



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0019358
(43) 공개일자 2017년02월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/04 (2006.01) *A23L 19/12* (2016.01)
C12N 15/82 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A01H 5/04 (2013.01)
A23L 19/12 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2016-7035059
- (22) 출원일자(국제) 2014년06월17일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년12월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/042631
- (87) 국제공개번호 WO 2015/195090
 국제공개일자 2015년12월23일

- (71) 출연인
제이.알.심프룻컴패니
미합중국 아이다호 83707 보이스, 메인스트리트
999 스위트 1300, 우체국사서함 27
- (72) 발명자
리첼 크레이그
미국 아이다호 83702 보이스 스위트 1300 메인 스트리트 999 제이.알.심프룻컴패니 내
- 안 후아**
미국 아이다호 83702 보이스 스위트 1300 메인 스트리트 999 제이.알.심프룻컴패니 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
석혜선, 김용인

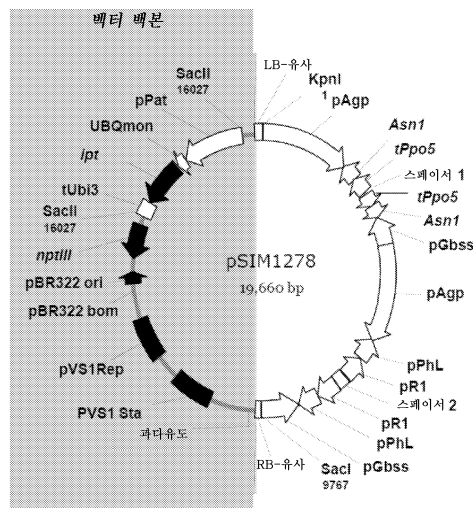
전체 청구항 수 : 총 23 항

- (54) 발명의 명칭 감자 종자 W8

(57) 요약

본 발명은 W8으로 지정되는 감자 종자를 개시한다. 본 발명은 감자 종자 W8의 덩이줄기, 감자 종자 W8의 씨앗, 감자 종자 W8의 식물 및 식물 부분, 감자 종자 W8으로부터 생산되는 식품, 및 감자 종자 W8을 자가교배하거나 또 다른 감자품종과 교배함으로써 감자 식물을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 유전자이식 감자 식물의 생산 방법, 및 이 방법에 의해 생산되는 유전자이식 감자 식물 및 이의 일부에 관한 것이다. 본 발명은 감자 종자 W8으로부터 유래된 다른 감자 식물 및 식물 부분, 감자 종자 W8으로부터 유래된 감자 식물 및 식물 부분을 생산하는 방법 및 이런 방법의 사용으로부터 유래된 감자 식물 및 이들의 부분에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 감자 종자 W8을 다른 감자 종자와 교배함으로써 생산된 잡종 감자 덩이줄기, 씨앗, 식물 및 식물 부분에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/8213 (2013.01)
C12N 15/8218 (2013.01)
C12N 15/8245 (2013.01)
C12N 15/8247 (2013.01)
C12N 15/825 (2013.01)
C12N 15/8274 (2013.01)
C12N 15/8282 (2013.01)
C12N 15/8286 (2013.01)

(72) 발명자

라스무센 줄런

미국 아이다호 83702 보이스 스위트 1300 메인 스트리트 999 제이.알.심프룻컴패니 내

두안 후이

미국 아이다호 83702 보이스 스위트 1300 메인 스트리트 999 제이.알.심프룻컴패니 내

삼푸헤 니콜라스

미국 아이다호 83702 보이스 스위트 1300 메인 스트리트 999 제이.알.심프룻컴패니 내

발무스 알렉시

미국 아이다호 83702 보이스 스위트 1300 메인 스트리트 999 제이.알.심프룻컴패니 내

예 징송

미국 아이다호 83702 보이스 스위트 1300 메인 스트리트 999 제이.알.심프룻컴패니 내

명세서

청구범위

청구항 1

감자 종자 W8의 감자 덩이줄기, 또는 감자 덩이줄기의 일부로서, 상기 덩이줄기의 대표적인 검체는 ATCC 등록 번호 PTA -121079로 기탁되어 있는 감자 종자 W8의 감자 덩이줄기, 또는 감자 덩이줄기의 일부.

청구항 2

제 1 항의 덩이줄기 또는 덩이줄기의 일부를 재배함으로써 생산되는 감자 식물 또는 이의 일부.

청구항 3

제 2 항의 식물의 모든 생리학적 및 형태학적 특징을 가지며, 포스포릴라제-L 및 디키나아제 R1 유전자를 위한 내인성 감자 프로모터의 역 반복체 이외에 내인성 아스파라긴 신타아제-1 유전자 및 내인성 폴리페놀 옥시다제-5 유전자의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 종자 W8에 존재하는 pSIM1278의 삽입체 영역을 포함하며 감자 역병 저항성 유전자 *Rpi-vnt1* 및 내인성 액포성 전화효소 유전자 *VInv*의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 W8에 존재하는 pSIM1678의 삽입체 영역을 더 포함하는 감자 식물.

청구항 4

제 2 항의 식물로부터 생산된 세포의 조직 배양물로서, 조직 배양물의 세포는 잎, 꽃가루, 배, 떡잎, 배축, 분열조직 세포, 뿌리, 근단, 암술, 꽃밥, 꽃, 줄기 및 덩이줄기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 식물 일부로부터 생산되며 상기 조직 배양 세포는 포스포릴라제-L 및 디키나아제 R1 유전자를 위한 내인성 감자 프로모터의 역 반복체 이외에 내인성 아스파라긴 신타아제-1 유전자 및 내인성 폴리페놀 옥시다제-5 유전자의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 종자 W8에 존재하는 pSIM1278의 삽입체 영역을 포함하며 감자 역병 저항성 유전자 *Rpi-vnt1* 및 내인성 액포성 전화효소 유전자 *VInv*의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 W8에 존재하는 pSIM1678의 삽입체 영역을 더 포함하는 감자 식물.

청구항 5

제 4 항의 조직 배양물로부터 재생되는 감자 식물로서, 상기 식물은 감자 종자 W8의 생리학적 특징 및 형태학적 특징을 모두 가지는 감자 식물.

청구항 6

제 1 항의 감자 덩이줄기 또는 덩이줄기를 일부를 재배함으로써 생산된 감자 씨앗으로서, 이 씨앗은 포스포릴라제-L 및 디키나아제 R1 유전자를 위한 내인성 감자 프로모터의 역 반복체 이외에 내인성 아스파라긴 신타아제-1 유전자 및 내인성 폴리페놀 옥시다제-5 유전자의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 종자 W8에 존재하는 pSIM1278의 삽입체 영역을 포함하며 감자 역병 저항성 유전자 *Rpi-vnt1* 및 내인성 액포성 전화효소 유전자 *VInv*의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 W8에 존재하는 pSIM1678의 삽입체 영역을 더 포함하는 감자 식물.

청구항 7

제 6 항의 씨앗을 재배함으로써 생산되는 감자 식물 또는 이의 일부.

청구항 8

제 7 항의 감자 식물의 조직 배양물로부터 재생된 감자 식물로서, 이 재생된 식물은 포스포릴라제-L 및 디키나아제 R1 유전자를 위한 내인성 감자 프로모터의 역 반복체 이외에 내인성 아스파라긴 신타아제-1 유전자 및 내인성 폴리페놀 옥시다제-5 유전자의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 종자 W8에 존재하는 pSIM1278의 삽입체 영역을 포함하며 감자 역병 저항성 유전자 *Rpi-vnt1* 및 내인성 액포성 전화효소 유전자 *VInv*의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 W8에 존재하는 pSIM1678의 삽입체 영역을 더 포

함하는 감자 식물.

청구항 9

2종의 감자 식물을 교배하는 단계, 및 생성되는 감자 씨앗을 수확(harvest)하는 단계를 포함하는 감자 씨앗의 생산 방법으로서, 적어도 하나의 감자식물은 제 2 항의 감자 식물인 방법.

청구항 10

2종의 감자 식물을 교배하는 단계, 및 생성되는 감자 씨앗을 수확하는 단계를 포함하는 감자 씨앗의 생산 방법으로서, 적어도 하나의 감자 식물은 제 7 항의 감자 식물인 방법.

청구항 11

제 10 항의 방법에 의해 생산된 감자 씨앗으로서, 이 씨앗은 포스포릴라제-L 및 디키나아제 R1 유전자를 위한 내인성 감자 프로모터의 역 반복체 이외에 내인성 아스파라긴 신타아제-1 유전자 및 내인성 폴리페놀 옥시다제-5 유전자의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 종자 W8에 존재하는 pSIM1278의 삽입체 영역을 포함하며 감자 역병 저항성 유전자 *Rpi-vnt1* 및 내인성 엽포성 전화효소 유전자 *VInv*의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 W8에 존재하는 pSIM1678의 삽입체 영역을 더 포함하는 감자 씨앗.

청구항 12

제 11 항의 상기 감자 씨앗을 재배함으로써 생산되는 감자 식물 또는 이의 일부.

청구항 13

제 12 항의 식물로부터 생산된 감자 씨앗으로서, 이 씨앗은 포스포릴라제-L 및 디키나아제 R1 유전자를 위한 내인성 감자 프로모터의 역 반복체 이외에 내인성 아스파라긴 신타아제-1 유전자 및 내인성 폴리페놀 옥시다제-5 유전자의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 종자 W8에 존재하는 pSIM1278의 삽입체 영역을 포함하며 감자 역병 저항성 유전자 *Rpi-vnt1* 및 내인성 엽포성 전화효소 유전자 *VInv*의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 W8에 존재하는 pSIM1678의 삽입체 영역을 더 포함하는 감자 씨앗.

청구항 14

제 9 항에 있어서,

상기 감자 식물의 하나는 감자 종자 W8이며 제 2 감자 식물은 유전자이식된 것인 방법.

청구항 15

2종의 감자식물을 교배하는 단계, 및 생성되는 감자씨앗을 수확하는 단계를 포함하는 감자 씨앗의 생산 방법으로서, 상기 감자 식물의 하나는 적어도 하나의 감자 식물은 제 7 항의 감자 식물이며 제 2 감자 식물은 유전자 이식된 것인 방법.

청구항 16

제 14 항의 방법에 의해 생산된 씨앗을 재배함으로써 생산된 감자 식물 또는 이의 일부로서, 상기 식물은 포스포릴라제-L 및 디키나아제 R1 유전자를 위한 내인성 감자 프로모터의 역 반복체 이외에 내인성 아스파라긴 신타아제-1 유전자 및 내인성 폴리페놀 옥시다제-5 유전자의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 종자 W8에 존재하는 pSIM1278의 삽입체 영역을 포함하며 감자 역병 저항성 유전자 *Rpi-vnt1* 및 내인성 엽포성 전화효소 유전자 *VInv*의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 W8에 존재하는 pSIM1678의 삽입체 영역을 더 포함하는 감자 식물 또는 이의 일부.

청구항 17

원하는 형질을 감자 종자 W8 내로 도입하는 방법으로서,

(a) W8 식물을, 원하는 형질을 포함하는 또 다른 감자 종자 식물과 교배하여, 자손 식물을 생산하는 단계로서, 덩이줄기의 대표적인 검체는 ATCC 등록 번호 PTA-121079로 기탁되었으며, 원하는 형질은 웅성 불임(male sterility), 제초제 저항성, 곤충 저항성, 지방산 대사 변형, 탄수화물 대사 변형, 및 박테리아 질병, 진균 질

병 또는 바이러스 질병에 대한 저항성으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 단계;

(b) 원하는 형질을 가지는 하나 이상의 자손 식물을 선별하는 단계;

(c) 선별된 자손 식물을 W8 식물과 역교배하여, 역교배 자손 식물을 생산하는 단계;

(d) 원하는 형질을 가지는 역교배 자손 식물을 선별하는 단계; 및

(e) 단계 (c) 및 (d)를 연속해서 2회 이상 반복하여, 원하는 형질을 포함하는, 선별된 제3 이상의 역교배 자손 식물을 생산하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

제 17 항의 방법에 생산된 감자 식물로서, 이 식물은 원하는 형질을 가지며 포스포릴라제-L 및 디키나아제 R1 유전자를 위한 내인성 감자 프로모터의 역 반복체 이외에 내인성 아스파라긴 신타아제-1 유전자 및 내인성 폴리페놀 옥시다제-5 유전자의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 품종 W8에 존재하는 pSIM1278의 삽입체 영역을 포함하며 감자 역병 저항성 유전자 *Rpi-vnt1* 및 내인성 액포성 전화효소 유전자 *VInv*의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 W8에 존재하는 pSIM1678의 삽입체 영역을 더 포함하는 감자 식물.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

원하는 형질은 제초제 저항성이며, 이 저항성은 이미다졸리논(imidazolinone), 설폰닐우레아, 글리포세이트(glyphosate), 글루포시네이트(glufosinate), L-포스포노트리신(L-phosphinothricin), 트리아진 및 벤조니트릴로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제초제에 부여되는 감자 식물.

청구항 20

제 18 항에 있어서,

원하는 형질은 곤충 저항성이며, 이 곤충 저항성은 *바실러스 투링지엔시스*(*Bacillus thuringiensis*) 내독소를 암호화하는 이식유전자에 의해 부여되는 감자 식물.

청구항 21

제 18 항에 있어서,

원하는 형질은 지방산 대사 변형 또는 탄수화물 대사 변형이며, 이 원하는 형질은 프록토실트랜스퍼라제, 레반수크라제(levansucrase), α -아밀라제, 인버타제(invertase) 및 전분 분지화 효소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 단백질을 암호화하는 핵산, 또는 스테아릴-ACP 데사투라제(desaturase)의 안티센스를 암호화하는 DNA에 의해 부여되는 감자 식물.

청구항 22

원자재(commodity) 식물 제품의 생산 방법으로서, 제 2 항의 식물 또는 이의 일부를 수득하는 단계, 상기 식물 또는 이의 식물 부분으로부터 원자재 식물 제품을 생산하는 단계를 포함하며, 상기 원자재 식물 제품은 감자튀김, 감자칩, 탈수된 감자 재료, 감자 플레이크 및 감자 과립으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 23

제 22 항의 방법에 의해 생산된 원자재 식물 제품으로서, 이 제품은 포스포릴라제-L 및 디키나아제 R1 유전자를 위한 내인성 감자 프로모터의 역 반복체 이외에 내인성 아스파라긴 신타아제-1 유전자 및 내인성 폴리페놀 옥시다제-5 유전자의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 종자 W8에 존재하는 pSIM1278의 삽입체 영역을 포함하며 감자 역병 저항성 유전자 *Rpi-vnt1* 및 내인성 액포성 전화효소 유전자 *VInv*의 발현 억제에 효과적인 감자 DNA의 역 반복체를 함유하는 W8에 존재하는 pSIM1678의 삽입체 영역을 더 포함하는 원자재 식물 제품.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 W8으로 지정된 신규 감자 종자, 및 해당 감자 품종에 의해 생성된 덩이줄기, 식물, 식물 부분, 조직 재배 산물 및 씨앗에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 감자튀김, 감자칩, 탈수 감자 재료, 감자 플레이크 및 감자 과립과 같이, 감자 종자 W8으로부터 제조된 식품에 관한 것이다. 본 출원에서 인용되는 모든 공개문헌은 참조로 본 명세서에 포함된다.

배경기술

[0002] 감자는 전세계적으로 4번째로 가장 중요한 식용 작물이며 현재까지 가장 중요한 채소이다. 감자는 현재 미국의 거의 모든 주에서 상업적으로 재배된다. 매년 감자 생산량은 미국에서만 1800만톤이 넘으며, 전세계적으로 3억 톤이 넘는다. 감자의 인기는 주로 이의 다용성 및 영양적 가치로 인한 것이다. 감자는 신선한 상태로, 동결된 상태로 또는 건조된 상태로 사용될 수 있거나, 가루, 전분 또는 알코올로 가공될 수 있다. 이들은 복합 탄수화물을 포함하며, 칼슘, 니아신 및 비타민 C가 풍부하다.

[0003] 식품 산업에서 감자의 품질은 2가지 중요한 인자들에 의해 악영향을 받는다: (1) 감자는 튀기거나 구울 때 신속하게 산화되어 발암성 생성물인 아크릴아마이드를 형성하는 비필수 유리 아미노산인 아스파라긴을 다량으로 함유하고; (2) 감자는 멎은 감자의 손상된 색소체로부터 폴리페놀 옥시다제가 누출되는 경우 발생하는 부작용인 효소적 갈변 및 변색에 매우 취약하다. 세포질에서, 효소는 페놀을 산화시키고, 그런 다음, 신속하게 중합되어 어두운 색소를 생성한다. 덩이줄기는 인산화된 전분을 다량으로 함유하며, 이 전분 중 일부는 저장 동안에 분해되어 포도당 및 과당을 생성한다. 이들 환원당은 아미노산과 반응하여 120℃를 초과하는 온도에서 가열 시 아크릴아마이드를 포함하는 마이야르 생성물을 형성한다. 전분 인산화에 관여하는 2가지 효소는 수(water) 다이키나아제 R1 및 포스포릴라제-L (R1 및 PhL)이다. 갈변은 또한 전분이 포도당 및 과당으로 부분적으로 분해된 결과로서 비-효소적으로 유도된다.

[0004] 많은 감자 재배종은 곰팡이와 같은 난균성 감자역병균(*Phytophthora infestans*)에 의해 야기된 치명적인 질병인 역병에 취약하다. 감자 역병은 급속히 확대되어 괴사가 될 수 있는 잎과 줄기 상의 검은 색/갈색 병변에 의해 확인된다. 심각한 역병은 감자역병균(*P. infestans*)이 숙주 작물에서 빠르게 성장하고 번식할 때 발생한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 지금까지, 낮은 아크릴아마이드 함량, 증가된 흑점 상처 내성(black spot bruise tolerance), 감소된 환원당 및 증가된 역병에 대한 저항성을 가진 덩이줄기를 생성하는 감자 식물 품종은 존재하지 않는다. 따라서, 알려지지 않은 핵산 또는 외래 핵산을 사용하지 않으면서, 독성 화합물의 수준이 낮고 질병에 대한 저항성이 증가된 감자 품종을 개발하는 것이 요구되고 있다. 본 발명은 이러한 요구를 충족시킨다.

[0006] 관련 기술의 상기 예들 및 이와 관련된 제한은 예시적일 뿐 배제적인 것으로 의도되지 않는다. 관련 기술의 다른 제한은 당업자가 명세서를 읽을 때 명백해질 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 하기의 실시태양 및 이의 양태는 예시적이며 범위를 제한하지 않는 것으로 의미되는 시스템, 틀 및 방법과 함께 기술된다. 다양한 실시태양에서, 상기 문제점들 중 하나 이상은 감소되거나 제거된 반면, 다른 실시태양은 그 외 개선에 관한 것이다.

[0008] 이를 위해, 본 발명은 감자식물 계통에 고유하며 외래 DNA, *아그로박테리움*(*Agrobacterium*) DNA, 바이러스 마커 또는 벡터 백본 서열을 함유하지 않는 핵산 서열로 형질전환된 신규 감자품종 W8을 제공한다. 더 정확하게 말하면, 감자품종 W8의 계통 내로 삽입된 DNA는 흑점 상처의 발현, 아스파라긴 축적 및 노화 감미에 관여하는 유전자를 침묵시키는 감자에 고유하거나 타가수정 가능한 감자 식물(sexually compatible plant)인 야생 감자에 고유한 비-암호화 폴리뉴클레오타이드이다.

[0009] 따라서, 한 실시태양에서, 본 발명은 아스파라긴 신타아제-1 유전자(fAsn1)의 단편 및 폴리페놀옥시다제-5 유전자의 3'-비번역 서열을 안티센스 배향으로 포함하는 DNA 분절의 복사체를 2개 함유하는 제1 침묵 카세트; 및 감자 포스포릴라제-L(pPhL) 유전자의 단편 및 감자 R1 유전자의 단편을 안티센스 배향으로 포함하는 DNA 분절의

복사체를 2개 함유하는 제2 침묵 카세트를 포함하는 pSIM1278로 불리는 식물 벡터를 제공한다. pSIM1278 벡터는 식물의 형질전환 전에는 식물 DNA의 유지를 지지하며 식물 세포의 형질전환 시에는 식물 세포 내로 전달되지 않는 9,512 bp의 백본 영역 및 형질전환 시 식물 세포의 게놈 내로 안정하게 통합되는 고유한 DNA(native DNA)를 포함하는 10,148 bp의 DNA 삽입체 영역을 포함한다.

[0010] 다른 실시태양에서, 본 발명은 식물 공포성 전화효소, *VInv*에 대한 *Rpi-vnt1* 발현 카세트 및 침묵 카세트를 포함하는 pSIM1678로 불리는 제 2 식물 벡터를 제공한다. *Rpi-vnt1* 유전자 카세트는 역병에 대해 광범위한 저항성을 제공하는 고유 프로모터 및 종결자 서열에 의해 조절된 VNT1 단백질 암호화 영역으로 이루어진 반면 침묵 카세트는 대립 식물 프로모터, pGbss 및 pAg가 측면에 위치한 감자 *VInv* 유전자로부터의 서열의 역전 반복체로 이루어진다. pSIM1678 벡터는 식물의 형질전환 전에는 식물 DNA의 유지를 지지하며 식물 세포의 형질전환 시에는 식물 세포 내로 전달되지 않는 9,512 bp의 백본 영역 및 형질전환 시 식물 세포의 게놈 내로 안정하게 통합되는 고유한 DNA(native DNA)를 포함하는 9,090 bp의 DNA 삽입체 영역을 포함한다.

[0011] 상이한 실시태양에서, 본 발명은 본 발명의 식물 벡터들 중 하나 또는 모두로 형질전환된 식물 세포를 제공한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명은 본 발명의 벡터들로 형질전환된 하나 이상의 세포를 포함하는 감자 식물 품종을 제공한다. 본 발명의 한 양태에서, 감자식물 품종은 벡터 pSIM1278의 침묵 카세트 2개 중 적어도 하나 및 벡터 pSIM1678의 침묵 카세트를 발현하며 침묵 카세트의 발현은 식물의 덩이줄기에서 아스파라긴 신타아제-1 유전자, 폴리페놀옥시다제-5 유전자 및 바칼로 인터바제 유전자의 하향조절을 초래한다. 본 발명의 한 바람직한 양태에서, 적어도 하나의 침묵 카세트를 발현하는 감자식물 품종의 덩이줄기는 동일한 품종의 비형질전환된 식물의 덩이줄기에는 존재하지 않는 둘 이상의 바람직한 형질을 나타낸다. 본 발명의 가장 바람직한 양태에서, 둘 이상의 바람직한 형질은 저장 동안 낮은 아스파라긴 축적, 흑점 상처 감소, 열-유도성 아크릴아마이드 형성의 감소 및 환원당의 축적 감소로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0012] 본 발명의 상이한 양태에서, 감자식물 품종은 식물 DNA 벡터 pSIM1278의 침묵 카세트 모두 및 벡터 pSIM1678의 침묵 카세트를 발현하며 침묵 카세트의 발현은 감자식물 품종의 덩이줄기에서 아스파라긴 신타아제-1 유전자, 폴리페놀옥시다제-5 유전자, 포스포릴라제-L 유전자, 다이키나아제 R1 유전자 및 공포성 전화효소 유전자의 하향조절을 초래한다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 식물 DNA 벡터 pSIM1278의 2개의 침묵 카세트 및 벡터 pSIM1678의 침묵 카세트를 발현하는 감자식물 품종의 덩이줄기는 동일한 품종의 비형질전환된 식물의 덩이줄기에는 존재하지 않는 둘 이상의 바람직한 형질을 나타낸다. 한 바람직한 실시태양에서, 둘 이상의 바람직한 형질은 낮은 아스파라긴 축적, 흑점 상처 감소, 저장 동안의 환원당 축적 감소 및 열-유도성 아크릴아마이드 형성의 감소로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본 발명의 한 양태에서, 식물 DNA 벡터 pSIM1278의 2개의 침묵 카세트 및 식물 DNA 벡터 pSIM1678의 침묵 카세트를 발현하는 감자식물 품종은 러셋 버뱅크(Russet Burbank) W8 품종이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명의 감자 식물 품종 W8은 식물 DNA 벡터 pSIM1678의 역병 저항 유전자(*Rpi-vnt1*)를 발현한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명의 감자 식물 품종 W8은 역병 감염에 대해 증가된 저항성을 가진다.

[0014] 따라서, 본 발명에 따라, W8으로 지정된 *솔라눔 투베로sum L. (Solanum tuberosum L.)* 종(species) 및 속(genus)의 새로운 감자 종자를 제공한다. 따라서, 본 발명은 감자 종자 W8, 감자 종자 W8의 덩이줄기, 감자 종자 W8의 식물, 감자 종자 W8의 씨앗, 감자 종자 W8으로부터 생산되는 식품, 및 감자 종자 W8을 자가교배하거나 감자 종자 W8 또 다른 감자 종자와 교배함으로써 생산되는 감자식물의 생산 방법, 및 감자 종자 W8의 돌연변이 또는 형질전환에 의한 변이체의 생성에 관한 것이다.

[0015] 따라서, 자가교배, 역교배, 잡종 생산, 집단 교배 등과 같이 종자 W8을 사용하는 이러한 임의의 방법들은 본 발명의 실시태양이다. 감자 종자 W8을 적어도 하나의 부모로서 사용함으로써 생산되는 모든 식물들은 본 발명의 범위에 속한다. 유리하게는, 감자 종자는 우수한 특징을 가진 제1세대(F₁) 감자 잡종 덩이줄기, 씨앗 및 식물을 생산하기 위해, 다른, 상이한 감자식물과의 교배에 사용될 수 있다.

[0016] 다른 실시태양에서, 본 발명은 감자 종자 W8의 단일 또는 다중 유전자 변환된 식물을 제공한다. 한 실시태양에서, 전달되는(transferred) 유전자(들)는 우성 대립 유전자(들) 또는 열성 대립 유전자(들)일 수 있다. 일부 실시태양에서, 전달되는 유전자(들)는 제초제 저항성(herbicide resistance), 곤충 저항성(insect resistance), 박테리아 질병, 진균 질병 또는 바이러스 질병에 대한 저항성, 웅성 수정능(male fertility), 웅성 불임(male sterility), 영양 품질 증강, 균일성, 전분 및 기타 탄수화물의 농도 증가, 상처 취약성(tendency to bruise) 감소, 및 전분에서 당으로의 변환율 감소와 같은 형질을 부여할 것이다. 유전자(들)는 자연적으로 존재하는 감

자 유전자이거나, 유전자 조작 기술, 역교배 또는 돌연변이를 통해 도입되는 이식유전자(transgene)일 수 있다.

[0017] 다른 실시태양에서, 본 발명은 감자 종자 W8의 조직 배양에 사용하기 위한 재생성 세포를 제공한다. 한 실시태양에서, 조직 배양은 상기 감자식물의 생리학적 특징 및 형태학적 특징을 모두 가지는 식물을 재생시킬 수 있으며, 상기 감자식물과 실질적으로 동일한 유전자형을 가지는 식물을 재생시킬 수 있을 것이다. 일부 실시태양에서, 이러한 조직 배양물 내의 재생성 세포는 배(embryo), 원형질체, 분열조직 세포, 캘러스, 화분, 잎, 꽃밥(anther), 암술, 떡잎, 배축(hypocotyl), 뿌리, 근단(root tip), 꽃, 씨앗, 잎꼭지(petiole), 덩이줄기, 눈(eye) 또는 줄기일 것이다. 더욱 나아가, 본 발명은 본 발명의 조직 배양으로부터 재생되는 감자식물을 제공한다.

