



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0120449
(43) 공개일자 2016년10월18일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 15/82</i> (2006.01) <i>A01H 5/00</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/113</i> (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 15/8286</i> (2013.01)
 <i>A01H 5/00</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0049442</p> <p>(22) 출원일자 2015년04월08일
 심사청구일자 2015년04월08일</p> | <p>(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 임현섭
 대전광역시 유성구 가정로 266 교수아파트 14동 302호</p> <p>윤영남
 대전광역시 서구 도안동로 77 도안 18단지 린폴하우스 1810동 2605호</p> <p>(74) 대리인
 최규환</p> |
|---|--|

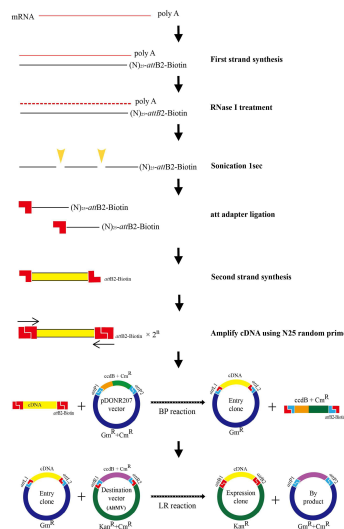
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 AltMV 유래 게이트웨이 발현벡터 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 AltMV 유래 게이트웨이 발현벡터 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 AltMV 게이트웨이 발현벡터를 이용하여 해충 유전자 발현 억제 RNAi를 유도하여 해충을 제어하고 동시에 해충 방제와 관련한 해충 유전자를 선별하는데 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/8205 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 112018-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 생명산업기술개발

연구과제명 담배가루이 제어용 RNAi 발현 토마토 유묘 개발 및 대량 생산 기술 확립

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2012.08.10 ~ 2015.08.09

명세서

청구범위

청구항 1

AltMV(Alternanthera mosaci virus) 유래 *TGB3*(triple gene block protein3)와 *CP*(coat protein) 유전자 사이에 게이트웨이 발현벡터 제조용 카세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 게이트웨이 발현벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 게이트웨이 발현벡터는 5'에서 3' 방향으로 AltMV(Alternanthera mosaci virus) 유래 *RdRp*(RNA dependent RNA polymerase), *TGB1*(triple gene block protein1), *TGB2*(triple gene block protein2), *TGB3*(triple gene block protein3), 게이트웨이 발현벡터 제조용 카세트 및 *CP*(coat protein) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 게이트웨이 발현벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 게이트웨이 발현벡터의 개열지도는 도 2의 ③에 도시된 것을 특징으로 하는 게이트웨이 발현벡터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 게이트웨이 발현벡터에 해충 cDNA 단편이 삽입된 것을 특징으로 하는 해충 방제용 재조합 RNAi 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 해충 cDNA 단편은 담배가루이 cDNA 단편인 것을 특징으로 하는 해충 방제용 재조합 RNAi 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 담배가루이 cDNA 단편은 서열번호 7 또는 8의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 해충 방제용 재조합 RNAi 벡터.

청구항 7

제4항의 재조합 RNAi 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 균주.

청구항 8

제7항의 아그로박테리움 균주를 식물체에 접종하는 단계;

접종된 식물을 해충에게 섭식시켜 해충 저항성을 나타내는 식물을 선별하는 단계; 및

상기 선별된 식물에 해당하는 아그로박테리움 균주로부터 cDNA 단편을 분리하는 단계를 포함하는 해충 방제용 cDNA 단편을 선별하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 해충은 담배가루이인 것을 특징으로 하는 해충 방제용 cDNA 단편을 선별하는 방법.

청구항 10

제9항의 방법에 의해 선별된, 서열번호 7 또는 8의 염기서열을 갖는 담배가루이 방제용 cDNA 단편.

청구항 11

제7항의 아그로박테리움 균주를 식물체에 접종하는 단계; 및

접종된 식물을 해충에게 섭식시켜 해충 저항성을 나타내는 식물을 선별하는 단계를 포함하는 해충 저항성 식물의 제조 방법.

청구항 12

제11항의 방법에 의해 제조된 해충 저항성 식물.

청구항 13

제6항의 서열번호 7 또는 8의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 해충 방제용 재조합 RNAi 벡터를 유효성분으로 함유하는 담배가루이 방제용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 AltMV(Alternanthera mosaic virus) 유래 *TGB3*와 *CP* 유전자 사이에 게이트웨이 발현벡터 제조용 카세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 게이트웨이 발현벡터 및 이를 이용한 해충 저항성 식물의 제조에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물 세포에 존재하는 이중가닥 RNA는 전사 후 유전자 침묵(Post Transcriptional Gene Silencing, 이하 PTGS라고 한다) 기작에 의해 분해시키게 된다. 또한 짧은 RNA 서열과 상동성이 있는 기주식물의 mRNA에 붙어 이중가닥 RNA를 형성하게 되며, 이는 식물의 PTGS 기능을 가동시켜 mRNA를 제거시킨다. 이러한 이중가닥 RNA의 존재는 식물에 있어서 RNA 바이러스 침입에 대비하여 준비된 방어 기작이라 할 수 있다. 식물 RNA 바이러스는 기주세포에 감염시 RNA를 복제하여 더 많은 바이러스를 생산해야 하지만, 식물 내에 존재하는 PTGS 기능에 의하여 많은 양의 RNA가 분해되어 RNA 농도가 현저하게 떨어지게 된다. 즉 한 가닥의 RNA 바이러스는 다시 한 가닥의 RNA를 복제하기 위해 주형 RNA를 만들고 이에 따라 RNA를 복제하는 동안 이중가닥 RNA를 구성하게 되어 식물의 PTGS 기능에 의해 공격받게 된다.

