



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0048319

(43) 공개일자 2015년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 4/00 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0128144

(22) 출원일자 2013년10월25일

심사청구일자 2014년05월16일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이상원

경기 수원시 영통구 영통로290번길 25, 504동 203호 (영통동, 신나무실5단지아파트)

유영철

경기 수원시 영통구 청명로 47-1, 201호 (영통동)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 증진된 병충해 저항성을 가지는 카페인 생합성 유전자가 도입된 형질전환 벼

(57) 요약

본 발명은 커피나무 유래 메틸전이효소를 발현하는 유전자를 포함하는 벼 형질전환용 재조합 벡터로 형질전환된 벼 세포를 수득하는 단계를 포함하는 병 저항성이 증진된 형질전환 벼의 제조방법 및 커피나무 유래 메틸전이효소가 도입된 카페인 생합성 형질전환 벼에 관한 것이다. 본 발명은 벼에 내재적으로 존재하지 않는 카페인 생합성 관련 유전자를 삽입함으로써, 박테리아 병원균에 대해 강력한 저항성을 갖는 형질전환 벼에 대한 것으로, 본 발명의 형질전환 벼를 이용하면 병 저항성을 통해 농약사용 절감, 생산성 향상 및 안전한 농산물 공급이 가능하게 되어 널리 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013009726

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 카페인 합성 벼 연구를 통한 벼 면역유도 기작 규명 및 면역 유도 유전자 동정

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009110

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 DMB (Dense Mutation Block) 기반 벼 분자유종플랫폼 개발 및 융합 오믹스 기술 이용 유용 유전자 대량 발굴

기 여 율 1/2

주관기관 식물분자유종사업단

연구기간 2012.07.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 커피나무 유래 메틸전이효소인 CaXMT1(xanthosine methyltransferase, XMT), CaMXMT1(7-methylxanthosine methyltransferase, MXMT) 및 CaDXMT1(3,7-dimethylxanthine methyltransferase, DXMT)를 코딩하는 유전자를 포함하는 벼 형질전환용 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 벼 잎을 감염시키는 단계; 및,

(b) 상기 (a) 단계에 감염된 벼 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 벼 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 병 저항성이 증진된 형질전환 벼의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, (c) 상기 (b) 단계에서 제조한 캘러스를 뿌리 및 성체로 분화 유도하는 단계를 추가로 포함하는, 형질전환 벼의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 병은 흰잎 마름병인 것인, 형질전환 벼의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 벼 잎은 동진벼(Dong-jin)로부터 채취한 것인, 형질전환 벼의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 커피나무 유래 메틸전이효소인 CaXMT1, CaMXMT1, 및 CaDXMT1를 코딩하는 유전자는 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 구성된 유전자인 것인, 형질전환 벼의 제조방법.

청구항 6

커피나무 유래 메틸전이효소인 CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1를 코딩하는 유전자가 도입된 병 저항성이 증진된 카페인 생합성 형질전환 벼.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 커피나무 유래 메틸전이효소는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 구성된 유전자인 것인, 카페인 생합성 형질전환 벼.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 형질전환 벼는 박테리아 병원균에 대하여 저항성을 갖는 것인 형질전환 벼.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 박테리아 병원균은 산토모나스 오리자에(*Xanthomonas oryzae*)에 대하여 저항성을 갖는 것인 형질전환 벼.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 형질전환 벼는 동진벼를 바탕으로 형질전환된 것인, 형질전환 벼.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 커피나무 유래 메틸전이효소를 발현하는 유전자를 포함하는 벼 형질전환용 재조합 벡터로 형질전환된 벼 세포를 수득하는 단계를 포함하는 병 저항성이 증진된 형질전환 벼의 제조방법 및 커피나무 유래 메틸전이효소가 도입된 카페인 생합성 형질전환 벼에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 벼 흰잎 마름병은 산토모나스 오리자에(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)에 의해서 발생하는 세균성 도관병으로, 발병시기는 7월 초~수확기이나 주로 7월 상순~8월 중순에 발병한다. 중간 기주식물인 줄풀 및 겨풀 등의 땅속 줄기 또는 뿌리주위나 병든 벼잎 및 벼 그루터기에서 세균의 월동이 가능하다. 세균이 편모(鞭毛)에 의해 물을 따라 전염하고 벼잎의 물구멍과 공기구멍 부위 및 절단된 뿌리로 침입한다. 병 발생은 해마다 발생이 많은 상습 발생지 위주로 발생하나 침관수지역이 아닌 지역에서도 발생이 많다.

[0003] 보통 출수기 전후에 나타나나 상습발생지나 다발생 발생지에는 본답 초기에 발병하며, 드물게는 묘판에서도 발병된다. 국내에서 최초 발병보고는 1930년 전라남도 해남군에서 처음 발견된 이래 1960년까지 남부 일부 지역에 제한적인 발생을 보이나 이병성 품종인 금남풍의 재배 확대로 전국적인 발생을 나타내었으며, 이후 다수계 품종 재배에 의한 밀양 23호에 의해 피해가 확대되어 재배기간 중 후기에 발생하는 잎에서의 발병 뿐만 아니라 이앙 후 분얼기까지 주 전체가 발생하는 금성형 증상을 보여 벼의 3대 병해의 하나로 간주된다.

[0004] 벼 흰잎 마름병균은 그람음성세균으로 분류되고 벼의 세균성 위조병을 유발하는 식물병원세균으로 세계적으로 널리 분포하여 벼에 큰 피해를 주지만, 병원균이 벼의 도관 내에서 증식하므로 약제방제 효과는 매우 낮으며, 현재까지 이 병에 특이적인 살균제 또한 없는 실정이다.

[0005] 한편, 벼 도열병은 마그나포르테 그리세아(*Magnaporthe grisea*)에 의하여 유발되는 병으로 전세계적으로 가장 파괴적인 질병 중의 하나이다. 병원균인 마그나포르테 그리세아는 불완전균류에 속하며 분생포자를 형성하는데, 균사 발육 온도는 16~40℃이고 최적 온도는 27~29℃이다. 분생포자의 발아 최적온도는 25~28℃이다. 도열병균은 피해줄의 목 가지 마디에서 균사의 상태로 월동하거나, 잡초에서 월동한 후 다음해 전염원이 된다. 일단 벼 도열병균의 분생자경이 형성되고 분생포자 형성, 분생포자 이탈, 분생포자의 비산, 식물체에의 부착, 발아, 부착기 형성, 침입, 병반형성의 과정을 거친다. 병발생 환경을 살펴보면 온도는 27~29℃와 90%이상의 습도에서 발병이 높다.

[0006] 이에 대해 질병 저항성(R) 유전자를 사용하는 것이 상기 질병의 통제를 위한 가장 효과적이며 환경친화적인 방식이다. 벼 도열병 저항성은 일반적으로 하기의 2 가지 유형으로 분류된다; 질적 (완전 또는 주요) 및 양적 (부분 또는 QTL) (Bonman 및 Mackill 1988, *Oryza* 25: 103-110). 현재까지 벼 도열병에 대한 50 개를 초과하는 많은 수의 주요 저항성 유전자가 맵핑되었으며 (Jeung 등 2007, *Theor. Appl. Genet.* 115:1163-1177), 저항성 유전자에 밀접하게 연관된 DNA 마커가 개발되었다.

[0007] 마그나포르테 그리세아에 대해 완전 저항성(complete resistance)을 가진 벼 재배종이 최근에 개발되었으나, 많은 경우에 보다 더 강력한 악성 균주의 출현으로 상기 저항성은 해당 계통의 초기 재배 수년 내에 소실된 실정이다(Bonman 및 Mackill 1988, *Oryza* 25: 103-110).