[0018] 추가 실시태양에서, 본 발명은 감자식물 품종인 러셋 버뱅크 W8의 덩이줄기로부터 제조되는 식품을 제공한다. 바람직하게는, 식품은 열처리된 제품이다. 더욱더 바람직하게는, 식품은 감자 튀김, 감자칩, 탈수된 감자 재료, 감자 플레이크 또는 감자 과립이다.

[0019] 상기 기술된 예시적 양태 및 실시태양 외에도, 추가적인 양태 및 실시태양은 하기의 상세한 설명을 연구함으로써 명백해질 것이다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 내용 중에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 pSIM1278 형질전환 벡터를 나타낸다. 좌측의 벡터 백본 영역은 길이가 9,512 bp로서, 10,149 bp 위치에서 시작하여 19,660 bp 위치에서 종결된다. 백본 DNA는 주로 식물 형질전환 전에 DNA 삽입체의 유지를 지지 제공하는 박테리아 DNA로 구성된다. 플랭킹 경계 서열을 포함하는 DNA 삽입체 영역(우측)은 길이가 10,148 bp(1 bp부터 10,148 bp)이다. DNA 삽입체는 고유한 DNA로만 구성되며 형질전환 시 감자 게놈 내로 안정하게 통합되었다.

도 2는 pSIM1278 형질전환 벡터에 삽입된 DNA 삽입체에서 침묵 카세트의 개략도를 제공한다. 각각의 침묵 카세트는 스페이서에 의해 분리된 2개의 유전자 단편의 복사체를 2개씩 함유한다. 4개의 표적화된 유전자인 *Asn-1*, *Ppo-5*, *Phl* 및 *R1*의 단편들을 포함하는 DNA 분절의 복사체 2개는 덩이줄기에서 주로 활성이며 Pro로서 표시된 2개의 수렴 프로모터(convergent promoter) 사이에 역반복체(inverted repeat)로서 삽입되었다. 생성되는 침묵 카세트를 함유하는 식물은 의도한 표적 유전자를 동적이며 역동적으로 침묵시키는 다양하고 비폴리아데닐화된(unpolyadenylated) RNA 분자 어레이를 덩이줄기에서 생성한다. RNA 분자의 크기는 일반적으로, 수렴 전사가 충돌 전사(collisional transcription)를 유도하기 때문에 적용되는 2개의 프로모터 간의 거리보다 더 작았다.

도 3은 pSIM1678 형질전환 벡터를 나타낸다. 좌측의 벡터 백본 영역은 길이가 9,512 bp로서, 9,091 bp 위치에서 시작하여 18,602 bp 위치에서 종결된다. 백본 DNA는 주로 식물 형질전환 전에 DNA 삽입체의 유지를 지지 제공하는 박테리아 DNA로 구성된다. 플랭킹 경계 서열을 포함하는 DNA 삽입체 영역(우측)은 길이가 9,090 bp(1 bp부터 9,090 bp)이다. DNA 삽입체는 고유한 DNA로만 구성되며 형질전환 시 감자 게놈 내로 안정하게 통합되었다.

도 4는 pSIM1278 형질 전환 벡터(상부 구조체)에 삽입된 DNA 삽입체의 침묵 카세트 및 pSIM1678 형질 전환 벡터(하부 구조체)에 삽입된 DNA 삽입체의 침묵 카세트의 개략도를 제공한다.

도 5는 러셋 버뱅크 대조군(WT)과 함께 두 가지 이벤트(event)(W3 및 W8)에 대한 자계 경작 식물의 덩이줄기에서 분리된 총 RNA (20 μ g)의 노던 블롯 분석 결과를 나타낸다. 블롯은 *Asn1*, *Ppo5*, *Phl*, *R1* 및 *VInv* 전사체(상부 패널)에 특이적인 프로브와 혼성화하였다. 내부 대조군 18s rRNA(중간 패널) 및 브롬화 에티듐 염색 총 RNA (하부 패널)에 특이적인 프로브를 내부 및 로딩 대조군으로 사용하였다. 각 블롯은 각 샘플에 대한 2개의 독립적인 생물학적 복제물을 포함한다. W3 = 제출되지 않은 추가 이벤트.

도 6은 러셋 버뱅크 대조군(WT)과 함께 두 가지 이벤트(W3 및 W8)에 대한 자계 경작 식물의 잎에서 분리된 총 RNA (20 μ g)의 노던 블롯 분석 결과를 나타낸다. 블롯은 *Asn1*, *Ppo5*, *Phl*, *R1* 및 *VInv* 전사체(상부 패널)에 특이적인 프로브와 혼성화하였다. 내부 대조군 18s rRNA(중간 패널) 및 브롬화 에티듐 염색 총 RNA (하부 패널)에 특이적인 프로브를 내부 및 로딩 대조군으로 사용하였다. 각 블롯은 각 샘플에 대한 2개의 독립적인 생물학적 복제물을 포함한다. W3 = 제출되지 않은 추가 이벤트.

도 7은 러셋 버뱅크 대조군(WT)과 함께 두 가지 이벤트(W3 및 W8)에 대한 자계 경작 식물의 줄기에서 분리된 총

RNA (20 μ g)의 노던 블롯 분석 결과를 나타낸다. 블롯은 *Asn1*, *Ppo5*, *PhL*, *R1* 및 *VInv* 전사체(상부 패널)에 특이적인 프로브와 혼성화하였다. 내부 대조군 18s rRNA(중간 패널) 및 브롬화 에티뮴 염색 총 RNA (하부 패널)에 특이적인 프로브를 내부 및 로딩 대조군으로 사용하였다. 각 블롯은 각 샘플에 대한 2개의 독립적인 생물학적 복제물을 포함한다. W3 = 제출되지 않은 추가 이벤트.

도 8은 러셋 버뱅크 대조군(WT)과 함께 두 가지 이벤트(W3 및 W8)에 대한 자계 경작 식물의 뿌리에서 분리된 총 RNA (20 μ g)의 노던 블롯 분석 결과를 나타낸다. 블롯은 *Asn1*, *Ppo5*, *PhL*, *R1* 및 *VInv* 전사체(상부 패널)에 특이적인 프로브와 혼성화하였다. 내부 대조군 18s rRNA(중간 패널) 및 브롬화 에티뮴 염색 총 RNA (하부 패널)에 특이적인 프로브를 내부 및 로딩 대조군으로 사용하였다. 각 블롯은 각 샘플에 대한 2개의 독립적인 생물학적 복제물을 포함한다. W3 = 제출되지 않은 추가 이벤트.

도 9는 러셋 버뱅크 대조군(WT)과 함께 두 가지 이벤트(W3 및 W8)에 대한 자계 경작 식물의 꽃에서 분리된 총 RNA (20 μ g)의 노던 블롯 분석 결과를 나타낸다. 블롯은 *Asn1*, *Ppo5*, *PhL*, *R1* 및 *VInv* 전사체(상부 패널)에 특이적인 프로브와 혼성화하였다. 내부 대조군 18s rRNA(중간 패널) 및 브롬화 에티뮴 염색 총 RNA (하부 패널)에 특이적인 프로브를 내부 및 로딩 대조군으로 사용하였다. 각 블롯은 각 샘플에 대한 2개의 독립적인 생물학적 복제물을 포함한다. W3 = 제출되지 않은 추가 이벤트.

도 10은 폴리페놀 옥시다제 활성에 대한 3개의 상이한 카테콜 분석의 결과를 나타낸다. 각 분석에 대해, 러셋 버뱅크 대조군이 상단에 있고 품종 W8이 하단에 있다. 진갈색은 흑점 상처 감소의 형질이 존재하지 않음을 가리킨다. 도 10에 도시된 바와 같이, W8은 흑점 상처 감소의 형질을 가지는 반면, 대조군은 그렇지 않다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 하기의 상세한 설명 및 표에서, 다수의 용어가 사용된다. 이러한 용어에 의해 제공될 범위를 포함하여, 명세서 및 청구항에 대한 명쾌하면서 일관된 이해를 제공하기 위해, 하기의 정의가 제공된다:
- [0023] 대립 유전자. 대립 유전자는 하나의 형질 또는 특징에 관한, 하나 이상의 다른 형태의 유전자 중 임의의 유전자이다. 이배체 세포 또는 유기체에서, 주어진 유전자의 2개의 대립 유전자들은 한 쌍의 상동 염색체상에서 상응하는 유전자 좌를 차지한다.
- [0024] 아미노산 서열. 본 발명에서 사용된 것과 같이, 식물로부터 단리되거나, 식물에 고유하거나, 식물에 자연적으로 존재하거나, 또는 합성에 의해 제조되거나 내인성 대응물의 핵산 서열을 포함하는 올리고펩타이드, 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질 및 이들의 단편을 포함한다.
- [0025] 인공적으로 조작됨. 본 발명에서 사용된 것과 같이, "인공적으로 조작됨"은 조작되지 않는 자연적으로 발생하는 대응물과 비교해 상이한 생물학적, 생화학적, 형태학적 또는 생리학적 표현형 및/또는 유전자형을 가지는 식물 또는 식물 세포를 생산하기 위해, 식물 또는 식물 세포를, 수동적으로 또는 기계적 수단이나 재조합 수단, 예컨대 유전자 조작 기술에 의해 이동시키거나, 배열하거나, 작동시키거나 또는 조절하는 것을 의미한다.
- [0026] 무성 번식. 배우자(gamete)의 융합을 수반하지 않는 일 절단부, 줄기 절단부, 뿌리 절단부, 덩이줄기 눈, 포복지(stolon), 단일 식물 세포 원형질체, 캘러스 등으로부터 전체 식물을 발생시킴으로써 자손을 생산하는 것이다.
- [0027] 백분. 전달용으로 의도되는 DNA 삽입체 서열을 배제한 바이너리(binary) 벡터의 핵산 서열이다.
- [0028] 역교배. 역교배는 재배자가 잡종 자손을 부모 중 하나로 다시 반복하여 교배시키는 과정으로서, 예를 들어, 제1세대 잡종 F₁을 F₁ 잡종의 부모 유전자형 중 하나와 교배시키는 것이다.
- [0029] 박테리아성 둘레 썩음병(Bacterial Ring Rot). 박테리아성 둘레 썩음병은 *클라비박터 미시가넨세* 아종 (*Clavibacter michiganense* ssp) 박테리아에 의해 유발되는 질병이다. 박테리아성 둘레 썩음병이란 명칭은 덩이줄기 내에서 관다발 둘레(vascular ring)의 특징적인 절단으로부터 유래된다. 이 둘레는 종종 크림 빛의 황색 내지 담갈색의 치즈 같은 부패로서 나타난다. 감자의 외부 표면상에서, 심각하게 병에 걸린 덩이줄기는 약간 패여 있으며, 건조하고 균열이 생긴 영역을 나타낼 수 있다. 감염된 덩이줄기의 관다발 조직에서 박테리아성 둘레 썩음병의 증상은 전술한 것보다 덜 명확할 수 있으며, 단지 부서지고, 산발적으로 나타나는 길은 선으로 보이거나 연속적인 황색의 변색으로 보이기도 한다.
- [0030] 흑점 상처. 상처가 난 덩이줄기 조직에서 확인되는 흑점은 세포 손상 후 생성되며 조직에 갈색, 회색 또는 흑색의 외양을 제공하는 멜라닌이라는 색소의 결과이다. 멜라닌은 세포 손상의 결과, 페놀 기질과 적절한 효소가 서

로 접촉하게 될 때 형성된다. 손상은 파괴된 세포를 필요로 하지 않는다. 그러나, 통상적으로 조직이 충격을 받을 때, 기질과 효소의 혼합이 발생해야 한다. 흑점은 주로 관다발 둘레 바로 아래에 위치하는 주골수(perimedullary) 조직에서 발생하지만, 피층(cortical) 조직의 일부를 포함하기에 충분할 정도로 클 수 있다.

[0031] 경계-유사 서열(border-like sequence). "경계-유사" 서열은 변형되어야 하는 선별된 식물종으로부터 단리되거나, 변형되어야 하는 식물종과 타가수정 가능한 식물로부터 단리되며, *아그로박테리움*의 경계 서열과 유사하게 작용한다. 즉, 본 발명의 경계-유사 서열은 이것이 연결되는 폴리뉴클레오타이드의 통합을 촉진하고 용이하게 한다. 본 발명의 DNA 삽입체는 바람직하는 경계-유사 서열을 함유한다. 경계-유사 서열은 길이가 5 bp 내지 100 bp, 길이가 10 bp 내지 80 bp, 길이가 15 bp 내지 75 bp, 길이가 15 bp 내지 60 bp, 길이가 15 bp 내지 50 bp, 길이가 15 bp 내지 40 bp, 길이가 15 bp 내지 30 bp, 길이가 16 bp 내지 30 bp, 길이가 20 bp 내지 30 bp, 길이가 21 bp 내지 30 bp, 길이가 22 bp 내지 30 bp, 길이가 23 bp 내지 30 bp, 길이가 24 bp 내지 30 bp, 길이가 25 bp 내지 30 bp, 또는 길이가 26 bp 내지 30 bp이다. DNA 삽입체 좌측 및 우측 경계 서열은 변형되어야 하는 식물의 게놈으로부터 단리되고/되거나 게놈에 고유하다. DNA 삽입체 경계-유사 서열은 뉴클레오타이드 서열 면에서, 임의의 공지된 *아그로박테리움*-유래 T-DNA 경계 서열과 동일하지 않다. 따라서, DNA 삽입체 경계-유사 서열은 *아그로박테리움* 종, 예컨대 *아그로박테리움 투메파시엔스*(*Agrobacterium tumefaciens*) 또는 *아그로박테리움 리조게네스*(*Agrobacterium rhizogenes*) 유래의 T-DNA 경계 서열과 상이한 뉴클레오타이드를 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개 또는 그 이상 가질 수 있다. 즉, 본 발명의 DNA 삽입체 경계 서열 또는 경계-유사 서열은 *아그로박테리움* 종, 예컨대 *아그로박테리움 투메파시엔스* 또는 *아그로박테리움 리조게네스* 유래의 T-DNA 경계 서열과 95% 이상, 90% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 60% 이상 또는 50% 이상의 서열 동일성을 가지나, 100%의 서열 동일성을 가지진 않는다. 본 발명에서 사용된 것과 같이, 설명적인 용어 "DNA 삽입체 경계" 및 "DNA 삽입체 경계-유사"는 교환할 수 있다. 경계-유사 서열은 식물 게놈으로부터 단리되며, 뉴클레오타이드 서열을 또 다른 뉴클레오타이드 서열 내로 통합시킬 수 있는 효율을 변화시키기 위해 변형 또는 돌연변이될 수 있다. 다른 폴리뉴클레오타이드 서열이 본 발명의 경계-유사 서열에 첨가되거나 경계-유사 서열 내에 혼입될 수 있다. 따라서, DNA 삽입체 좌측 경계 또는 DNA 삽입체 우측 경계는 5'- 및 3'- 다중 클로닝 부위, 또는 부가적인 제한 부위를 가지도록 변형될 수 있다. DNA 삽입체 경계 서열은 동반(accompanying) 벡터 유래의 벡터 DNA가 식물 게놈 내로 통합되지 않는 가능성을 높이기 위해 변형될 수 있다.

[0032] 로 본질적으로 구성됨. 특정 요소들"로 본질적으로 구성되는" 조성물은 이들 요소의 포함뿐만 아니라 본 발명의 조성물의 기본적인 신규한 특징에 실질적으로 영향을 미치지 않는 요소들의 포함으로 제한된다. 따라서, 조성물이 본 발명의 기본적인 신규한 특징에 영향을 미치지 않는 한, 즉, 선별된 식물종 또는 선별된 식물종과 타가수정 가능한 식물로부터 유래되지 않는 외래 DNA를 포함하지 않는 한, 해당 조성물은 "로 본질적으로 구성되는"이란 용어로 특징지어지는 본 발명의 조성물의 성분인 것으로 간주될 수 있다.

[0033] 떡잎. 떡잎은 자엽(seed leaf)의 한 유형이다. 떡잎은 씨앗의 양분 저장 조직을 함유한다.

[0034] 퇴화 프라이머(degenerate primer). "퇴화 프라이머"는 정확하진 않지만 유사한 상동성을 가진 서열에 혼성화되는 경우, 염기 미스매치를 수용할 수 있기에 충분한 뉴클레오타이드 변이를 함유하는 올리고뉴클레오타이드이다.

[0035] 쌍떡잎(dicotyledon)(쌍자엽(dicot)). 배가 2개의 자엽 또는 떡잎을 가지는 꽃식물이다. 쌍자엽의 예는 담배, 토마토, 감자, 고구마, 카사바, 알팔파(alfalfa) 및 대두를 비롯한 콩과식물(legume), 당근, 딸기, 상추, 오크(oak), 단풍나무, 호두나무, 장미, 민트, 호박(squash), 테이지 및 선인장을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0036] DNA 삽입체. 본 발명에 따르면, 식물의 게놈에 삽입되어야 하는 DNA 삽입체는 해당 식물에 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 해당 식물에 고유한 유전적 요소를 가진다. 일례에서, 예를 들어, 본 발명의 감자품종 W8의 pSIM1278로부터의 DNA 삽입체는 형질전환 시 식물 세포의 게놈에 안정적으로 통합되며, 흑점 상처의 발현, 아스파라긴 축적 및 노화 감미에 관여하는 유전자를 침묵시키는 감자에 고유하거나 타가수정 가능한 감자 식물인 야생 감자에 고유한 10,148 bp의 비-암호화 폴리뉴클레오타이드이다. DNA 삽입체는 바람직하게는 2개의 발현 카세트를 포함하며, pSIM1278 형질전환 벡터로 지칭되는 형질전환 벡터 내로 삽입된다. 제 1 카세트는 ADP 글루코스 피로포스포릴라제 유전자(*Agp*)의 *Agp* 프로모터와 과립-결합 신타아제 유전자(*Gbss*)의 *Gbss* 프로모터 사이에서 역반복체로서 배열되는 아스파라긴 신타아제-1 유전자(*Asn1*) 및 폴리페놀옥시다제-5 유전자(*Ppo5*)의 단편을 둘 다 포함한다. 이들 프로모터는 덩이줄기에서 주로 활성이다. 제 2 카세트의 기능은 전분-연관 유전자 다이키나아제-R1(*RI*) 및 포스포릴라제-L 유전자(*PhL*)의 프로모터를 침묵시키는 것이다. 이 카세트는 제 1 카

세트와 동일한 Agp 프로모터 및 Gbss 프로모터에 작동가능하게 연결된, 전분-연관 유전자 다이키나아제-R1(*RI*) 및 포스포릴라제-L 유전자(*PhL*)의 프로모터들의 단편으로 구성된다. 두 번째 DNA 삽입체는 *Rpi-vnt1* 발현 카세트와 식물 액포성 전화효소 유전자, *VInv*를 위한 침묵 카세트를 포함하는 pSIM1678로 불리는 형질전환 벡터로부터 유래한다. *Rpi-vnt1* 유전자 카세트는 역병에 대해 광범위한 저항성을 제공하는 고유 프로모터 및 종결자 서열에 의해 조절된 VNT1 단백질 암호화 영역으로 이루어진 반면 침묵 카세트는 대립 식물 프로모터, pGbss 및 pAgp가 측면에 위치한 감자 *VInv* 유전자로부터의 서열의 역전 반복체로 이루어진다. 이들 발현 카세트는 외래 DNA를 함유하지 않으며, 선별된 식물종 유래의 DNA 또는 선별된 식물종과 타가수정 가능한 식물 유래의 DNA로만 구성된다.

[0037] 배. 배는 성숙 씨앗 내에 함유된 미성숙 식물이다.

[0038] 외래. 핵산과 관련하여 "외래"는 해당 핵산이 비-식물 유기체로부터 유래되거나, 형질전환되어야 하는 식물과 동일한 종인 아닌 식물로부터 유래되거나, 형질전환되어야 하는 식물과 교배할 수 없는 식물로부터 유래되지 않으며, 표적 식물의 종에 속하지 않음을 의미한다. 본 발명에 따르면, 외래 DNA 또는 RNA는 균류, 박테리아, 바이러스, 포유류, 어류 또는 조류의 유전적 구성(genetic makeup)에 자연적으로 존재하나, 형질전환되어야 하는 식물에는 자연적으로 존재하지 않는 핵산을 나타낸다. 따라서, 외래 핵산은 예를 들어, 형질전환된 식물에 의해 자연적으로 생성되지 않는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산이다. 외래 핵산은 단백질 생성물을 암호화해야 할 필요는 없다. 본 발명에 따르면, 원하는 유전자내 식물은 이의 게놈 내에 통합되는 임의의 외래 핵산을 함유하지 않는 식물이다.

[0039] 유전자. 본 발명에서 사용된 것과 같이, "유전자"는 암호화 영역을 지칭하며, 해당 영역에 대해 5'- 또는 3'-인 뉴클레오타이드 서열은 포함하지 않는다. 기능성 유전자는 프로모터 또는 종결자에 작동가능하게 연결되는 암호화 영역이다. 유전자는 상이한 종 유래이든지 또는 동일한 종 유래이든지 간에, 형질전환 또는 다양한 육종 방법을 이용하여, 종의 게놈 내로 도입될 수 있다.

[0040] 변환된 유전자(변환). 유전자 변환된(변환) 식물은 역교배로 일컬어지는 식물 육종 기술에 의해 개발되는 식물을 지칭하며, 여기서, 역교배 기술, 유전자 조작 또는 돌연변이를 통해 품종 내로 전달되는 하나 이상의 유전자 외에도, 품종의 원하는 형태학적 특징 및 생리학적 특징들은 실질적으로 모두 복귀된다. 하나 이상의 유전자 좌 또한 전달될 수 있다.

[0041] 유전자 재배열. 생체 내에서뿐만 아니라 시험관 내에서 자발적으로 발생할 수 있는 유전적 요소의 재연관(re-association)을 지칭하며, 이는 유전적 물질의 새로운 조직화(organization)를 도입한다. 예를 들어, 상이한 염색체의 유전자 좌에서 폴리뉴클레오타이드를 함께 스플라이싱하는 것은 식물 발달 및 생식적 재조합(sexual recombination) 동안에 생체 내에서 자발적으로 일어날 수 있다. 따라서, 시험관 내에서 비-자연적인 유전적 변형 기술에 의한 유전적 요소의 재조합은 마찬가지로 생체 내에서 생식적 재조합을 통해 일어날 수 있는 재조합 이벤트와 흡사하다.

[0042] 시스토 선충(golden nematode). 흔히 시스토 선충으로 공지되어 있는 *글로보테라 로스토키엔시스*(*Globodera rostochiensis*)는 감자식물의 뿌리 및 덩이줄기에 영향을 미치는 식물 기생 선충이다. 증상은 불량한 식물 성장, 시들음(wilting), 수분 스트레스(water stress) 및 양분 결핍을 포함한다.

[0043] 배축. 배축은 떡잎과 뿌리 사이의 배 또는 묘목의 부분이다. 따라서, 배축은 순(shoot)과 뿌리 사이의 전이 구역으로서 간주될 수 있다.

[0044] 틀 내에서(in frame). 뉴클레오타이드 트리플릿(triplet)(코돈)은 식물 세포에서 원하는 재조합 단백질의 초기(nascent) 아미노산 서열로 번역된다. 구체적으로, 본 발명은 해독틀 내에서 제 2 핵산에 연결된 제 1 핵산을 고려하며, 여기서, 제 1 뉴클레오타이드 서열은 유전자이며, 제 2 뉴클레오타이드는 프로모터 또는 유사한 조절 요소이다.

[0045] 통합하다. 선별된 식물종 유래의 핵산 서열, 선별된 식물과 동일한 종 유래의 식물 유래의 핵산 서열, 또는 선별된 식물종과 타가수정 가능한 식물 유래의 핵산 서열의 선별된 식물종의 세포 게놈 내로의 삽입을 지칭한다. "통합"은 고유한 유전적 요소만의 식물 세포 게놈 내로의 혼입을 지칭한다. 고유한 유전적 요소를 예컨대 상동성 재조합에 의해 통합하기 위해, 본 발명은 이러한 과정에서 하나의 단계로서 고유한 것이 아닌 DNA를 "사용"할 수 있다. 따라서, 본 발명은 특정한 DNA 분자의 "사용"과 특정한 DNA 분자의 식물 세포 게놈 내로의 "통합"을 구별한다.

[0046] 도입. 본 발명에서 사용된 것과 같이, 감염, 형질감염, 형질전환 또는 형질도입을 비롯한 방법에 의해, 핵산 서

열을 세포 내로 삽입하는 것을 지칭한다.

