctc tcgccggcgt ggatccggcc cggatctcgc ggggaatggg gctctcgat 5880

gtagatctgc gatccgcctg tgttggggga gatgatgggg ggtttaaaat ttccgccgtg 5940

ctaaacaaga tcaggaagag gggaaaaggg cactatggtt tataatttta tatatttctg 6000

ctgcttcgtc aggccttagat gtgctagatc tttctttctt cttttgttg gtagaatttg 6060

aatccctcag cattgttcat cggtagtttt tcttttcatg atttgtgaca aatgcagcct 6120

cgtgcggagc tttttttag gtagaagtga tcaacatgg ccagatcaa caacatggcc 6180

cagggcattc agaccctgaa ccctaactct aacttcaca agccgcaagt gccaagtct 6240

agctccttc tcgtgttcgg ctccaagaag ctcaagaata gcgccaatc catgctggtc 6300

ctgaagaaag actcgatctt catgcagaag ttctgtctct ttcgcatcag tgcttcgggt 6360

gcgactgcct gcatgctac ctctgttagg aacgcctggg acgtcgccgc tctccctgag 6420

gagctgagcg agaagccctt gggtcgcacc atcctagaca ctccgttagc cttttaccgc 6480

cagcctgacg gcgtagtggc ggccctgctt gacatctgcc cgcataggtt cgctccgctc 6540

agcgacggca tctctgtaaa cgggcattct cagtgcctgt accacgggct ggaatttgac 6600

ggcgggtgggc agtgtgtcca caaccgcac ggcaacggcg cacggccagc ttccctcaac 6660

gttaggtcgt tcctgttgt cgagcgcgac gactgatct ggatctggcc tggcgacca 6720

gctctggccg atccaggagc cattcccgc ttcggttgcc gcgtggacc agcctatcgg 6780

acggtcggcg gttacgggca cgtcgattgt aactataagc tccttgtgga caaccttatg 6840

gatttgggcc acgtcagta cgtgcaccgg gctaacgctc agactgacgc ctttgaccgt 6900

ctcgaaagg aggtcatcgt cggcgacgga gagattcagg cgctgatgaa gatccctgga 6960

ggcacgccct ctgtgctcat ggcaagttt ctcagaggcg cgaacacgcc cgtggacgcc 7020

tggaacgaca tccgtggaa taaggtctcc gcgatgctga acttcacgc cgttgccccc 7080

gagggcacac ccaaagagca gtcaatccac agcagaggga cccatattct tacaccggaa 7140
accgaggcta gttgccacta cttcttcggc tcgtcacgga atttcgggat agacgatccg 7200
gagatggacg gtgttcttcg atcttggcaa gcgcaagctc tcgtcaagga agataaggtg 7260
gtcgtggagg ctatcgagcg taggcgcgcc tacgttgagg cgaacggat taggcccgcg 7320
atgctgtcct gcgacgagcg cgcagttaga gtgtcgcgcg agatagaaaa gctggagcag 7380
ctagaggccg cctgaggta cgcagctcgc aatcactagt gaattctgca tgcgtttgga 7440
cgtatgctca ttcaggttgg agccaatttg gttgatgtgt gtgcgagttc ttgcgagtct 7500

gatgagacat ctctgtattg tgtttctttc ccagtgttt tctgtacttg tgtaatcggc 7560
taatcgccaa cagattcggc gatgaataaa tgagaaataa attgttctga ttttgagtgc 7620
aaaaaaaaag gaattagatc tgtgtgtgtt ttttgatcc ccggggcggc cgcacaacaa 7680
acgaatacgt cctgcttgcc ctactaggcc aacgcaggcg ctggccgtga cggccacgag 7740
cgaactgata tcgaattcta gggataacag ggtaatccac gtgtagctaa acgcgcctc 7800
atctaagccc ccatttgac gtgaatgtag acacgtcgaa ataaagattt ccgaattaga 7860
ataatttggt tattgcttgc gcctataaat acgacggatc gtaatttgtc gttttatcaa 7920

