

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0052962 (43) 공개일자 2016년05월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)	
(21) 출원번호 10-2014-0148598	(72) 발명자 이상원 경기 수원시 영통구 영통로290번길 25, 504동 203호 (영통동, 신나무실주공아파트)	
(22) 출원일자 2014년10월29일 심사청구일자 2014년10월29일	박종찬 부산 부산진구 복지로 70, 206동 304호 (개금동, 현대아이아파트)	
	안진홍 경기 용인시 기흥구 탑실로 152, 210동 1703호 (공세동, 탑실마을대주피오레2단지)	
	(74) 대리인 손민	

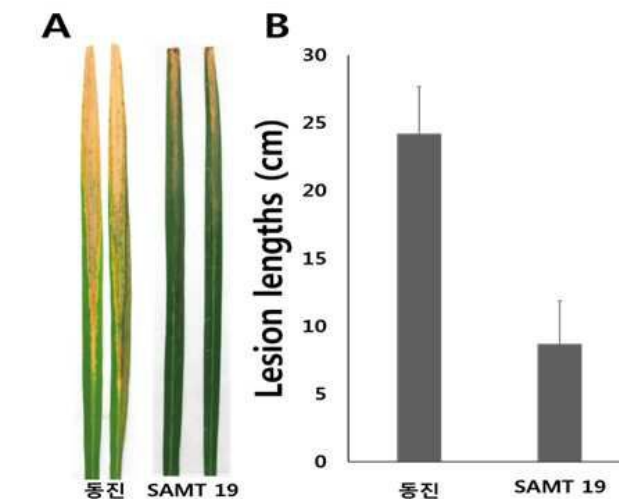
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **흰잎 마름병 저항성 메틸전이효소 및 이를 이용한 형질 전환 식물체**

(57) 요약

본 발명은 메틸전이효소인 LOC_0s06g22440 유전자가 불활성화되도록 T-DNA 서열이 삽입된, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 포함하는 식물 형질전환체, 및 상기 형질전환체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 상기 재조합 벡터를 이용하여, LOC_0s06g22440 유전자를 불활성화시키는 단계를 포함하는 벼의 병 저항성의 증진방법에 관한 것이다. 본 발명은 벼에 내재적으로 존재하며 흰잎 마름병에 대한 이병성 유전자, LOC_0s06g22440의 유전자 서열 내에 T-DNA 서열을 삽입함으로써, 흰잎 마름병에 대해 강력한 저항성을 갖는 형질 전환 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 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ009110
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21
연구과제명	벼 메틸전이효소 유전자 연구를 통한 다양한 스트레스 저항성 유전자 발굴 및 활용
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2012.07.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	PJ008098
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21_GM작물실용화
연구과제명	벼 저항성 관련 non-RD kinase 유전자 발굴 및 활용: nRDA41과 nRDK08
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os06g22440 유전자의 활성이 약화 또는 불활성화된, 식물 형질 전환체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 LOC_Os06g22440 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 LOC_Os06g22440 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 메틸전이효소로 코딩되는 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 식물은 벼(Oryza sp.)인 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 벼는 동진벼인 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 활성 약화 또는 불활성화는 LOC_Os06g22440 유전자의 서열 내에 T-DNA 서열을 삽입하여 이루어지는 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 T-DNA 서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 식물 형질 전환체는 흰잎 마름병에 대한 저항성을 갖는 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 9

메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os06g22440 유전자의 활성을 약화 또는 불활성화시키는 T-DNA 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 LOC_0s06g22440 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 LOC_0s06g22440 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 메틸전이효소로 코딩되는 것인, 재조합 벡터.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 T-DNA 서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 식물은 벼(*Oryza sp.*)인 것인, 재조합 벡터.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 병 저항성은 흰잎 마름병에 대한 저항성인 것인, 재조합 벡터.

청구항 15

(a) 제9항 내지 제14항 중 어느 한 항의 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 식물을 감염시키는 단계; 및
(b) 상기 (a) 단계에서 감염된 식물의 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 식물의 세포를 수득하는 단계를 포함하는,

병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서, (c) 상기 (b) 단계에서 제조한 캘러스를 뿌리 및 성체로 분화 유도하는 단계를 추가로 포함하는, 제조방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 식물은 벼(*Oryza sp.*)인 것인, 제조방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 병 저항성은 흰잎 마름병에 대한 저항성인 것인, 제조방법.

청구항 19

메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s06g22440 유전자의 활성을 약화 또는 불활성화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s06g22440 유전자의 활성이 약화 또는 불활성화된, 식물 형질 전환체, 상기 유전자의 활성을 약화 또는 불활성화시키는 T-DNA 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터 및 상기 식물 형질 전환체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 상기 LOC_0s06g22440 유전자의 활성을 약화 또는 불활성화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 벼 흰잎마름병은 *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 땅속줄기 또는 뿌리주위나 병든 벼짚 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 상습발생지 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 보이다 이병(罹病)성 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 흰잎마름병균은 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] 또한, 기존의 작물에 대한 저항성 부여방법은 외래 유전자의 도입을 통해 식물체로 하여금 새로운 형질을 부여하는 기술이 대다수였다.
- [0006] 한편, 동진벼는 내병, 양질, 다수성 신품종육성을 목표로 1975년에 농촌진흥청에서 금남풍과 낙동벼 그리고 사도미노리를 교배하여 개발된 품종으로, 병해 저항성의 경우 줄무늬잎마름병에 강하고, 도열병에는 중간 정도의 저항성을 가지며, 흰잎마름병과 기타 병충해에는 약한 편이다. 이에, 동진벼의 흰잎마름병과 도열병에 대한 저항성 연구와 개량된 품종에 대한 육성 전략이 요구되고 있다.
- [0007] 이에 본 발명자들은 아직 극복되지 못한 벼 흰잎마름병에 대한 이병(罹病)성 유전자를 동정하기 위해 예의 연구 노력한 결과, 천연형 벼 동진의 보유 유전자 중 흰잎마름병에 이병(罹病)성을 부여하는 메틸전이 효소 유전자 (LOC_0s06g22440)를 동정해내어, 이를 불활성화시킨 형질전환체가 흰잎마름병에 저항성을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s06g22440 유전자의 활성이 약화 또는 불활성화된, 식물 형질 전환체를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s06g22440 유전자의 활성을 약화 또는 불활성화시키는 T-DNA 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터를 제공하는 것

이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 상기 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 식물을 감염시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 감염된 식물의 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 식물의 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os06g22440 유전자의 활성을 약화 또는 불활성화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os06g22440 유전자의 활성이 약화 또는 불활성화된, 식물 형질 전환체를 제공한다.

[0013] 본 발명에서는 벼에 내재적으로 존재하는 이병성 유전자인, LOC_Os06g22440의 서열 내에 T-DNA 서열을 삽입함으로써, 해당 유전자가 불활성화되도록 하여 흰잎 마름병에 대해 저항성을 갖춘 형질전환 벼를 제조하였다.