[0008] 한편, 동진벼는 내병, 양질, 다수성 신품종육성을 목표로 1975년에 농촌진흥청에서 금남품과 낙동벼 그리고 사도미노리를 교배하여 개발된 품종으로, 병해 저항성의 경우 줄무늬잎마름병에 강하고, 도열병에는 중간 정도의 저항성을 가지며, 흰잎 마름병과 기타 병충해에는 약한 편이다. 이에, 동진벼의 흰잎 마름병과 도열병에 대한 저항성 연구와 개량된 품종에 대한 육성 전략이 요구되고 있다.

[0009] 이에 본 발명자들은 아직 극복되지 못한 벼 흰잎 마름병 및 도열병에 대한 저항성을 갖는 형질전환 벼를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 커피나무에서 동정된 3가지의 N-methyltransferase 유전자의 도입을 통해 카페인을 생합성하는 벼를 제조하였으며, 해당 벼가 흰잎 마름병 및 기타 박테리아 병원균에 대한 저항성을 가지는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 커피나무 유래 메틸전이효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 벼 형질전환용 재조합 벡터로 형질전환된 벼 세포를 수득하는 단계를 포함하는 병 저항성이 증진된 형질전환 벼의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 커피나무 유래 메틸전이효소가 도입된 병 저항성이 증진된 카페인 생합성 형질전환 벼를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 커피나무 유래 메틸전이효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 벼 형질전환용 재조합 벡터로 형질전환된 벼 세포를 수득하는 단계를 포함하는 병 저항성이 증진된 형질전환 벼의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명에서는 야생형 벼에 내재적으로 존재하지 않는 카페인 생합성 관련 유전자인 커피나무 유래 메틸전이효소를 코딩하는 유전자를 삽입함으로써, 해당 유전자를 발현하여 박테리아 병원균에 대해 저항성을 갖춘 형질전환 벼를 제조하였다.

[0014] 구체적으로는, 본 발명은 야생형 벼에 내재적으로 존재하지 않는 카페인 생합성 관련 유전자인 커피나무 유래 메틸전이효소인 CaXMT1(xanthosine methyltransferase, XMT), CaMXMT1(7-methylxanthosine methyltransferase, MXMT) 및 CaDXMT1(3,7-dimethylxanthine methyltransferase, DXMT)를 코딩하는 유전자를 포함하는 벼 형질전환용 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 벼 잎을 감염시키는 단계 및 감염된 벼 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 벼 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 병 저항성이 증진된 형질전환 벼의 제조방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명의 제조방법은 상기 캘러스화하여 형질전환된 벼 세포를 수득하는 단계에서 제조한 캘러스를 뿌리 및 성체로 분화 유도하는 단계를 추가로 포함하는 방법일 수 있다.

[0016] 본 발명에서 용어, "벼"는 일반적으로 *Oriza sp.*에 속하는 벼를 의미할 수 있으며, 특히 자포니카(japonica) 품종인 동진벼(Dong-jin)일 수 있다. 본 발명에서 벼는 카페인 생합성에 관련된 커피나무 유래 메틸전이효소를 도입함으로써, 카페인을 생산할 수 있는 능력이 있는 한, 그 벼가 야생형이든 형질전환체이든 제한이 없이 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에서 벼 잎은 상기 벼로부터 채취한 것일 수 있으며, 특히 동진벼로부터 채취한 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 동진벼로부터 채취한 벼 잎에 벼 형질전환용 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움을 감염시켜, 캘러스를 제조하였다. 즉, 동진벼를 바탕으로 형질전환하여 형질전환 벼를 제조하였다.

[0018] 본 발명에서 용어, "커피나무 유래 메틸전이효소"는 커피나무에서 유래한 메틸전이효소 중에서 카페인 생합성에

관련된 N-메틸전이효소(N-methyltransferase)를 의미하고, 이는 CaXMT1(xanthosine methyltransferase, XMT), CaMXMT1(7-methylxanthosine methyltransferase, MXMT), 및 CaDXMT1(3,7-dimethylxanthine methyltransferase, DXMT)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소일 수 있으며, 바람직하게는 2종 이상, 가장 바람직하게는 3종일 수 있다. 특히, 본 발명의 형질전환 벼에는 커피나무 유래 메틸전이효소인 CaXMT1, CaMXMT1, 및 CaDXMT1를 코딩하는 유전자가 모두 도입될 수 있다. 상기 본 발명의 형질전환 벼에 도입되는 커피나무 유래 메틸전이효소인 CaXMT1, CaMXMT1, 및 CaDXMT1를 코딩하는 유전자는 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 구성된 유전자일 수 있다.

[0019] 본 발명에서는 커피나무에서 카페인을 생합성하는 경로에 관여하는 N-메틸전이효소를 벼에 도입하여, 카페인을 생합성하는 벼를 제조하고자 하였다. 이를 위하여 커피나무의 생합성 경로에 관여하는 N-메틸전이효소인 CaXMT1(xanthosine methyltransferase, XMT), CaMXMT1(7-methylxanthosine methyltransferase, MXMT), 및 CaDXMT1(3,7-dimethylxanthine methyltransferase, DXMT)를 선택하였다(도 1).

[0020] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 커피나무에서 유래한 서열번호 1의 염기서열을 갖는 CaXMT1 유전자, 서열번호 2의 염기서열을 갖는 CaMXMT1 유전자 및 서열번호 3의 염기서열을 갖는 CaDXMT1 유전자를 벼에 도입하여, 카페인 생합성 형질전환 벼를 제조하였다.

[0021] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 형질전환 벼에서 상기 도입한 커피나무 유래 메틸전이효소 유전자가 발현하는지 여부는 상기 CaXMT1 유전자, CaMXMT1 유전자 및 CaDXMT1 유전자에 대한 RNA 존재여부를 확인하는 역전사 효소 PCR(reverse transcriptase PCR)을 이용하여 확인하였다. 그 결과, 야생형에서는 발현을 확인할 수 없었던 상기 유전자들이 본 발명의 형질전환 벼에서는 발현되고 있는 것을 확인하였다.

[0022] 또한, 본 발명의 형질전환 벼에서 카페인이 생합성 되는지 여부는 HPLC로 분석한 결과 야생형 동진벼에서는 합성되지 않던 카페인이 본 발명의 형질전환 벼에서 합성되는 것을 확인하였다.

[0023] 본 발명에서 용어, "아그로박테리움"은 그람양성의 세균으로, 식물의 뿌리나 줄기의 상처를 통해 식물세포에 감염되어, 자신이 가지고 있는 유전자를 식물 세포의 유전체에 삽입하여 식물세포의 형질전환을 일으키는 암종세균의 일종이다. 본 발명에서 상기 아그로박테리움은 바람직하게는 아그로박테리움 투메파키엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)일 수 있다.

[0024] 본 발명에서 용어, "캘러스(callus)"란, 식물에 상처가 났을 때 생기는 분화되지 않은 부정형의 세포덩어리로 즉, 미분화세포를 의미하며, 특히, 본 발명에서는 식물의 잘린 부위에 아그로박테리움 등 형질전환용 암종세균을 감염시켰을 때 감염된 세포가 미분화상태로 상처부위에 덩어리진 것을 의미한다. 즉, 본 발명에서는 암종세균에 감염되어 형질전환된 세포만이 암종 덩어리를 생성하는 특징을 이용하여 형질전환된 미분화세포를 얻을 수 있는데 이것이 캘러스 형태로 생성되게 된다.

[0025] 상기 병 저항성이 증진된 형질전환체의 제조방법은, 바람직하게는 수득된 캘러스를 뿌리 및 성체로 분화시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 캘러스는 상기 설명한대로 미분화된 상태의 세포 덩어리에 불과하기 때문에, 이를 온전한 종자로 수득하기 위해서는 뿌리 및 성체로 분화하는 것을 유도하는 것이 필요할 수 있다.

[0026] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 수득된 캘러스를 루트-인덕션 배지에서 배양하여 뿌리 및 성체로 분화하는 것을 유도하였다.