- [0047] 단리된. "단리된"은 임의의 핵산 또는 화합물이 이의 정상적이며 고유한 환경으로부터 물리적으로 분리되는 것을 지칭한다. 단리된 물질은 예를 들어, 용매, 완충제, 이온 또는 그 외의 성분을 함유하는 적합한 용액에서 유지될 수 있으며, 정제된 형태 또는 비정제된 형태로 존재할 수 있다.
- [0048] 역병. 난균성 감자역병균(*oomycete Phytophthora infestans*)에 의해 유발되고 감자 식물의 잎, 줄기, 과일 및 덩이줄기를 감염시키고 파괴할 수 있는 '감자 마름병'으로도 알려진 감자병.
- [0049] 리더. 유전자의 앞쪽에 있으며(또는 5') 전사는 되지만 번역은 되지 않는 서열.
- [0050] 유전자 좌. 유전자 좌는 하나 이상의 형질, 예를 들어, 음성 불임, 체초제 저항성, 곤충 저항성, 질병 저항성(disease resistance), 찰녹말(waxy starch), 변형 지방산 대사, 변형 피틴산 대사, 변형 탄수화물 대사 및 변형 단백질 대사를 부여한다. 형질은 예를 들어, 역교배, 자연 돌연변이 또는 유도 돌연변이, 또는 유전적 형질 전환 기술을 통해 도입되는 이식유전자에 의해 품종의 게놈 내로 도입되는 자연적으로 존재하는 유전자에 의해 부여될 수 있다. 유전자 좌는 단일 염색체 위치에서 통합되는 하나 이상의 대립 유전자를 포함할 수 있다.
- [0051] 상품 수율(marketable yield). 상품 수율은 직경이 2인치 내지 4인치인 수확되는 모든 덩이줄기의 중량이다. 상품 수율은 cwt(100웨이트(hundred weight))로 측정되며, 여기서, cwt는 100파운드이다.
- [0052] 외떡잎(monocotyledon)(단자엽(monocot)). 배가 떡잎 또는 자엽을 하나 가지는 꽃식물이다. 단자엽의 예는 잔디 풀, 옥수수, 쌀, 귀리, 밀, 보리, 수수, 난초, 붓꽃, 백합, 양파 및 야자나무(palm)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0053] 고유한. "고유한" 유전적 요소는 형질전환되어야 하는 식물의 게놈에 자연적으로 존재하거나, 게놈으로부터 기원하거나, 게놈에 속하는 핵산을 지칭한다. 따라서, 형질전환되어야 하는 식물 또는 식물종의 게놈으로부터 단리되거나, 형질전환되어야 하는 식물종과 타가수정 가능하거나 교배가능한(interfertile) 식물 또는 종으로부터 단리되는 임의의 핵산, 유전자, 폴리뉴클레오타이드, DNA, RNA, mRNA 또는 cDNA 분자는 식물종에 "고유한", 즉, 토종(indigenous)이다. 즉, 고유한 유전적 요소는 전형적인 식물 육종을 통한 식물의 개량을 위해 식물 재배자가 접근할 수 있는 모든 유전적 물질을 나타낸다. 고유한 핵산의 임의의 변이체 또한, 본 발명에 따르면 "고유한" 것으로 간주된다. 이러한 면에서, "고유한" 핵산은 또한, 식물 또는 이의 타가수정 가능한 종으로부터 단리되고, 변형 또는 돌연변이화되어, 생성되는 변이체는 식물로부터 단리되는 비변형된 고유한 핵산과 뉴클레오타이드 서열이 99% 이상, 98% 이상, 97% 이상, 96% 이상, 95% 이상, 94% 이상, 93% 이상, 92% 이상, 91% 이상, 90% 이상, 89% 이상, 88% 이상, 87% 이상, 86% 이상, 85% 이상, 84% 이상, 83% 이상, 82% 이상, 81% 이상, 80% 이상, 79% 이상, 78% 이상, 77% 이상, 76% 이상, 75% 이상, 74% 이상, 73% 이상, 72% 이상, 71% 이상, 70% 이상, 69% 이상, 68% 이상, 67% 이상, 66% 이상, 65% 이상, 64% 이상, 63% 이상, 62% 이상, 61% 이상 또는 60% 이상 유사할 수 있다. 고유한 핵산 변이체는 또한 뉴클레오타이드 서열이 약 60% 미만, 약 55% 미만 또는 약 50% 미만 유사할 수 있다. 식물로부터 단리된 "고유한" 핵산은 또한 해당 핵산으로부터 전사 및 번역되는 자연적으로 존재하는 단백질 생성물의 변이체를 암호화할 수 있다. 따라서, 고유한 핵산은 핵산이 단리되었던 식물에서 발현되는 비변형된 고유한 단백질과 아미노산 서열이 99% 이상, 98% 이상, 97% 이상, 96% 이상, 95% 이상, 94% 이상, 93% 이상, 92% 이상, 91% 이상, 90% 이상, 89% 이상, 88% 이상, 87% 이상, 86% 이상, 85% 이상, 84% 이상, 83% 이상, 82% 이상, 81% 이상, 80% 이상, 79% 이상, 78% 이상, 77% 이상, 76% 이상, 75% 이상, 74% 이상, 73% 이상, 72% 이상, 71% 이상, 70% 이상, 69% 이상, 68% 이상, 67% 이상, 66% 이상, 65% 이상, 64% 이상, 63% 이상, 62% 이상, 61% 이상 또는 60% 이상 유사한 단백질을 암호화할 수 있다.
- [0054] 고유한 유전적 요소. "고유한 유전적 요소"는 본 발명에 따른 선별된 식물종 게놈 내로 혼입 및 통합될 수 있다. 고유한 유전적 요소는 선별된 식물종에 속하는 식물, 또는 선별된 식물종과 타가수정 가능한 식물로부터 단리된다. 예를 들어, 재배되는 감자(솔라눔 투베로sum) 내로 혼입되는 고유한 DNA는 *S. 투베로sum*의 임의의 유전자형, 또는 *S. 투베로sum*과 타가수정 가능한 야생 감자종(예., *데미쑈(S. demissum)*)의 임의의 유전자형으로부터 유래될 수 있다.
- [0055] 자연적으로 존재하는 핵산. 자연적으로 존재하는 핵산은 선별된 식물종의 게놈 내에서 확인되며, DNA 분자 또는 RNA 분자일 수 있다. 식물종의 게놈에 통상적으로 존재하는 제한 부위의 서열은 해당 제한 부위가 해당 게놈으로부터 물리적으로 단리되지 않았더라도, 벡터 또는 올리고뉴클레오타이드와 같은 외인성 DNA 분자 내로 조작될 수 있다. 따라서, 본 발명은 해당 서열이 선별된 식물종, 또는 형질전환되어야 하는 선별된 식물종과 타가수정 가능한 식물의 게놈에 자연적으로 존재하는 한, 제한 효소 인지 서열과 같은 뉴클레오타이드 서열을 합성 제조

할 수 있게 한다.

- [0056] 작동가능하게 연결된. 조합된 상태에서 2개 이상의 분자들이 식물 세포에서 적절하게 작용하는 방식으로, 이들 분자를 조합하는 것이다. 예를 들어, 프로모터는 프로모터가 구조 유전자의 전사를 조절하는 경우, 구조 유전자에 작동가능하게 연결된다.
- [0057] 식물. 본 발명에서 사용된 것과 같이, 용어 "식물"은 속씨식물 및 겉씨식물, 예컨대 감자, 토마토, 담배, 알팔파, 상추, 당근, 딸기, 사탕무, 카사바, 고구마, 대두, 옥수수, 잔디풀, 밀, 쌀, 보리, 수수, 귀리, 오크, 유칼립투스, 호두나무 및 야자나무를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 따라서, 식물은 단자엽 또는 쌍자엽일 수 있다. 본 발명에서 사용된 것과 같이, 단어 "식물"은 또한 유성 생식 또는 무성 생식으로 발생되든지 간에 식물 세포, 씨앗, 식물 자손, 주아(propagule), 및 절단부 또는 씨앗과 같은 이들 중 임의의 자손을 포함한다. 식물 세포는 현탁 배양물, 캘러스, 배, 분열조직 영역, 캘러스 조직, 잎, 뿌리, 순, 배우체(gametophyte), 포자체(sporophyte), 화분, 씨앗 및 소포자(microspore)를 포함한다. 식물은 다양한 성숙 단계들에 있을 수 있으며, 액체 배양물이나 고체 배양물, 또는 포트(pot), 온실 또는 필드 내의 토양 또는 적합한 매질에서 성장할 수 있다. 식물에서 도입된 리더, 트레일러(trailer) 또는 유전자 서열의 발현은 일시적이거나 영구적일 수 있다. "선별된 식물종"은 이들 "식물" 중 임의의 하나의 종일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 식물 부분. 본 발명에서 사용된 것과 같이, 용어 "식물 부분"(또는 감자식물 또는 이의 일부)은 원형질체, 잎, 줄기, 뿌리, 근단, 꽃밥, 암술, 씨앗, 배, 화분, 밑씨(ovule), 떡잎, 배축, 꽃, 덩이줄기, 눈, 조직, 잎꼭지, 세포, 분열조직 세포 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 식물종. 생식적인 친화성을 적어도 일부 나타내는 공식적으로 명명되는 식물종에 속하는 식물군이다.
- [0060] 식물 형질전환 및 세포 배양. 광범위하게는, 식물 세포가 유전적으로 변형되고, 유지, 추가적인 성장 및/또는 추가적인 발달에 적절한 식물배양 배지로 전달되는 과정을 지칭한다.
- [0061] 정확한 육종(precise breeding). 선별된 식물종, 선별된 식물과 동일한 종의 또 다른 식물, 또는 선별된 식물종과 타가수정 가능한 종으로부터 단리된 핵산, 예컨대 고유한 유전자 및 조절 요소를 개별 식물 세포 내로 안정하게 도입한 다음, 이들 유전적으로 변형된 식물 세포를 식물 전초(whole plant) 내로 재생시킴으로써 식물을 개량하는 것을 지칭한다. 알려지지 않은 핵산 또는 외래 핵산이 식물 게놈 내로 영구적으로 혼입되기 때문에, 본 기술은 종래의 식물 육종을 통해서도 접근가능한 동일한 유전적 물질을 이용한다.
- [0062] 자손. 본 발명에서 사용된 것과 같이, 2개의 감자식물의 교배로부터 생산되는 F₁ 감자식물을 포함하며, 여기서, 적어도 하나의 식물은 감자 종자 W8를 포함하며, 자손으로는 추가로, 재현성 부모 라인(recurrent parental line)과의 F₂, F₃, F₄, F₅, F₆, F₇, F₈, F₉, 및 W8 세대간 교배(generational cross)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 양적 형질 유전자 좌(Quantitative Trait Loci; QTL). 양적 형질 유전자 좌(QTL)는 통상 계속해서 분포되는 수적으로 대표적인 형질을 어느 정도 조절하는 유전자 좌를 지칭한다.
- [0064] 제조함. 본 발명에서 사용된 것과 같이, 유전자가 클로닝될 수 있으며, DNA가 서열화될 수 있고, 단백질 생성물이 생성될 수 있는 다양한 기술들을 광범위하게 지칭한다. 본 발명에서 사용된 것과 같이, 이 용어는 또한 유전자가 식물 숙주 시스템의 세포 내로 전달된 후 생성된 단백질을 지칭한다.
- [0065] 재생. 재생은 조직 배양으로부터의 식물의 발달을 지칭한다.
- [0066] 조절 서열. 식물 시스템에서 관심 유전자의 전사 또는 생성되는 RNA의 번역을 증가시키고/거나 최대화하기 위해 발현 벡터에 포함될 수 있는 당해 기술분야에서 표준이며 공지되어 있는 서열을 지칭한다. 이들은 프로모터, 펩타이드 이출(export) 신호 서열, 인트론, 폴리아데닐화 및 전사 종결 부위를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 식물에서 발현 수준을 증가시키기 위해 핵산 구축물을 변형시키는 방법 또한 일반적으로 당해 기술분야에서 공지되어 있다(예를 들어, Rogers et al., 260 *J. Biol. Chem.* 3731-38, 1985; Cornejo et al., 23 *Plant Mol. Biol.* 567: 81, 1993 참조). 단백질의 전사율에 영향을 미치기 위해 식물 시스템을 조작하는 경우, 양성 작동 서열 또는 음성 작동 서열, 인핸서 및 사일런서와 같은 조절 서열뿐만 아니라 염색질 구조를 비롯하여 당해 기술분야에 공지된 다양한 인자들이 영향을 미칠 수 있다. 본 발명은 이들 인자 중 적어도 하나가 관심 단백질을 발현시키기 위해 식물을 조작하는 데 이용될 수 있다는 것을 제공한다. 본 발명의 조절 서열은 고유한 유전적 요소로서, 즉, 변형되어야 하는 선별된 식물종으로부터 단리된다.

- [0067] 선별성 마커. "선별성 마커"는 전형적으로, 항생제, 제초제 또는 독성 화합물에 대한 일부 종류의 저항성을 부여하는 단백질을 코딩하는 유전자이며, 형질전환 이벤트를 확인하는 데 사용된다. 선별성 마커의 예는 스트렙토마이신 저항성을 암호화하는 스트렙토마이신 포스포트랜스퍼라제(*spt*) 유전자, 만노스-6-포스페이트를 프룩토스-6 포스페이트로 변환시키는 포스포만노스 이소머라제(*pmi*) 유전자, 카나마이신 및 게네티신 내성을 암호화하는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(*npt II*) 유전자, 하이그로마이신에 대한 저항성을 암호화하는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 (*hpt* 또는 *aphiv*) 유전자, 설폰닐우레아-유형 제초제에 대한 저항성을 암호화하는 아세트락테이트 신타아제(*als*) 유전자, 포스포노트리신 또는 바스타(basta)와 같이 글루타민 신타아제의 작용을 저해하는 제초제에 대한 저항성을 암호화하는 유전자(예, 바르(bar) 유전자), 또는 당해 기술분야에 공지되어 있는 다른 유사한 유전자를 포함한다.
- [0068] 센스 억제. 유전자이식 식물에서 해당 유전자의 모두 또는 일부의 하나 이상의 추가적인 복사체의 발현에 의해 내인성 유전자의 발현을 감소시키는 것이다.
- [0069] 비중. 본 발명에서 사용된 것과 같이, "비중"은 밀도의 표현으로서, 감자 품질의 측정값이다. 덩이줄기의 비중 및 전분 함량 및 건조 물질 또는 총 고체의 백분율 사이에는 높은 상관관계가 있다. 비중이 높을수록, 회수율이 높아지고, 가공 제품의 품질이 양호해진다.
- [0070] T-DNA-유사. "T-DNA-유사" 서열은 선별된 식물종, 또는 선별된 식물종과 타가수정 가능한 식물로부터 단리되며, *아그로박테리움* 종 T-DNA와 100%는 아니지만 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 동일성을 공유하는 핵산이다. T-DNA-유사 서열은 각각이 뉴클레오타이드 서열을 또 다른 폴리뉴클레오타이드 내로 통합시킬 수 있는 하나 이상의 경계 서열 또는 경계-유사 서열을 함유할 수 있다.
- [0071] 총 수율. 총 수율은 수확된 모든 덩이줄기들의 총 중량을 지칭한다.
- [0072] 트레일러. 유전자 뒤에 있으면서(또는 유전자에 3') 전사는 되지만 번역은 되지 않는 서열을 지칭한다.
- [0073] 전사된 DNA. 유전자, 및 해당 유전자와 연관있는 비번역 리더와 트레일러 서열 둘 다를 포함하며, 선행 프로모터의 작동에 의해 단일 mRNA로서 전사되는 DNA를 지칭한다.
- [0074] 식물 세포의 형질전환. DNA가 식물 세포의 계놈 내로 안정하게 통합되는 과정을 지칭한다. "안정하게"란, 세포 계놈에서 세포 계놈에 의한 폴리뉴클레오타이드의 영구적이거나 비-일시적인 체류 및/또는 발현을 지칭한다. 따라서, 안정하게 통합되는 폴리뉴클레오타이드는 형질전환된 세포 계놈 내에서 고정체(fixture)이며, 세포 또는 생성되는 형질전환 식물의 잇따른 자손을 통해 복제 및 번식될 수 있는 것이다. 형질전환은 당해 기술분야에 잘 공지되어 있는 다양한 방법들을 이용하여 자연적이거나 인공적인 조건하에 이루어질 수 있다. 형질전환은 *아그로박테리움*-매개 형질전환 프로토콜, 바이러스 감염, 위스커(whisker), 전기천공, 열 쇼크, 리포펙션(lipofection), 폴리에틸렌 글리콜 처리, 미세-주사(micro-injection) 및 입자 충격(particle bombardment)을 포함하는 핵산 서열을 원핵 숙주 세포 또는 진핵 숙주 세포 내로 삽입하는 임의의 공지된 방법에 의존할 수 있다.
- [0075] 이식유전자. 단백질 암호화 영역을 포함하는 숙주 계놈 내로 삽입될 유전자를 지칭한다. 본 발명의 맥락에서, 이식유전자를 포함하는 요소는 숙주 계놈으로부터 단리된다.
- [0076] 유전자이식 식물. 적어도 하나의 이식유전자를 함유하는 유전적으로 변형된 식물을 지칭한다.
- [0077] 변이체. 본 발명에서 사용된 것과 같이, "변이체"는 특정 유전자 또는 단백질의 표준 또는 주어진 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열로부터 벗어나는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 의미하는 것으로 이해된다. 용어, "이소폼", "이소타입" 및 "유사체" 또한, 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열의 "변이체" 형태를 지칭한다. 하나 이상의 아미노산의 첨가, 제거 또는 치환, 또는 뉴클레오타이드 서열의 변화에 의해 변경되는 아미노산 서열은 "변이체" 서열인 것으로 간주될 수 있다. 변이체는 "보존적" 변화를 가질 수 있으며, 여기서, 치환된 아미노산은 유사한 구조적 또는 화학적 특성을 가지며, 예를 들어, 루신이 아이소루신으로 대체되는 것이다. 변이체는 "비보존적" 변화를 가질 수 있으며, 예를 들어, 글리신이 트립토판으로 대체되는 것이다. 유사한 최소 변이는 또한, 아미노산 결실 또는 삽입, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 어떤 아미노산 잔기가 치환, 삽입 또는 결실될 수 있는지 결정하는 가이드선(guidance)은 벡터 NTI Suite(InforMax, MD) 소프트웨어와 같이 당해 기술분야에 잘 공지되어 있는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 찾을 수 있다.
- [0078] 덩굴식물 성숙도(vine maturity). 덩굴식물 성숙도는 식물이 탄수화물을 이용하여 광합성을 계속하는 능력을 지칭한다. 덩굴식물 성숙도는 1 내지 5의 척도로 점수가 매겨지며, 여기서, 1은 죽은 덩굴식물이고, 5는 여전히

꽃을 피우고 있는 녹색 덩굴식물이다.

[0079] 감자는 사배체이며, 매우 이형접합성(heterozygous)이고, 근교약세(inbreeding depression)에 민감하기 때문에, 바람직한 형질을 감자식물의 게놈 내로 삽입하는 것은 특유의 어려움을 제공한다. 따라서, 종래의 육종을 이용한 가공 동안에, 아크릴아마이드를 더 적게 생성하고, N-나이트로소-N-(3-케토-1,2-부테인다이올)-3'-나이트로티라민(Wang *et al.*, *Arch Toxicol* 70: 10-5, 1995), 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄(Janzowski *et al.*, *Food Chem Toxicol* 38: 801-9, 2000), 및 돌연변이유발 특성을 가진 다른 마이야르 반응 생성물(Shibamoto, *Prog Clin Biol Res* 304: 359-76, 1989)을 비롯하여 유해한 마이야르 반응 생성물을 더 적게 생성하는 유전자 이식 감자식물을 효율적으로 개발하는 것이 매우 어렵다.

[0080] 공정 변화, 텍스트로스 감소, 및 아스파라기나제, 시트레이트 및 경쟁적 아미노산과 같은 첨가제를 통해 아크릴아마이드를 감소시키는 몇몇 방법들이 시험된 바 있으며, 연구가 계속 진행 중이다. 감자 산업 전반에 걸쳐 공정 변화를 시행하는 데 드는 자본 비용은 수백만 달러에 이를 것이다. 비용 외에도, 이들 공정 변화는 아스파라기나제 또는 시트레이트와 같은 첨가제와 관련된 잠재적으로 부정적인 향을 포함하는 상당한 단점들을 가진다. 전형적으로, 후라이 제조업체는 원하는 금갈색을 발색시키기 위해 감자튀김 공정 동안 텍스트로스를 첨가하지만, 텍스트로스 또한 마이야르 반응을 통해 아크릴아마이드의 형성을 증가시킨다. 아크릴아마이드의 현저한 감소는 단지 텍스트로스를 공정에서 생략함으로써 일어난다; 그러나, 시그너처 금갈색은 일부 다른 방식으로(아나토(annatto)와 같은 색상의 첨가를 통해) 발색되어야 한다. 다른 색상을 사용하는 경우, 이들 갈변 반응을 통해 발생하는 전형적인 향이 존재하지 않게 된다. 아스파라긴과 같은 반응물을 감소시키기 위해 첨가제를 사용할 경우의 또 다른 문제점은 동결 저장 동안에 발생하는 수분 이동으로서, 아스파라긴이 표면으로 되돌아가고 아크릴아마이드가 증가된다. 마지막으로, 감자에 상처가 난 후 발생하는 흑화(blackening)는 감자 튀김 및 칩 가공 시 품질 및 회수율에 영향을 미친다. 손상되고 상처가 난 감자는 가공 전에 손질되거나 버려져야 해서, 품질 문제 또는 경제적 손실을 야기한다.

[0081] 본 발명의 "고유한 기술" 전략은 흑점 상처에 관여하는 폴리페놀옥시다제-5(PP0-5)의 발현, 아크릴아마이드 형성의 전구체인 아스파라긴 축적에 관여하는 아스파라긴 신타아제-1(Asn-1)의 발현, 수크로오스를 글루코오스와 프룩토오스로 전환시키는 효소 액포성 전효소의 발현, 및/또는 아크릴아마이드와 같은 독성 마이야르 생성물을 형성하고, 아스파라긴과 같은 아미노산과 정상적으로 반응하는 환원당의 축적과 연관된 효소인 포스포릴라제-L 및 키나아제-R1의 발현을 감소시킴으로써 감자의 작물 특성 및 영양가를 개선하기 위한 감자 산업의 요구를 해결한다. 덩이줄기에서 이들 유전자의 부분적인 침묵 또는 완전한 침묵은 아크릴아마이드를 생성하는 잠재성을 낮춘다. 본 발명의 고유한 기술을 사용하면, 감자를, 식물의 게놈 내로 임의의 외래 유전적 물질을 통합시키지 않으면서 오로지 비-코딩 조절 영역만 함유하는 감자식물로부터 수득되는 유전적 물질 또는 감자식물과 타가수정 가능한 식물로부터 수득되는 유전적 물질인 "고유한" 유전적 물질로만 형질전환시킴으로써, 바람직한 형질을 상업적으로 가치있는 감자식물 품종의 게놈 내로 혼입시킬 수 있다. 바람직한 형질은 충격-유도성 흑점 상처에 대한 높은 내성, 감자 역병 감염에 대한 저항성 증가, 아크릴아마이드 전구체인 아스파라긴의 형성 감소, 및 환원당의 축적 감소와 더불어, 결과적으로, 아크릴아마이드를 포함하는 독성 마이야르 생성물의 축적 저하, 개량된 품질 및 식품 색 조절을 포함한다. 감자는 사배체이며, 매우 이형접합성이고, 근교약세에 민감하기 때문에, 이들 바람직한 형질을 기존의 감자 품종 내로 혼입하는 것은 전통적인 육종을 통해서 달성하기란 불가능하다.

[0082] 본 발명에 사용되는 비-암호화 감자식물 DNA 삽입체 서열은 감자식물 게놈에 고유하며, 임의의 *아그로박테리움* DNA를 함유하지 않는다. DNA 삽입체들 중 하나는 바람직하게는 2개의 발현 카세트를 포함하며, pSIM1278 형질전환 벡터로 지칭되는 형질전환 벡터 내로 삽입된다. 제 1 카세트는 ADP 글루코스 파이로포스포릴라제 유전자(Agp)의 Agp 프로모터와 과립-결합 신타아제 유전자(Gbss)의 Gbss 프로모터 사이에서 역반복체로서 배열되는 아스파라긴 신타아제-1 유전자(Asn1) 및 폴리페놀옥시다제-5 유전자(Ppo5)의 단편을 둘 다 포함한다. 이들 프로모터는 덩이줄기에서 주로 활성이다. 제 2 카세트의 기능은 전분-연관 유전자 다이키나아제-R1(R1) 및 포스포릴라제-L 유전자(PhL)의 프로모터를 침묵시키는 것이다. 이 카세트는 제1 카세트와 동일한 Agp 프로모터 및 Gbss 프로모터에 작동가능하게 연결된, 전분-연관 유전자 다이키나아제-R1(R1) 및 포스포릴라제-L 유전자(PhL)의 프로모터들의 단편으로 구성된다. 이들 발현 카세트는 외래 DNA를 함유하지 않으며, 선별된 식물종 유래의 DNA 또는 선별된 식물종과 타가수정 가능한 식물 유래의 DNA로만 구성된다. 제 2 DNA 삽입체는 식물 공포성 전효소, VInv에 대한 Rpi-vnt1 발현 카세트 및 침묵 카세트를 포함하는 pSIM1678로 불리는 제 2 식물 벡터로부터 유래된다. Rpi-vnt1 유전자 카세트는 역병에 대해 광범위한 저항성을 제공하는 고유 프로모터 및 종결자 서열에 의해 조절된 VNT1 단백질 암호화 영역으로 이루어진 반면 침묵 카세트는 대립 식물 프로모터, pGbss 및 pAgp가 측면에 위치한 감자 VInv 유전자로부터의 서열의 역전 반복체로 이루어진다. 제 1 카세트의 기능은 감자 역병에 저

항성을 부여하는 반면 제 2 카세트의 기능은 액포성 전화효소 유전자, 환원 글루코오스 및 프룩토오스를 침묵시키는 것이다.

[0083] 본 발명에 사용되는 상업적으로 가치있는 감자식물 품종은 러셋 버뱅크이다. 루터 버뱅크(Luther Burbank)가 1870년대 초에 이 품종을 개발하였다. 식물은 활력적이며 사철 내내 덩굴 성장을 지속한다. 줄기는 두껍고, 주로 각이 져 있으며, 미세하게 얼룩이 져 있다. 잎은 폭이 중간 내지 길며, 색상은 옅은 녹색 내지 중간 녹색이다. 꽃은 몇 개 되지 않으며, 백색이고, 생식력이 없다. 종자는 더넝이병(common scab)에는 내성이 있지만, 위조병(*Fusarium*)과 청고병(*Verticillium wilts*), 잎말이병(leafroll)과 망형 괴사(net necrosis), 감자 바이러스 Y 및 감자 역병에 취약하다. 식물은 혹(knob), 뿔족단(pointed end) 및 덩벨(dumbbell)이 없는 덩이줄기를 생산하기 위해서 높고 균일한 토양 수분 및 조절된 질소 비옥도(nitrogen fertility)의 조건을 필요로 한다. 식물이 스트레스를 받을 경우, 덩이줄기에서 젤리-말단(jelly-end) 및 당-말단(sugar-end)이 발달한다. 생산된 덩이줄기는 큰 갈색 표면과 백색의 엽육을 가지며, 양호한 장기 저장 특징을 나타내고, 우수한 베이킹 및 가공 품질에 대한 표준을 나타낸다. 러셋 버뱅크 품종은 흑점 상처를 발병하는 높은 취약성을 가지며 또한 높은 자유 아스파라긴 함량과 높은 노화 감미 잠재성을 가진다(Am. J. Potato Res (1966) 43: 305-314]. 품종은 불임성이며, 특히 감자 튀김감자 튀김 북서부 및 중서부에서 광범위하게 재배된다.

[0084] 본 발명은 형질전환 벡터 pSIM1278로 형질전환된 후 제 2 형질전환 벡터 pSIM1678로 형질전환되며, 마커보다는 폴리머라제 연쇄 반응을 이용하여 확인되고, 성공적으로 번식되는 상당한 시장 가치를 가진 감자품종 - 즉, 러셋 버뱅크 - 을 제공한다. 본 발명은 또한, 본 발명의 감자식물 품종 W8의 덩이줄기로부터 제조되는 식품을 제공한다. 감자 종자 W8은 경제 협력 개발 기구(OECD)에 따라 다음 독특한 식물품종 식별자: SPS-Ø Ø Ø W8-4를 가진다.

[0085] 고유한 DNA를 이용한 표적화된 유전자 침묵은 감자식물 품종 W8의 덩이줄기에서 표적화된 유전자의 RNA 전사체의 수준을 감소시킨다. 감자 종자 W8은 다중 메커니즘에 의해 덩이줄기에서 환원당의 수준을 낮추는 발현 카세트들을 함유한다. pSIM1278에 의한 형질전환을 통해, 침묵 카세트가 전분-연관 유전자(*RI*) 및 포스포릴라제-L 유전자(*PhL*)의 프로모터에 대해 도입된 반면, pSIM1678에 의한 형질전환은 전화효소 유전자에 대한 침묵 카세트를 도입하였다(*VInv*; Ye et al., 2010). 종합하면, 이런 형질은 전분과 수크로오스의 환원당(글루코오스 및 프룩토오스)으로의 전환을 늦춤으로써 작동한다.