[0014] 보다 상세하게는 본 발명자들은 아그로박테리움(Agrobacterium)을 이용한 형질전환 방법을 통해 만들어진 10만 개통의 벼 돌연변이 집단에서 흰잎마름병에 저항성이 있는 돌연변이체를 관찰하였다. 돌연변이 식물체는 아그로박테리움(Agrobacterium)에 의해 유전자를 발현시키는 발현 유도 서열을 포함하는 T-DNA 가 genome 상에 삽입되어 삽입된 지역의 유전자 기능이 불활성화된 식물체이다. T-DNA 삽입 위치를 genome DNA PCR과 염기서열 분석을 통해 확인할 수 있으며, 데이터 베이스에서 유전자 locus id를 찾을 수 있다.

[0015] 본 발명에서 용어 “메틸전이효소”는 메틸기전이를 촉매하는 효소의 총칭으로, 메틸기전달효소의 일종으로 기질인 아미노기, 히드록시기, 티올기를 메틸화하여 메틸화효소라고 부르는 경우도 있다

[0016] 본 발명에서 용어, “LOC_Os06g22440”는 Oryza sativa 여섯번째 유전체 (chromosome)에 존재하는 유전자로, 이의 발현물은 단백질 메틸전이효소의 일종이다. 상기 LOC_Os06g22440 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 유전자 일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 유전자 일 수 있으며, 또는 서열번호 3의 아미노산 서열로 코딩되는 유전자 일 수 있다.

[0017] 상기 LOC_Os06g22440 (TIGR, Os06g0329900 (RAP-DB))의 genome DNA 크기는 2284 bp (서열번호 1)이며 대표 coding sequence (LOC_Os06g22440.1)의 크기는 1101 bp (서열번호 2)로 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되며 366 개의 아미노산으로 번역되어 단백질 (서열번호 3)이 만들어진다. 이 단백질은 plant methyltransferase domain (Methyltransf_7)을 암호화 한다 (도 1B).

[0018] 상기 LOC_Os06g22440 유전자는 벼에 내재적으로 존재하는 유전자이다. 본 발명에서 용어, "내재적"이란 생물이 천연의 상태로 가지고 있는 것을 의미하는데, 본 발명에서는 식물, 바람직하게는 벼(Oryza sp.) 유전체 (chromosome)가 천연적으로 가지고 있는 유전자를 표시할 때 사용한다. 본 발명의 LOC_Os06g22440 유전자는 천연형 벼에서 내재적인 유전자이다.

[0019] 본 발명에서 용어 "활성 약화"는 DNA, 즉 유전자 상으로는 존재하나 RNA로 전사(transcription)되는 비율이 낮거나, 단백질로 번역(translation) 되는 비율이 낮아서 본연의 기능을 발휘하지 못하는 것을 의미하고, 본 발명에서는 벼가 내재적으로 가지고 있는 유전자가 전사 또는 번역이 되는 비율이 낮아서 그 기능을 제대로 발현하지 못하는 것을 의미하고, 특히, LOC_Os06g22440 유전자가 그 기능을 제대로 발현하지 못하는 것을 의미한다.

[0020] 본 발명에서 용어 "불활성화"는 DNA, 즉 유전자 상으로는 존재하나 RNA로 전사(transcription)되지 못하거나, 단백질로 번역(translation)되지 못하여 본연의 기능을 발휘하지 못하는 것을 의미하고, 본 발명에서는 벼가 내재적으로 가지고 있는 유전자가 전사 또는 번역되지 않는 특성상 그 기능을 발현하지 못하는 것을 의미하고, 특히, LOC_Os06g22440 유전자가 그 기능을 발현하지 못하는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명에서 상기 유전자의 "활성 약화" 또는 "불활성화"를 위하여 1) 해당 유전자의 서열 내에 T-DNA 서열을 삽입, 2) 활성이 불활성화된 형태로 변형시키는 방법으로 소실, 또는 3) 이의 조합에 의해 불활성화되도록 변형시킬 수 있다.

[0022] 본 발명에서는 바람직하게는 상기 LOC_Os06g22440 유전자 서열 내에 T-DNA를 삽입할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 4로 기재되는 염기서열을 삽입할 수 있다. 가장 바람직하게는 상기 LOC_Os06g22440 유전자의 서

열 내의 두 번째 인트론 부위 (intron region)에 T-DNA 서열 (서열번호 4)을 삽입하여, 상기 LOC_Os06g22440 유전자를 불활성화 시킬 수 있다. 본 발명에서 상기 LOC_Os06g22440 유전자의 두 번째 인트론 부위인 서열번호 1의 1272~1283 염기서열 사이에 서열번호 4로 기재되는 T-DNA 서열을 삽입하였다.

[0023] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, LOC_Os06g22440 유전자 서열 내에 T-DNA(서열번호 4)를 삽입함으로써, LOC_Os06g22440의 유전자를 불활성화시켰으며, 이에 의해 LOC_Os06g22440 유전자가 불활성화되도록 형질전환된 식물 형질 전환체가 흰잎 마름병에 대해 병 저항성을 가지는 것을 확인하였다(도 5).

[0024] 본 명세서에서, 용어 "식물"은 성숙한 식물 뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다. 본 발명에서 상기 벡터로 식물 형질전환체를 제조하기 위하여 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는 아그로박테리움을 이용한 형질전환 방법, 미세사출법(microprojectile bombardment), 일렉트로포레이션(electroporation), PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포솜 매개법(liposome-mediated method), 인-플란타 형질전환법(In planta transformation), 진공 침윤법(Vacuum infiltration method), 화아침지법(floral meristem dipping method), 및 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method)을 이용할 수 있으며, 더 바람직하게는 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법을 이용할 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 따르면, LOC_Os06g22440 유전자가 불활성화된 벼의 형질전환체를 제작하기 위하여 상기과 같은 T-DNA를 포함하는 재조합 벡터를 아그로박테리움을 통해 벼 세포에 도입하여 형질전환체를 제작하였으며, 상기 형질전환체는 평균 병증의 길이가 천연형 동진벼의 반 정도에 불과하여 (천연형 vs. SAMT 19 : 24.2cm vs. 8.6cm), 흰잎 마름병에 대한 강력한 저항성을 가짐을 확인할 수 있었다(도 5).

[0026] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 DNA 염기서열 상의 삽입, 결실 또는 대체 등의 변이를 통해 특정 형질이 발생하거나 사라지거나 조절되는 모든 행위를 의미하며, 특히 본 발명에서는 외부로부터 주어진 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것을 의미한다. 본 발명에서 용어, "형질 전환체"는 형질전환으로 인해 생성된 형질전환 식물을 의미하며, 유전자 재조합 기술을 이용하여 특정 유전자의 변형 또는 활성의 변이가 유발되어 생성된 유전자 재조합체를 포함한다.

[0027] 본 발명에서 용어, "식물 형질 전환체"는 형질전환의 대상이 될 수 있는 모든 식물을 포함하며, 특히, LOC_Os06g22440 유전자 또는 이에 해당하는 유전자가 포함되어 있는 식물은 모두 제한없이 포함한다. 바람직하게는 상기 식물 형질 전환체는 벼(Oryza sp.)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 동진벼일 수 있다.