[0027] 본 발명에서 용어, "병 저항성"은 각종 질병에 대해 발병이 잘 일어나지 않거나, 발병되더라도 병 진행의 속도가 현저히 느리거나, 회복이 되는 능력이 뛰어난 것을 의미한다. 본 발명에서 병 저항성은 각종 곰팡이 및 박테리아 병원균에 의하여 일어나는 병에 대한 저항성일 수 있으며, 특히 흰잎 마름병에 대한 저항성을 의미할 수 있다. 또한, 상기 흰잎 마름병의 원인균인 산토모나스 오리자에(*Xanthomonas oryzae*)에 대한 저항성을 가지는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 본 발명의 형질전환 벼의 흰잎 마름병에 대한 저항성을 확인하기 위해서, 6주간 생장시킨 벼에 흰잎 마름병의 원인균인 산토모나스 오리자에(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, PX099Az)를 가위 접종법으로 접종한 뒤 2주 후 병증을 측정하였다(도 6). 그 결과, 형질전환 벼는 평균 파괴된 상처 길

이가 천연형 동진벼의 34.4 %에 불과하여, 흰잎 마름병에 대한 강력한 저항성을 가짐을 확인할 수 있었다(도 6).

[0029] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 커피나무 유래 메틸전이효소가 도입된 병 저항성이 증진된 카페인 생합성 형질 전환 벼를 제공한다. 특히, 본 발명의 형질전환 벼는 커피나무 유래 메틸전이효소인 CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자가 도입된 병 저항성이 증진된 카페인 생합성 형질전환 벼일 수 있으며, 바람직하게는 CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1를 코딩하는 유전자가 모두 도입된 형질전환 벼일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 벼, 커피나무 유래 메틸전이효소, 병 저항성 및 형질전환은 상기 설명된 바와 동일하다.

발명의 효과

[0031] 본 발명은 벼에 내재적으로 존재하지 않는 카페인 생합성 관련 유전자를 삽입함으로써, 박테리아 병원균에 대해 강력한 저항성을 갖는 형질전환 벼에 대한 것으로, 본 발명의 형질전환 벼를 이용하면 병 저항성을 통해 농약사용 절감, 생산성 향상 및 안전한 농산물 공급이 가능하게 되어 널리 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 커피나무의 카페인 생합성 경로와 본 발명에서 사용한 3가지 N-methyltransferase 유전자를 나타낸 도이다.

도 2는 형질전환 벼 제조를 위한 벡터(pBIN-NM777)에 도입을 위해 삽입된 카페인 합성 관련 메틸전이효소(CaXMT1: xanthosine methyltransferase, CaMXMT1: 7-methylxanthine methyltransferase, CaDXMT1: 3,7-dimethylxanthine methyltransferase)를 코딩하는 유전자가 삽입된 구조를 나타낸 도이다. 구체적으로, 도에서 사용된 약자의 의미는 다음과 같다 : LB, left border; RB, right border; p, promoter; t, terminator; NOS, nopaline synthase; 35S, CaMV 35S RNA; NPT II, neomycin phosphotransferase; HPT, hygromycin phosphotransferase.

도 3은 야생형 동진벼와 본 발명의 카페인 생합성 형질전환 벼의 표현형을 관찰한 사진이다.

도 4는 제조된 형질전환 벼에서 도입한 3가지 N-methyltransferase 유전자의 발현을 역전사 효소 PCR로 측정된 결과이다.

도 5는 야생형 동진벼와 본 발명의 카페인 생합성 형질전환 벼에서의 카페인 합성량을 HPLC로 측정한 결과이다.

도 6은 야생형 동진벼와 본 발명의 카페인 생합성 형질전환 벼에 대하여 흰잎마름병 균의 저항성을 확인 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0034] 실시예 1 : 카페인 생합성 관련 N-메틸전이효소 유전자

[0035] 본 발명자들은 야생형 벼가 가지지 않는 커피나무의 카페인 생합성 경로에 관여하는 효소들로 3개의 N-메틸전이효소(N-methyl transferase)를 카페인 생합성 형질전환 벼를 제조하는데 선택하였다. 이에 커피나무 유래의 3개 N-메틸전이효소인 CaXMT1(xanthosine methyltransferase, XMT), CaMXMT1(7-methylxanthosine methyltransferase, MXMT), CaDXMT1(3,7-dimethylxanthine methyltransferase, DXMT)를 이용하였다(도 1).

[0036] 상기 CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1는 Hiroshino Sano 교수로부터 벡터(Hirotaka et al., Plant Molecular

Biology, 59:221-227, 2005)를 받아 이용하였다. 구체적인 벡터는 하기 실시예 2와 같이 제조되었다.

[0037] **실시예 2 : 벼 형질전환용 재조합 벡터 제조**

[0038] 커피나무 유래 카페인 생합성 관련 유전자를 벼에 삽입하기 위한 벡터 pBIN-NMT777을 제조하였다.

[0039] 구체적으로는 기존의 벡터 pBIN에 CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1를 코딩하는 유전자를 삽입하였으며, 각각의 유전자 별로 발현을 위한 35s 프로모터를 5'에 결합시켜 도입하였다. 구체적으로는 5'에서 3'의 순서로 35s 프로모터-CaDXMT1 코딩 유전자 → 35s 프로모터-CaMXMT1 코딩 유전자 → 35s 프로모터-CaXMT1 코딩 유전자가 되도록 벡터에 삽입하였으며, 이를 통해 카페인 생합성 벼 생산을 위한 벼 형질전환용 벡터 pBIN-NMT777을 제조하였다 (도 2). 또한, 형질전환 식물체 선별을 위하여 항생제 하이그로마이신과 네오마이신 저항성 유전자를 이용하였다.

[0040] 상기 제조한 pBIN-NMT777벡터는 서열번호 10의 염기서열을 가진다.

[0041] **실시예 3 : 형질전환 벼 제조**

[0042] 상기 수득한 CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1 발현용 벡터를 전기충격 방법(electroporation)을 이용하여 아그로박테리움 투메파키엔스(Agrobacterium tumefaciens)에 도입하였다. 형질전환 벼를 제조하기 위하여 야생형 동진 벼 종자를 사용하여 종자의 소독은 50% chlorox로 1시간 가량 소독한 후 멸균수로 10~15회 세척하였다. 소독된 종자는 N6D medium(4g/l⁻¹ N6 powder (Duchefa, Netherland), 30g/l⁻¹ Sucrose, 2.878g/l⁻¹ L-proline, 0.3g/l⁻¹ Casamino acid, 0.1g/l⁻¹ Myo-inositol, 1mL 2,4D (2mg/mL), 4g/l⁻¹ Gelrite, pH5.8)에 치상하여 32℃를 유지하는 배양기에 암 조건으로 5일간 캘러스를 유도하였다.

[0043] 유도된 캘러스는 상기 유전자가 형질도입된 아그로박테리아(LBA4404)를 접종하여 형질전환된 캘러스를 만들었다. 형질전환된 캘러스는 2N6-AS(4g/l⁻¹ N6 powder(Duchefa, Netherland), 30g/l⁻¹ Sucrose, 2.878g/l⁻¹, 10g/l⁻¹ D-glucose, 1mL 2,4D (2mg/mL), 4g/l⁻¹ Gelrite, 100mM Acetosyringone, pH5.2) 치상하여 28℃ 1일/23.5℃ 4일 동안 암조건에서 배양하였다. 저항성 캘러스 선별을 위해 Hygromycin 항생제가 첨가된 사용한 N6D medium에 캘러스를 치상하여 빛 조건 28℃ 2주간 배양하였다. 선별된 캘러스를 REIII-CP medium (4.41g/l⁻¹ MS vitamin powder, 30g/l⁻¹ Sucrose, 30g/l⁻¹ Sorbitol, 2g/l⁻¹ Casamino acid, 0.02mL NAA (1mg/mL), 1mL Kinetine (2mg/mL), 0.1g/l⁻¹ Myo-inositol, 4g/l⁻¹ Gelrite, pH5.8)에 계대하여 빛 조건 28℃ 2주 재분화 과정을 실시하였다. 재분화된 개체를 MS(Murashige and Skoog) medium으로 옮겨 28℃ 7일 동안 빛 조건에서 재분화를 실시 하였다. 순화과정을 위해 water, 28℃ 빛 조건에서 5일동안 순화과정을 거쳐 식물체를 토양으로 옮겨 식물체를 제조하였다.