[0086] 따라서, 본 발명의 감자식물 품종 W8의 덩이줄기는 프라이 또는 베이킹 시 아크릴아마이드 형성 감소와 연관된, 유리 아마이드 아미노산인 아스파라긴 및 글루타민의 비율 감소를 포함하는 매우 바람직한 형질을 포함한다. 구체적으로, 본 발명의 감자품종 W8은 자유 아스파라긴 함량의 2배 내지 4배 이상의 감소, 흑점 상처와 연관된 변색 감소 및 감자 역병에 대한 저항성 증가를 특징으로 한다. 더욱이, 본 발명의 감자품종 W8은 저장 동안에 전분이 환원당인 글루코오스 및 프룩토오스로 분해되는 것을 지연시킨다. 전분-대-당 전환의 약화는 노화 감미 및 아크릴아마이드 형성을 추가로 감소시키고 열-유도성 갈변을 제한한다.

[0087] 따라서, 본 발명의 감자품종 W8은 이의 덩이줄기가 열 가공 시 아크릴아마이드를 상당히 적은 양으로 생성하고 임의의 잠재적으로 유해한 외래 유전자를 운반하지 않기 때문에, 감자산업 및 식품 시장에 매우 가치가 있다.

[0088] 실시예

[0089] 본 발명은 새로운 유전자내 감자식물 품종을 개발하기 위해, 고유한 비-코딩 DNA를 선별된 감자식물 품종의 게놈 내로 통합하는 고유한 기술을 이용한다. 이 방법은 형질 확인, 벡터 설계, 벡터의 *아그로박테리움* 내로의 혼입, 수여자 감자품종의 선별, 식물 형질전환, 오픈 리딩 프레임 부재의 증명(evidence), 및 새로운 감자식물 품종이 고유한 DNA만을 함유한다는 것의 확인을 포함한다. 본 발명의 감자 종자 W8은 아크릴아마이드 형성 잠재성이 저하되어 있으며, 수크로오스를 보다 소량으로 가지며, 흑점 상처에 대해 이의 비형질전환된 대응물보다 더 저항성이다. 추가적으로, 본 발명의 감자 종자 W8은 감자 역병에 대해 증가된 저항성을 가진다.

[0090] 실시예 1. pSIM1278 형질전환 벡터

[0091] 본 발명에서 사용되는 형질전환 벡터 pSIM1278은 0.4-kb 감자식물 DNA 단편(진뱅크 등록번호 AY566555로서 기탁됨)을, 플라스미드 pVS1 및 pBR322 유래의 박테리아 복제 기원, 및 카나마이신에 대한 박테리아 내성에 대한 *nptIII* 유전자를 운반하는 pCambia1301(호주, 캔버라의 Cambia)의 5.9-kb SacII-SphI 단편과 연결함으로써 제작한 pSIM106으로부터 유래되었다. Ubi-3 프로모터(Garbarino and Belknap, 1994) 뒤에 *아그로박테리움 ipt* 유전자를 포함하고 그 뒤에 Ubi-3 종결자를 포함하는 발현 카세트를 2.6-kb SacII 단편으로서 벡터 백본 내로 도입하였다(Rommens et al., 2004). 2개의 침묵 카세트를 운반하는 고유한 10-kb DNA 분절을 pSIM106의 DNA 삽입

체 내로 삽입하여, pSIM1278을 수득하였다. 이 벡터들 모든 형질전환들에 사용하였다. pSIM1278 벡터 지도는 도 1에 도시되어 있다. 벡터 백본 영역은 10,149 bp 위치에서 시작하고 19,660 bp 위치에서 종결하기 때문에, 9,512 bp이다. 백본 DNA는 주로 박테리아 DNA로 구성되며 식물의 형질전환 전에 DNA 삽입체의 지지 유지를 제공한다. 백본 부분은 식물 세포 내로 전달되지 않는다. 백본의 다양한 요소들은 표 1에 기술되어 있다. pCambia 벡터의 일반적인 구조 지도는 <http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html>에서 발견될 수 있다.

표 1

[0092]

유전자 요소	기원	등록번호	위치 (pSIM1278)	기능
SacII 제한 부위	솔라눔 투베로숨	AJ272136.1	19,411-19,416	Ubi7 프로모터와 LB 인접 서열을 연결하는 데 사용되는 제한 부위.
76-아미노산 감자 유비퀴틴 모노머(UBQ mon)에 대한 암호화 서열을 포함하는 폴리우니퀴틴 프로모터(Ubi7)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	U26831.1	17,671-19,410	ipt 백본 마커 유전자의 발현을 유도하는 프로모터
아이소펜테닐 트랜스페라제(ipt)유전자	아그로박테리움 투메파시엔스	NC_002377.1	16,936-17,658	식물에서 아이소펜테닐-AMP, 사이토키닌을 형성하는 AMP와 아이소펜테닐피로포스페이트의 응축. 식물의 비정상적 성장 표현형을 초래(Smigocki and Owens 1988)
유비퀴틴-3 유전자의 종결자(tUbi3)	솔라눔 투베로숨	GP755544.1	16,230-16,584	ipt 유전자 전사를 위한 종결자(Garbarino and Belknap 1994)
네오마이신 포스포트렌스페라제 III(nptIII) 유전자	대장균	FJ362602.1	15,240-16,034	아미노글리코사이드 포스포트렌스페라제 (Courvalin et al. 1977)
pBR322에 대한 복제 기원(pBR322 ori)	대장균	J01784.1	14,669-14,949	복제의 박테리아 기원
(pBR322 bom)	대장균	J01749.1	14,269-14,529	대장균에서 복제를 위한 pBR322 영역
pVS1 레플리콘 (pVS1Rep)	슈도모나스 플루오레센스 플라스미드 pVS1	AJ537514.1 (4,501-5,501)	12,859-13,859	아그로박테리움에서 복제를 위한 pVS1 영역
pVS1 파티셔닝 단백질 StaA (PVS1 Sta)	슈도모나스 플루오레센스 플라스미드 pVS1	AJ537514.1 (6,095-7,095)	11,266-12,266	pVS1 안정성
과다유도(Overdrive)	아그로박테리움 투메파시엔스	K00549.1 (103-132)	10,155-10,184	오른쪽 경계 위치에서 절단을 향상시킨다

[0093]

실시예 2. pSIM1278 식물 DNA 삽입체 및 이의 오픈 리딩 프레임(ORF)

[0094]

pSIM1278에 사용된 플랭킹 경계 서열(flanking border sequence)를 포함하는 pSIM1278 DNA 삽입 영역은 1 bp에서 10,148 bp로, 길이가 10,148 bp이다. pSIM1278 DNA 삽입체는 고유한 DNA로만 구성되며 감자 게놈 내로 안정하게 통합된다. pSIM1278 DNA 삽입체 또는 이의 기능성 부분은 본 발명의 감자식물 품종에서 통합되는 벡터 pSIM1278의 유일한 유전 물질이다. pSIM1278 DNA 삽입체는 아래 도 2와 표 2에 기술되어있다. LB 및 RB 서열(각각 25 bp)은 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 T-DNA 경계와 유사하고 기능하도록 합성적으로 설계되었다. 진뱅크 등록번호 AY566555는 경계 영역에 대한 DNA 소스를 명확히 하기 위해 수정되었다. 유전 요소 5와 10으로 기술된 ASN1은 Chawla et al., 2012에서 StAst1이라 지칭된다.

표 2

[0095]

유전자 요소	기원	등록번호	위치(pSIM1278)	의도한 기능
1. 왼쪽 경계(LB) 부위 1	합성	AY566555 (bases 1-25)	1 - 25	pSIM1278로부터 단일-가닥 DNA 삽입체를 방출하는 2차 절단 부위 (van Haaren et al. 1989)

2. LB를 포함하는 왼쪽 경계 영역 서열	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	AY566555 (bases1-187)	1 - 187	LB에서 2차 절단을 지원한다
3. KpnI 제한 부위	솔라눔 투베로숨	AF393847.1	188 -193	DNA 삽입체를 LB 인접 서열과 연결하기 위한 부위.
4. ADP 글루코오스 피로포스포릴라제 유전자에 대한 프로모터(pAgp), 1st 복제물	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363752	194-2,453	특히 덩이줄기에서 Asn1과 Ppo5의 단편을 포함하는 역 반복체의 발현을 유도하는 두 개의 수렴 프로모터 중 하나
5. 아스파라긴 신서타제-1(Asn1) 유전자의 단편(1st 복제물 안티센스 배향)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363759	2,454-2,858	Asn1 전사체의 분해를 유발하여 아스파라긴 생성을 손상시키는(10) 이중 가닥 RNA와 함께 생성한다 (Chawla et al. 20123)
6. 폴리페놀 옥시다제-5 유전자(Ppo5)의 3'-비번역된 서열(1st 복제물, 안티센스 배향)	솔라눔 투베로숨	HM363754	2,859-3,002	Ppo5 전사체의 분해를 유발하여 흑점 발달을 차단하는(9) 이중 가닥 RNA와 함께 생성한다
7. XbaI 제한 부위	솔라눔 투베로숨	DQ478950.1	3,003-3,008	제 1 Ppp5 복제물을 스페이서-1에 연결하기 위한 부위.
8. 스페이서-1	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363753	3,009-3,166	제 1 역 반복체들 사이의 서열
9. 폴리페놀 옥시다제-5 유전자(Ppo5)의 3'-비번역된 서열(2nd 복제물, 센스 배향)	솔라눔 투베로숨	HM363754	3,167-3,310	Ppo5 전사체의 분해를 유발하여 흑점 발달을 차단하는(6) 이중 가닥 RNA와 함께 생성한다
10. 아스파라긴 신서타제-1(Asn1) 유전자의 단편(2nd 복제물, 센스 배향)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363759	3,311-3,715	Asn1 전사체의 분해를 유발하여 아스파라긴 생성을 손상시키는(5) 이중 가닥 RNA와 함께 생성한다 (Chawla et al. 20123)
11. EcoRI 제한 부위	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	X73477	3,716-3,721	제 2 Asn1 복제물을 Gbss 프로모터에 연결하기 위한 부위.
12. 과립-결합 전분 신타아제(pGbss) 유전자에 대한 프로모터(1st 복제물, pAgp의 1st 복제물에 대한 수렴 배향)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363755	3,722-4,407	특히 덩이줄기에서 Asn1과 Ppo5의 단편을 포함하는 역 반복체의 발현을 유도하는 두 개의 수렴 프로모터 중 하나
13. SpeI / KpnI 제한 부위	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	X95996 / AF393847.1	4,408-4,423	Gbss 프로모터를 제 2 Agp 프로모터에 연결하기 위한 폴리링커 부위.
14. pAgp, 2nd 복제물	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363752	4,424-6,683	특히 덩이줄기에서 PhL과 R1의 단편을 포함하는 역 반복체의 발현을 유도하는 두 개의 수렴 프로모터 중 하나
15. 감자 포스포릴라제-L(pPhL) 유전자에 대한 유전자의 단편(1st 복제물, 안티센스 배향)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363758	6,684-7,192	PhL 전사체의 분해를 유발하여 전분 분해를 통한 환원당의 형성을 제한하는 (20) 이중 가닥 RNA와 함께 생성한다
16. 감자 R1 유전자(pR1)에 대한 프로모터의 단편(1st 복제물, 안티센스 배향)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363757	7,193-7,724	R1 전사체의 분해를 유발하여 전분 분해를 통한 환원당의 형성을 제한하는 (19) 이중 가닥 RNA와 함께 생성한다
17. PstI 제한 부위	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	DQ478950.1	7,725-7,730	제 1 프로모터 단편을 스페이서 2에 연결하기 위한 부위
18. 스페이서-2	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363756	7,731-7,988	제 2 역 반복체 사이의 서열
19. 감자 R1 유전자(pR1)에 대한 프로모터의 단편(2nd 복제물, 센스 배향)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363757	7,989-8,520	R1 전사체의 분해를 유발하여 전분 분해를 통한 환원당의 형성을 제한하는 (16) 이중 가닥 RNA와 함께 생성한다

20. 감자 포스포릴라제-L(pPhL) 유전자에 대한 유전자의 단편(2nd 복제물, 센스 배향)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363758	8,521-9,029	PhL 전사체의 분해를 유발하여 전분 분해를 통한 환원당의 형성을 제한하는 (15) 이중 가닥 RNA와 함께 생성한다
21. pGbss (2nd 복제물, pAgt의 2nd 복제물에 대한 수렴 배향)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363755	9,030-9,953	특히 덩이줄기에서 PhL과 R1의 단편을 포함하는 역 반복체의 발현을 유도하는 두 개의 수렴 프로모터 중 하나
22. SacI 제한 부위	솔라눔 투베로숨	AF143202	9,954 - 9,962	RB 인접 서열을 DNA 삽입체에 연결하기 위한 부위.
23. RB를 포함하는 오른쪽 경계 영역 서열	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	AY566555 (bases 231-416)	9,963 - 10,148	RB-유사 부위에서 1차 절단을 지원한다
24. 오른쪽 경계 (RB) 서열1	합성	AY566555 (bases 392-416)	10,124 - 10,148	pSIM1278로부터 단일-가닥 DNA 삽입체를 방출하는 1차 절단 부위 (van Haaren et al. 1989)

[0096] 본 발명의 감자 혈통 W8를 생산하는 데 사용된 표 2에 기술된 DNA 삽입체는 인접한 유전자를 활성화시키지 않으며 감자식물 품종 W8의 표현형에 악영향을 미치지 않는다. 또한, 본 발명의 감자식물 품종 W8은 DNA 삽입체에 의해 암호화되는 오픈 리딩 프레임과 연관된 신규 단백질을 생성하지 않는다.

[0097] 실시예 3. pSIM1678 형질전환 벡터

[0098] 본 발명에 사용된 벡터 pSIM1678은 실시예 1에서 pSIM1278에 대해 기술된 동일한 방법을 사용하여 형질전환되었다. pSIM1678 벡터 맵은 도 3에 도시된다. 벡터 백본 영역은 9,091 bp 위치에서 시작하고 18,602 bp 위치에서 종결하기 때문에, 9,512 bp이다. 백본 DNA는 주로 박테리아 DNA로 구성되며 식물의 형질전환 전에 DNA 삽입체의 지지 유지를 제공한다. 백본 부분은 식물 세포 내로 전달되지 않는다. 백본의 다양한 요소들은 표 1에 기술되어 있다. 표 1에 도시된 넘버링 시스템이 pSIM1278을 기초로 하나, 백본 서열은 pSIM1678과 동일하다.

[0099] 실시예 4. pSIM1678 식물 DNA 삽입체 및 이의 오픈 리딩 프레임(ORF)

[0100] pSIM1278에 사용된 플랭킹 경계 서열(flanking border sequence)을 포함하는 pSIM1278 DNA 삽입 영역은 길이가 9,090 bp(1 bp에서 9,090 bp)이다. pSIM1678 DNA 삽입체는 고유한 DNA로만 구성되며 감자 게놈 내로 안정하게 통합된다. pSIM1678 DNA 삽입체 또는 이의 기능성 부분은 본 발명의 감자식물 품종에서 통합되는 벡터 pSIM1678의 유일한 유전 물질이다. pSIM1678 DNA 삽입체는 아래 도 3과 표 3에 기술되어 있다. 표 3에서, LB 및 RB 서열(각각 25 bp)은 아그로박테리움 투메파키엔스(Agrobacterium tumefaciens)의 T-DNA 경계와 유사하고 기능하도록 합성적으로 설계되었다. 진뱅크 등록번호 AY566555는 경계 영역에 대한 DNA 소스를 명확히 하기 위해 수정되었다.

표 3

[0101]

유전자 요소	기원	등록번호	위치 (pSIM1678)	의도한 기능
1. 왼쪽 경계(LB) 부위	합성	AY566555 (bases 1-25)	1 - 25	pSIM1678로부터 단일-가닥 DNA 삽입체를 방출하는 2차 절단 부위
2. LB를 포함하는 왼쪽 경계 영역	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	AY566555 (bases 1-187)	1 - 187	LB에서 2차 절단을 지원한다
3. KpnI 제한 부위	솔라눔 투베로숨	AF393847.1	188 - 193	DNA 삽입체를 LB 인접 서열과 연결하기 위한 부위.
4. 감자 역병 저항 유전자(<i>Rpi-vnt1</i>)에 대한 고유 프로모터	솔라눔 벤투리	FJ423044.1	194 -902	감자 역병 저항 유전자 <i>vnt1</i> 의 발현을 유도한다
5. 감자 역병 저항 유전자(<i>Rpi-vnt1</i>)	솔라눔 벤투리	FJ423044.1	903 -3,578	솔라눔 벤투리 감자 역병 저항 단백질 유전자
6. <i>Rpi-vnt1</i> 유전자에 대한 고유 종결자	솔라눔 벤투리	FJ423044.1	3,579 -4,503	감자 역병 저항 유전자 <i>vnt1</i> 의 말단 전사
7. Apa1	솔라눔 투베로숨	HM363755	4,504 -4,509	<i>vnt1</i> 종결자를 Agp 프로모터와 연결하기 위한 부위

8. ADP 글루코오스 피로포스포릴라제 유전자(pAgp)에 대한 프로모터	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363752	4,510 - 6,770	산 전화효소 유전자의 단편을 포함하는 역 반복체의 발현을 유도하는 두 개의 수렴 프로모터 중 하나.
9. BamHI	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	DQ206630	6,771 - 6,776	Agp 프로모터를 전화효소와 연결하기 위한 부위
10. 산 전화효소의 단편 (센스 배향)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	DQ478950.1	6,777 - 7,455	전화효소 전사체의 분해를 유발하는 (12) 이 중 가닥 RNA와 함께 생성한다
11. EcoRI	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	X73477	7,456 - 7,461	전화효소 단편(센스)을 전화효소 단편(안티-센스)와 연결하기 위한 부위
12. 산 전화효소의 단편 (안티센스 배향)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	DQ478950.1	7,462 - 7,965	전화효소 전사체의 분해를 유발하는 (10) 이 중 가닥 RNA와 함께 생성한다
13. SpeI	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	X95996	7,966 - 7,971	전화효소 단편(안티-센스)를 GBSS 프로모터에 연결하기 위한 부위
14. 과립-결합 전분 신타아제(pGbss) 유전자에 대한 프로모터 (pAgp에 대한 수렴 배향)	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	HM363755	7,972 - 8,895	특히 덩이줄기에서 전화효소 유전자의 단편을 포함하는 역 반복체의 발현을 유도하는 두 개의 수렴 프로모터 중 하나
15. SacI 제한 부위	솔라눔 투베로숨	AF143202	8,896 - 8,901	DNA 삽입체를 RB 인접 서열과 연결하기 위한 부위.
16. RB를 포함하는 오른쪽 경계 영역	솔라눔 투베로숨 품종 레인저 러셋	AY566555 (bases 231-416)	8,902 - 9,090	RB-유사 부위에서 1차 절단을 지원한다
17. 오른쪽 경계(RB) 서열	합성	AY566555 (bases 392-416)	9,066 - 9,090	pSIM1278로부터 단일-가닥 DNA 삽입체를 방출하는 1차 절단 부위 (van Haaren et al. 1989)

[0102] 실시예 5. 아그로박테리움 균주 및 형질감염

[0103] C58-유래의 *아그로박테리움* 균주 AGL1은 매우 유해한(hyper-virulent) 플라스미드, pTiBo542의 전달 DNA(transfer DNA)를 정확하게 결실시킴으로써 개발하였다(Lazo et al., 1991). 아그로박테리움의 생존을 방지하여, 아그로박테리움이 없는 식물을 선택하는 항생제인 티멘틴을 함유하는 배지에서 형질 전환 식물을 재배하였다. 선택 후, 식물은 항생제와 아그로박테리움을 함유하지 않으며, 감자 유래 발현 카세트가 식물의 게놈에 삽입된다.

[0104] 모주(stock plant)는 3% 수크로스 및 2g/l 겔잔(gelzan)(번식 배지)을 함유하는 40ml 하프-스트렝스(half-strength) M516(식물공학) 배지와 함께 마젠타 박스(magenta box)에서 유지시켰다. 4mm 내지 6mm의 감자 절간 분절(internode segment)을 4주령의 식물로부터 절단하고, pSIM1278을 운반하는 아그로박테리움 AGL1 균주로 감염시키고, 3% 수크로스 및 2g/l 겔잔을 함유하는 조직 배양 배지(공동-배양 배지)로 전달하였다. 2일 후, 감염된 외식체(explant)를 3% 수크로스, 2g/l 겔잔, 300mg/l 티멘틴 및 1.2ml 식물 보호 배지(식물공학)를 함유하는 M404 배지(식물공학)로 전달하여, *아그로박테리움*을 제거하였다(호르몬-무함유 배지). 이 식물이 아그로박테리움이 없다는 증거는 형질전환 이벤트의 줄기 및/또는 잎 조각을 영양 배지-효모 추출물(NBY 배지)에 2주 동안 28℃로 부산물 없이 배양하여 얻었다. 형질전환 된 식물은 살아있는 아그로박테리움이 없는 경우에만 필드에 옮겨 심었다. 이 방법의 상세한 사항은 다른 곳(Richaël et al. (2008))에 기술되어 있다.

[0105] *아그로박테리움*은 오른쪽 경계(RB) 부위에서 절단에 효과적이지만, 종종 왼쪽 경계(LB) 부위에서 절단함으로써 그 플라스미드 벡터로부터 DNA 삽입체를 완전히 방출하지 못한다(Gelvin 2003). 결과적으로, 일부 감염된 식물 세포는 DNA 삽입체 자체뿐만 아니라 식물의 성장 및 발달 과정을 조절하는 식물 호르몬 사이토키닌에 대한 백본 마커 유전자, 아이소펜텐일형질전환효소(isopentenyltransferase, ipt)를 함유하는 추가 플라스미드 백본 서열을 수용하였다. 과다발현은 발육 정지된 표현형, 비정상적인 잎 또는 사이토카인 과다생산에 의한 정착 불능을 초래하며, 이것은 백본 DNA를 함유하는 식물을 선택하는데 사용되었다(Richaël et al., 2008). 2주마다, 감염된 외식체를 임의의 합성 호르몬을 함유하지 않는 신선한 배지로 전달하고, 24℃에서 16시간 광주기 하에 퍼시칼 생장 챔버(Percival growth chamber)에서 배양하였으며, 여기에서 외식체는 순을 형성하기 시작하였다. 여

러 순들이 *ipt* 유전자를 발현하였으며, 사이토키닌 과다생산 표현형을 나타내었고; 이들 순은 버렸고 추가적인 분석을 고려하지 않았다. PCR 유전형 분석은 잔여 순들 중 약 0.3% 내지 1.5%는 *ipt* 유전자가 결여되어 있지만 DNA 삽입체의 적어도 일부를 함유하였다는 것을 입증하였다.

[0106] 러셋 버뱅크 W8 이벤트는 서로 다른 플라스미드에 의한 두 개의 분리된 형질 전환으로부터 파생된 삽입체를 포함한다. 첫 번째 삽입체인 플라스미드 pSIM1278은 덩이줄기에서 최대 4개의 감자 유전자인 *Asn1*, *Ppo5*, *R1* 및 *PhL*를 침묵시키도록 설계된 역전 반복체로 이루어진 2개의 카세트를 함유한다. 유사하게 두 번째 플라스미드인 pSIM1678은 덩이줄기에 *Vlnv* 유전자를 침묵시키는 역전 반복체로 구성된 카세트를 함유하는 반면, 고유 감자 프로모터 아래에 *Rpi-vnt1* 유전자의 사본을 함유한다.

[0107] 이벤트 W8을 생성하기 위한 pSIM1278 및 pSIM1678에 의한 러셋 버뱅크의 형질전환과 관련된 삽입체의 유전학적 및 구조적 특징은 두 형질전환이 각 플라스미드에 대한 단일 통합 부위를 생성한다는 것을 보여 주었다. pSIM1278의 형질전환에서 유래된 DNA의 구조는 최초 삽입체의 구조에 비해 복잡했다. 삽입된 DNA는 형질전환 동안 *Asn1/Ppo5* 침묵 카세트의 탠덤 반복체, 거의 완전한 pSIM1278 구조체, 및 pR1/pPh1 침묵 카세트의 복제 및 개재 Ph1 서열을 갖는 Gbss 프로모터의 탠덤(tandem) 복제를 함유하는 역전 반복체로 이루어진 구조를 유도하는 재배열 된 것으로 보인다.

[0108] 이러한 구조는 예상보다 더 복잡하지만, 복제된 침묵 카세트는 손상되지 않고 조직-특이적 프로모터의 제어 상태로 유지된다. 이 구조는 생성물의 안전성 또는 형질 효능에 악영향을 미치지 않는다.

[0109] W8은 또한 단일 통합 유전자 좌에 존재하는 pSIM1678로부터의 단일 DNA 복제물을 함유한다. pSIM1678의 DNA 삽입체는 전체 T-DNA 왼쪽 경계와 *Rpi-vnt1* 프로모터의 137-bp를 제거하는 330-bp의 결실이 있는 거의 손상되지 않은 DNA 삽입체를 함유한다. 프로모터에서 이 작은 결실은 감자 역병 저항성을 부여하는 유전자의 능력에 영향을 미치지 않는다. 또한, *Rpi-vnt1* 유전자와 관련된 RNA 발현은 RT-PCR을 사용하여 입증되었다.

[0110] 실시예 6. 벡터 백본 DNA의 부재에 대한 증거

[0111] 다음의 방법은 플라스미드의 백본 부분이 상업적 목적으로 개발된 이벤트에서 존재하지 않는다는 것을 확인하기 위해 사용되었다: 1) 식물이 플라스미드 백본에서 음성 선택가능한 아이소펜테닐 아이소머라제(*ipt*) 마커 유전자와 연관된 표현형을 갖는 경우, 이들은 버려졌다; 2) 백본 DNA의 부재는 서던 블롯 하이브리드화 (Southern blot hybridization)로 확인되었다; 3) PCR은 백본 DNA의 단편이 없음을 확인하는데 사용되었다. 종합적으로, 서던 블롯과 PCR 분석 결과는 러셋 버뱅크 W8 이벤트는 형질전환에 사용된 플라스미드로부터의 백본을 함유하지 않는다는 것을 나타내었다.

[0112] 실시예 7. 삽입된 DNA의 안정성

[0113] 박테리아 T-DNA는 식물에 삽입된 후에 항상 안정한 것은 아니다. 추정된 불안정성 비율($0.5-5.9 \times 10^{-4}$)은 감수 분열과 관련이 있으며(Muller et al., 1987; Conner et al., 1998), 이는 감자와 관련이 없는데 감자는 무성적으로 번식되기 때문이다. 따라서, DNA 삽입은 안정적인 것으로 예상된다. 씨앗 보다는 덩이줄기가 다음 세대를 정의하는데 사용되었는데 이는 덩이줄기는 상업적으로 심어지는 것이기 때문이다.

[0114] 분자 안정성 및 표현형 분석을 모두 사용하여 유전자 안정성을 평가하였다. 삽입체의 구조는 W8 감자의 3세대 (G0-G3)에 걸쳐 분리된 계통 DNA의 서던 블롯 분석을 사용하여 안정한 것으로 나타났으나, 표현형 안정성은 필드-성장 덩이줄기의 제 2세대에서, 폴리페놀 옥시다제 활성을 측정하여 평가되었다. 이 방법은 감자 절단면에 카테콜을 도포한 후 PPO 침묵의 시각적 증거를 나타낸다. 이런 연구는 형질을 유지하면서 W8의 원하는 유전적 변화가 여러 클론 주기 동안 안정적으로 유지되도록 하기 위해 수행되었다.