[0028] 본 발명에서 상기 식물 형질 전환체는 흰잎 마름병에 대한 저항성을 가질 수 있다.

[0029] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 LOC_Os06g22440 유전자는 천연형 벼에서 내재적인 유전자이며, 유전자 서열 내에 서열번호 4의 T-DNA 서열을 삽입하는 형질전환을 통하여 LOC_Os06g22440에 해당하는 유전자가 불활성화되는 형질전환체를 제조하였으며, 이를 SAMT 19 이라고 명명하였다.

[0030] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os06g22440 유전자의 활성을 약화 또는 불활성화시키는 T-DNA 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터를 제공한다.

[0031] 상기 메틸전이효소, LOC_Os06g22440, 활성 약화, 불활성화, 및 T-DNA 서열은 상기 설명한 바와 같다.

[0032] 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 흰잎 마름병에 대한 저항성을 의미할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 용어, "재조합 벡터"는 특정 서열이 변이, 삽입 또는 제거되는 유전자 재조합 과정을 거친 벡터를 의미하며, 본 발명에서는 상기 LOC_Os06g22440 유전자의 발현이 불활성화되도록 상기 LOC_Os06g22440 유전자 서열 내에 T-DNA가 삽입된 것이다.

[0034] 본 발명에서 일실시예에 따르면, 상기 LOC_Os06g22440 유전자가 이병(罹病)에 관여하는지를 확인하기 위하여, 동진벼에 존재하는 LOC_Os06g22440 유전자의 서열 내의 두 번째 인트론 부위 (intron region)에 T-DNA 서열 (서열번호 4)을 삽입하여, LOC_Os06g22440 유전자를 불활성화시켰다(도 2). 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시

예에서 상기 LOC_0s06g22440 유전자가 불활성화되도록 형질전환된 식물 형질 전환체가 흰잎 마름병에 대해 병 저항성을 가지는 것을 확인하였다(도 5).

- [0035] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 상기 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 식물을 감염시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 감염된 식물의 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 식물의 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법을 제공한다.
- [0036] 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.
- [0037] 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.
- [0038] 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.
- [0039] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 수득된 캘러스를 루트-인덕션 배지에서 배양하여 뿌리 및 성체로 분화하는 것을 유도하였다(실시예 2).
- [0040] 또 하나의 양태로, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s06g22440 유전자의 활성을 약화 또는 불활성화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 재조합 벡터, LOC_0s06g22440 유전자, 활성 약화, 불활성화 및 병 저항성 등은 상기 설명한 바와 같다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 용어 "증진"은 본 발명에서 대조군 벼와 비교하여 적어도 5% 또는 10%, 바람직하게는 적어도 20% 또는 40%, 더욱 바람직하게는 50%, 60%, 70% 또는 80% 이상의 병 저항성을 의미하며, 벼가 원래 가지고 있는 병 저항성에 비해 상기 유전자를 도입하여 병 저항성이 증가되는 것을 의미한다.

발명의 효과

- [0043] 본 발명의 벼에 내재적으로 존재하는 흰잎 마름병에 대한 이병(罹病)성 유전자인 LOC_0s06g22440의 유전자 서열 내에 T-DNA 서열을 삽입함으로써, 흰잎 마름병에 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

- [0044] 도 1은 흰잎 마름병에 대한 이병(罹病)성과 관련된 유전자로 선별된 LOC_0s06g22440의 구조에 대한 개요도로, 도 1의 A는 유전자 상의 구조를 나타내며, 도 1의 B는 상기 유전자가 불활성화되도록 제작된 단백질의 구조를 나타낸다. 이에 표시된 Methyltransf_7은 메틸전이효소 활성 부분 (methyltransferase domain)을 의미한다.
- 도 2는 LOC_0s06g22440의 유전자 서열 내에 T-DNA 서열이 삽입된 SAMT 19 유전자 변형 벼의 게놈 DNA의 일부분을 나타내는 구조도이다.
- 도 3은 SAMT 19 유전자 변형 벼에서 T-DNA 삽입위치를 PCR로 확인한 도면이다.

도 4는 SAMT 19 유전자 변형 벼에서 LOC_Os06g22440의 발현 여부를 확인하는 RT-PCR 결과를 보여주는 도면이다.

도 5는 SAMT 19 유전자 변형 벼의 흰잎 마름병에 대한 저항성을 실험한 결과를 보여주는 도면으로, 도 5의 A는 천연형 벼 및 SAMT 19 유전자 변형 벼의 흰잎 마름병균을 가위 접종법으로 접종한 결과를 보여주는 사진이고, 도 5의 B는 이의 감염에 의해 파괴된 벼 잎의 길이를 측정하여 평균 낸 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 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.

[0046] 실시예 1. Bioinformatics를 통한 형질전환 타겟 유전자 선별

[0047] 동진벼의 유전체가 보유한 식물체의 질환 저항성과 밀접한 관련이 있을 것으로 예측되는 메틸전이효소 230개를 동정하였다. 이 중, microarray data를 바탕으로 MeV v2.0 프로그램을 이용하여 흰잎 마름병에 이병(罹病)성을 가질 확률이 높은 유전자를 24개 선별하였다. 선별된 유전자에 대하여 형질전환체를 제조하여 병 저항성을 갖는 유전자를 동정해 내는 과정에서, 본 발명의 LOC_Os06g22440이 흰잎마름병에 이병(罹病)성을 갖는 유전자로 선별되었다.

[0048] 실시예 2. 발현 유도체 삽입된 형질전환 벼 제조

[0049] 2-1. 벼 형질전환용 재조합 벡터 제조

[0050] LOC_Os06g22440 유전자의 두번째 인트론 부위에 T-DNA 서열을 삽입하기 위해 벡터를 제작하였다. 먼저, 유전체 삽입을 위한 T-DNA, 삽입위치의 왼쪽 유전자 서열을 확인하기 위한 N-GUS를 포함하는 재조합 벡터를 제조하기 위한, 담배 잎 모자이크바이러스 35S 프로모터 유래 DNA, 삽입위치의 오른쪽 유전자 서열을 확인하기 위한 L-0.5/1.5를 가지는 벡터를 제작하였다. 삽입된 유전체로부터 타겟 유전자의 확인과 증폭을 위한 프라이머는 아래와 같다.

[0051] T-DNA 서열의 확인과 증폭을 위한 프라이머는 아래와 같다.

[0052] T-DNA-F (정방향, 서열번호 8)

[0053] 5' - GTTTACCCGCCAATATATCCTGTCA -3'

[0054] T-DNA-R (역방향, 서열번호 9)

[0055] 5' - CTAAGAGAAAAGAGCGTTTA -3'

[0056] PCR 증폭 조건은 처음 DNA의 열변성을 위하여 94℃에서 3분간 1 cycle, 그리고 94℃ 1분, 58℃에서 1분, 72℃에서 2분간으로 총 35 cycle을 실시하였으며, 최종 DNA 합성은 7분으로 하였다.