[0044] 상기 제조한 형질전환 벼를 생장시켜 벼의 표현형을 관찰한 결과, 야생형 동진벼와 큰 차이를 보이지 않고 온전히 생장할 수 있음을 확인하였다(도 3).

[0045] **실시예 4. 형질전환 벼의 N-메틸전이효소 발현 검증**

[0046] 상기 실시예 3에서 제조한 형질전환 동진벼에서 커피나무 유래의 CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1 효소가 발현되는지 여부를 역전사 효소 PCR(RT-PCR, reverse transcriptase-PCR)로 확인하였다.

[0047] 구체적으로는, 형질전환 벼인 #1 실험체 및 #2 실험체의 잎 0.1g에서 total RNA를 추출하였다. 이를 주형으로 하여 CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1 효소의 발현을 확인할 수 있는 RNA 역전사용 프라이머와 역전사 효소(reverse transcriptase DNA polymerase)를 이용하여 역전사 효소 PCR을 행하였다. 해당 실험에서 사용한 RNA

역전사용 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0048] CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1 발현 확인을 위한 RT-PCR용 프라이머 서열

유전자	프라이머 종류	서열
CaXMT1	CaXMT1_rt_primer_forward (서열번호 4)	5'-ATCAACTGGTTCTCGCCAAG-3'
	CaXMT1_rt_primer_reverse (서열번호 5)	5'-CTGCTCTAACGGAAGATGCA-3'
CaMXMT1	CaMXMT1_rt_primer_forward (서열번호 6)	5'-TCCTACAATCTGGCTCTTGC-3'
	CaMXMT1_rt_primer_reverse (서열번호 7)	5'-TGCTTTAATTGTTTCATGGGATC-3'
CaDXMT1	CaDXMT1_rt_primer_forward (서열번호 8)	5'-TCATTCTACAATCTGTTTCTCATCAG-3'
	CaDXMT1_rt_primer_reverse (서열번호 9)	5'-TATGGAATTCGGGTTCGCA-3'

[0049] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 야생형의 동진벼에서는 CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1이 전혀 발현되지 않는데에 비하여 본 발명의 형질전환 벼에서는 CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0050] 실시예 4. 형질전환 벼의 카페인 합성 검정

[0051] 상기 실시예 3에서 제조한 형질전환 동진벼에서 도입한 커피나무의 카페인 생합성 경로에 작용하는 CaXMT1, CaMXMT1 및 CaDXMT1 유전자가 발현하는 것은 상기 실시예 4에서 확인하였으나, 벼의 식물체 내에서도 문제없이 카페인이 합성되는지 여부를 HPLC로 확인하였다.

[0052] 구체적으로는, 대조군으로의 야생형 동진벼와 본 발명의 카페인 생합성 형질전환 벼를 각각 생장시켜 6주차에 잎을 채취하였다. 채취한 벼잎 0.15 g을 액체 질소를 사용하여 마쇄한 뒤, 70% 메탄올 1mL을 첨가하여 60 ℃에서 1시간 온도 유지하여 성분을 추출하였다. 이후, 원심분리를 통하여 상등액을 채취하여 HPLC sample을 제작하여, HPLC를 진행하였다.

[0053] 한편, HPLC를 진행한 조건은 하기 표 2와 같다.

표 2

[0054] HPLC 진행조건

· 시간에 따른 농도구배	0~4 분 : B to 2%/ 4~21 분 : B 2 to 9%/ 21~32 분 B 9 to 23 %, 32~45 분 B to 23%
· Post-run 시간	10 분
· 유속	0.8 ml/분
· 샘플량	20 μ l
· 용매 조성	A 용매- 0.05% Trichloroacetic acid B 용매- Acetonitrile
· 컬럼	Agilent Eclipse XDB-C18 5um
· 측정 UV	210 nm

[0055] 상기 카페인 합성량 검정 결과, 야생형 동진벼에서는 카페인이 전혀 측정되지 않았으며, 본 발명의 카페인 생합

성 형질전환 벼에서 카페인이 과량 합성되는 것을 확인할 수 있었다(도 5).

[0056]

실시에 5. 형질전환 벼의 병 저항성 검정

[0057]

상기 실시예 3에서 제조된 형질전환 벼가 흰잎 마름병에 대해 저항성을 보이는지 확인하기 위해, 대조군으로 천연형 동진벼 및 형질전환 벼를 6주간 키웠다. 28℃ 배양기에서 3~4일 키운 흰잎마름병을 유발하는 균주인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(strain : PX099Az) 물 10ml에 CFU 10⁹ 양을 희석시켜 가위를 그 균주를 희석시킨 물에 담궈 접종하는 가위 접종법을 사용하여 접종한 뒤 2주 후 병증을 측정하였다(도 6).

[0058]

병증 측정은 접종한 부위로부터 감염되어 파괴된 상처 길이(Lesion Lengths)를 측정하였으며, 천연형 동진벼 및 형질전환 벼의 측정값을 비교하였다.

[0059]

도 6에서 확인할 수 있듯이, 평균 파괴된 상처 길이를 측정한 결과 천연형 동진벼는 평균 16 cm에 달하는데 반하여, 형질전환 벼는 평균 5.5 cm로 병증이 약 34.4 %에 불과하여, 흰잎 마름병에 대한 강력한 저항성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0060]

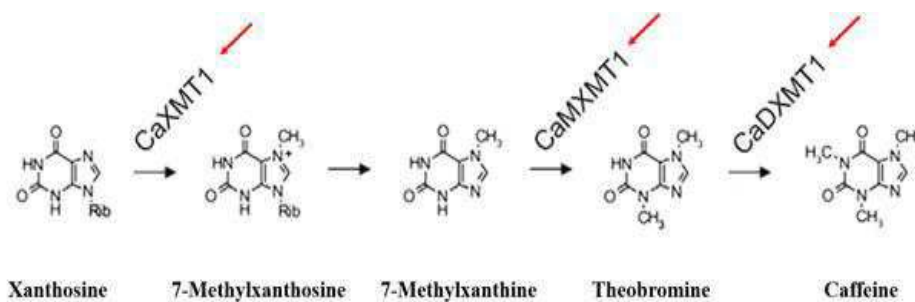
이와 같은 결과를 통하여, 벼에 커피나무 유래의 3 종류의 N-메틸전이 효소를 도입시킴으로써, 카페인을 생합성하는 형질전환 벼를 제조하였으며, 해당 형질전환 벼가 흰잎 마름병을 포함하는 박테리아 병원균에 대한 저항성을 가질 수 있음을 확인하였다.