[0115] DNA 삽입체의 안정성은 서던 블롯을 사용하여 3개의 연속적인 클론 세대(G1, G2 및 G3)를 원래의 형질전환체 (G0)와 비교함으로써 평가하였다. 안정한 DNA 삽입체는 동일한 구조를 유지하고 식물의 여러 세대에 걸쳐 동일한 소화 패턴을 생성 할 것으로 예상된다. W8 이벤트에서 삽입체의 안정성을 시험하기 위해, pSIM1278 및 pSIM1678 둘 다에서 삽입체의 영역에 혼성화하는 두 개의 프로브(GBS1 및 AGP) 및 pSIM1678 삽입체에 특이적인 두 프로브(INV 및 VNT1)를 사용하여 분해 패턴을 비교하였다. 이들 프로브가 DNA 계통뿐만 아니라 DNA 삽입체 (들)과 혼성화하는 DNA 서열은 감자 계통에 함유되기 때문에, 내인성 및 삽입체- 특이적 밴드 모두가 서던 블롯에서 예상된다.

[0116] 모든 계통 DNA 샘플을 제한 효소, EcoRV로 분해하였고, AGP 또는 GBS1에 특이적인 프로브와 혼성화시켰다. EcoRV는 이들 연구를 위해 선택되었는데 이는 pSIM1278 삽입체(예를 들어, 2.3kb)에서 예측된 크기의 내부 밴드

를 갖는 독특한 밴딩 패턴을 제공하기 위해 두 삽입체 내에서 소화되기 때문이다. W8의 모든 샘플 사이의 밴딩 패턴은 두 프로브에 대해 서로 동일하였다. 러셋 버뱅크 대조군에 있는 여러 밴드는 W8에서도 발견되지만 W8은 pSIM1278 및 pSIM1678 삽입체에 해당하는 밴드도 함유한다. 이런 밴드는 분석된 W8의 모든 세대 사이에 유사하게 일치하여 두 삽입체의 유전적 안정성을 나타낸다.

[0117] pSIM1678 삽입체에 특이적인 두 개의 프로브를 사용하여 두 번째 분석을 실행하였다. 이 분석을 위해 계능 DNA 샘플을 제한 효소 XbaI로 분해하고 VNT1 및 INV 프로브와 혼성화하였다. XbaI는 pSIM1678을 내부적으로 분해하고 공지된 크기의 밴드(예를 들어, INV 프로브에 대해 4.6 kb)를 생성함에 따라 이들 연구에 대한 제한 효소로 선택되었다. 다시, 내인성 및 삽입-특이적 밴드 모두를 분석된 3세대 간의 일치하는 밴딩 패턴으로 검출하였다. 유전적 및 표현형 분석 결과는 pSIM1278 및 pSIM1678의 형질전환으로 인해 발생하는 삽입은 3세대에 걸쳐 안정적이라는 것을 나타내었다. 3세대에 걸쳐 입증된 안정성을 감안할 때, 이후의 식물 번식주기 동안 안정성이 유지될 가능성이 있다.

[0118] 실시예 8. 유전자 침묵의 효능 및 조직-특이성

[0119] 침묵은 침묵을 표적으로 한 유전자 및 프로모터로부터 유래된 서열을 포함하는 역반복체를 도입함으로써 달성되었다. 이중 가닥 RNA 매개 침묵에 관련된 많은 평행 경로가 있지만, 이러한 역반복체의 전사는 바이러스 방어에 관여하는 세포 기계에 의해 처리되는 것으로 생각된다(Fusaro et al., 2006). W8 감자는 총 5개의 다른 감자 유전자로부터의 서열을 포함하는 3개의 독특한 카세트를 함유한다. pSIM1278 구조체는 2개의 유전자 침묵 카세트에 구성된다(도 4, 상부 구조체 참조). 하나의 카세트는 두 유전자, 아스파라긴 신타아제-1(*Asn1*)과 폴리페놀 옥시다제 -5(*Ppo5*)로부터의 서열의 역반복체를 함유한다. 두 번째 카세트는 전분 관련 유전자 R1(531-bp) 및 포스포릴라제-L(*PhL*)(508-bp)의 프로모터로부터의 서열을 함유한다. 최종 카세트는 액포성 전효소(*VInv*) 유전자로부터의 서열을 함유하는 역반복체를 포함하는 pSIM1678 구조체를 통해 도입되었다(도 4 참조, 하부 구조체).

[0120] 3개의 모든 침묵 카세트는 광합성-활성 조직 및 뿌리와 비교하여 덩이줄기에서 매우 활성인 감자의 *Agp* 및 *Gbss* 유전자로부터의 잘 특징화되며 조직-특이적 프로모터의 동일한 세트에 의해 조절된다(Nakata et al., 1994; Visser et al., 1991). 따라서 발현 및 유전자 침묵은 덩이줄기에서 가장 효과적이며 덩이줄기에 대해 크게 제한될 것으로 예상되었다.

[0121] 5개의 모든 표적 유전자의 발현을 노던 블롯 분석으로 특징화하여 각 카세트로부터의 유전자 침묵의 효과를 측정하였다. *Asn1*, *Ppo5* 및 *VInv*의 강력한 침묵이 덩이줄기에서 발견된 반면 R1의 침묵은 덜 효과적이었다(도 5). *PhL*의 침묵은 대조군과 W8 샘플 사이에 측정 가능한 차이가 관찰되지 않아 비효율적이라고 간주되었다. 동일한 pSIM1278 구조체에 의한 다른 이벤트에서, 덩이줄기에서 *PhL* 및 *R1*에 대한 프로모터의 부분적 침묵이 관찰되었다(Collinge and Clark, 2013).

[0122] 이전의 연구는 *Ppo* 유전자 침묵이 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출되지 않는 수준으로 관련 단백질의 양을 감소시킨다는 것을 보여주었다(Llorente et al., 2011). 마찬가지로, *R1* 유전자의 침묵은 전분 과립에 적어도 부분적으로 결합된 ~ 160kDa 단백질의 축적을 감소시켰다(Lorberth et al., 1998).

[0123] 표적 유전자 발현을 다른 식물 조직에서 평가하여 유전자 침묵의 특이성을 결정하였다. 노던 블롯 분석은 W8과 러셋 버뱅크 대조군으로부터의 잎, 줄기, 뿌리 및 꽃으로부터 분리된 RNA에서 유사하게 실행되었다. 도 6, 7 및 8에 도시된 바와 같이, 러셋 버뱅크 대조군에 비해 잎, 줄기 또는 뿌리에 표적 유전자의 침묵이 없었다. 대조군을 포함하는 모든 잎 및 줄기 샘플에서 약하게 발현된 *VInv* 유전자에 해당하는 것을 제외하고는 모든 전사체를 쉽게 검출할 수 있었다.

[0124] 일부 표적 침묵이 관찰된 덩이줄기 이외의 유일한 조직은 꽃 샘플에 있었다. 이들 샘플은 러셋 버뱅크 대조군에 비해 W8에서 *Asn1* 전사체의 일부 침묵을 나타내었으며, 이는 조직에서 일부 누설되는 발현으로 인한 것일 수 있다(도 9).

[0125] 러셋 버뱅크 내로 도입된 W8 이벤트를 생성하기 위한 3개의 유전자 침묵 카세트 중 2개는 RNAi-매개 침묵을 위한 표적 전사체를 침묵시키는데 매우 효과적이었다. 이런 두 구조체는 W8의 덩이줄기에서 *Asn1*, *Ppo5* 및 *VInv*를 효과적으로 침묵시켰다. 덩이줄기에 대한 침묵의 특이성은 만약 있다면 RNAi 기계에 의해 생성된 siRNA의 일부가 다른 조직으로 퍼지거나 이들의 수준이 이런 조직에서 RNAi 반응을 일으키기에 불충분하다는 것을 의미한다. 덩이줄기 외부의 침묵에 대한 유일한 증거는 *Asn1*의 낮은 수준이 관찰된 꽃에 있었으나, 변화의 정도는 덩이줄기에서 보다 훨씬 낮았다. *PhL*과 *R1*에 의한 프로모터 침묵 전략은 최소한의 효과를 나타내었으며, 이는 동일한 pSIM1278 구조체를 함유한 다른 이벤트와 일치한다(Collinge and Clark 2013).

[0126] 예상한 바와 같이, *Asn1*, *Ppo5* 및 *VInv*와 관련된 RNA 전사체의 감소된 발현이 추가로 입증되었다. 또한, 조성물 자료 및 농경학 자료는 중요한 오프-타겟 효과 또는 의도하지 않은 침묵과 관련될 수 있는 임의의 예상치 못한 표현형을 나타내지 않았다. 예를 들어, 덩이줄기에서 *Asn1*의 강한 침묵은 아미노산 아스파라긴의 축적을 제한하는 반면, 잎 또는 줄기에서 *Asn1*의 침묵은 성장 및 발달에 악영향을 미칠 수 있으나, 이는 사실이 아니었다. 따라서 RNAi 반응은 효과적이고 특이적이며 이러한 감자 유전자를 침묵시키는 것이 잡초 또는 다른 식물 해충의 특성에 영향을 미칠 것이라는 징후는 없다.

[0127] 실시예 9. 감자 종자 W8 특징화 요약

[0128] 감자품종 W8은 감자 역병에 대한 저항성을 증가시키고, 흑점 상처의 원인이 되는 효소의 발현을 감소시킴으로써 품질을 개량하고 반응물, 즉 아스파라긴과 환원당의 농도를 저하함으로써 아크릴아마이드를 감소시키고자 하는 감자산업의 요구를 해결한다. 감자품종 W8을 감자식물 계통에 고유하며 외래 DNA, *아그로박테리움* DNA, 바이러스 마커 또는 벡터 백본 서열을 함유하지 않는 핵산 서열로 형질전환하였다. 또한, 형질과 연관된 특징을 제외하고는, 이벤트들이 종래의 대조군과 동일하게 성장하는 것을 보장하도록 작물 연구를 수행하였다.

[0129] 작물 특성

[0130] 미국에서 감자 생산의 주요 영역을 대표하는 다수의 위치에서 재배될 때 러셋 버뱅크 품종 W8은 대조군 러셋 버뱅크와 비교하여 동일한 표현형을 갖는다는 것을 확인하기 위한 농경학 시험이 수행되었다. 2012년과 2013년에 재배된 W8과 대조군의 농경학적 특성, 수율 및 등급 특징의 평가 요약은 표 4와 표 5에 도시된다. 전체적으로, 이 결과는 이러한 특성에 대해 W8과 대조군 사이에 큰 차이가 없음을 확인한다. 아래의 표 4 및 5에서, 1열은 특성을 나타내고 2열은 다양성을 나타내며 3열은 테스트된 식물의 수를 나타내며 4열은 특성에 대한 LS 평균값을 나타내며 5열은 p-값 (볼드체이고 밑줄은 통계학적으로 유의한 차이를 나타낸다), 6열은 표준 편차(SD)를 나타내며, 7열은 90% 신뢰 구간(CI)을 나타내며, 8열은 재래식 품종 (CVR)의 평균값 범위를 나타낸다. 표 5에서, 튀겨진 덩이줄기 조각의 색상을 USDA 문셀(Munsell) 색상 차트와 비교하였다. 높은 당은 감자 튀김에 대한 문셀 색상 차트와 비교할 때, 가장 어두운 면 상에 숫자 3 또는 그보다 어두운 지배적인 색상을 가지는 튀김 조각을 가진 덩이줄기의 백분율이다. 당 말단은 숫자 3 또는 더 어두운 색상(USDA AMS 1969)의 결과를 나타내는 조각의 전체 폭에 대해 조각의 가장 어두운 면 상에 길이가 1/4 인치 이상인 말단을 가진 튀겨진 조각을 가진 덩이줄기의 백분율이다. 프라이 0 - 프라이 4는 가장 어두운 면의 지배적인 색상이 감자 튀김의 문셀 색상 차트와 비교될 때, 각각 0-4의 색상 판독 값으로 결정되는 튀겨진 조각을 가진 덩이줄기의 백분율이다. 따라서, 보고된 숫자는 문셀 차트에서 0, 1, 2, 3 또는 4를 받은 프라이의 백분율입니다. 숫자가 낮을수록 색상이 더 좋으며, 0이 가장 좋다.

표 4

[0131]

특징	품종	N	평균	P-값	SD	90% CI		CVR	
조기 출현율 (%)	대조군	41	61.5	.	14.8	57.1	64.9	0.0	93.1
	W8	40	39.5	0.0001	23.3	31.8	44.3		
최종 출현율 (%)	대조군	41	87.1	.	10.7	84.4	90.0	10.6	98.1
	W8	40	80.3	0.2060	20.2	74.4	85.1		
식물 당 줄기 (#)	대조군	39	1.7	.	0.7	1.4	1.8	1.0	3.1
	W8	36	1.7	0.8868	0.7	1.4	1.8		
식물 생장력 (1-5 Scale)	대조군	37	3.7	.	0.9	3.4	3.9	2.0	5.0
	W8	35	3.0	0.0065	0.8	2.8	3.2		
식물 높이 (cm)	대조군	41	45.1	.	14.0	42.7	50.0	31.8	71.6
	W8	38	40.4	0.0098	12.5	38.0	44.9		
덩굴 건조 (%)	대조군	37	44.0	.	29.3	37.0	53.3	3.8	100.0
	W8	35	35.5	0.1471	30.7	29.4	46.9		

표 5

[0132]

특징	품종	N	평균	P-값	SD	90% CI		CVR	
총 수율 (cwt/a)	대조군	41	445.7	.	149.7	397.1	475.9	135.6	733.2
	W8	38	417.9	0.4080	165.4	360.8	451.3		
US#2 수율 (cwt/a)	대조군	41	375.7	.	147.5	328.8	406.3	118.9	653.7

	W8	38	312.2	0.0506	144.1	264.2	343.1		
식물당 덩이줄기 (#)	대조군	41	7.8	.	2.5	7.0	8.3	2.5	19.5
	W8	38	8.4	0.4657	3.2	7.2	8.9		
덩이줄기 <4 oz (%)	대조군	9	8.2	.	5.3	4.9	11.5	.	.
	W8	9	15.9	0.2434	6.9	11.7	20.2		
덩이줄기 4-6 oz (%)	대조군	41	18.5	.	8.6	16.5	21.0	4.6	41.1
	W8	41	20.5	0.3148	7.1	18.8	22.6		
덩이줄기 6-10 oz (%)	대조군	41	31.1	.	8.7	28.9	33.5	15.3	41.2
	W8	41	28.6	0.3435	8.2	26.1	30.5		
덩이줄기 10-14 oz (%)	대조군	41	19.0	.	8.4	16.7	21.1	1.0	26.8
	W8	41	14.0	<u>0.0071</u>	8.1	11.8	16.0		
덩이줄기 >14 oz (%)	대조군	41	14.3	.	16.9	9.3	18.2	0.0	45.5
	W8	41	8.6	0.0554	11.0	5.8	11.5		
비중	대조군	41	1.077	.	0.0	1.1	1.1	0.7	1.2
	W8	41	1.073	0.8058	0.0	1.1	1.1		
높은 당 (%)	대조군	41	11.0	.	16.9	6.0	14.9	0.0	84.8
	W8	41	1.4	<u>0.0337</u>	7.3	0	3.4		
당 말단 (%)	대조군	41	19.7	.	18.5	14.7	24.4	0.0	52.6
	W8	41	3.3	<u><.0001</u>	6.5	1.2	4.6		
프라이 0	대조군	32	76.5	.	30.9	67.2	85.7	0.0	100.0
	W8	32	94.9	<u>0.0272</u>	19.4	89.1	100.0		
프라이 1	대조군	32	2.9	.	10.5	0.0	6.0	0.0	29.7
	W8	32	1.5	0.6142	6.2	0.0	3.4		
프라이 2	대조군	32	9.9	.	18.9	4.3	15.6	0.0	28.4
	W8	32	1.7	<u>0.0173</u>	7.3	0.0	3.9		
프라이 3	대조군	32	1.9	.	3.7	0.8	3.0	0.0	23.1
	W8	32	0.8	0.4899	3.4	0.0	1.8		
프라이 4	대조군	32	6.3	.	14.8	1.8	10.7	0.0	79.7
	W8	32	1.0	0.2316	5.9	0.0	2.8		
총 내부 결함 (%)	대조군	41	1.6	.	2.5	0.8	2.1	0.0	15.5
	W8	41	1.2	0.7205	2.2	0.6	1.8		

[0133] 감자 종자 W8에 대해 표 4 및 5에 제시된 데이터를 기초로, 조기 출현율 백분율과 당 말단 백분율을 제외하고, 비형질전환된 러셋 버뱅크 품종과 감자 종자 W8 사이에 농경학적 특성, 수율 및 등급화 및 생태학적 상호작용에서 종합적으로 주요한 차이가 없는 것으로 결론지을 수 있다. 따라서, 복수-해 데이터를 기초로, 러셋 버뱅크 품종 W8은 잡초화 또는 식물 해충 잠재성의 결과로서 환경에서 지속될 상당한 위험을 일으키지 않는다.

[0134] 감자 역병

[0135] 많은 감자 품종은 곰팡이-유사 난균성 감자역병균(*Phytophthora infestans*)에 의해 야기된 치명적인 질병인 감자 역병에 약하다. 감자 역병은 감자는 급속히 확산되고 괴사될 수 있는 잎과 줄기 상의 검은색/갈색 병변으로 확인된다. 심한 역병은 감자역병균(*P. infestans*)이 숙주 작물에서 빠르게 성장하고 번식할 때 발생한다.

[0136] *Rpi-vnt1*로 알려진 감자 역병 저항성 유전자가 W8에 첨가되어, 성공적으로 감자 역병 저항성을 부여하였다. 감자 역병 저항성의 효능을 입증하기 위해, 러셋 버뱅크 품종 W8과 대조군 러셋 버뱅크의 잎과 덩이줄기를 접종함으로써 연구를 수행하였다.

[0137] 시험 기간의 종료시에, 각 현장으로부터의 등급이 취해졌고, 하기 표 6 및 7에 요약되어있다. 감자 역병에 대한 잎 저항성의 결과는 표 6에 도시된다. 각각의 균주 부위는 그 영역에서 발견된 균주에 따라 US-8, US-22 또는 US-23을 포함한 상이한 균주 접종물을 가졌다. 표 6은 1열은 품종을 나타내며, 2열은 LS 평균 백분율 및 감자 역병 감염을 나타내며, 3열은 p-값을 나타내며, 여기서 W8과 대조군 사이의 유의한 차이는 볼드체이고 밑줄이 그어져 있으며, 4열은 재래 품종의 평균값의 범위인 종래 품종 범위를 나타낸다.

표 6

품종	평균 백분율 잎 감자 역병 감염	P-값	CVR
대조군	58.3	<u><.0001</u>	18.8 - 100
W8	0.50	.	.

표 6에서 알 수 있듯이, W8에 대한 잎 감자 역병의 백분율의 현저한 감소가 러셋 버뱅크 대조군과 비교하여 발견되었는데, 이는 감자 역병 저항성 유전자가 W8의 감자 역병에 저항성을 부여하며 잎에서 효능이 있다는 결론을 뒷받침한다.

하기 표 7은 감염 백분율에 따라 결정된 W8 및 대조군의 덩이줄기 감자 역병 감염률의 결과를 나타낸다. 표 7, 1열은 감자 역병 분리체를 나타내며, 2열은 품종을 나타내며, 3열은 LS 평균 백분율 감자 역병 덩이줄기 감염을 나타내며 4열은 p-값을 나타내며, 여기서 W8과 대조군 사이의 유의한 차이는 볼드체이고 밑줄이 그어져 있다.

표 7

분리체	품종	평균 백분율 덩이줄기 감자 역병 감염	P-값
US-22	대조군	100.0	.
US-22	W8	51.0	<u><0.0001</u>
US-8	대조군	67.0	.
US-8	W8	21.1	<u><0.0001</u>

표 7에 나타난 것과 같이, 덩이줄기에서 백분율 감자 역병 감염의 현저한 감소는 US-22 및 US-8 분리체 모두에 대한 대조군과 비교하여 W8에 대해 발견하였다.

흑점 상처 저항력

흑점 상처는 감자산업에서 가장 중요한 품질 이슈 중 하나를 나타내는 상처가 난 덩이줄기에 영향을 미치는 변색이다. 병태는 폴리페놀옥시다제(Ppo)가 손상된 색소체로부터 세포질로 누수된 결과이다. 세포질에서, 이 효소는 폴리페놀을 산화한 다음, 어두운 침전물을 형성한다. pSIM1278 DNA 삽입체의 2개의 침묵 카세트 중 하나는 조절 요소들 사이에 역반복체로서 위치하는 *솔라눔 베루코숨(Solanum verrucosum)*으로부터의 Ppo5 유전자의 단편의 2개 복사체를 함유한다. 이 역반복체의 발현은 감자 Ppo5 유전자의 침묵을 유발하며 흑점 상처의 발생을 상당히 감소시킨다.

감자 종자 W8의 덩이줄기 및 흑점 상처에 취약한 대조군 러셋 버뱅크 품종의 덩이줄기를 흑점 상처 내성에 대해 2가지 방식으로 분석하였다.

덩이줄기 변색은 카테콜을 비롯한 페놀을 산화시킨 다음, 신속하게 중합하여 색소를 생성하는 화합물을 생성하는 폴리페놀옥시다제의 활성에 의해 야기된다. 흑점 상처 내성을 시험하기 위한 간접적인 방법은 1-ml 카테콜 (50 mM MOPS 속 25 mM, pH 6.5)을 덩이줄기의 절단면 상에 피펫팅하고 진갈색 침전물의 Ppo-의존적인 발색을 모니터링하는 것을 기초로 한다. 진갈색 침전물의 Ppo-의존적인 발색은 20분 후에 평가하였다. 감자 종자 W8에 대한 카테콜 분석법의 결과를 도 10에 도시된다. 도 10에서 도시된 바와 같이, 러셋 버뱅크 대조군은 진갈색으로 변하였으며, 이는 흑점 상처를 나타내는 반면, 감자 종자 W8은 진갈색으로 변하지 않았고, 이는 W8이 비형질전환된 러셋 버뱅크 대조군보다 흑점 상처에 대해 보다 저항성이라는 것을 나타내며 감소된 흑점 형질의 효능을 뒷받침한다.

상처 내성을 분석하는 두 번째 방법은 효소 분석법으로 PPO 활성을 측정하는 것이었다. L-DOPA의 도파크롬으로의 전환은 $A_{474nm} \cdot \Delta A_{474nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 을 측정하여 시간 경과에 따라 관찰되었으며, 이는 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg dw tuber}^{-1}$ 의 단위로 환산되었다. 표 8에 도시된 것과 같이, 효소 분석법은 W8은 러셋 버뱅크 대조군과 비교될 때 PPO 활성의 90% 감소($0.025 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg dw tuber}^{-1}$)를 나타낸다. W8 덩이줄기에서 감소된 활성은 Ppo5 유전자의 침묵을 통한 흑점 감소와 관련이 있었다.

표 8

[0148]

품종	PPO 활성 ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg dw tuber}^{-1}$)
러셋 버뱅크 W8	0.0018
러셋 버뱅크 대조군	0.0258

[0149]

아스파라긴 및 아크릴아마이드 수준

[0150]

감자 품종 W8의 덩이줄기는 표 9에 나타난 것과 같이, 수확시 대조군보다 유리 아스파라긴은 적었지만 아스파르트산, 글루타민 및 글루탐산은 더 많았다. W8에 대한 유리 아스파라긴, 아스파라긴산, 글루타민 및 글루탐산의 평균값은 모두 허용차 간격 및 합쳐진 문헌 범위 내에 있었고, 따라서 감자에 대한 정상적인 범위 내로 생각되었다. 표 9, 1열은 mg/100g의 아미노산을 나타내고, 2열은 품종을 나타내며, 3열은 LS 평균을 나타내며, 4열은 P-값을 나타내며, 여기서 W8과 대조군 러셋 버뱅크 사이의 유의한 차이는 볼드체이며 밑줄이 그어지며, 5열은 시험된 식물의 수를 나타내며 6열은 범위를 나타내며, 7열은 허용오차 범위(TI)를 나타내며, 8열은 Davies (1977), Shepherd et al. (2010), Lisinska and Leszczynski (1989)로부터 선택한 결합된 문헌 범위를 나타낸다.

표 9

[0151]

화합물	품종	평균	P-값	N	범위		TI		CLR	
					Min	Max	Min	Max	Min	Max
아스파라긴 (mg/100g)	W8	87.8	<.0001	41	62.1	140	.	.	.	.
	버뱅크	300	.	41	198	469	60.0	482	31.2	698
아스파르트산 (mg/100g)	W8	45.2	0.0032	41	32.8	63.9	.	.	.	.
	버뱅크	40.4	.	41	27.9	52.7	12.6	72.8	6.4	75.2
글루타민 (mg/100g)	W8	252	<.0001	41	203	335	.	.	.	.
	버뱅크	139	.	41	95.7	198	23.3	260	44.0	540
글루탐산 (mg/100g)	W8	51.3	<.0001	41	27.9	75.5	.	.	.	.
	버뱅크	40.8	.	41	26.0	72.0	10.2	80.3	45.0	74.2

[0152]

낮아진 아스파라긴, 프록토오스 및 글루코오스 수준이 가공된 감자 제품에서 아크릴아마이드의 전반적 감소를 유도하는데 이는 이들이 아크릴아마이드 형성시 반응물이기 때문이다. 아크릴아마이드를 감소시키는 효능을 입증하기 위해, W8 및 대조군 러셋 버뱅크의 필드 재배 덩이줄기를 수확시 및 정상 (46 °F) 및 차가운 (38 °F) 저장 온도에서 3, 6 및 9개월 동안 저장 후 분석하였고 결과를 표 10 및 표 11에 나타내었다. 아크릴아마이드를 시험하기 전에, W8 및 대조군 러셋 버뱅크를 감자튀김으로 만들었다. 표 10은 수확시 및 46 °F에서 저장 후 10억분의 1(ppb)로 감자튀김 아크릴아마이드 수준을 나타내며 표 11은 수확시 및 38 °F에서 저장 후 10억분의 1(ppb)로 감자튀김 아크릴아마이드 수준을 나타낸다. 표 10 및 표 11, 1열은 시험이 수행된 시기를 나타내고, 2열은 화합물을 나타내고, 3열은 품종을 나타내고, 4열은 ppb의 LS 평균 아크릴아마이드 수준을 나타내며, 5열은 P-값을 나타내며, W8과 대조군 사이의 유의한 차이는 볼드체이고 밑줄이 그어지며, 6열은 동일한 저장 시간에 대조군과 비교한 아크릴아마이드의 감소율을 나타내고, 7열은 시험된 덩이줄기의 수를 나타내며, 8열은 ppb의 아크릴아마이드 범위를 나타내고, 9열은 허용오차 범위(TI)를 나타낸다.