[0057] 해당 증폭된 PCR 산물을 1.0%의 아가로스겔(agarose gel)로 전기영동 한 후 EtBr(ethidium bromide) 용액에 염색하여 UV lamp하에서 염기 크기에 해당하는 band를 절단하여 아가로스겔(agarose gel) 정제법으로 정제하였다.

[0058] 추출한 PCR 산물을 상기 제한효소 BamH I /Kpn I 으로 절단하였다. 또한, 재조합 벡터인 pGA2772 벡터를 제한효소 BamH I /Kpn I 로 절단하여, 절단된 벡터를 상기 아가로스겔 정제법으로 정제하였다. 상기 PCR 산물에 의한 DNA 단편을 절단된 재조합 벡터에 삽입하여, T-DNA 서열(T-DNA sequence, 서열번호 4)이 삽입된 재조합 벡터 pGA2772 vector를 제조하였다.

[0059] **2-2. 형질전환체 제조**

[0060] 상기 제조된 벡터를 전기충격 방법(electroporation)을 이용하여 아그로박테리움 투메파키엔스(Agrobacterium tumefaciens)에 도입하였다. 배양실에서 무균상태로 자란 동진벼에 리프 디스크(leaf disc)법으로 형질전환하였다. 구체적으로는 벼잎을 대략 5 x 5 mm 크기로 잘라서 200 μ l의 아그로박테리움이 포함된 MSO 액체 배지(MS 염 4.3g, 수크로스 30g/L, pH 5.6 내지 5.8)에 넣었다가 암조건에서 2 내지 3일 동안 배양하고, 배양된 잎 절편을 캘러스-슈트(callus-shoot) 유도 배지(MSO배지에 100 μ g NAA, 1mg BA, 500 μ g 세포탁심, 1 mg 포스피노트리신(phosphinothricin), 0.7% 피토 한천(phyto agar), pH 5.6)으로 옮기고, 새로운 배지로 옮겨 주었다. 유도된 발아는 1.5 내지 2 cm 정도 자라면 루트-인덕션 배지(MSO배지에 250 μ g 세포탁심, 10mg 포스피노트리신, 0.7% 피토 한천, pH 5.6)로 옮겨 주었다.

[0061] T-DNA서열이 삽입된 상기 유전자 형질전환 벼를 SAMT 19로 명명하였으며, 이의 유전자 구조는 도 2에 개시된 바와 같다. 구체적으로는, 동진벼에 존재하는 LOC_Os06g22440의 서열 내에 예측되는 두 번째 인트론 부위 (intron region)에 T-DNA 서열 (서열번호 4)을 삽입하여, 상기 실시예 1에서 선별된 목적 유전자 LOC_Os06g22440가 불활성화된 형질전환체를 제조하였다(도 2).

[0062] **2-3. 재조합 벡터의 벼 유전체 삽입위치 확인**

[0063] T-DNA 삽입에 의해 만들어진 SAMT 19에 대한 inverse-PCR 및 염기 서열 분석을 통해 T-DNA가 삽입된 염색체를 분석하였다.

[0064] 상기 선별된 계통의 벼 종자를 MSO 배지에 28℃에서 10일간 배양하였다. 이렇게 배양한 개체들의 잎 100mg을 채취하여 액체질소를 이용하여 급냉각한 후 분쇄하였다. 분쇄된 잎에서 one step buffer (1M Tris (pH9.5) 5ml, 0.5M EDTA 1ml, KCl 3.73g을 넣고 물로 50ml을 맞춰 조제)을 이용하여 DNA를 추출하였다.

[0065] SAMT 19는 LOC_Os06g22440 유전자의 인트론 부분에 T-DNA가 삽입된 계통으로 T-DNA 삽입위치에서 앞뒤에서 만들어진 프라이머 (서열번호 5 및 서열번호 6)와 T-DNA 삽입서열 중 iR2 프라이머 (서열번호 7)를 이용하여 PCR로 유전형 분석을 하였다.

[0066] PCR 반응은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 1분, 57℃에서 1분, 72℃에서 1분 을 38회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 7분을 진행하였다. PCR 산물은 agarose gel을 이용하여 전기영동으로 확인하였다(도 3). 이를 통해 유전형을 선별하였다.

[0067] 이에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[0068] SAMT 19_F (서열번호 5)

[0069] 5' - TATCACGCTCGATATGGGTG - 3'

[0070] SAMT 19_R (서열번호 6)

[0071] 5' - CAGCTTCTCAGGATGCCATA- 3'

[0072] iR2 (서열번호 7)

[0073] 5' - CAGGACGTAACATAAGGGACTGA - 3'

[0074] **실시예 3. 형질전환 벼의 유전자 불활성 검증**

[0075] LOC_Os06g22440 유전자의 유전자 서열 내에 T-DNA를 삽입한 형질전환 벼 (SAMT 19)에서 LOC_Os06g22440 유전자 불활성을 역전사 효소 PCR (RT-PCR, reverse transcriptase-PCR)로 확인 하였다.

[0076] 구체적으로는, 형질전환 벼 (SAMT 19)의 잎 0.1g에서 total RNA를 추출하였다. 이를 주형으로 하여 LOC_Os06g22440의 발현을 확인할 수 있는 RNA 역전사용 프라이머(정방향 서열번호 10, 역방향 서열번호 11)와 역전사 효소 (reverse transcriptase DNA polymerase)를 이용하여 역전사 효소 PCR을 수행하였다. 도 4 에서 확인할 수 있듯이, 천연형 동진벼 에서는 LOC_Os06g22440의 발현이 나타나지만 SAMT19에는 유전자의 발현이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] 이에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[0078] RT-SAMT 19_F (정방향, 서열번호 10)

[0079] 5' - TGACATGGTCACTATGGGTG -3'

[0080] RT-SAMT 19_R (역방향, 서열번호 11)

[0081] 5' - TCTCAGCATACTTGCTACCC -3'

[0082] 실시예 4. 형질전환 벼(SAMT 19)의 흰잎 마름병에 대한 저항성 검정

[0083] 상기 실시예 2에서 제조된 형질전환 벼가 흰잎 마름병에 대해 저항성을 보이는지 확인하기 위해, LOC_Os06g22440 유전자 서열 내에 T-DNA가 삽입된 형질전환 벼인 SAMT 19와 대조군으로 천연형 동진벼를 6주간 성장시켜 흰잎 마름병을 유발하는 균주인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (strain : PX099Az)를 가위에 묻혀 접종한 2주 후 병증 측정하였다 (도 5). 병증 측정은 접종한 부위로부터 감염되어 파괴된 상처 길이(Lesion Lengths)를 측정하여 천연형 동진벼와 비교하였다.

[0084] 도 5의 B에서 확인할 수 있듯이, SAMT 19 형질전환체는 평균 병증의 길이가 천연형 동진벼의 반 정도에 불과하여 (천연형 vs. SAMT 19 : 24.2cm vs. 8.6cm), 흰잎 마름병에 대한 강력한 저항성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0085] 이와 같은 결과를 통하여, 본 발명의 형질전환 벼 SAMT 19는 내재적 유전자 LOC_Os06g22440를 불활성화시킴으로써 흰잎 마름병에 대한 저항성을 가질 수 있음을 확인하였다.