[0061]

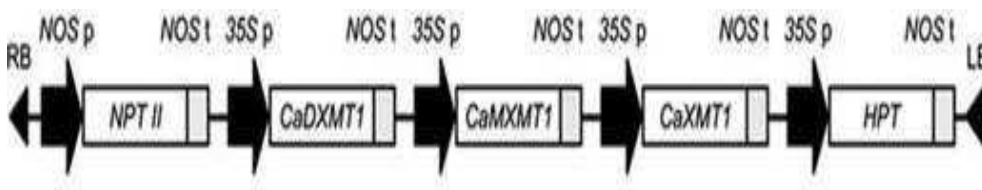
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



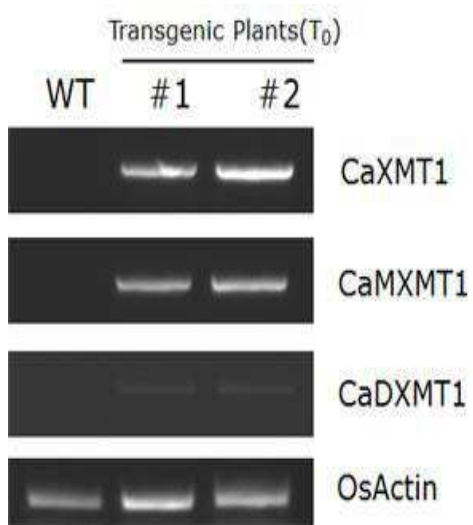
도면2



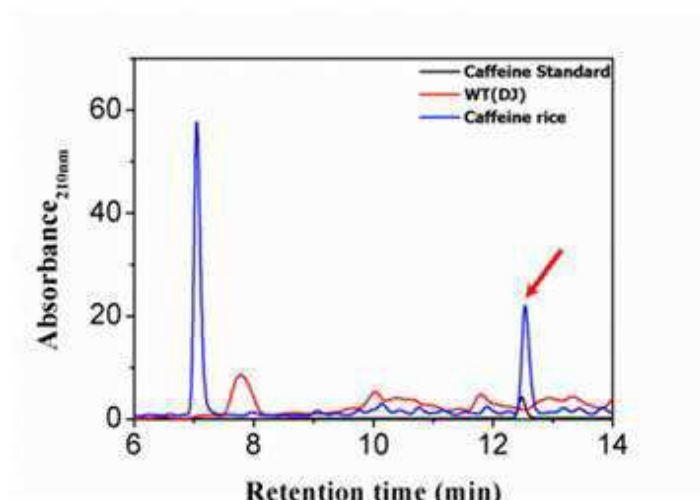
도면3



도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A caffeine-synthesis transgenic rice having enhanced resistance to the disease and the pest

<130> PA130757KR
 <160> 10
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 1316
 <212> DNA
 <213> CaXMT- Xanthosine methyltransferase(XMT)
 <400> 1

cacgaggctt tggcagtccc aattcgattt atgtgcaagt cctgcatatg aatggagctc 60
 caagaagtcc tgcggatgaa tggaggcgaa ggcgatacaa gctacgcaa gaattcagcc 120

tacaatcaac tggttctcgc caagtgaaa cctgtccttg aacaatgcgt acgggaattg 180
 ttgcgggcca acttgcccaa catcaacaag tgcattaaag ttgcggattt gggatgcgct 240
 tctggacca acacactttt aacggttcgg gacattgtcc aaagtattga caaagttggc 300
 caggaaaaga agaataaatt agaactgccc accattcaga ttttctgaa tgatcttttc 360
 ccaaatgatt tcaattcggg tttcaagttg ctgccaagct tctaccgcaa acttgagaaa 420
 gaaaaatggac gcaaaatagg atcgtgccta ataggggcaa tgcccggctc tttctacagc 480
 agactcttcc ccgaggagtc catgcatttt ttacactctt gttactgtct tcaatggtta 540

tctcaggttc ctacgggttt ggtgactgaa ttggggatcg gcacgaacaa agggagcatt 600
 tactcttcca aagcaagtgc tctgcccgtc cagaaggcat atttgatca atttacgaaa 660
 gattttacca ctttctaag gattcattcg gaagagttgt tttcacatgg ccgaatgctc 720
 cttacttgca tttgtaaagg agttgaatta gacgcccgga atgccaataga cttacttgag 780
 atggcaataa acgacttggt tgttgaggga catctggagg aagaaaaatt ggatagtttc 840
 aatcttcag tctatatacc ttcagcagaa gaagtaaagt gcatagtga ggaggaaggt 900
 tcttttgaaa tttataacct ggagactttt aaggtccttt acgatgctgg cttctctatt 960

gacgatgaac atattaaagc agagtatgtt gcatcttcg ttagagcagt ttacgaaccc 1020
 atcctcgcaa gtcattttgg agaagctatt atacctgaca tattccacag gtttgcgaag 1080
 catgcagcaa aggttctccc cttgggcaaa ggcttctata ataactttat ctttctctc 1140
 gccaaaaagc cagagaagtc agacatgtaa aagtttggtt ttgtgttggg gaaaggaata 1200
 agtgccgttg ggggtctttc gggtattgtg ctttttatat tattgttttg tatccgtaat 1260
 aaaagtgggtg tgtaagaata agatatttga cactcaataa tttattttca taaaaa 1316

<210> 2
 <211> 1298

<212> DNA

<213> CaMXMT1 7-methylxanthine N-methyltransferase

<400> 2

```

agcagtcgca attcgattgt cctgcatatg aatggagctc caagaagtcc tgcataatgaa      60
tgaagggtgaa ggcgatacaa gctacgcca gaatgcatcc tacaatctgg ctcttgccaa      120
ggtgaaacct ttccttgaac aatgcatatg agaattgttg cgggccaact tgcccaacat      180
caacaagtgc attaaagtgc cggatttggg atgcgcttct ggaccaaaca cacttttaac      240
agtgcgggac attgtgcaaa gtattgacaa agttggccag gaagagaaga atgaattaga      300
acgtcccacc attcagattt ttctgaatga tcttttccaa aatgatttca attcggtttt      360

caagttgctg ccaagcttct accgcaaact cgagaaagaa aatggacgca agataggatc      420
gtgcctaata agcgcaatgc ctggctcttt ctacggcaga ctcttccccg aggagtccat      480
gcattttttg cactcttggt acagtgttca ttggttatct caggttccca gcggttttgt      540
gattgaattg gggattgttg caaacaagg gagtatttac tcttcaaag gatgtcgtcc      600
gcccgtccag aaggcatatt tggatcaatt tacgaaagat ttaccacat ttctaaggat      660
tcattcgaaa gagttgtttt cacgtggccg aatgctcttt acctgcattt gtaaagtaga      720
tgaattcgac gaaccgaatc ccctagactt acttgacatg gcaataaacg acttgattgt      780

tgagggactt ctggaggaag aaaaattgga tagtttcaat attccattct ttacaccttc      840
agcagaagaa gtaaagtga tagttgagga ggaagggtct tgcgaaattt tataatctgga      900
gacttttaag gccattatg atgctgcctt ctctattgat gatgattacc cagtaagatc      960
ccatgaacaa attaaagcag agtatgtgga atcattaatt agatcagttt acgaaccat      1020
cctcgcaagt catcttgag aagctattat gcctgactta ttccacaggc ttgcgaagca      1080
tgcagcaaag gttctccaca tgggcaaagg ctgctataat aatcttatca tttctctcgc      1140
caaaaagcca gagaagtcag acgtgtaaaa gtttgttttt agttgggttt tgtgccgttg      1200

ggggtctttc gggtattgtc gttttgtatt cgtaataaaa gtgatgtgca agaataagat      1260
atttagtaca atattttcat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      1298

```

<210> 3

<211> 1963

<212> DNA

<213> CaDXMT1 3-7, dimethylxanthine methyltransferase (DXMT) gene, DXMT-a-3 allele

<400> 3

```

atggagctcc aagaagtcct gcagatgaat ggaggcgaag gcgatacaag ctacgccaag      60