표 10

[0153]

시기	화합물	품종	평균 (ppb)	P-값	감소율	N	범위 (ppb)		TI (ppb)	
							Min	Max	Min	Max
신선	아크릴아마이드	W8	75.3	<.0001	85.0	41	32.7	185	10.0	1035
		버뱅크	503	.	.	41	229	971		
46°F에서 3개월	아크릴아마이드	W8	86.1	<.0001	80.9	9	74.5	94.3	10.0	599
		버뱅크	450	.	.	9	393	514		
46°F에서 6개월	아크릴아마이드	W8	68.3	0.0011	83.7	9	50.4	96.2	10.0	688
		버뱅크	420	.	.	9	330	528		

46°F에서 9개월	아크릴아마이드	W8	115	0.0013	78.2	9	90.7	156	10.0	1047
		버뱅크	528	.	.	9	429	740		

표 11

[0154]

시기	화합물	품종	평균 (ppb)	P-값	감소율	N	범위 (ppb)		TI (ppb)	
							Min	Max	Min	Max
38°F에서 6개월	아크릴아마이드	W8	203	<.0001	86.2	3	199	207	1155	1792
		버뱅크	1473	.	.	3	1450	1500		
38°F에서 9개월	아크릴아마이드	W8	212	<.0001	90.8	3	201	234	761	3839
		버뱅크	2300	.	.	3	2160	2380		

[0155]

표 10에 나타난 바와 같이, 수확시, W8 덩이줄기로 제조된 감자튀김은 대조군 러셋 버뱅크보다 85% 적은 아크릴아마이드를 함유하였다. 감자를 46°F에서 9개월 동안 저장했을 때, W8의 아크릴아마이드 수치는 러셋 버뱅크 대조군보다 78% 내지 83.7% 낮았다. 표 11에 나타난 것과 같이, 6 내지 9개월 동안 38°F에서 저장 후 W8 감자튀김의 아크릴아마이드 수치는 지속적으로 대조군보다 훨씬 낮았다.

[0156]

환원당 및 전화효소 침묵

[0157]

감자 종자 W8은 다수의 메커니즘에 의해 덩이줄기에서 환원당의 수준을 낮출 수 있는 발현 카세트를 함유한다. pSIM1278을 이용한 형질전환을 통해, 전분 관련 유전자(RI) 및 포스포릴라제-L 유전자(PhL)의 프로모터를 위한 침묵 카세트가 도입되었지만, pSIM1678을 사용한 형질전환은 전화효소 유전자를 위한 침묵 카세트를 도입하였다(Ye et al. 2010). 종합적으로, 이러한 특성은 전분과 수크로오스가 환원당(글루코오스와 프룩토오스)으로의 전환을 늦춤으로써 기능한다. 수확 후 1개월 쯤 분석할 때 RI와 PhL의 침묵이 환원당 수준을 낮췄지만(Collinge and Clark, 2013), 환원당의 주요 감소는 전화효소 침묵과 관련이 있는 것으로 보인다. RI, PhL 및 VInv를 침묵시키는 전반적인 이점에는 특히 색상 제어와 관련하여 향상된 품질이 포함되므로 대부분의 감자튀김 또는 칩 고객은 요구하는 원하는 황금 갈색 색상에 기여한다. 또한, 환원당은 아스파라긴과 같은 아미노산과 반응하여 아크릴아마이드를 포함하는 마이아르 생성물을 생산한다.

[0158]

pSIM1678의 VInv 유전자 침묵 카세트는 수크로오스를 글루코오스 및 프룩토오스로 전환시키는 효소인 액포성 전화효소의 수준을 감소시킨다. 감자에서 전화효소의 수준이 감소하면, 환원당 글루코오스 및 프룩토오스는 저장 동안 낮은 수준으로 유지되는 반면, 특히 감자튀김의 전형적인 보관 온도인 46 - 48°F로 유지될 때 증가한다. 전화효소 활성을 시험하기 전에, 덩이줄기를 1달 동안 39°F에 보관하였다. W8 및 러셋 버뱅크 대조군의 각각에 대한 세 복제물을 분석에 사용하였고 활성은 nmol/min/gm 덩이줄기의 단위로 글루코오스의 축적에 의해 측정하였다. 표 12에 나타난 대로, W8은 대조군 러셋 버뱅크와 비교하여 저온-저장 덩이줄기에서 액포성 전화효소 활성이 85% 감소했다. W8 덩이줄기에서 감소된 액포성 전화효소 활성은 표 13 및 14에 나타난 바와 같이 VInv 유전자로부터의 RNA 축적 감소 및 환원당 글루코오스 및 프룩토오스의 낮은 수준과 관련되어있다.

표 12

[0159]

품종	전화효소 활성 (nmole glu/min/mg tuber)	감소율
러셋 버뱅크 W8	1.37	85%
러셋 버뱅크 대조군	8.86	

[0160]

장기간의 저온 저장은 감자튀김 및 감자칩으로 1년 내내 가공하기 위한 고품질 감자의 적절한 공급을 유지하기 위해 필요하지만, 냉간-유도된 감미료(cold-induced sweetening, CIS)를 유도한다. CIS는 풍미 변화, 원치 않는 어두운 색상 및 증가된 양의 아크릴아마이드를 포함하는 고온에서 가공된 감자 제품에서 원하지 않는 부작용을 일으킨다. 액포성 산 전화효소(VInv)는 매우 낮은 온도에서 저장된 덩이줄기에서 글루코오스와 프룩토오스의 양을 증가시킬 때 CIS 과정에서 매우 중요한 효소이다(Zrenner 등, 1996). W8은 VInv 유전자의 발현을 억제하였고 따라서 러셋 버뱅크 대조군에 비해 저온 저장에서 글루코오스 및 프룩토오스 수준을 감소시키고 CIS를 감소시켰다. 환원당 감소를 유도하는 형질의 효능을 입증하기 위해, W8 및 형질전환된 대조군의 필드-재배 덩이줄기

를 수확시 및 정상(46°F) 및 저온 (38°F) 저장 온도에서 분석 하였다.

[0161]

환원당, 글루코오스 + 프룩토오스 및 비환원당인 수크로오스를 수확시 및 3개월, 6개월 및 9개월 저장 후 W8에서 시험하였다. 냉동 감자튀김용인 러셋 버뱅크 감자에는 일반적으로 사용되는 46°F 및 V_{Inv} 를 침묵시키고, 높은 수준의 환원당 없이 더 나은 품질을 제공할 수 있는 낮은 온도인 38°F의 두 개의 다른 저장 온도를 사용하였다. 수확시 및 모든 저장 시점과 온도에서, W8 덩이줄기는 표 13 및 14에 나타난 바와 같이 대조군에 비해 더 낮은 수준의 환원당 글루코오스 및 프룩토오스를 함유하였다. 수확시의 W8에 대한 모든 당 수치는 허용오차 범위 내에 있었고, 이는 대조군과의 조성물 증가를 나타낸다. 표 13은 수확시 및 46°F에서 3개월, 6개월, 9개월 동안 저장 후 프룩토오스 + 글루코오스와 수크로오스에 대한 감자 당 수치를 나타내며 표 14는 38°F에서 6개월 또는 9개월 동안 저장했을 때 프룩토오스 + 글루코오스와 수크로오스에 대한 감자 당 수치를 나타낸다. 표 13과 표 14, 1열은 시험이 수행된 시기를 나타내고, 2열은 품종을 나타내고, 3열은 mg/100g의 LS 평균 당 수준을 나타내며, 4열은 P-값을 나타내며, W8과 대조군 사이의 유의한 차이는 볼트체이고 밑줄이 그어지며, 5열은 시험된 덩이줄기의 수를 나타내며, 6열은 mg/100g의 당 범위를 나타내고, 7열은 허용오차 범위(TI)를 나타낸다.

표 13

[0162]

시기	품종	평균	P-값	N	범위		TI	
					Min	Max	Min	Max
프룩토오스 + 글루코오스 (mg/100g)								
신선	W8	38.4	<u>0.0002</u>	41	9.68	106	1.00	424
	대조군	146	.	41	14.0	406		
46°F에서 3개월	W8	122	<u>0.0056</u>	9	54.1	210	1.00	996
	대조군	483	.	9	298	598		
46°F에서 6개월	W8	116	<u><.0001</u>	9	20.8	310	1.00	640
	대조군	261	.	9	153	459		
46°F에서 9개월	W8	106	<u>0.032</u>	9	79.7	160	1.00	648
	대조군	224	.	9	105	372		
수크로오스 (mg/100g)								
신선	W8	395	<u><.0001</u>	41	161	775	1.00	512
	대조군	241	.	41	113	558		
46°F에서 3개월	W8	651	<u><.0001</u>	9	520	738	1.00	1125
	대조군	148	.	9	56.2	228		
46°F에서 6개월	W8	202	<u>0.0021</u>	9	177	229	1.00	345
	대조군	97.6	.	9	80.1	144		
46°F에서 9개월	W8	146	<u><.0001</u>	9	105	201	10.4	103
	대조군	56.9	.	9	44.8	77.3		

표 14

[0163]

시기	품종	평균	P-값	N	범위		TI	
					Min	Max	Min	Max
프룩토오스 + 글루코오스 (mg/100g)								
38°F에서 6개월	W8	91.7	<u>0.0002</u>	3	83.7	97.4	1.00	1586
	대조군	640	.	3	590	726		
38°F에서 9개월	W8	151	<u><.0001</u>	3	102	188	183	1586
	대조군	754	.	3	703	788		
수크로오스 (mg/100g)								
38°F에서 6개월	W8	963	<u><.0001</u>	3	945	986	1.00	661
	버뱅크	182	.	3	138	206		
38°F에서 9개월	W8	645	<u><.0001</u>	3	598	714	1.00	325
	버뱅크	152	.	3	137	163		

[0164]

표 13 및 14에 나타난 바와 같이, 모든 W8 덩이줄기는 수확시 및 38°F 및 46°F에서 다중 저장 시간 이후에 대조

군 샘플보다 많은 수크로오스를 함유하였다. W8에서 *VInv* 유전자를 침묵시킨 최종 결과는 더 낮은 수준의 환원당과 더 높은 수준의 수크로오스이다. 이러한 변화는 수확시 및 최대 9개월의 저장 기간 동안 관찰된다. 저장 시간에 따라 W8에서 환원당이 증가하나, 러셋 버뱅크 대조군보다 일관되게 낮게 유지된다. 38°F에서 저장했을 때 대조군에 비해 W8에서 훨씬 낮은 수준의 환원당이 관찰되었으며, 이는 저온 저장은 W8에 적합하다는 것을 암시한다. 모든 경우에 환원당의 현저한 감소는 수크로오스의 높은 수준과 연관된다. 온도가 낮을수록 호흡작용이 줄어들지만 질병으로 인한 손실도 줄어들 것으로 예상된다.

[0165] 러셋 버뱅크 감자 품종 W8은 감자역병에 대한 저항성을 증가시키고, 흑점을 일으키는 효소의 발현을 감소시키고, 감소된 아스파라긴과 환원당의 감소된 수준을 통해 아크릴아마이드를 감소시킴으로써 품질을 향상시키는 감자산업의 요구를 해결한다.

[0166] 본 발명의 추가 실시태양

[0167] 상기에서 지칭되는 유리한 특징들을 조합하는 감자 품종을 도출하는 연구는 대체로 경험적이다. 이러한 연구는 시간, 노동 및 자본의 광범위한 투자를 필요로 한다. 감자 종자의 개발은 종종, 온실에서 상업적인 이용까지 최대 8년 이상 걸릴 수 있다. 육종은 가장 중요한 특징들을 자손에게 혼입하기 위해 우수한 부모를 신중하게 선별하는 데에서 시작된다. 원하는 모든 형질들이 통상적으로 단 1회의 교배로는 나타나지 않기 때문에, 육종은 누적되어야 한다.

[0168] 현재의 육종 기술은 부모 클론의 조절된 수분(pollination)을 계속한다. 전형적으로, 화분은 이후에 암컷 부모를 수분하는 데 사용하기 위해 젤라틴 캡슐에 수집된다. 잡종 씨앗은 온실에서 파종되고, 덩이줄기는 수천 개의 개별 묘목으로부터 수확 및 보유된다. 이듬해에, 각각의 생성되는 묘목으로부터 1개 내지 4개의 덩이줄기를 필드에 심고, 필드는 바이러스 및 질병의 확산을 방지하기 위해 극도의 주의를 기울이도록 한다. 이 첫째 묘목 작물로부터, 선별 과정에서 생존한 각각의 잡종 개체 유래의 몇몇 "씨앗" 덩이줄기를 이듬해의 식재(planting)를 위해 보유한다. 2년째가 지난 후, 상업적인 용도로서의 덩이줄기의 적합성을 결정하기 위해 밀도 측정 및 프라이 시험용으로 검체를 채취하였다. 그런 다음, 이때까지 선별 과정에서 생존한 식물들, 보다 포괄적인 일련의 프라이 시험 및 밀도 측정을 위해 3번째 해에 확장된 부피로 심었다. 4년째의 개발 단계에서, 상이한 생존 조건에 대한 이들의 적응성을 측정하기 위해, 몇몇 주에서 생존 선별을 필드 시험으로 수행하였다. 결국, 우수한 품질을 가진 품종이 다른 농장으로 전달되며, 씨앗은 상업적인 규모로 증가하였다. 일반적으로, 이때까지, 새로운 개량된 감자 종자를 개발하기 위해서는 식재, 수확 및 시험까지 8년 이상이 투자되어 왔다.

[0169] 특이적인 단백질 생성물을 암호화하는 유전자의 단리 및 특징화를 가능하게 하는 분자 생물학적 기술의 출현으로, 식물 생물학 분야의 과학자들은, 식물의 형질을 특이적인 방식으로 변경시키기 위해, 외래 유전자, 또는 고유한 또는 내인성 유전자의 부가적인 또는 변형된 버전(아마도 상이한 프로모터들에 의해 유도됨)을 포함하고 발현하도록 식물의 게놈을 조작하는데 큰 관심을 나타내었다. 이러한 외래의 부가적인 및/또는 변형된 유전자는 본원에서 종합적으로 "이식유전자"로서 지칭된다. 지난 15년 내지 20년 동안, 유전자이식 식물을 생산하는 몇몇 방법들이 개발되어 왔으며, 본 발명, 특히 실시태양은 또한, 청구되는 품종 또는 라인의 형질전환된 버전에 관한 것이다.

[0170] 식물 형질전환은, 식물 세포에서 작용할 발현 벡터의 구축을 수반한다. 이러한 벡터는 조절 요소(예를 들어, 프로모터)의 조절하의 또는 조절 요소에 작동가능하게 연결되는 유전자를 포함하는 DNA를 포함한다. 발현 벡터는 이러한 작동가능하게 연결되는 유전자/조절 요소 조합을 하나 이상 함유할 수 있다. 벡터(들)는 플라스미드 형태로 있을 수 있으며, 이식유전자를 감자식물(들)의 유전적 물질 내로 혼입하기 위해 후술되는 바와 같이 형질전환 방법을 이용하여 형질전환된 감자식물을 생산하기 위해, 단독으로 또는 다른 플라스미드와 조합되어 사용될 수 있다.

[0171] 전통적인 식물 육종은 전형적으로, 새롭고 개량된 특징을 가진 품종을 제조하기 위해, 식물 염색체의 무작위 재조합에 의존한다. 표준의 잘 공지된 기술에 따르면, 유전자 및 조절 요소를 포함하는 유전적 "발현 카세트"는 *아그로박테리움*-단리된 전달 DNA("T-DNA")의 경계 내에 삽입되고, 식물 게놈 내로 통합된다. T-DNA 물질의 *아그로박테리움*-매개 전달은 전형적으로 하기의 표준 절차를 포함한다: (1) 적어도 하나는 외래 기원의 것인 유전적 요소의 시험관 내 재조합에 의해, 형질전환 선별용 발현 카세트를 제조하는 단계, (2) 이 발현 카세트를, 종종 외래 DNA를 함유하는 적어도 하나의 다른 발현 카세트와 함께, 통상 T-DNA 경계 서열의 측면에 존재하는 *아그로박테리움* DNA의 염기쌍 수백 개로 구성되는 바이너리 벡터의 T-DNA 영역 내로 삽입하는 단계, (3) 종종 *아그로박테리움* 유래의 부가적인 바이너리 벡터 서열의 일부 또는 모두와 수반되는, T-DNA 경계들 사이에 위치하는 서열을 식물 세포로 전달하는 단계, 및 (4) 수율 증가, 개량된 활력, 질병 및 곤충에 대한 내성 증가, 또는 스트

레스 하에서의 생존능 증가와 같은 원하는 형질을 나타내는, 안정하게 형질전환된 식물 세포를 선별하는 단계.

- [0172] 따라서, 유전자 조작 방법은 프로모터 및 종결자와 같은 조절 요소, 및 새로운 형질의 발현에 관여하거나 또는 형질전환체의 확인 및 선별을 위한 마커로서 작용하는 유전자를 포함하는, 바이러스, 박테리아 및 식물로부터의 외래의 비-토종 핵산의 도입에 의존한다. 마커 유전자는 전형적으로, 박테리아 소스로부터 유래되며, 항생제내성 또는 제초제저항성을 부여한다. 전형적인 육종 방법은 힘들며 시간 소모적이고, 새로운 품종은 전형적으로 단지 상대적으로 중간 정도의 개량을 나타낸다.
- [0173] "안티센스" 기술에서, 유전자이식 식물에서 유전자의 발현을 침묵시키기 위해 고유한 유전자의 서열은 도치(invert)된다. 그러나, 도치된 DNA는 통상, 식물 발달을 방해하고/하거나 이들의 영양가를 감소시키기 때문에 바람직하지 않을 수 있는 외래 아미노산 서열을 암호화하는, 프로모터와 종결자 사이에 삽입되는, 새로운 비특정화된 오픈 리딩 프레임에 함유한다.
- [0174] 감자 형질전환용 발현 벡터: 마커 유전자
- [0175] 발현 벡터는 마커를 함유하는 형질전환된 세포가 음성 선별, 즉, 선별성 마커 유전자를 함유하지 않는 세포의 성장을 저해함으로써 회수되거나, 양성 선별, 즉, 유전적 마커에 의해 암호화되는 생성물을 스크리닝함으로써 회수되게 하는 조절 요소(예를 들어, 프로모터)에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 유전적 마커를 포함한다. 식물 형질전환에 보편적으로 사용되는 다수의 선별성 마커 유전자는 형질전환 분야에 잘 공지되어 있으며, 예를 들어, 항생제 또는 제초제일 수 있는 선별성 화학제를 대사적으로 해독시키는 효소를 코딩하는 유전자, 또는 저해제에 둔감한 변경된 표적을 암호화하는 유전자를 포함한다. 소수의 양성 선별 방법이 또한 당해 기술분야에 공지되어 있다.
- [0176] 식물 형질전환에 보편적으로 사용되는 하나의 선별성 마커 유전자는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 II(nptII) 유전자로서, 식물 조절 신호의 조절하에서 카나마이신에 대한 저항성을 부여한다. Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:4803 (1983). 보편적으로 사용되는 또 다른 선별성 마커 유전자는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자로서, 항생제 하이그로마이신에 대한 저항성을 부여한다. Vanden Elzen et al., Plant Mol. Biol., 5:299 (1985).
- [0177] 항생제에 대한 저항성을 부여하는, 박테리아 기원의 부가적인 선별성 마커 유전자는 겐타마이신 아세틸 트랜스퍼라제, 스트렙토마이신 포스포트랜스퍼라제 및 아미노글리코사이드-3'-아데닐 트랜스퍼라제, 블레오마이신 내성 결정인자를 포함한다. Hayford et al., Plant Physiol. 86:1216 (1988), Jones et al., Mol. Gen. Genet., 210:86 (1987), Svab et al., Plant Mol. Biol. 14:197 (1990) Hille et al., Plant Mol. Biol. 7:171 (1986). 다른 선별성 마커 유전자는 글리포세이트, 글루포시네이트 또는 브로록시닐(bromoxynil)과 같은 제초제에 대한 저항성을 부여한다. Comai et al., Nature 317:741-744 (1985), Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2:603-618 (1990) and Stalker et al., Science 242:419-423 (1988).
- [0178] 박테리아 기원은 아니지만 식물 형질전환용의 선별성 마커 유전자는 예를 들어, 마우스 다이하이드로폴레이트 리덕타제, 식물 5-에놀피루빌쉬키메이트(enolpyruvylshikimate)-3-포스페이트 신타아제 및 식물 아세토타레이트 신타아제를 포함한다. Eichholtz et al., Somatic Cell Mol. Genet. 13:67 (1987), Shah et al., Science 233:478 (1986), Charest et al., Plant Cell Rep. 8:643 (1990).
- [0179] 식물 형질전환용의 또 다른 부류의 마커 유전자는 형질전환된 세포를 항생제와 같은 독성 성분에 대한 저항성에 대해 직접적으로 유전적 선별을 하기보다는 추정상 형질전환된 식물 세포를 스크리닝하는 것을 필요로 한다. 이들 유전자는 특히, 특이적인 조직에서 유전자 발현의 공간적인 패턴을 정량화하거나 시각화하는 데 유용하며, 유전자 발현의 조사를 위해 유전자 또는 유전자 조절 서열에 융합될 수 있기 때문에 종종 리포터 유전자로서 지칭된다. 추정적으로 형질전환된 세포의 스크리닝에 보편적으로 사용되는 유전자는 β -글루쿠로니다제(GUS), β -갈락토시다제, 루시페라제 및 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제를 포함한다. Jefferson, R.A., Plant Mol. Biol. Rep. 5:387 (1987), Teeri et al., EMBO J. 8:343 (1989), Koncz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:131 (1987), DeBlock et al., EMBO J. 3:1681 (1984).
- [0180] 식물조직의 파괴를 필요로 하지 않는 GUS 활성을 생체 내에서 시각화하는 방법이 이용가능하다. Molecular Probes publication 2908, IMAGE GREEN, p. 1-4 (1993) 및 Naleway et al., J. Cell Biol. 115:151a (1991). 그러나, 이들 GUS 활성의 생체 내 시각화 방법은 낮은 민감도, 높은 형광 백그라운드 및 루시페라제 유전자를 선별성 마커로서 사용하는 것과 연관된 제한점들로 인해, 형질전환된 세포의 회수에 유용한 것으로 입증되지 않았다.

- [0181] 보다 최근, 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 유전자는 원핵 세포 및 진핵 세포에서 유전자 발현용 마커로서 이용되어 왔다. Chalfie et al., Science 263:802 (1994). GFP, 및 GFP의 돌연변이체는 스크리닝가능한 마커(screenable marker)로서 사용될 수 있다.
- [0182] 감자 형질전환용 발현 벡터: 프로모터
- [0183] 발현 벡터에 포함된 유전자는 프로모터와 같은 조절 요소를 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 구동되어야 한다. 몇몇 유형의 프로모터들은 단독으로 또는 프로모터와 조합되어 사용될 수 있는 다른 조절 요소들과 마찬가지로, 형질전환 분야에 잘 알려져 있다.
- [0184] 본 발명에서 사용된 것과 같이, "프로모터"는, 전사의 시작부로부터 업스트림에 있으면서, 전사를 개시하기 위해 RNA 폴리머라제 및 다른 단백질의 인지 및 결합에 관여하는 DNA 영역에 대한 참조를 포함한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. 발달 조절하에서 프로모터의 예는 잎, 뿌리, 씨앗, 섬유, 물관(xylem vessel), 헛물관(tracheid) 또는 후막조직(sclerenchyma)과 같은 소정의 조직에서 전사를 우선적으로 개시하는 프로모터를 포함한다. 이러한 프로모터는 "조직-우선적인" 것으로 지칭된다. 소정의 조직에서만 전사를 개시하는 프로모터는 "조직-특이적인" 것으로 지칭된다. "세포-유형" 특이적인 프로모터는 주로, 하나 이상의 기관에 존재하는 소정의 유형의 세포, 예를 들어, 뿌리 또는 잎의 관다발 세포에서 발현을 유도한다. "유도성" 프로모터는 환경적인 조절하에 존재하는 프로모터이다. 유도성 프로모터에 의한 전사에 영향을 미칠 수 있는 환경적인 조건의 예로는, 혐기성 조건 또는 광(light)의 존재를 포함한다. 조직-특이적인 프로모터, 조직-우선적인 프로모터, 세포 유형 특이적인 프로모터 및 유도성 프로모터는 "비-구성적" 프로모터의 부류를 구성한다. "구성적" 프로모터는 대부분의 환경적 조건하에 활성인 프로모터이다.
- [0185] A. 유도성 프로모터
- [0186] 유도성 프로모터는 감자에서 발현될 유전자에 작동가능하게 연결된다. 선택적으로, 유도성 프로모터는, 감자에서 발현될 유전자에 작동가능하게 연결되는 신호 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된다. 유도성 프로모터를 이용하여, 전사율은 유도제에 반응하여 증가한다.
- [0187] 임의의 유도성 프로모터가 본 발명에 사용될 수 있다. Ward et al., Plant Mol. Biol. 22:361-366 (1993)을 참조한다. 예시적인 유도성 프로모터로는, 구리에 반응하는 ACEI 시스템(Mett et al., PNAS 90:4567-4571 (1993)); 벤젠설폰아미드 제조제 약해 경감제에 반응하는, 옥수수 유래의 In2 유전자(Hershey et al., Mol. Gen. Genetics 227:229-237 (1991) 및 Gatz et al., Mol. Gen. Genetics 243:32-38 (1994)) 또는 Tn10 유래의 Tet 억제제(Gatz et al., Mol. Gen. Genetics 227:229-237 (1991))를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 특히 바람직한 유도성 프로모터는 식물이 정상적으로 반응하지 않는 유도제에 반응하는 프로모터이다. 예시적인 유도성 프로모터는 스테로이드 호르몬 유전자 유래의 유도성 프로모터로서, 이의 전사 활성은 글루코코르티코스테로이드 호르몬에 의해 유도된다. Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421 (1991).
- [0188] B. 구성적 프로모터
- [0189] 구성적 프로모터는 감자에서 발현될 유전자에 작동가능하게 연결되거나, 구성적 프로모터는 감자에서 발현될 유전자에 작동가능하게 연결되는 신호 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0190] 다수의 상이한 구성적 프로모터들이 본 발명에 이용될 수 있다. 예시적인 구성적 프로모터로는 식물 바이러스 유래의 프로모터, 예컨대 CaMV 유래의 35S 프로모터(Odell et al., Nature 313:810-812 (1985)) 및 쌀 액틴(McElroy et al., Plant Cell 2: 163-171 (1990)); 유비퀴틴(Christensen et al., Plant Mol. Biol. 12:619-632 (1989) 및 Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18:675-689 (1992)); pEMU(Last et al., Theor. Appl. Genet. 81:581-588 (1991)); MAS(Velten et al., EMBO J. 3:2723-2730 (1984)) 및 옥수수 H3 히스톤(Lepetit et al., Mol. Gen. Genetics 231:276-285 (1992) 및 Atanassova et al., Plant Journal 2 (3): 291-300 (1992))과 같은 유전자 유래의 프로모터를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0191] 브라씨카 나푸스(Brassica napus) ALS3 구조 유전자(또는 상기 Xba1/NcoI 단편과의 뉴클레오타이드 서열 유사성)에 대해 5' Xba1/NcoI 단편인 ALS 프로모터는 특히 유용한 구성적 프로모터를 나타낸다. PCT 출원 WO 96/30530을 참조한다.
- [0192] C. 조직-특이적 또는 조직-선택적 프로모터
- [0193] 조직-특이적 프로모터는 감자에서 발현용 유전자에 작동가능하게 연결된다. 선택적으로, 조직-특이적인 프로모터는, 감자에서 발현용 유전자에 작동가능하게 연결되는 신호 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가

능하게 연결된다. 조직-특이적인 프로모터에 작동가능하게 연결된 관심 유전자로 형질전환된 식물은 이식유전자의 단백질 생성물을 특이적인 조직에서 배제적으로 또는 우선적으로 생성한다.