aatgtacttt cattttataa taacgtcgcg gacatctaca ttttgaatt gaaaaaaaaat 7980
tggttaattac tctttctttt tctccatagc attcgcaata cagtttagatg cgagtgaagc 8040
acgataagtc acaaccataa tacatactat tagaatccgg ctctttgccg agtgcttttt 8100
ttgggcactc ggcaaagact tctttaccgg caaagtccta ctctcggtaa cgaccacgtt 8160
taccgagagc aggacgtcgc gtacaggag acactcggca aagacctctt tgtcgagtgc 8220
caaacgctcg gcaaagggcc gtcagcagcc gtctatagca gatgtttatt atctttgccg 8280
agcgccaagc gttggcactc ggcaaaacaa gtgttgccga gtgcttaaat tggacactcg 8340

gcaaaatata tttttctttt tctttttgc aacaaactt tctgtggttt gttcctacac 8400
tatgtagaca tacatgttcc attttggcac aattataaaa gtgtttgcta taaatattag 8460
attttgttcg ttaattgaa ttttctcgga taattcagat ttgaactaca agtcactcaa 8520
aaaatggaaa accatgaatg caaaaatgat atccatgtta tttagcacia gttacggccg 8580
atttcaggag tagacccgaa tttttgagca ccatgctcac gaaacatgac tgtgaacttg 8640
tcatccagtt gttttaaaa tgtataaaac acaaacaaaa tcaaaaaatc atgaaacttg 8700
tccacatgct atgatatcat catatgtaga ggttgtgata aaaagttgaa aatatttcgt 8760

gaaagttgct catagttcac tgagcctctt tgtcgagtgt cacactcggc aaagcctttg 8820
tcgagtgcct cagacactcg gcaataaagt tgtttccagt agtgacatta atagaaaaag 8880
agtgcatagt tcgttcacat agctaactaa ttggttcatt acaagaaac attagaacaa 8940

gcataatgat gacttggaca taatgaaata aaatacatag gttgagggaa ccaaacataa 9000
 tggaacacag aacaaataga ggacaacatc atagaaaacg acataacttc acatgggttt 9060
 tacgccaatt gctccacgcc aagtccataa gtgctcgatg agatcatgtt gaagttggtt 9120
 gtatcatttg agactagtga tgttgtgggtg ggagcatagc cactctgtac gaacttcagg 9180

gatttgtatg agagatccac gtgcactcca attgcggcaa actcaacatt acttgcacgt 9240
 gggaccttgt cctcgacaa 9259

<210> 11
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 11

gaattgaaaa aaaattggta attactcttt ctt 33

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 12

atcgtgcttc actcgcatct aact 24

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 13

ctccatagca ttcgcaata 19

<210> 14
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 14

attagaaagc tcgcaattga ggtctgtcga ggaggttaac ctaggtactg aattaccctg 60
 ttatccctaa ctagatatcg a 81
 <210> 15
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > Recombinant
 <400> 15
 tggcgcgccca agacgcaaac tcggaccggt tcaagccgtc aaggcacttc tatgcaacca 60
 c 61
 <210> 16
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 16
 atcctgttgt ttggtgatcc ttttgcaggt gcaacctgt ctccggagag gagaccagt 59
 <210> 17
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 17
 ccagttaggc cagttacceca gatctgatta attaactagg ctactgtagc tagctg 56
 <210> 18
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 18
 aaaaatggaa tgtcatgcta aggagggtgc cgcggcccgg ccgtgacggc cagagcgaa 60
 ctctgcagg acaacggagc agcctcctca gcaaatcct 99
 <210> 19

<211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 19
 tgaggttgat ttgctgaggt agcgccgcg ttaacaagct tctgcagaat tcgtca 56
 <210> 20
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > Recombinant
 <400> 20
 aggtagaagt gatcaaccat ggcccagatc aacaacatgg cccagggcat ccaga 55
 <210> 21
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 21
 cgcgagatag aaaagctgga gcagctagag gccgcctgag gtaccgagct cgtcaatcac 60
 tagtgaattc tgcattgcgtt tggacgtatg c 91
 <210> 22
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant
 <400> 22
 ctagggataa cagggtaatc cacgtgtagc taaacgcgc ctcattctag ccccatcttg 60
 gacgtga 67