```

aattcagcct acaatgtctg tctgtctctc tatctctctt taacgcacac acacacacag	120
agtagtagta aatcatgcta tgatacgtcg atctctaact tagtatgtct tttttccccc	180
cttaacattt gtattttgga gtggtatgtg tagcaactgg ttctcgccaa ggtgaaaccc	240
gtccttgaac aatgcgtacg ggaattgttg cgggcccaact tgcccaacat caacaagtgc	300
attaaagttg cggatttggg atgcgcttct ggaccaaaca cacttttaac agttcgggac	360
attgtccaaa gtattgacaa agttggccag gaaaagaaga atgaattaga acgtcccacc	420
attcagattt ttctgaatga tcttttccca aatgatttca attcggtttt caagttgctg	480
ccaagcttct accgcaaact tgagaaagaa aatggacgca aaataggatc gtgcctaata	540
ggggcaatgc cggctctttt ctacagcaga ctcttccccg aggagtccat gcattttttg	600
cactcttgtt acagtgttca ttggttatct caggtctttg agttaatccc ttttatcctt	660
ttactttttc ttgtagcaag aaagagattt ctgaagaac taataacata ttttatttaa	720
gttgtggctc atgatttaca ttcccatatg caacactaac aaaatgatcc aactatataa	780
gttaccagct ctagacgtgc aggttcccag cggtttgggtg actgaattgg ggatcagtgc	840
gaacaaaggg tgcatttact cttccaaagc aagtcgtccg cccgtccaga agacatattt	900
ggatcaattt acgaaagatt ttaccacatt tcttaggatt cattcggaag agttgatttc	960
acgtggccga atgtctctta ctttcatttg caaagaagat gaattcggca acccgaaattc	1020
catggactta cttgagatgt caataaacga cttggttatt gaggttatca tttctctgtc	1080
tatttgatga tcagatgtct gatcattgct tgttatctga aataaactag atagctagct	1140
agcttattca gggttcctac cttagctgca aaatggatgc aattttatcc tctgtaacct	1200
tgatagaata aacttttgtt agaccaagtt caccgtaaat cagatggtag taacctttaa	1260
ttggaagtta ggtcacacaa ctccaataca gttaagataa ttctttcaag ttagaaatat	1320
aggggggattt aatttgtcat ctatcttttt ttcccccca ttttgggtta aaaggtattg	1380
gaaaaaataa taatatgaac taaaagcaca agtaataata atatattcat attgaaatta	1440
aggaaaaaaa ctgttcgttt ttttttcta gagttgacgt tttagcaaat tggctgattt	1500
ccaagtcttg tacgtccagt aattcgaatt gacttgctga ttggcatatg tatgtatata	1560
ggggcatctg gaggaagaaa aattggacag tttcaatgtt ccagtctatg cagcttcagc	1620
agaagaagta aagcgcatag ttgaggagga aggttctttt gaaattttat acctggagac	1680
ttttaaggcc ccttatgatg ctggcttctc tattgatgat gattaccaag gaagatccca	1740
ttccccagta tcctgcgatg aacatgctag agcagcgcat gtggcatctg tcgttagatc	1800

agtttacgaa cccatcctcg caggtcattt tggagaagct atttacctg acttatccca 1860

caggattgag aagaatgcag caaaggttct ccgctcgggc aaaggcttct atgatatgtct 1920

tatcatttct ctcgcaaaa agccagagaa gtcagacgtg taa 1963

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CaXMT1_rt_primer_forward

<400> 4

atcaactggg tctcgccaag 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CaXMT1_rt_primer_reverse

<400> 5

ctgctctaac ggaagatgca 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CaMXMT1_rt_primer_forward

<400> 6

tcctacaatc tggtctttgc 20

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CaMXMT1_rt_primer_reverse

<400> 7

tgctttaatt tgttcattggg atc 23

<210> 8

<211> 26

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CaDXMT1_rt_primer_forward	
<400>	8	
	tcattctaca atctgtttct catcag	26
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CaDXMT1_rt_primer_reverse	
<400>	9	
	tatggaattc gggttctcga	20
<210>	10	
<211>	13080	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pBIN-NMT777 vector	
<400>	10	
	ttggcatgca catacaaatg gacgaacgga taaacctttt cacgcccttt taaatatccg	60
	attattctaa taaacgctct ttctcttag gtttaccgc caatatatcc tgtcaaacac	120
	tgatagttta aactgaaggc gggaaacgac aatctgatca tgagcggaga attaagggag	180
	tcacgttatg acccccgccg atgacgcggg acaagccgtt ttacgtttgg aactgacaga	240
	accgcaacgt tgaaggagcc actcagccgc gggtttctgg agtttaatga gctaagcaca	300
	tacgtcagaa accattattg cgcgttcaaa agtcgcctaa ggtcactatc agctagcaaa	360
	tatttcttgt caaaaatgct ccaactgacgt tccataaatt ccctcggta tccaattaga	420
	gtctcatatt cactctcaat ccaaataatc tgcaccggat ctggatcggt tcgcatgatt	480
	gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat	540
	gactgggcac aacagacaat cggtctgtct gatgccgccg tgttccggct gtcagcgag	600
	gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga actgcaggac	660
	gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcgac	720
	gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg gcaggatctc	780
	ctgtcatctc accttgcctc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatcgggcgg	840

ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc aagcgaaaca tgcgcatcgag	900
cgagcacgta ctcggatgga agccgggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat	960
caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggcctcaagg cgcgcatgcc cgacggcgat	1020
gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatgggtgga aaatggccgc	1080
ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg	1140
ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggccggcgaat gggctgaccg cttcctcgtg	1200
ctttacggta tcgccgtcc cgattcgag cgcatcgct tctatcgct tcttgacgag	1260
ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcgacgccc aacctgccat	1320
cacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt gggttcgga atcgttttcc	1380
gggacgccgg ctggatgac ctcagcgcg gggatctcat gctggagttc ttgccccag	1440
ggatctctgc ggaacaggcg gtgcaagggtg ccgatatcat tacgacagca acggccgaca	1500
agcacaacgc cagcatcctg agcgacaata tgatcgggcc cgcggtccac atcaacggcg	1560
tcggcggcga ctgccaggc aagaccgaga tgcaccgca tatcttgctg cgttcggata	1620
ttttcgtgga gttcccgcga cagaccggga tgatccccga tcgttcaaac atttggaat	1680
aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata taatttctgt	1740
tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg	1800
ttttatgat tagagtcccg caattataga ttaatacgc gatagaaac aaaatatagc	1860
gcgcaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgtcatctat gttactagat cgggcctcct	1920
gtcaatgctg gcgcgggctc tgggtgggtg tctgggtgcg gctctgaggg tgggtgctct	1980
gaggttgcg gttctgaggg tggcggtctt gagggaggcg gttccggtgg tggctctggt	2040
tccggtgatt ttgattatga aaagatggca aacgctaata agggggctat gaccgaaaat	2100
gccgatgaaa acgcgctaca gtctgacgct aaaggcaaac ttgattctgt cgctactgat	2160
tacggtgctg ctatcgatgg ttctattggt gacgtttccg gccttgctaa tggtaatggt	2220
gctactggtg attttgctgg ctctaattcc caaatggctc aagtcggtga cggtgataat	2280
tcacctttaa tgaataattt ccgtcaatat ttaccttccc tccctcaatc ggttgaatgt	2340
cgccttttg tctttggccc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcttg gccgattcat	2400
taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt	2460
aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt	2520
atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat	2580