[0194] 임의의 조직-특이적인 프로모터 또는 조직-우선적인 프로모터가 본 발명에 이용될 수 있다. 예시적인 조직-특이적인 프로모터 또는 조직-우선적인 프로모터는 파세올린(phaseolin) 유전자의 유래의 것과 같은 뿌리-선호적인 프로모터(Murai et al., Science 23:476-482 (1983) 및 Sengupta-Gopalan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3320-3324 (1985)); cab 또는 루비스코(rubisco) 유래의 것과 같은 잎-특이적인 프로모터 및 광-유도성 프로모터(Simpson et al., EMBO J. 4(11):2723-2729 (1985) 및 Timko et al., Nature 318:579-582 (1985)); LAT52 유래의 것과 같은 꽃밥-특이적인 프로모터(Twell et al., Mol. Gen. Genetics 217:240-245 (1989)); Zm13 유래의 것과 같은 화분-특이적인 프로모터(Guerrero et al., Mol. Gen. Genetics 244:161-168 (1993)) 또는 apg 유래의 것과 같은 소포자-선호적인 프로모터 (Twell et al., Sex. Plant Reprod. 6:217-224 (1993))를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0195] 단백질을 하위세포(subcellular) 구획으로 표적화하기 위한 신호 서열

[0196] 이식유전자에 의해 생성되는 단백질을 엽록체, 액포, 퍼옥시좀, 글리옥시좀, 세포벽 또는 미토콘드리아와 같은 하위세포 구획으로 수송하거나, 아포플라스트(apoplast) 내로 분비하는 것은 신호 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을, 관심 단백질을 암호화하는 유전자의 5' 및/또는 3' 영역에 작동가능하게 연결함으로써 달성된다. 구조 유전자의 5' 및/또는 3' 말단에 있는 서열을 표적화하는 것은 단백질 합성 및 가공 동안에, 인코딩된 단백질이 궁극적으로 구획화되는 곳을 결정할 수 있다.

[0197] 신호 서열의 존재는, 폴리펩타이드를 세포내 소기관 또는 하위세포 구획으로 인도하거나 아포플라스트로 분비되게 한다. 다수의 신호 서열들이 당해 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, Becker et al., Plant Mol. Biol. 20:49 (1992); Close, P.S., Master's Thesis, Iowa State University (1993); Knox, C., et al., Plant Mol. Biol. 9:3-17 (1987); Lerner et al., Plant Physiol. 91:124-129 (1989); Frontes et al., Plant Cell 3:483-496 (1991); Matsuoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:834 (1991); Gould et al., J. Cell. Biol. 108:1657 (1989); Creissen et al., Plant J. 2:129 (1991); Kalderon, et al., Cell 39:499-509 (1984); Steifel, et al., Plant Cell 2:785-793 (1990)을 참조한다.

[0198] 외래 단백질 유전자 및 작물 유전자

[0199] 본 발명에 따른 유전자이식 식물을 이용하여, 외래 단백질은 상업적인 양으로 생성될 수 있다. 따라서, 당해 기술분야에서 양호하게 이해되는 형질전환된 식물의 선별 및 번식 기술은 통상적인 방식으로 수확되는 복수의 유전자이식 식물을 제공하며, 그런 다음, 외래 단백질은 관심 조직 또는 총 바이오매스로부터 추출될 수 있다. 식물 바이오매스로부터의 단백질 추출은, 예를 들어, Heney and Orr, Anal. Biochem. 114:92-6 (1981)에서 논의된 공지된 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0200] 바람직한 실시태양에 따르면, 외래 단백질의 상업적인 생성을 위해 제공되는 유전자이식 식물은 감자식물이다. 또 다른 바람직한 실시태양에서, 관심 바이오매스는 씨앗 또는 덩이줄기이다. 보다 높은 발현 수준을 나타내는 상대적으로 소수의 유전자이식 식물의 경우, 유전자 지도는 통합된 DNA 분자의 거의 정확한 염색체 위치를 확인하는 종래의 RFLP, PCR 및 SSR 분석을 통해 주로 제작될 수 있다. 이러한 면에서, 예시적인 방법에 대해서는, Glick and Thompson, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology CRC Press, Boca Raton 269:284 (1993)를 참조한다. 염색체 위치에 관한 지도 정보는 대상(subject) 유전자이식 식물의 소유권 보호(proprietary protection)에 유용하다. 승인되지 않은 번식이 수행되고 다른 생식질(germplasm)과 교배 제조되는 경우, 통합 영역의 지도는 의심(suspect) 식물에 대한 유사한 지도와 비교되어, 의심 식물이 대상 식물과 공통적인 혈통(parentage)을 가지는지 결정할 수 있다. 지도 비교는 혼성화, RFLP, PCR, SSR 및 서열화를 수반할 것이며, 이들 모두는 종래 기술이다.

[0201] 마찬가지로, 본 발명에 의해, 작물 유전자는 형질전환된 식물에서 발현될 수 있다. 보다 특히, 식물은 대상 작물의 다양한 표현형들을 발현하도록 유전적으로 조작될 수 있다. 이러한 면에서 연루되는 예시적인 유전자로는, 하기에서 범주화되는 것들을 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다:

[0202] 1. 해충 또는 질병에 대한 내성을 부여하며 암호화하는 유전자:

[0203] A. 식물 내병성 유전자. 식물 방어는 종종, 식물 내의 내병성 유전자(R)의 생성물과 병원체 내의 상응하는 비병원성(avirulence; Avr) 유전자의 생성물 간의 특이적인 상호작용에 의해 활성화된다. 식물품종은 특이적인 병원체 균주에 내성인 식물을 조작하기 위해, 클로닝된 내성 유전자(들)로 형질전환될 수 있다. 예를 들어 Jones et

al., Science 266:789 (1994)(클라드로스포리움 풀붐(*Cladosporium fulvum*)에 내성인 토마토 Cf-9 유전자의 클로닝); Martin et al., Science 262:1432 (1993)(슈도모나스 사이린개 pv.(*Pseudomonas syringae* pv.) 토마토에 내성인 토마토 Pto 유전자는 단백질 키나아제를 암호화한다); Mindrinos et al. Cell 78:1089 (1994)(슈도모나스 사이린개에 대한 내성을 위한 아라비도시스(*Arabidopsis*) RSP2 유전자)를 참조한다.

- [0204] B. 대두 포낭 선충병(cyst nematode)과 같은 해충에 대한 저항성을 부여하는 유전자. 예를 들어, PCT 출원 WO96/30517; PCT 출원 WO93/19181을 참조한다.
- [0205] C. 바실러스 투린지엔시스 단백질, 이의 유도체 또는 이를 토대로 모델링된 합성 폴리펩타이드. 예를 들어, Bt δ -내독소 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 클로닝을 개시하는 Geiser et al., Gene 48:109 (1986)을 참조한다. 더욱이, δ -내독소 유전자를 암호화하는 DNA 분자는 예를 들어, ATCC 등록 번호 40098, 67136, 31995 및 31998 하에 미국 버지니아주 머내서스의 American Type Culture Collection로부터 구매할 수 있다.
- [0206] D. 렉틴. 예를 들어, 몇몇 클리바 미니아타(*Clivia miniata*) 만노스-결합 렉틴 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 개시하는 Van Damme et al., Plant Molec. Biol. 24:25 (1994)을 참조한다.
- [0207] E. 아비딘과 같은 비타민-결합 단백질. 아비딘 및 아비딘 호모로그를 해충에 대한 유충제로서 사용하는 것을 교시하는 PCT 출원 US 93/06487을 참조한다.
- [0208] F. 효소 저해제, 예를 들어, 프로테아제 또는 프로티나제(proteinase) 저해제 또는 아밀라제 저해제. 예를 들어, Abe et al., J. Biol. Chem. 262:16793 (1987)(쌀 시스테인 프로티나제 저해제의 뉴클레오타이드 서열), Huub et al., Plant Molec. Biol. 21:985 (1993)(담배 프로티나제 저해제 I을 암호화하는 cDNA의 뉴클레오타이드 서열), Sumitani et al., Biosci.Biotech.Biochem.57:1243 (1993)(스트렙토마이세스 니트로스포레우스(*Streptomyces nitrosporeus*) α -아밀라제 저해제의 뉴클레오타이드 서열) 및 미국 특허 5,494,813(Hepher 및 Atkinson, 1996년 2월 27일에 발행됨)을 참조한다.
- [0209] G. 곤충-특이적인 호르몬 또는 페로몬, 예컨대 엑디스테로이드 또는 유충 호르몬, 이의 변이체, 이를 기재로 하는 모방제(mimetic), 또는 이의 길항제 또는 작용제. 예를 들어, 유충 호르몬의 불활성화제인 클로닝된 유충 호르몬 에스터라제의 바칼로바이러스 발현에 대한 개시내용인 Hammock et al., Nature 344:458 (1990)을 참조한다.
- [0210] H. 발현 시, 병에 걸린 해충의 생리작용을 방해하는 곤충-특이적인 펩타이드 또는 신경펩타이드. 예를 들어, Regan, J. Biol. Chem. 269:9 (1994)(발현 클로닝은 곤충 이노 호르몬 수용체에 대한 DNA 코딩을 제공함), 및 Pratt et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 163:1243 (1989)(알로스타틴(allostatin)은 디플롭테라 폰타타(*Diploptera punctata*)에서 확인됨)의 개시내용을 참조한다. 또한, 곤충-특이적인 기생충 신경독소를 암호화하는 유전자를 개시하는 Tomalski 등의 미국 특허 5,266,317을 참조한다.
- [0211] I. 뱀, 말벌 등에 의해 자연상에서 생성되는 곤충-특이적인 독. 예를 들어, 전갈 곤충독성 펩타이드를 코딩하는 유전자의 식물에서의 이중성 발현에 대한 개시내용은 Pang et al., Gene 116:165 (1992)을 참조한다.
- [0212] J. 모노테르펜, 세스퀴테르펜, 스테로이드, 하이드록삼산(hydroxamic acid), 페닐프로파노이드 유도체, 또는 살충 활성을 가진 또 다른 비-단백질 분자의 과잉축적에 관여하는 효소.
- [0213] K. 생물학적 활성 분자의 번역 후 변형을 비롯한 변형에 관여하는 효소; 예를 들어, 천연 또는 합성이든지간에, 당분해 효소, 단백질분해 효소, 지질분해 효소, 뉴클레아제, 사이클라제, 트랜스아미나제, 에스터라제, 하이드롤라제, 포스파타제, 키나아제, 포스포릴라제, 폴리머라제, 엘라스타제, 키티나제 및 글루카나제. 칼라제(callase) 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 개시하는 PCT 출원 WO 93/02197(Scott 등)을 참조한다. 키티나제-암호화 서열을 함유하는 DNA 분자는 예를 들어, 등록 번호 39637 및 67152 하에 ATCC로부터 수득될 수 있다. 또한, 담배 박각시나방 키티나제를 암호화하는 cDNA의 뉴클레오타이드 서열을 교시하는 Kramer et al., Insect Biochem. Molec. Biol. 23:691 (1993), 및 파슬리 ubi4-2 폴리우비퀴틴 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 Kawalleck et al., Plant Molec.Biol. 21:673 (1993)을 참조한다.
- [0214] L. 신호 형질도입을 자극하는 분자. 예를 들어, 녹두 칼모둘린 cDNA 클론에 대한 뉴클레오타이드 서열에 대한 Botella et al., Plant Molec. Biol. 24:757 (1994)의 개시내용, 및 옥수수 칼모둘린 cDNA 클론의 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 Griess et al., Plant Physiol. 104:1467 (1994)의 개시내용을 참조한다.
- [0215] M. 소수성 모멘트 펩타이드. 진균 식물 병원체를 저해하는 타카이플레신(Tachyplesin)의 펩타이드 유도체를 개시하는 PCT 출원 WO95/16776, 및 내병성을 부여하는 합성 항균 펩타이드를 교시하는 PCT 출원 WO95/18855를 참

조한다.

- [0216] N. 막 투과효소, 채널 형성제 또는 채널 차단제. 예를 들어, 슈도모나스 솔라나세아룸(*Pseudomonas solanacearum*)에 저항성인 유전자이식 담배 식물이 되게 하는, 세크로핀- β 분해성 펩타이드 유사체의 이중성 발현에 대한 Jaynes et al., *Plant Sci* 89:43 (1993)의 개시내용을 참조한다.
- [0217] O. 바이러스-침습성 단백질 또는 이로부터 유래되는 복합체 독소. 예를 들어, 형질전환된 식물 세포에서 바이러스 코트 단백질의 축적은, 코트 단백질 유전자가 유래되는 바이러스뿐만 아니라 관련 바이러스에 의해 영향을 받는 바이러스 감염 및/또는 질병 발병에 대한 저항성을 제공한다. Beachy et al., *Ann. Rev. Phytopathol.* 28:451 (1990)을 참조한다. 코트 단백질-매개의 저항성은 알팔파 모자이크 바이러스, 오이 모자이크 바이러스 및 담배 모자이크 바이러스에 대한 형질전환된 식물에서 부여되었다.
- [0218] P. 곤충-특이적인 항체 또는 이로부터 유래되는 면역독소. 따라서, 곤충의 장(insect gut)에서 중요한 대사 작용을 표적으로 하는 항체는 영향을 받는 효소를 불활성화시켜, 곤충을 살해할 것이다. Taylor et al., Abstract #497, Seventh Int'l Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions (Edinburgh, Scotland) (1994)(단일-사슬 항체 단편의 생성을 통한, 유전자이식 식물 담배에서 효소적 불활성화)을 참조한다.
- [0219] Q. 바이러스-특이적인 항체. 예를 들어, 재조합 항체 유전자를 발현하는 유전자이식 식물이 바이러스 공격으로부터 보호된다는 것을 보여주는, Tavladoraki et al., *Nature* 366:469 (1993)를 참조한다.
- [0220] R. 병원체 또는 기생충에 의해 자연상에서 생성되는 발달-억제성 단백질. 따라서, 균류의 엔도- α -1,4-D-폴리갈라투로나제는 식물 세포벽 호모- α -1,4-D-갈락투로나제를 용해함으로써 식물 영양분 방출 및 균류의 콜로니화를 용이하게 한다. Lamb et al., *Bio/Technology* 10:1436 (1992)을 참조한다. 콩 엔도폴리갈락투로나제-저해 단백질을 암호화하는 유전자의 클로닝 및 특징화는 Toubart et al., *Plant J.* 2:367 (1992)에 의해 기술되어 있다.
- [0221] S. 자연상에서 식물에 의해 생성되는 발달-억제성 단백질. 예를 들어, Logemann et al., *Bio/Technology* 10:305 (1992)는 보리 리보솜-불활성화 유전자를 발현하는 유전자이식 식물은 진균 질병에 대한 증가된 내성을 가짐을 보여주었다.
- [0222] T. 전신성 획득 저항성(Systemic Acquired Resistance; SAR) 반응에 관여하는 유전자 및/또는 발병-관련 유전자. Briggs, S. *Current Biology*, 5(2) (1995).
- [0223] U. 항진균 유전자. Cornelissen and Melchers, *Plant Physiol.*, 101:709-712 (1993); Parijs et al., *Planta* 183:258-264 (1991) 및 Bushnell et al., *Can. J. of Plant Path.* 20(2):137-149 (1998)를 참조한다.
- [0224] V. 역병(*Phytophthora blight*)에 대한 내성을 부여하는 유전자, 예컨대 R1, R2, R3, R4 및 다른 내성 유전자. Naess, S.K., et. al., (2000) Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 101: 697-704 및 Li, X., et. al., (1998) Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: the R2 allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1121-1128을 참조한다.
- [0225] 2. 제초제에 대한 내성을 부여하는 유전자, 예를 들어:
- [0226] A. 이미다졸리논(imidazolinone) 또는 설폰일우레아와 같이 생장점 또는 분열조직을 저해하는 제초제. 이 범주의 예시적인 유전자는 예를 들어, 각각 Lee et al., *EMBO J.* 7:1241 (1988), 및 Miki et al., *Theor. Appl. Genet.* 80:449 (1990)에 기술된 바와 같이 돌연변이체 ALS 및 AHAS 효소를 코딩한다.
- [0227] B. 글리포세이트(glyphosate)(돌연변이체 5-에놀피루브레이트-3-포스페이트 신타아제(EPSP) 및 *aroA* 유전자 각각에 의해 손상된 내성) 및 다른 포스포노 화합물, 예컨대 글루포시네이트(glufosinate)(포스포노트리신 아세틸 트랜스퍼라제(PAT) 및 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*) PAT 바르(bar) 유전자), 및 피리디독시 또는 페녹시 프로피온산 및 사이클로헥손(ACCase 저해제-암호화 유전자). 예를 들어, 글리포세이트 저항성을 부여할 수 있는 EPSP 형태의 뉴클레오타이드 서열을 개시하는 Shah 등의 미국 특허 4,940,835를 참조한다. 돌연변이체 *aroA* 유전자를 암호화하는 DNA 분자는 ATCC 등록 번호 39256으로 수득될 수 있으며, 돌연변이체 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 Comai의 미국 특허 4,769,061에 개시되어 있다. Kumada 등의 유럽 특허 출원 0 333 033 및 Goodman 등의 미국 특허 4,975,374는 L-포스포노트리신과 같은 제초제에 대한 저항성을 부여하는 글루타민 신타아제 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 개시한다. PAT 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 Leemans 등의 유럽 특허 출원 0 242 246에 제공된다. DeGreef et al., *Bio/Technology* 7:61 (1989)은

포스포노트리신 아세틸 트랜스퍼라제 활성을 코딩하는 키메라 바르 유전자를 발현하는 유전자이식 식물의 제조를 기술하고 있다. 세톡시딤(sethoxydim) 및 할록시퓌(haloxypyr)와 같이 페녹시 프로피온산 및 사이클로헥손에 대한 저항성을 부여하는 유전자의 예는, Marshall et al., Theor. Appl. Genet. 83:435 (1992)에 의해 기술된 Acc1-S1, Acc1-S2 및 Acc2-S3 유전자이다.

- [0228] C. 트리아진(psbA 및 gs+ 유전자) 또는 벤조니트릴(니트릴라제 유전자)과 같이 광합성을 저해하는 제조제. Przibila et al., Plant Cell 3:169 (1991)는 클라마이도모나스(*Chlamydomonas*)를 돌연변이체 psbA 유전자를 암호화하는 플라스미드로 형질전환하는 것을 기술한다. 니트릴라제 유전자에 대한 뉴클레오타이드 서열은 Stalker의 미국 특허 4,810,648에 개시되어 있으며, 이들 유전자를 함유하는 DNA 분자는 ATCC 등록 번호 53435, 67441 및 67442로 입수가 가능하다. 글루타티온 S-트랜스퍼라제를 코딩하는 DNA의 클로닝 및 발현은 Hayes et al., Biochem. J. 285:173 (1992)에 의해 기술되어 있다.
- [0229] D. 다양한 유형의 제조제들에 내성인 이 효소를 발현하는 식물을 제조하기 위해 확인되었으며, 식물의 품종 내로 도입된 아세토하이드록시산 신타아제. Hattori et al., Mol. Gen. Genet. 246:419, 1995를 참조한다. 제조제에 대한 저항력을 부여하는 다른 유전자로는, 래트(rat) 시토크롬 P4507A1 및 효모 NADPH-시토크롬 P450 옥시도리덕타제의 키메라 단백질을 암호화하는 유전자(Shiota et al., Plant Physiol., 106:17, 1994), 글루타티온 리덕타제 및 슈퍼옥사이드 디스무타제에 대한 유전자(Aono et al., Plant Cell Physiol. 36:1687, 1995) 및 다양한 포스포트랜스퍼라제들에 대한 유전자(Datta et al., Plant Mol. Biol. 20:619, 1992)를 포함한다.
- [0230] E. 프로토포르피리노젠 옥시다제(프로톡스(protox))는 모든 식물 생존에 필수적인 엽록소의 생성에 필수적이다. 프로톡스 효소는 제조제 화합물의 품종에 대한 표적으로서 작용한다. 이들 제조제는 또한, 존재하는 모든 상이한 종의 식물들의 생장을 저해하여, 이들의 총 파괴를 유발한다. 이들 제조제에 저항성인 변형된 프로톡스 활성을 가진 식물의 개발은 미국 특허 6,288,306; 6,282,837; 5,767,373; 및 국제 공개 WO 01/12825에 기술되어 있다.
- [0231] 3. 부가 가치 형질을 부여하거나 이에 기여하는 유전자, 예컨대:
- [0232] A. 예를 들어, 식물을 스테아릴-ACP 데사투라제(desaturase)의 안티센스 유전자로 형질전환시킴으로써, 식물의 스테아르산 함량을 증가시키는, 지방산 대사 변형. Knultzon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2625 (1992)를 참조한다.
- [0233] B. 감소된 파이테이트 함량 - 1) 파이타제-인코딩 유전자의 도입은 보다 많은 유리 포스페이트를 형질전환된 식물에 첨가하여, 파이테이트의 절단을 증강시킬 것이다. 예를 들어, *아스퍼길러스 니거(Aspergillus niger)* 파이타제 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대한 개시내용은 Van Hartingsveldt et al., Gene 127:87 (1993)을 참조한다. 2) 파이테이트 함량을 감소시킨 유전자가 도입될 수 있었다. 예를 들어, 옥수수에서, 이는 낮은 수준의 피틴산을 특징으로 하는 옥수수 돌연변이체에 관여하는 단일 대립 유전자와 연관된 DNA를 클로닝한 다음 이를 재도입함으로써 달성될 수 있었다. Raboy et al., Maydica 35:383 (1990)을 참조한다.
- [0234] C. 예를 들어, 식물을 전분의 분지화 패턴을 변경시키는 효소를 코딩하는 유전자로 형질전환함으로써 영향을 받는 변형된 탄수화물 조성물. Shiroza et al., J. Bacteriol. 170:810 (1988)(스트렙토코커스(*Streptococcus*) 돌연변이체 프록토실트랜스퍼라제 유전자의 뉴클레오타이드 서열), Steinmetz et al., Mol. Gen. Genet. 20:220 (1985)(바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 레반수크라제 유전자의 뉴클레오타이드 서열), Pen et al., Bio/Technology 10:292 (1992)(바실러스 리케니폰니스(*Bacillus licheniformis*) α-아밀라제를 발현하는 유전자이식 식물의 생산), Elliot et al., Plant Molec. Biol. 21:515 (1993)(토마토 전화효소 유전자의 뉴클레오타이드 서열), SØgaard et al., J. Biol. Chem. 268:22480 (1993)(보리 α-아밀라제 유전자의 부위-특이적인 돌연변이생성) 및 Fisher et al., Plant Physiol. 102:1045 (1993)(옥수수 배젖(endosperm) 전분 분지화 효소 II)를 참조한다.
- [0235] D. FAD-2 유전자 변형을 통한 올레산 상승 및/또는 FAD-3 유전자 변형을 통한 리놀레산 저하. 미국 특허 6,063,947; 6,323,392; 및 국제 공개 WO 93/11245를 참조한다.
- [0236] 4. 웅성 불임을 조절하는 유전자
- [0237] A. 용단층(tapetum)-특이적인 프로모터의 조절하에서 화학적 N-Ac-PPT의 적용을 수반하는 데아세틸라제 유전자의 도입. 국제 공개 WO 01/29237을 참조한다.
- [0238] B. 다양한 수술(stamen)-특이적인 프로모터들의 도입. 국제 공개 WO 92/13956 및 WO 92/13957을 참조한다.