[0086] 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.

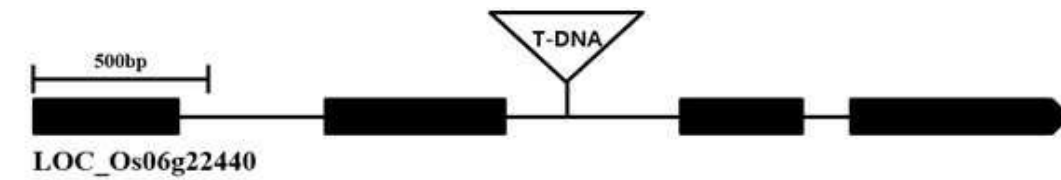
[0087]

도면

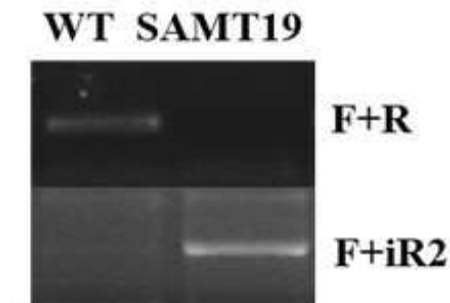
도면1



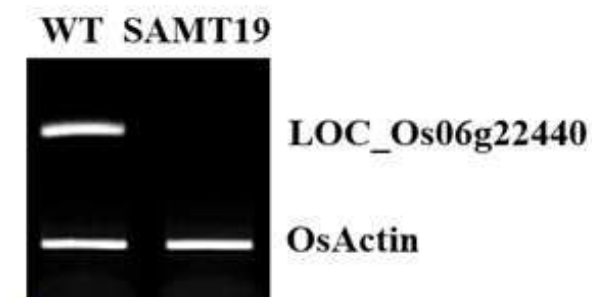
도면2



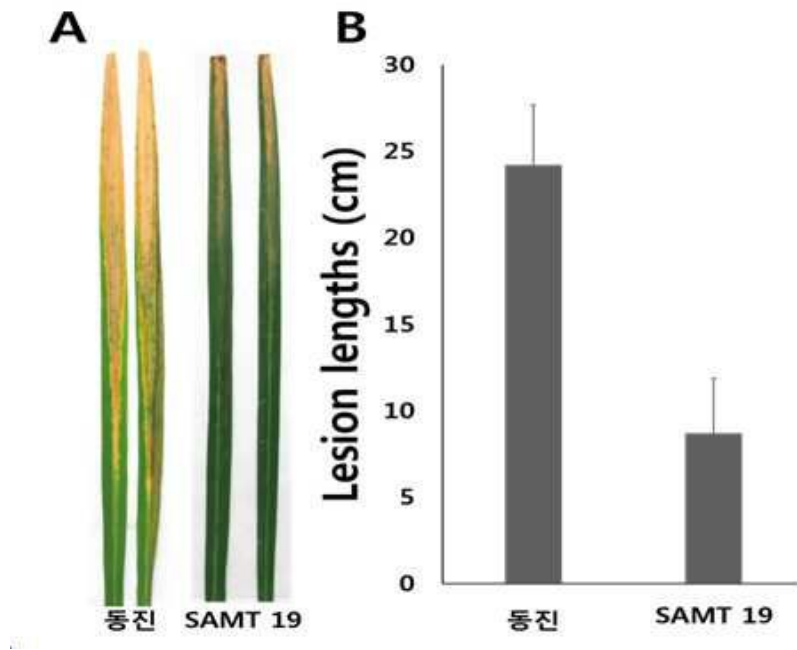
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Methyltransferase gene resistant to a bacterial blight, and the transgenic plant using the same
- <130> KPA141026KR
- <160> 11
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 2284
- <212> DNA
- <213> LOC_Os06g22440
- <400> 1

tactaattct ataattgaaa aggaagcagg atggcattaa ttaattgtgc caaatgtcta	60
tatattagca gccagaatag ttatgccata tgattggcac agaaaagaat atacctagt	120
ttcgccggtg agtgtacaac tacaagatct gcgttttttt ctagctagct ctagctagca	180
gatgaagtat ctggtgttca gcgctgctcc aagcaaatta ggcaaaaacc atggcatcca	240
aacagatggt acatatgaat cgaggccaag gggaaacaag ctatgctcga aactccattc	300
ttcagtgctg ttctctgctc ttaattagtt aatctacaat tttttttagt taatcaacaa	360
ttgcctatga tcttttctgc ttagaggaag aatgtaatta ttattttttt ttatagagag	420

aaaaaatgaa aatcaactga acatatataa gtcagacttt tcgataaagt aaaagaagtt	480
tgcaaaatgt ctccaattt gctcaaaata caaatgttct cggaccgata tattccgaaa	540
ttttcttaat ttcggttta tagtcacccc cgaaatttt ttgctttcag aaaagctgtt	600
aatcccgagt aaaacgcacc tgcagaacgc tgaacagaac aggatgaggc cgctgataga	660
agacgccatc gccgacctg tatgcagcag aagcatggtg atcgccgacc tgggctgctc	720
atccggcccg aacgcgctcg cgctcgctc gatcgccgctc gacgccttcc gccgccggtg	780
cctcgctc cggcggccac cgccaccggc ggagctctgc gtactcctca acgatctccc	840
cgacaacgac ttgccacgg tggatgaagag cctcgtggag ttcaggcgaa acaacggcga	900
cgagcctgtc ctctgaccg gcgtcgtgcc tggctcctc tacgggaggc tcttcgccgc	960
tgaatccctg catctcgtc gctcgtccaa cagcctccac tggctctccg aggtcagaaa	1020
tcctaagatt tttttcttc tataataaaa gtaaccttt taagacttat tttagcata	1080
cgaaccttct aaccatacta acagaggcaa aacaacattg tcacgctagt ttgtctggca	1140
tgacagcgtt gttctaccac acaccatgac tgcgtgata gaacaaaact atcacgctcg	1200
atatgggtgg tgcagacatt gttatttgc acgttagcgt aattaaaagg ttcagaattt	1260
gaaataagtt ttataaaagt ttatttttaa ataaaaagtt tagaaaataa taaaaatttg	1320
aatcatacag tactgatcac cagcatgcat tctgaattta ttattctttg aggcgaaaat	1380
tttgtttcaa tttcatggca gcaggctcct gaagatctga agatgaacgg aattccggca	1440
tacgacgttg acggaacgt gaggagagag agacgagccg tggctgttgg ggcttatgca	1500
cggcagttca ggaaggattt catggcgttt ctgaagatga gggtgtaga actgggtcca	1560
ggaggccgaa tggctacttc acttcaggc aggcgatctg ttgatctcgc ctccgaactc	1620
acgcacgcat gggaatccac agccatgacc ctaagtgaca tggctactat ggtaaattta	1680
actgttttac cttgctagaa cttcaccatt tgcatacga caaatgatta gtactatcta	1740
tggcatcctg agaagctgag attttggagt aattgacagg gtgtgattga caaagaaaag	1800
tttgaacat tctacatgcc gatttacgga ccttccgatg aagagatcag acagatcatc	1860
caagaagaag ggtccttctt gatacgggag atgcaggtac ctgaactcac gagtgggtgcg	1920
tacagcgcgc tgatcacctc ggcaagggtg gcaagtatgc tgagagccgc attcgagccc	1980
ataattgttc agcattttgg accgaccgga tgcgatggaa aagaagggat catggatgag	2040
ttcgtgagga cggcggagcg tcggtggagc ttggagggca gcttgcaaga cgagcttgca	2100
caaaaccctc gaggcgttct gcttgtgtcc ctcgagaaga agccgtcatg accatccggt	2160
agattataat tataattatg taactgctac cttctgtcga cagtaaatcc attcttaaat	2220