tacgccaagc ttgcatgcct gcaggtcccc agattagcct tttcaatttc agaaagaatg	2640
ctaaccacaca gatggttaga gaggcttacg cagcaggtct catcaagacg atctaccga	2700
gcaataatct ccaggaaatc aaataccttc ccaagaaggt taaagatgca gtcaaaagat	2760
tcaggactaa ctgcatcaag aacacagaga aagatatatt tctcaagatc agaagtacta	2820
ttccagtatg gacgattcaa ggcttgcttc acaaccaag gcaagtaata gagattggag	2880
tctctaaaaa ggtagttccc actgaatcaa aggccatgga gtcaaagatt caaatagagg	2940
acctaacaga actcgccgta aagactggcg aacagttcat acagagtctc ttacgactca	3000
atgacaagaa gaaaatcttc gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa	3060
atatcaaaga tacagtctca gaagacaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa	3120
tatccggaaa cctctcgga ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag	3180
tggaaaagga aggtggctcc tacaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg	3240
aagatgcctc tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg	3300
aaaaagaaga cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg	3360
acgtaaggga tgacgcacaa tcccactatc cttcgcaaga ccttctctct atataaggaa	3420
gttcatttca tttggagaga acacggggga ctctagagga tccccgggtg gtcagtcctt	3480
tatggagctc caagaagtcc tgcatatgaa tggaggcgaa ggcgatacaa gctacgcaa	3540
gaactcattc tacaatctgt ttctcatcag ggtgaaacct atccttgaa aatgcataca	3600
agaattgttg cgggccaact tgcccaacat caacaagtgc attaaagttg cggatttggg	3660
atgcgcttct ggaccaaaca cacttttaac agttcgggac attgtacaaa gtattgacaa	3720
agttggccag gaaaagaaga atgaattaga acgtcccacc attcagattt ttctgaatga	3780
tcttttccaa aatgatttca attcggtttt caagtcgtg ccaagcttct accgcaaact	3840
tgagaaagaa aatggacgca aaataggatc atgcctgata ggcgcaatgc ctggctcttt	3900
ctacggcaga ctcttccccg aggagtccat gcatttttta cactcttggt actgtttgca	3960
ttggttatct caggttccca gcggtttggt gactgaattg gggatcagtg cgaacaaagg	4020
gtgcatttac tcttccaaag caagtcgtcc gccatccag aaggcatatt tggatcaatt	4080
tacgaaagat ttaccacat ttcttaggat tcattcgga gagttgattt cacgtggccg	4140
aatgctcttt acttgattt gcaaagaaga tgaattcgag aaccgaatt ccatagactt	4200
acttgagatg tcaataaacg acttggttat tgagggacat ctggaggaag aaaaattgga	4260
cagtttcaat gttccaatct atgcaccttc aacagaagaa gtaaagtgca tagttgagga	4320

ggaaggttct tttgaaattt tatacctgga gacttttaag gtcctttatg atgctggctt	4380
ctctattgat gatgattacc aaggaagatc ccattcccca gtatcctgcg atgaacatgc	4440
tagagcagcg catgtggcat ctgtcgttag atcaattttc gaaccatcg tcgcaagtca	4500
ttttggagaa gctatcatgc ctgacttata ccacaggatt gcgaagaatg cagcaaaggt	4560
tcttcgctcc ggcaaaggct tctatgatag tcttattcatt tctctcgcca aaaagccaga	4620
gaagtcagac gtgtaaatca acaactctcc tggcgcacca tcgtcggcta cagcctcggg	4680
aattgctacc gagctcgaat ttccccgac gttaaacaat ttggcaataa agtttcttaa	4740
gattgaatcc tgttgccggt ctgcatga ttatcatata atttctgtg aattacgtta	4800
agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt tttatgatta	4860
gagtcgccga attatacatt taatcgcga tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg	4920
ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatca agcttgcatg cctgcaggtc	4980
cccagattag ctttttcaat ttcagaaaga atgctaacc acagatggtt agagaggctt	5040
acgcagcagg tctcatcaag acgatctacc cgagcaataa tctccaggaa atcaaatacc	5100
ttccaagaa ggttaaagat gcagtcaaaa gattcaggac taactgcac aagaacacag	5160
agaaagatat atttctcaag atcagaagta ctattccagt atggacgatt caaggcttgc	5220
ttcacaacc aaggcaagta atagagattg gagtctctaa aaaggtagtt cccactgaat	5280
caaaggccat ggagtcaaag attcaaatag aggacctaac agaactcgcc gtaaagactg	5340
gcgaacagtt catacagagt ctcttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc ttcgtcaaca	5400
tggtggagca cgacacactt gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc	5460
aaagggaat tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctctc ggattccatt	5520
gcccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa ggaagggtggc tcctacaaat	5580
gccatcattg cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtgggtcca	5640
aagatggacc cccaccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt	5700
caaagcaagt ggattgatgt gatatttcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact	5760
atccttcgca agaccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttggag agaacacggg	5820
ggactctaga ggatccccgg gtggtcagtc ccttatggag ctccaagaag tctgcatat	5880
gaatgaaggt gaaggcgata caagctacgc caagaatgca tcctacaatc tggctcttgc	5940
caaggtgaaa cctttccttg aacaatgcat acgagaattg ttgcgggcca acttgccaa	6000
catcaacaag tgcattaaag ttgcggattt gggatgcgct tctggaccaa acacatttt	6060
aacagtgcgg gacattgtgc aaagtattga caaagttggc caggaagaga agaataaatt	6120
agaacgtccc accattcaga tttttctgaa tgatcttttc caaaatgatt tcaattcggg	6180

tttcaagttg ctgccaagct tctaccgcaa actcgagaaa gaaaatggac gcaagatagg	6240
atcgtgccta ataagcgcaa tgcctggctc tttctacggc agactcttcc ccgaggagtc	6300
catgcatttt ttgcactctt gttacagtgt tcattggtta tctcaggttc ccagcggttt	6360
ggtgattgaa ttggggattg gtgcaaacaa agggagtatt tactcttcca aaggatgtcg	6420
tccgcccgtc cagaaggcat atttggatca atttacgaaa gattttacca catttctaag	6480
gattcattcg aaagagtgtt tttcacgtgg ccgaatgctc cttacctgca tttgtaaagt	6540
agatgaattc gacgaaccga atcccctaga cttacttgac atggcaataa acgacttgat	6600
tgttgaggga cttctggagg aagaaaaatt ggatagtttc aatattccat tctttacacc	6660
ttcagcagaa gaagtaaagt gcatagttag ggaggaaggt tcttgcgaaa ttttatact	6720
ggagactttt aaggcccat atgatgctgc cttctctatt gatgatgatt acccagtaag	6780
atcccatgaa caaattaaag cagagtatgt ggcatcatta attagatcag tttacgaacc	6840
catcctcgca agtcattttg gagaagctat tatgcctgac ttattccaca ggcttgcgaa	6900
gcatgcagca aaggttctcc acatgggcaa aggctgctat aataatctta tcatttctct	6960
cgccaaaaag ccagagaagt cagacgtgta aatcaacaac tctcctggcg caccatcgtc	7020
ggctacagcc tcgggaattg ctaccgagct cgaatttccc cgatcgttca aacatttggc	7080
aataaagttt ctttaagatt aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc	7140
tgttgaatta cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat	7200
gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat	7260
agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgcatc tatgttacta gatcaagctt	7320
gcatgcctgc aggtccccag attagccttt tcaatttcag aaagaatgct aaccacaga	7380
tggttagaga ggcttacgca gcaggcttca tcaagacgat ctacccgagc aataatctcc	7440
aggaaatcaa ataccttccc aagaaggtta aagatgcagt caaaagattc aggactaact	7500
gcatcaagaa cacagagaaa gatataattc tcaagatcag aagtactatt ccagtatgga	7560
cgattcaagg cttgcttcac aaaccaaggc aagtaataga gattggagtc tctaaaaagg	7620
tagttccac tgaatcaaag gccatggagt caaagattca aatagaggac ctaacagaac	7680
tcgccgtaaa gactggcgaa cagttcatac agagtctctt acgactcaat gacaagaaga	7740
aaatcttctg caacatggtg gagcacgaca cacttgtcta ctccaaaaat atcaaagata	7800
cagtcacaga agaccaaagg gcaattgaga cttttcaaca aagggttaata tccggaaacc	7860
tcctcggatt ccattgcca gctatctgtc actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag	7920
gtggtccta caaatgcat cattgcgata aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg	7980
ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgttgaa aaagaagacg	8040

ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg	8100
acgcacaatc ccactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt	8160
tggagagaac acgggggact ctagaggatc cccgggtggt cagtcctta tggagctcca	8220
agaagtcttg cggatgaatg gaggcgaagg cgatacaagc tacgccaaga attcagccta	8280
caatcaactg gttctcgcca aggtgaaacc tgtccttgaa caatgcgtac gggaattgtt	8340
gcgggccaac ttgcccaaca tcaacaagtg cattaagtt gcggatttgg gatgcgcttc	8400
tggaccaaac acacttttaa cagttcgga cattgtccaa agtattgaca aagttggcca	8460
ggaaaagaag aatgaattag aacgtccac cattcagatt tttctgaatg atcttttccc	8520
aatgatttc aattcggttt tcaagttgct gccagcttc taccgcaaac ttgagaaaga	8580
aaatggacgc aaaataggat cgtgcctaata aggggcaatg cccggctctt tctacagcag	8640
actcttcccc gaggagtcca tgcatTTTTT acactcttgt tactgtcttc aatggttatc	8700
tcaggttcct agcggtttgg tgactgaatt ggggatcagt acgaacaaag ggagcattta	8760
ctcttccaaa gcaagtcgtc tgcccgtcca gaaggcatat ttggatcaat ttacgaaaga	8820
ttttaccaca tttctaagga ttcattcgga agagttgttt tcacatggcc gaatgtcct	8880
tacttgcatt tgtaaaggag ttgaattaga cgcccgaat gccatagact tacttgagat	8940
ggcaataaac gacttggttg ttgagggaca tctggaggaa gaaaaattgg atagtttcaa	9000
tcttccagtc tatatacctt cagcagaaga agtaaagtgc atagttgagg aggaaggttc	9060
ttttgaaatt ttatacttg agacttttaa ggtcctttac gatgctggct tctctattga	9120
cgatgaacat attaaagcag agtatgttgc atcttccgtt agagcagttt acgaacccat	9180
cctcgcaagt catTTTggag aagctattat acctgacata ttccacaggt ttgcgaagca	9240
tgcagcaaag gttctccct tgggcaaagg cttctataat aatcttatca tttctctgc	9300
caaaaagcca gagaagtcag acgtgtaaat caacaactct cctggcgcac catcgtcggc	9360
tacagcctcg ggaattgcta ccgagctcga atttccccga tcgttcaaac atttggcaat	9420
aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata taatttctgt	9480
tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg	9540
tttttatgat tagagtcccg caattataca ttttaatcgc gatagaaaac aaaatatagc	9600
gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgtcatctat gttactagat caattagctt	9660
ctaggacgcg tcgacgctc gacgcgtcga cgcgtcgacg cgctctagag atccgtcaac	9720
atggtggagc acgacactct cgtctactcc aagaatatca aagatacagt ctgagaagac	9780

caaagggcta ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatcgg gaaacctcct cggattccat	9840
tgccagcta tctgtcactt catcaaaagg acagtagaaa aggaaggtgg cacctacaaa	9900
tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc gttcaagatg cctctgccga cagtgggtccc	9960
aaagatggac ccccccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct	10020
tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac	10080
tatccttcgc aagaccttc ctctataaa ggaagttcat ttcatttggg gaggacgacc	10140
ccgatatgaa aaagcctgaa ctccaccgca cgtctgtcga gaagtttctg atcgaagaat	10200
tcgacagcgt ctccgacctg atgcagctct cggagggcgga agaattctgt gctttcagct	10260
tcgatgtagg agggcgtgga tatgtcctgc gggtaaatag ctgcgccgat ggtttctaca	10320
aagatcgta tgtttatcgg cactttgcat cggccgcgct cccgattccg gaagtgttg	10380
acattgggga attcagcgag agcctgacct attgcatctc ccgccgtgca cagggtgtca	10440
cgttgcaaga cctgcctgaa accgaactgc ccgctgttct gcagccggtc gcggaggcca	10500
tggatgcgat cgctgcggcc gatcttagcc agacgagcgg gttcgccca ttcggaccgc	10560
aaggaatcgg tcaatacact acatggcgtg atttcatatg cgcgattgct gatccccatg	10620
tgtatcactg gcaaactgtg atggacgaca ccgtcagtgc gtcctgcgcg caggctctcg	10680
aggagctgat gctttgggcc gaggactgcc ccgaagtccg gcacctctg caccgggatt	10740
tcggctcaa caatgtctg acggacaatg gccgcataac agcggtcatt gactggagcg	10800
aggcgatgt cggggattcc caatacagg tcgccaacat cttcttctgg aggccgtggt	10860
tggcttgat ggagcagcag acgcgtact tcgagcggag gcatccggag cttgcaggat	10920
cgcccggtc cggggcgtat atgctccgca ttggtcttga ccaactctat cagagcttgg	10980
ttgacggcaa tttcgatgat gcagcttggg cgcagggtcg atgcgacgca atcgtccgat	11040
ccggagccgg gactgtcggg cgtacacaaa tcgcccgag aagcgcggcc gtttggaccg	11100
atggctgtgt agaagtactc gccgatagt gaaaccgacg cccagcact cgtccgaggg	11160
caaaggaata gagtagatgc cgaccgggat ccaacactta cgtttgcaac gtccaagagc	11220
aaatagacca cgaacccgg aaggttgccg cagcgtgtgg attgcgtctc aattctctct	11280
tgcaggaatg caatgatgaa tatgatactg actatgaaac tttgagggaa tactgcctag	11340
caccgtcacc tcataacgtg catcatgcat gccctgacaa catggaacat cgctattttt	11400
ctgaagaatt atgctcgtt gaggatgtcg cggcaattgc agctattgcc aaaatcgaaa	11460
taccctcac gcatgcattc atcaatatta ttcatgcggg gaaaggcaag attaatacaa	11520
ctggcaaatc atccagcgtg attggttaact tcagttccag cgacttgatt cgttttgggtg	11580
ctaccacgt tttcaataag gacgagatgg tggagtaaag aaggagtgcg tcgaagcaga	11640

tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcat	11700
gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat	11760
gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca ttttaatacgc	11820
gatataaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgtcatctat	11880
gttactagat cgatcaaact tcggtactgt gtaatgacga tgagcaatcg agaggctgac	11940
taacaaaagg tatgccccaa aacaacctct ccaactgtt tcgaattgga agtttctgct	12000
catgccgaca ggcataaact agatattcgc gggtatttcc cactaattcg tcctgctggt	12060
ttgcgccaaag ataaatcagt gcatctcctt acaagttcct ctgtcttggt aatgaactg	12120
ctgactgccc cccaagaaag cctcctcatc tcccagttgg cggcggtgga tacaccatcg	12180
aaaacccacg tccgaacact tgatacatgt gcctgagaaa taggcctacg tccaagagca	12240
agtcctttct gtgctcgtcg gaaattcctc tcctgtcaga cggtcgtgcg catgtcttgc	12300
gttgatgaag ctaattcact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc	12360
gttaccacac ttaatcgctt tgcagcacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa	12420
gaggcccga ccatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcgc ccgtccttt	12480
cgtttcttc cttcctttc tcgccaggtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg	12540
ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc ttacggcac ctgacccca aaaaacttga	12600
tttgggtgat gggtcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac	12660
gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc	12720
tatctcgggc tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggaac caccatcaaa	12780
caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc gtggaccgct tgetgcaact ctctcagggc	12840
caggcgggtga agggcaatca gctgttggcc gtctcactgg tgaaaagaaa aaccacccca	12900
gtacattaaa aacgtccgca atgtgttatt aagttgtcta agcgtcaatt tgtttacacc	12960
acaatatatc ctgccaccag ccagccaaca gctccccgac cggcagctcg gcacaaaatc	13020
accactcgat acaggcagcc catcagtcgg ggacggcgtc agcgggagag ccgttgtaag	13080
	13080