- [0239] C. 바르나제(barnase) 유전자 및 바르스타(barstar) 유전자의 도입. Paul et al., *Plant Mol. Biol.* 19:611-622, (1992)를 참조한다.
- [0240] 감자 형질전환 방법
- [0241] 생물학적 및 물리적 식물 형질전환 프로토콜을 비롯하여 수많은 식물 형질전환 방법이 개발되어 왔다. 예를 들어, Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B.R. and Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc. Boca Raton, 1993) 페이지 67-88을 참조한다. 또한, 식물 세포 또는 조직의 형질전환 및 식물의 재생을 위한 발현 벡터 및 시험관 내 배양 방법이 이용가능하다. 예를 들어, Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B.R. and Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) 페이지 89-119를 참조한다.
- [0242] A. *아그로박테리움*-매개의 형질전환 - 발현 벡터를 식물 내로 도입하는 한가지 방법은 *아그로박테리움*의 자연적인 형질전환 시스템을 토대로 한다. 예를 들어, Horsch et al., *Science* 227:1229 (1985)를 참조한다. A. *투메파시엔스* 및 A. *리조게네스*는 식물 세포를 유전적으로 형질전환하는 식물 병원성 토양 박테리아이다. A. *투메파시엔스* 및 A. *리조게네스*의 Ti 플라스미드 및 Ri 플라스미드는 각각 식물의 유전적인 형질전환에 관여하는 유전자를 운반한다. 예를 들어, Kado, C.I., *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:1 (1991)을 참조한다. *아그로박테리움* 벡터 시스템 및 *아그로박테리움*-매개의 유전자 전달 방법에 관한 설명은 상기 Gruber 등, 상기 Miki 등 및 Moloney et al., *Plant Cell Reports* 8:238 (1989)에 의해 제공된다. 또한, 1996년 10월 8일에 발행된 미국 특허 5,563,055(Townsend 및 Thomas)를 참조한다.
- [0243] B. 직접적인 유전자 전달 - *아그로박테리움*-매개의 형질전환에 대한 대안으로서 개발된 직접적인 유전자 전달로서 종합적으로 지칭되는 몇몇의 식물 형질전환 방법. 미세투사물(microprojectile)의 식물 표면의 일반적으로 이용가능한 방법은 1 μ m 내지 4 μ m를 측정한다. 발현 벡터는 식물 세포벽 및 세포막을 침투하기에 충분한 300 m/s 내지 600 m/s의 속도로 미세투사물을 가속화하는 바이오리스틱 장치(biolistic device)를 사용하여 식물조직 내로 도입된다. Sanford et al., *Part. Sci. Technol.* 5:27 (1987); Sanford, J.C., *Trends Biotech.* 6:299 (1988); Klein et al., *Bio/Tech.* 6:559-563 (1988); Sanford, J.C. *Physiol Plant* 7:206 (1990); Klein et al., *Biotechnology* 10:268 (1992). 또한, 1991년 5월 14일에 발행된 미국 특허 5,015,580(Christou 등) 및 1994년 6월 21일에 발행된 미국 특허 5,322,783(Tomes 등)을 참조한다.
- [0244] DNA를 식물에 물리적으로 전달하는 또 다른 방법은 표적 세포의 소니케이션이다. Zhang et al., *Bio/Technology* 9:996 (1991)을 참조한다. 다른 예로, 리포솜 및 스페로플라스트(spheroplast) 융합은 발현 벡터를 식물 내로 도입하는 데 사용되어 왔다. Deshayes et al., *EMBO J.*, 4:2731 (1985); Christou et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84:3962 (1987). CaCl₂ 침전, 폴리비닐 알코올 또는 폴리-L-오르니틴을 사용하여 DNA를 원형질체 내로 직접 흡수시키는 것이 또한 보고되었다. Hain et al., *Mol. Gen. Genet.* 199:161 (1985) 및 Draper et al., *Plant Cell Physiol.* 23:451 (1982). 원형질체 및 전체 세포와 조직의 전기천공 또한 기술되었다. Donn et al., In Abstracts of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC, A2-38, p 53 (1990); D'Halluin et al., *Plant Cell* 4:1495-1505 (1992) 및 Spencer et al., *Plant Mol. Biol.* 24:51-61 (1994).
- [0245] 감자 표적 조직의 형질전환 후, 상기 선별성 마커 유전자의 발현은 당해 기술분야에 잘 공지되어 있는 재생 및 선별 방법을 이용하여, 형질전환된 세포, 조직 및/또는 식물을 우선적으로 선별할 수 있게 한다.
- [0246] 상기 형질전환 방법은 전형적으로 유전자이식 식물 품종을 생산하는 데 사용될 것이다. 그런 다음, 새로운 유전자이식 식물 품종을 생산하기 위해, 유전자이식 식물 품종은 또 다른(비-형질전환된 또는 형질전환된) 품종과 교배될 수 있었다. 다른 예로, 상기 형질전환 기술을 이용하여 특정한 감자 라인 내로 조작된 유전적 형질은 식물 육종 분야에 잘 알려져 있는 전통적인 역교배 기술을 이용하여 또 다른 라인 내로 이동될 수 있다. 예를 들어, 역교배 접근법은, 공개적인 비-엘리트 품종 유래의 조작된 형질을 엘리트 품종으로 이동시키거나, 이의 계통에 외래 유전자를 함유하는 품종 유래의 조작된 형질을, 해당 유전자를 함유하지 않는 품종 또는 품종들 내로 이동시키는 데 사용될 수 있었다. 본 발명에서 사용된 것과 같이, "교배"는 문맥에 따라 단순한 X $\times$ Y 교배 또는 역교배 과정을 지칭할 수 있다.
- [0247] 당업자는, 용어 감자식물이 본 발명의 맥락에서 사용되는 경우, 이는 또한 W8의 필수적인 구별 특징을 보유하는 유도체 품종, 예컨대 해당 품종의 유전자 변환된 식물, 또는 하나 이상의 부가 가치(예, 체조직 저항성 또는 곤

충 저항성) 유전자가 혼입되어 있는 유전자이식 식물 유도체를 포함함을 인지할 것이다. 역교배 방법은 특징을 품종 내로 개량하거나 도입하기 위해 본 발명과 함께 이용될 수 있다. 본 발명에서 사용된 것과 같이, 용어 "역교배"는, 잡종 자손을 재현성(recurrent) 부모로 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 이상 반복해서 교배하는 것을 지칭한다. 하나 이상의 원하는 특징에 대한 유전자(들)에 기여하는 부모 감자식물은 비재현성 부모 또는 공여자 부모로 지칭된다. 이 용어는, 비재현성 부모는 역교배 프로토콜에서 1회 사용되며, 따라서, 반복되지 않는다는 사실을 지칭한다. 비재현성 부모 유래의 유전자 또는 유전자들이 전달되는 부모 감자식물은 역교배 프로토콜에서 수차례 사용되므로, 재현성 부모로서 공지되어 있다. 전형적인 역교배 프로토콜에서, 본래의 관심 품종(재현성 부모)는 전달되어야 하는 관심 유전자(들)를 운반하는 제2 품종(비재현성 부모)에 교배된다. 그런 다음, 이 교배로 인해 생성되는 자손은 재현성 부모에 다시 교배되고, 이 과정은 감자식물이 수득될 때까지 반복되며, 여기서, 비재현성 부모로부터 전달되는 하나 이상의 유전자 외에도, 재현성 부모의 본질적으로 모든 원하는 형태학적 특징 및 생리학적 특징들은 변환된 식물에서 회수된다.

[0248] 적합한 재현성 부모의 선별은 성공적인 역교배 절차의 중요한 단계이다. 역교배 프로토콜의 목적은 하나 이상의 형질 또는 특징을 본래의 품종에서 변경 또는 치환하는 것이다. 이를 달성하기 위해, 재현성 품종의 하나 이상의 유전자는 비재현성 부모 유래의 원하는 유전자(들)를 사용하여 변형, 치환 또는 보충되는 한편, 원하는 유전자 중 본질적으로 모두 또는 나머지를 보유하며, 따라서, 본래의 품종의 원하는 생리학적 및 형태학적 구성을 보유한다. 특징한 비재현성 부모의 선택은 역교배의 목적에 따라 다를 것이다. 주요한 목적들 중 하나는 일부 상업적으로 바람직하며 작물적으로 중요한 형질을 식물에 부가하는 것이다. 정확한 역교배 프로토콜은, 적절한 시험 프로토콜을 결정하기 위해 변경 또는 첨가되는 특징 또는 형질에 따라 다를 것이다. 전달되는 특징이 우성 대립 유전자인 경우 역교배 방법이 간략화되긴 하지만, 열성 대립 유전자 또한, 전달될 수 있다. 이 경우, 원하는 특징이 성공적으로 전달되었는지 결정하기 위해, 자손의 시험을 도입하는 것이 필요할 수 있다.

[0249] 마찬가지로, 이식유전자는 당업자에게 잘 알려져 있는 구축된 재조합 방법의 품종들 중 임의의 품종을 사용하여 식물 내로 도입될 수 있다. 예컨대: Gressel, 1985, Biotechnologically Conferring Herbicide Resistance in Crops: The Present Realities, In *Molecular Form and Function of the Plant Genome*, L. van Vloten-Doting, (ed.), Plenum Press, New York; Huttner, S.L., et al., 1992, Revising Oversight of Genetically Modified Plants, *Bio/Technology*; Klee, H., et al., 1989, Plant Gene Vectors and Genetic Transformation: Plant Transformation Systems Based on the use of *Agrobacterium tumefaciens*, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*; Koncz, C., et al., 1986, The Promoter of T_L-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of *Agrobacterium* Binary Vector; *Molecular and General Genetics*; Lawson, C., et al., 1990, Engineering Resistance to Mixed Virus Infection in a Commercial Potato Cultivar: Resistance to Potato Virus X and Potato Virus Y in Transgenic Russet Burbank, *Bio/Technology*; Mitsky, T.A., et al., 1996, Plants Resistant to Infection by PLRV. 미국 특허 5,510,253; Newell, C.A., et al., 1991, *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Solanum tuberosum* L. Cv. Russet Burbank, *Plant Cell Reports*; Perlak, F.J., et al., 1993, Genetically Improved Potatoes: Protection from Damage by Colorado Potato Beetles, *Plant Molecular Biology*이며, 이들 모두는 이 목적을 위해 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0250] 새로운 품종의 개발에서 규칙적으로 선별되지 않으나 역교배 및 유전자 조작 기술에 의해 개량될 수 있는 다수의 형질들이 확인되었다. 이들 형질은 유전자이식 식물일 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있으며; 이들 형질의 예로는, 제초제저항성; 박테리아, 균류 또는 바이러스 질병에 대한 저항성; 곤충 저항성; 전분 및 다른 탄수화물 농도의 균일성 또는 증가; 증강된 영양 품질; 덩이줄기에 상처가 생길 가능성의 감소; 및 전분의 당으로의 변환율의 감소를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이들 유전자는 일반적으로 핵을 통해 유전된다. 이들 형질 중 몇몇은 미국 특허 5,500,365, 미국 특허 5,387,756, 미국 특허 5,789,657, 미국 특허 5,503,999, 미국 특허 5,589,612, 미국 특허 5,510,253, 미국 특허 5,304,730, 미국 특허 5,382,429, 미국 특허 5,503,999, 미국 특허 5,648,249, 미국 특허 5,312,912, 미국 특허 5,498,533, 미국 특허 5,276,268, 미국 특허 4,900,676, 미국 특허 5,633,434 및 미국 특허 4,970,168에 기술되어 있다.

[0251] 기탁 정보

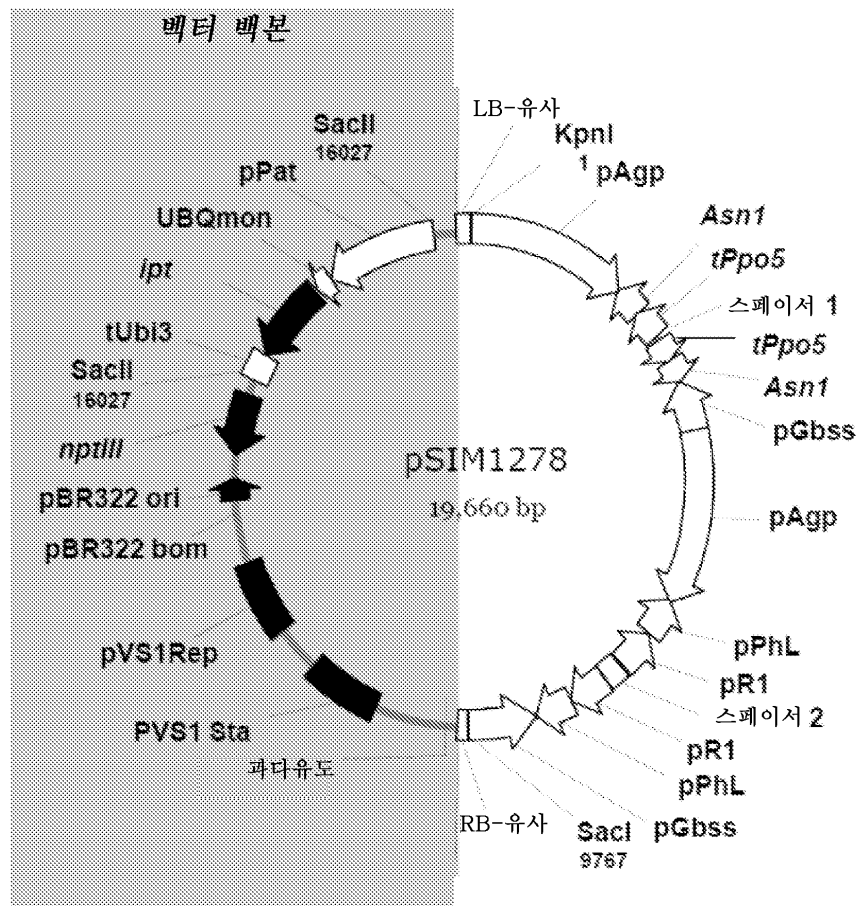
[0252] 상기 개시되며 첨부된 청구항에서 언급되는 J.R. Simplot Company 소유의 감자 종자 W8의 덩이줄기 기탁은 미국 20110 버지니아주 머내서스, 10801 유니버시티 블러바드(University Boulevard)의 American Type Culture Collection(ATCC)에서 이루어졌다. 기탁 일자 2014년 3월11일이었다. 미세덩이줄기의 25개 바이얼의 기탁은

본 출원의 출원일 전부터 J.R. Simplot Company에 의해 유지된 동일한 기탁으로부터 취하였다. 특허 등록 시 모든 구속들은 돌이킬 수 없게 제거될 것이며, 기탁은 37 C.F.R. §§ 1.801-1.809의 필요조건들을 모두 충족시키고자 한다. ATCC 등록 번호는 PTA-121079이다. 기탁은 30년 동안 또는 마지막 요청 후 5년 동안, 또는 기간이 얼마나 길든지 간에 특허의 시행 기간(enforceable life) 동안 기탁소에서 유지될 것이며, 해당 기간 동안 필요에 따라 대체될 것이다.

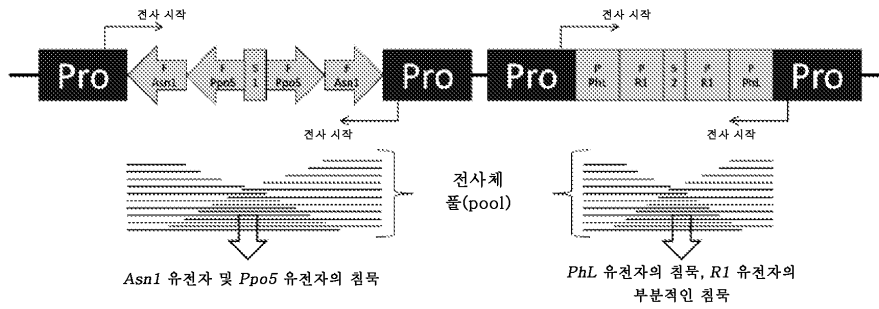
- [0253] 다수의 예시적인 양태 및 실시태양은 상기에 논의되어 있긴 하지만, 당업자는 이의 소정의 변형, 치환, 첨가 및 하위조합을 인지할 것이다. 따라서, 하기의 첨부되는 청구항 및 이후에 도입되는 청구항은, 이들의 참 사상 및 범주 내에 속하는 바와 같이, 이러한 모든 변형, 치환, 첨가 및 하위조합을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0254] 기탁기관명 : The American Type Culture Collection
- [0255] 수탁번호 : PTA-121079
- [0256] 수탁일자 : 20140311

도면

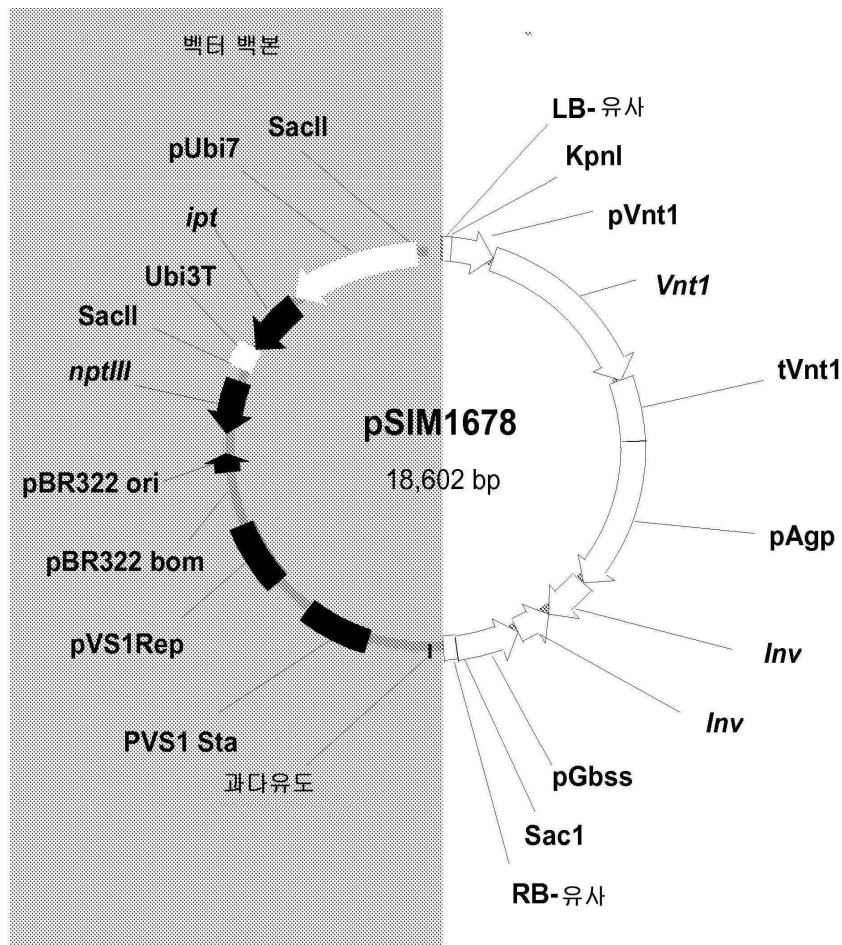
도면1



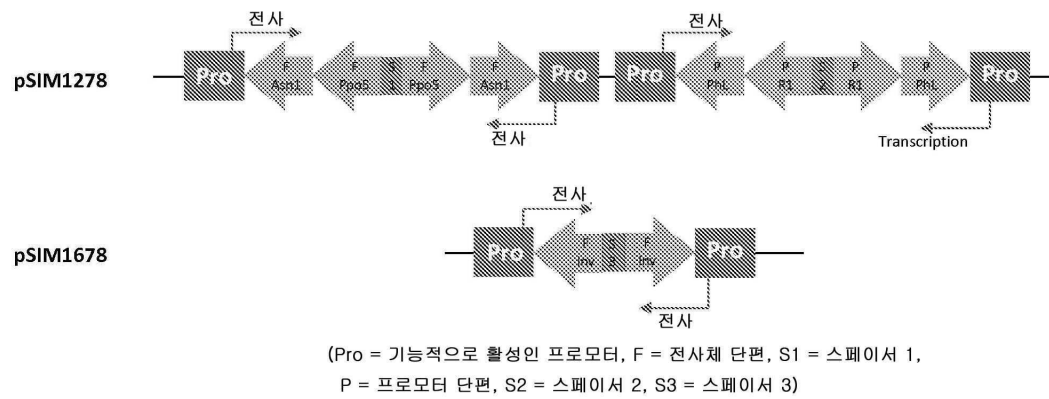
도면2



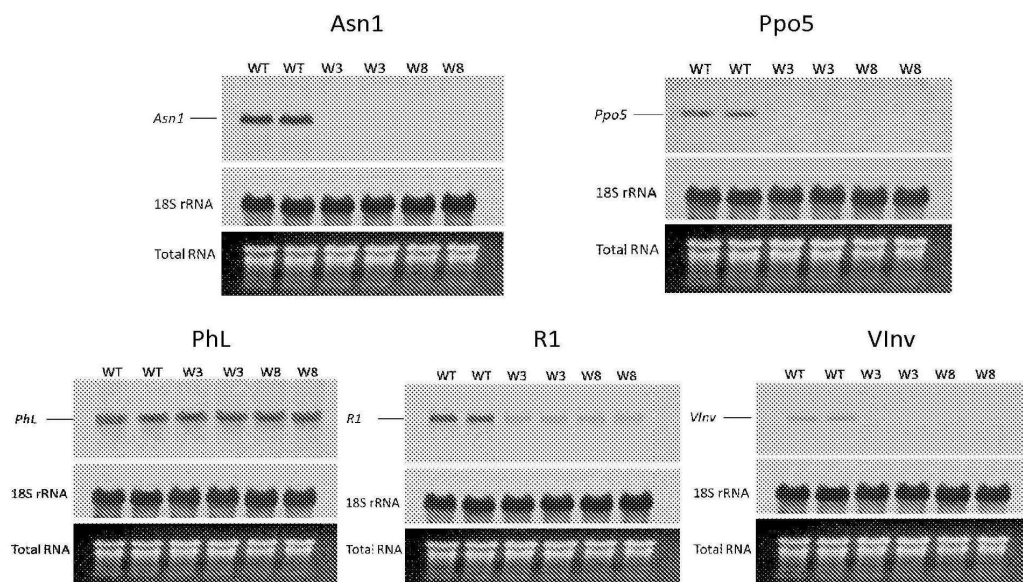
도면3



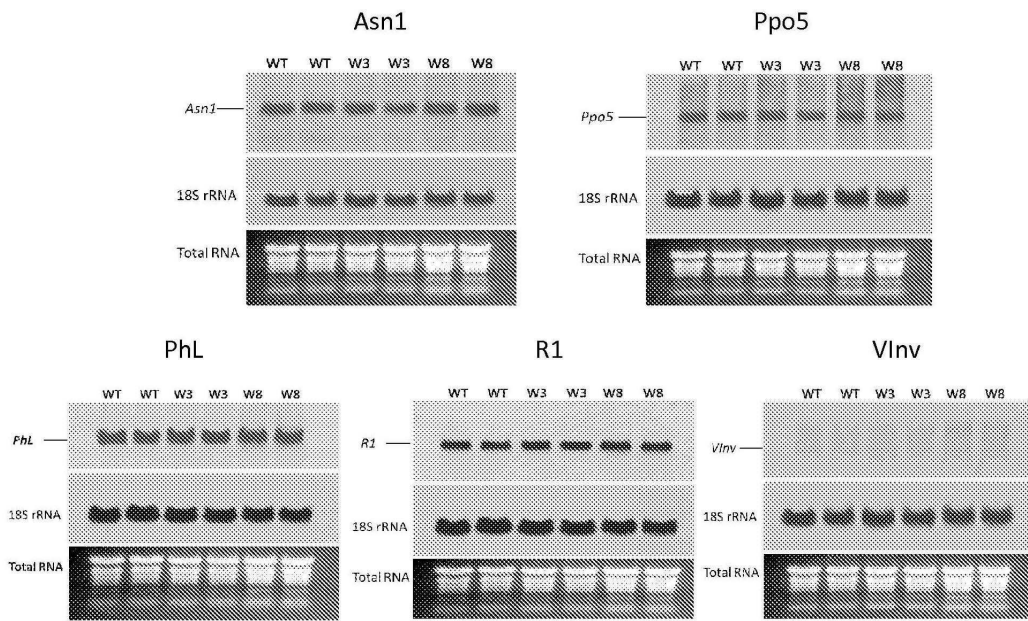
도면4



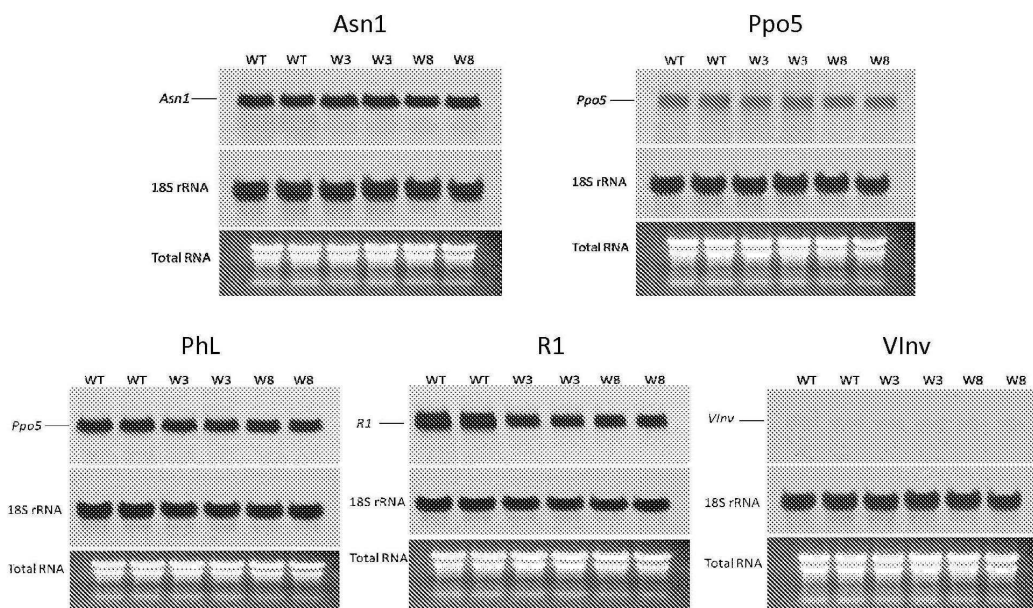
도면5



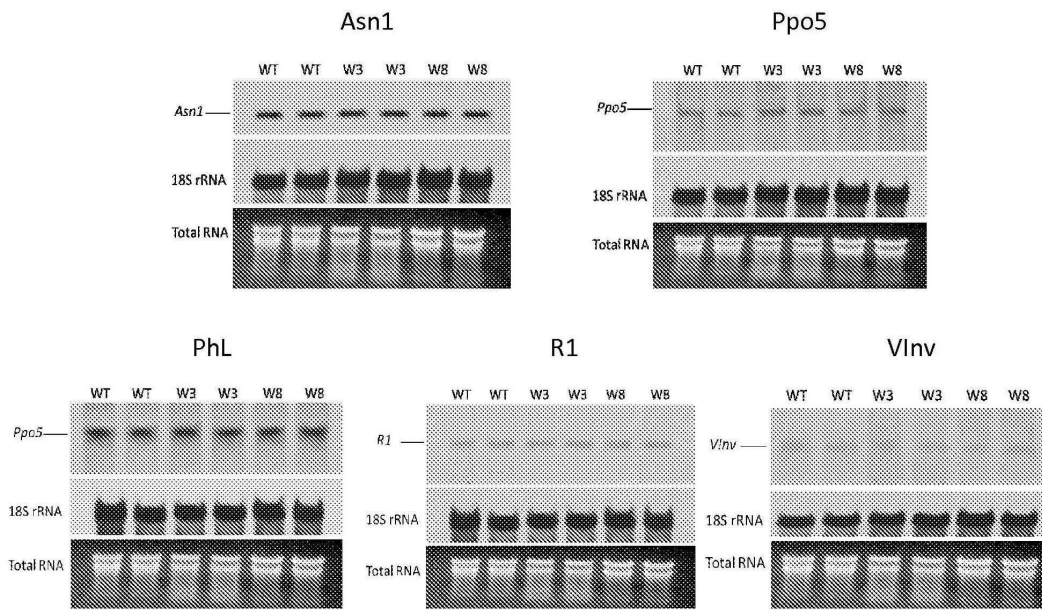
도면6



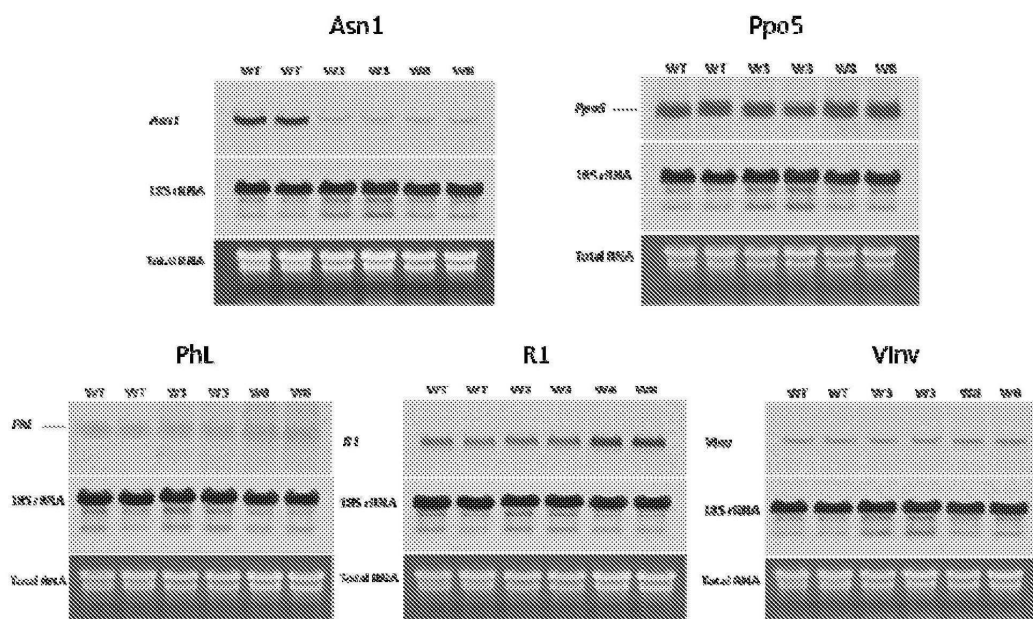
도면7



도면8



도면9



도면10