ctggttagatt ttataccact atattggccg attttagttc ataaaaagaa attttttagt	2280
tgctc	2284
<210> 2	
<211> 1101	
<212> DNA	
<213> Coding Sequence	
<400> 2	
atggcatcca aacagatggt acatatgaat cgaggccaag gggaaacaag ctatgctcga	60
aactccattc ttcagaacgc tgaacagaac aggatgaggc cgctgataga agacgccatc	120
gccgacctcg tatgcagcag aagcatggtg atcgccgacc tgggctgctc atccggcccc	180
aacgcgctcg cgctcgctc gatcgccgtc gacgccttc gccgcccgtg cctcgcgctc	240
cggcggccac cgccaccggc ggagctctgc gtactctca acgatctccc cgacaacgac	300
ttcgccacgg tggigaagag cctcgtggag ttcaggcgaa acaacggcga cgagcctgtc	360
ctcctgaccg gcgtcgtgcc tggctccttc tacgggaggc tcttcgccgc tgaatccctg	420
catctcgtct gctcgtccaa cagcctccac tggctctccg aggctcctga agatctgaag	480
atgaacggaa ttccggcata cgacgttgac gcgaacgtga ggagagagag acgagccgtg	540
gtcgttgggg cttatgcacg gcagttcagg aaggatttca tggcgtttct gaagatgagg	600
gctgtagaac tggccccagg aggccgaatg gtactctcac ttgcaggcag gcgatctgtt	660
gatctcgctt ccgaactcac gcacgatgg gaatccacag ccatgaccct aagtgacatg	720
gtcactatgg gtgtgattga caaagaaaag ttgaaacat tctacatgcc gatttacgga	780
ccttcgatg aagagatcag acagatcatc caagaagaag ggtccttctt gatacgggag	840
atgcaggtag ctgaactcac gagtgggtgcg tacagcgcgc tgatcacctc ggcaagggtg	900
gcaagtatgc tgagagccgc attcgagccc ataattgttc agcattttgg accgaccgga	960
tgcatgggaa aagaagggat catgtagtag ttcgtgagga cggcggagcg tcggtggagc	1020
ttggagggca gcttgcaaga cgagcttgca caaacccctc gaggcgttct gcttgtgtcc	1080
ctcgagaaga agccgtcatg a	1101
<210> 3	
<211> 366	
<212> PRT	
<213> LOC_0s06g22440	
<400> 3	

Met Ala Ser Lys Gln Met Val His Met Asn Arg Gly Gln Gly Glu Thr
1 5 10 15
Ser Tyr Ala Arg Asn Ser Ile Leu Gln Asn Ala Glu Gln Asn Arg Met
20 25 30
Arg Pro Leu Ile Glu Asp Ala Ile Ala Asp Leu Val Cys Ser Arg Ser
35 40 45
Met Val Ile Ala Asp Leu Gly Cys Ser Ser Gly Pro Asn Ala Leu Ala
50 55 60
Leu Ala Ser Ile Ala Val Asp Ala Phe Arg Arg Arg Cys Leu Ala Leu
65 70 75 80
Arg Arg Pro Pro Pro Pro Ala Glu Leu Cys Val Leu Leu Asn Asp Leu
85 90 95
Pro Asp Asn Asp Phe Ala Thr Val Val Lys Ser Leu Val Glu Phe Arg
100 105 110
Arg Asn Asn Gly Asp Glu Pro Val Leu Leu Thr Gly Val Val Pro Gly
115 120 125
Ser Phe Tyr Gly Arg Leu Phe Ala Ala Glu Ser Leu His Leu Val Cys
130 135 140
Ser Ser Asn Ser Leu His Trp Leu Ser Glu Ala Pro Glu Asp Leu Lys
145 150 155 160
Met Asn Gly Ile Pro Ala Tyr Asp Val Asp Ala Asn Val Arg Arg Glu
165 170 175
Arg Arg Ala Val Val Val Gly Ala Tyr Ala Arg Gln Phe Arg Lys Asp
180 185 190
Phe Met Ala Phe Leu Lys Met Arg Ala Val Glu Leu Val Pro Gly Gly
195 200 205
Arg Met Val Leu Ser Leu Ala Gly Arg Arg Ser Val Asp Leu Ala Ser
210 215 220
Glu Leu Thr His Ala Trp Glu Ser Thr Ala Met Thr Leu Ser Asp Met
225 230 235 240
Val Thr Met Gly Val Ile Asp Lys Glu Lys Phe Glu Thr Phe Tyr Met
245 250 255

Pro Ile Tyr Gly Pro Ser Asp Glu Glu Ile Arg Gln Ile Ile Gln Glu
260 265 270

Glu Gly Ser Phe Leu Ile Arg Glu Met Gln Val Pro Glu Leu Thr Ser
275 280 285

Gly Ala Tyr Ser Ala Leu Ile Thr Ser Ala Arg Val Ala Ser Met Leu
290 295 300

Arg Ala Ala Phe Glu Pro Ile Ile Val Gln His Phe Gly Pro Thr Gly
305 310 315 320

Cys Asp Gly Lys Glu Gly Ile Met Asp Glu Phe Val Arg Thr Ala Glu
325 330 335

Arg Arg Trp Ser Leu Glu Gly Ser Leu Gln Asp Glu Leu Ala Gln Asn

340 345 350

Pro Arg Gly Val Leu Leu Val Ser Leu Glu Lys Lys Pro Ser
355 360 365

<210> 4

<211> 8275

<212> DNA

<213> Inserting Sequence

<400> 4

gtttaccgc caatataatcc tgtcaaacac ggatccgagg taccaggtag caggtagagt 60
ccattcttac taccacgggtg ctattttttt tgctatgtgg ctaattacat gactaacttg 120
gggtgctaaa tcttacagggt tatatgcagg ttatatgcag gtcccgggta ggtcagtcac 180
ttatgttacg tctgtagaa accccaaccc gtgaaatcaa aaaactcgac ggcctgtggg 240

cattcagtct ggatcgcgaa aactgtggaa ttgatcagcg ttggtgggaa agcgcgttac 300
aagaaagccg ggcaattgct gtgccaggca gttttaacga tcagttcgcc gatgcagata 360
ttcgtaatta tgcgggcaac gtctggtatc agcgcgaagt ctttataccg aaaggttggg 420
caggccagcg tatcgtgctg cggttcgatg cggtcactca ttacggcaaa gtgtgggtca 480
ataatcagga agtgatggag catcagggcg gctatacgcc atttgaagcc gatgtcacgc 540
cgtatgttat tgccgggaaa agtgtacgta tcaccgtttg tgtgaacaac gaactgaact 600
ggcagactat cccgccggga atggtgatta ccgacgaaaa cggcaagaaa aagcagtcctt 660

acttccatga ttctttaac tatgccggaa tccatcgag cgtaatgctc tacaccacgc 720

cgaacacctg ggtaggacgat atcacctggg tgacgcatgt cgcgcaagac tgtaaccacg	780
cgtctgttga ctggcagggtg gtggccaatg gtgatgtcag cgttgaactg cgtgatgcgg	840
atcaacaggt ggttgcaact ggacaaggca ctagcgggac tttgcaagtg gtgaatccgc	900
acctctggca accgggtgaa ggttatctct atgaactgtg cgtcacagcc aaaagccaga	960
cagagtgtga tatctaccgc cttcgcgtcg gcatccggtc agtggcagtg aagggccaac	1020
agttcctgat taaccacaaa ccgttctact ttactggctt tggtcgtcat gaagatgcgg	1080
acttacgtgg caaaggattc gataacgtgc tgatgggtgca cgaccacgca ttaatggact	1140
ggattggggc caactctac cgtacctgc attacctta cgtgaagag atgctcgact	1200
gggcagatga acatggcatc gtgggtgattg atgaaactgc tgcgtcggc tttaacctct	1260
ctttaggcat tggtttcgaa gcgggcaaca agccgaaaga actgtacagc gaagaggcag	1320
tcaacgggga aactcagca gcgcacttac aggcgattaa agagctgata gcgcgtgaca	1380
aaaaccaccc aagcgtgggtg atgtggagta ttgccaacga accggatacc cgtccgcaag	1440
tgcacgggaa tatttcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccg acgcgtccga	1500
tcacctgct caatgtaatg ttctgcgacg ctacacacga taccatcagc gatctctttg	1560
atgtgctgtg ccigaacctg tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat ttggaacgg	1620
cagagaaggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat cagccgatta	1680
tcataccga atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac accgacatgt	1740
ggagtgaaga gtatcagtgt gcatggctgg atatgtatca ccgcgtcttt gatcgcgtca	1800
gcgccgtcgt cggatgaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg caaggcatat	1860
tgcgcgttgg cggtaacaag aaagggatct tcactgcga ccgcaaaccg aagtcggcgg	1920
ctttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg cagcaggag	1980
gcaacaatg aatcaacaac tctctggcg caccatcgtc ggctacagcc tcgggaattg	2040
ctaccgagct cgaatttccc cgatcgttca aacatttggc aataaagttt cttaagattg	2100
aatctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc tgttgaatta cgttaagcat	2160
gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggttttat gattagagtc	2220
ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa	2280
ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta gatcggaat taattcatcg ataggctagt	2340
catggtgact gtacgttgta agtgcagcaa actgccgacg cgatgcaaac tgtacacgtt	2400
aacatgccac tcacctggaa cgcacaatgg ccactagggtg cggccgtagt gtggatttca	2460
aagagagaga gagagagaga gagctaatac cgtaaacgta aacacagcag atagcagaga	2520
tgttgattag gcaaacacgt ataaaagcca atccaataaa ctacatttag cgaagtgcta	2580

tactaatgca ctaataacga actgttcttt tcttaagatc ggagccagta atgggttgtc	2640
agcaggagaa gcacgtaaac cttgaacat actaagttcc acagtcgaga gtaaaccgta	2700
atcaacacaa gaaacaaaca taaaattgaa caaacgcgca tattataagt gacgaagcgg	2760
tctcacataa aacagggcac acaggttaca acaacgaggg ttgtaagccc attaagcccc	2820
aaacatcaga tcaccacaag caaatgtctc gaagacacac gcacacggca acaggataac	2880
tccacactgg cagatcatgg gatagcagca gttatcaatc aggccttgac acacagaaca	2940
tcaagcccc agacgacgac gactcctcta gatcccggtc ggcatctact ctattccttt	3000
gccctcggac gagtgtctgg gcgtcgggtt ccactatcgg cgagtacttc tacacagcca	3060
tcggtccaga cggccgcgct tctgcgggcg atttgtgtac gcccgacagt cccggtccg	3120
gatcggacga ttgcgtcgca tcgaccctgc gcccaagctg catcatcgaa attgccgtca	3180
accaagctct gatagagttg gtcaagacca atgcggagca tatacgcccg gagccgcggc	3240
gatcctgcaa gctccggatg cctccgctcg aagtagcgcg tctgtgtctc catacaagcc	3300
aaccacggcc tcagaagaa gatgttggcg acctcgtatt gggaatcccc gaacatcgcc	3360
tcgtccagt caatgaccgc tgttatgcgg ccattgtccg tcaggacatt gttggagcgg	3420
aaatccgct gcacgaggtg cggacttcg gggcagtcct cgccccaaag catcagctca	3480
tcgagagcct gcgcgacgga cgcactgacg gtgtcgtcca tcacagtttg ccagtatac	3540
acatggggat cagcaatcgc gcataatgaaa tcacgccatg tagtgtattg accgattcct	3600
tcggtccga atggccgaa cccgtctgtc tggttaagat cggccgcagc gatcgcattc	3660
atggcctccg cgaccggtg cagaacagcg ggcagttcgg ttccaggcag gtcttgcaac	3720
gtgacacct gtgcacggcg ggagatgcaa taggtcaggc tctcgtgaa tccccaatg	3780
tcaagcatt ccggaatcgg gagcgcggcc gatgcaaagt gccgataaac ataacgatct	3840
ttgtagaac catcggcgca gctatttacc cgcaggacat atccagccc tctacatcg	3900
aagctgaaag cagagattc ttgcctcc gagagctgca tcaggtcgga gacgtgtcg	3960
aacttttcga tcagaaactt ctgcacagac gtcgcgtga gttcaggctt ttcatatct	4020
cattgcccc cgggatccgt cgagtcagcc tgaaaggaca aaatacatgt tagcgcctta	4080
gigtacatt attatttcag tacagcaaga taacacaatt caaaagactg acccataata	4140
aataactagt cctcaattta aaatttgagt tctaaatag acatctatga atatgtgta	4200
catcggcact acagaaaata cgattcccaa taattgaaca attgtacttt atttagttgt	4260
tactacaaca atggaagata caagatcgtt tcaaaactac catacatgca tggagtattt	4320
gttcacaga tctggaaaaa acagatctga cgggcagtgt caccaaacac tagacatatg	4380

tatttgtatt aggtggatga cgtgtacaaa catgactacc agatctagaa ttagaacgcg	4440
gcgtgctttg gaaatgttaa gtagatccaa atacatcggt aacaaatgaa catattcata	4500
tgacatagct gtaaaacatc atgatctatc atatcaacta gaggggatct cggcatgtat	4560
cattctattg catctagaac catagcattt ccatgtgaca aacaattttg aaacatacat	4620
tgctcagatc taccataaga acaccatgtt catgacagca tcgacatga tttccacatt	4680
taacagcatc ccgaggtcag atccagtgtt tagaactatc atttcagcaa aattcacaaa	4740
ataaatctc caattcgctt acatatatcc attccacgca tcctaggacc agatccacca	4800
taccagtata cacgaacact aaacatttca tcagatccgc taactacgac agagaaaacg	4860
cagatccaga caaccagatc caccgacaaa taaacacagc cccccacatc caacaaccgc	4920
gaatccacc agatctgacc cagaagcagg cacgaagaac acgggggggtg agggagatgg	4980
gacgcggatc caagcttggc ggcggatttg gttgatgctg cgacggcggc ggagaaggga	5040
gagaggggag agggagaaaa gcgcggaggc gcggagagag gcgagtacga agacgccttt	5100
ctctgcgttg tctcggttga gggtttgcga tccccgact ccgcccgttt tataggcca	5160
gacagcctgg acctctcagg agcgggaagcg aagggatggg ggagttttgc gttttacccc	5220
ctttgacgtc ttcaaaattc actcgcatct cacatcgtgc ctgcaaaggc cgggtggttg	5280
gatcatatcg agaataattt ataagttagg gagctttctg ataatatcca ccgcaaggag	5340
gccatttcgt ttgcactcgg ttgaagtcca taccgcctc tcgttagttt cactgacagg	5400
tgggtccaga ggcttccttc gtgtgcggtt agcgaagtca cgcgtcgtc caagaaaaag	5460
cagtaggtga cctggccacc tcgtttagg tgcgaccgat gcagacgtcc cgcttgccgg	5520
tgggcccacg ttacagctgg gtcccacata tcggtgggtg cgatgagttg ttcggtgcgt	5580
aggagtagat tggatcccaa cgggtggttg cgtcgtcggc ggccctgccg attttatatt	5640
cgatttttga aatgcgagag cgggagaacg gcaccgttgg cttggctgtg gatgccgtta	5700
gccgcaccgg actattcggc ccagttccat ttggcccaa cttgaaacag cgcggagcac	5760
aagacggggg agcccattta ggcccgtaat ctgagccctg tagaaagtcc gtgtcgttgc	5820
gatggaccag aaagcccata aaccttggag gcgttctctg ctgggaataa aataagttca	5880
cactctgtcc ctcaacttta cgtcgagttt gtttgacatc gctaatgcc agtaccagaa	5940
atcttggata caaataaggt ttgatataaa gtggcacgtg gtgaatggca tcgtttgaaa	6000
aatcttcaga tcgagcgggc ttcacaagcc gtaagtcaa gtgccaaaat ttgtgaagaa	6060
aattacttcc ttcatttcac aatgtaagtt attttagcat tttccacatt catattgata	6120

tcaataaatt tagatagata tataatgtctg aattcgtacc gttacgagc tctagaagct	6180
tcagtactac gcgtctcgag gcctattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga	6240
gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc	6300
cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa	6360
ataggcgtat cagcaggccc ttctgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct	6420
gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac	6480
aagcccgta gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg	6540
catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg	6600
taaggagaaa ataccgcac aggcgccatt cgccattcag gctgcgcaac tgttgggaag	6660
ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgtgcaa	6720
ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt ccagctcacg acgttgtaaa acgacggcca	6780
gtgaattcac tagtgattgc tctagacact gatagtttcg gatctagata tcacatcaat	6840
ccacttgctt tgaagacgtg gttggaacgt cttcttttc cacgatgttc ctctgggtg	6900
gggtccatc ttgggacca ctgtcggtag aggcactttg aacgatagcc ttctcttat	6960
cgcaatgatg gcattttag aagccatctt cttttctac tgcctttcg atgaagtac	7020
agatagctgg gcaatggaat ccgaggaggt ttcccgatat taccctttgt tgaaaagtct	7080
caatagccct ctggtcttct gagactgtat cttgatatt cttggagtag acgagagtgt	7140
cgtgctccac catgttgggg atctagatat cacatcaatc cacttgcttt gaagacgtgg	7200
ttggaacgtc ttcttttcc acgatgttc tcgtgggtgg gggccatct ttgggaccac	7260
tgctggtaga ggcatcttga acgatagcct ttctttatc gcaatgatgg cattttaga	7320
agccatcttc cttttctact gtcttttga tgaagtgaca gatagctggg caatggaatc	7380
cgaggagggt tcccgatatt accctttgtt gaaaagtctc aatagccctc tgggtctctg	7440
agactgtatc ttgatattc ttggagtaga cgagagtgtc gtgctccacc atgttgggga	7500
tctagatata acatcaatcc acttgctttg aagacgtggt tggaacgtct tctttttcca	7560
cgatgttcc cgtgggtggg ggtccatctt tgggaccact gtcggtagag gcatcttgaa	7620
cgatagcctt tcctttatcg caatgatggc attttagaa gccatcttc ttttctactg	7680
tcctttcgat gaagtacag atagctgggc aatggaatcc gaggaggttt cccgatatta	7740
ccctttgttg aaaagtctca atagccctct ggtcttctga gactgtatct ttgatattct	7800
tggagtagac gagagtgtcg tgctccacca tgttggggat ctagatatca catcaatcca	7860
cttgctttga agacgtggtt ggaacgtctt ctttttcac gatgttctc gtgggtgggg	7920
gtccatcttt gggaccactg tcggtagagg catcttgaac gatagccttt cttttatcg	7980

aatgatggca ttgttagaag ccatcttcct ttctactgt ctttcgatg aagtgcaga 8040
tagctgggca atggaatccg aggaggtttc ccgatattac ctttgttga aaagtctcaa 8100
tagccctctg gtcttctgag actgtatctt tgatattctt ggagtagacg agagtgtcgt 8160
gtccaccat gtgggggatc ctctagagtc gagaattcag tacattaaaa acgtccgcaa 8220

tgtgttatta agttgtctaa gcgtcaattt gtttacacca caatatatcc tgcca 8275

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SAMT 19_F

<400> 5

tatcacgctc gatatgggtg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SAMT 19_R

<400> 6

cagcttctca ggatgccata 20

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iR2

<400> 7

caggacgtaa cataaggac tga 23

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T-DNA-F

<400> 8

gtttaccgc caatatatcc tgtca 25

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T-DNA-R

<400> 9
 ctaagagaaa agagcgttta 20

<210> 10
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT-SAMT 19_F

<400> 10
 tgacatggtc actatgggtg 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT-SAMT 19_R
 <400> 11

tctcagcata cttgctaccc