[0003] 기존의 기술은 식물바이러스에 목적 식물유전자를 삽입시켜 목적 유전자 발현 조절을 통한 유전자 기능을 확인하는 방법으로 이용되어 왔다. 이를 VIGS(Virus Induced Gene Silencing)라고 한다. VIGS는 식물 RNA 바이러스가 항상 이중가닥의 RNA를 생산하여 PTGS를 가동시키는 원칙을 이용한 것이다. 식물 내에 발현하는 다양한 mRNA의 기능을 확인하기 위해 특정 mRNA의 염기서열을 바이러스에 삽입함으로써 상기 바이러스가 복제를 시작할 때 특정 mRNA 염기서열도 바이러스 유전자와 같이 이중가닥으로 생성시키게 된다. 이중가닥인 기주의 특정 mRNA 서열은 PTGS를 가동시키게 되며 기주 내에 늘 발현하고 있는 특정 mRNA를 바이러스 RNA로 인식하게 되어 바이러스 RNA와 같이 기주의 특정 mRNA도 분해가 된다. 결과적으로 기주의 특정 mRNA의 발현은 현저하게 떨어져 기주의 표현형으로 나타나게 되며, 이 표현형을 바탕으로 하여 특정 mRNA의 기능을 파악할 수 있게 된다. 이것을 역유전학 툴(Reverse Genetic Tool)이라고 한다.

[0004] 최근 RNAi는 농업해충 방제를 위한 대안적 전략으로 여겨지고 있다. 현재 나비목 곤충, 초파리류, 점박이응애, 진딧물, 메뚜기 심지어 독일바퀴 등 농업해충 뿐만 아니라 위생 해충까지 RNAi 연구가 진행되었다. 곤충 유전자는 이중가닥 RNA의 직접적인 injection이나 이중가닥 RNA를 인공먹이에 섞은 뒤 인공먹이를 곤충에게 섭식시키는 방법으로 유전자 발현량의 감소를 확인할 수 있지만 이러한 이중가닥 RNA의 전달 방법은 야외포장에서 RNAi 기술을 이용하여 해충을 방제하기에는 어려움이 있어 야외포장에서 RNAi 기술을 사용하기 위해서는 이중가닥 RNA의 효과적인 전달방법의 모색이 필요하다.

[0005] 식물바이러스가 기주 세포에 감염되었을 때, 식물은 바이러스 게놈을 타겟으로 하여 RNA를 기반으로 하는 방어를 활성화시킨다. VIGS(virus-induced gene silencing)는 이러한 RNA가 매개하는 항 바이러스성 방어기작을 이용하는 기술이다. Tobacco rattle virus(TRV)와 Barley stripe mosaic virus(BSMV)를 포함한 몇몇 식물 RNA 바이러스는 이미 VIGS를 위한 벡터로 많이 사용되고 있다. VIGS 벡터를 사용하면, 벡터 안에 있는 타겟 유전자의 mRNA 조각이 발현됨으로써 타겟 mRNA의 녹아웃(knock out)이 가능하다. 식물 RNA 바이러스가 복제되면서 만들어지는 이중가닥 RNA는 PTGS를 유도하게 된다. 이러한 VIGS 벡터에 흡즙형 곤충의 유전자를 클로닝하여 식물에 접종하게 되면 바이러스 복제 과정에서 곤충 유전자의 이중가닥 RNA가 생성이 되고, 이를 타겟 흡즙형 곤충이 식물을 흡즙할 때 이중가닥 RNA를 같이 섭식하여 곤충 체내에서 RNAi를 유도할 수 있다.

[0006] 이러한 방어기작을 바탕으로 PTGS에 관한 연구가 활발히 진행되었으며 RNAi(RNA interference)의 방어기작에 관련된 연구로 발전하게 되었다. 예를 들어 기주 내에서 발현되는 mRNA와 상동성이 있는 염기서열의 small RNA를 주입하게 되면 염기서열의 상동성에 의해 주입된 RNA는 기주에서 발현되고 있는 mRNA에 부착하게 되며 이는 곧 PTGS를 가동시키게 되어 결과적으로 타겟이 되는 mRNA는 발현하지 못하게 되어 목적 유전자 발현을 조절할 수 있게 되었다. 이러한 기술은 최근 선충, 해충 등에 적용하여 개체수를 감소하기 위한 생식 관련 mRNA 발현을 조절케 하는 RNAi를 개발하기도 하였다. 하지만 RNAi에 대한 제어기작은 이해가 되었어도 적용할 수 있는 방법에 대한 명확한 기술 개발은 없었다.

[0007] 한국등록특허 제1478113호에는 '콩에서 유용 유전자의 기능 분석을 위한 SYCMV 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1206928호에는 '배추속 식물의 자가불화합성 인자에 대한 RNA 간섭 카세트, 그를 포함하는 벡터 및 상기 RNA 간섭 카세트가 도입된 형질전환 배추속 식물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 AltMV 유래 게이트웨이 발현벡터 및 이의 용도에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, AltMV 게이트웨이 발현벡터를 제작하여 담배가루이 cDNA library의 PCR 산물을 AltMV 게이트웨이 발현벡터에 클로닝한 후 다양한 담배가루이 cDNA 단편을 클로닝하였으며, 식물에 접종하여 담배가루이 증식제어 효과를 가짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 AltMV(Alternanthera mosaci virus) 유래 TGB3(triple gene block protein3)와 CP(coat protein) 유전자 사이에 게이트웨이 발현벡터 제조용 카세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 AltMV 유래 게이트웨이 발현벡터를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 게이트웨이 발현벡터에 해충 cDNA 단편이 삽입된 것을 특징으로 하는 해충 방제용 재조합 RNAi 벡터를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 RNAi 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 균주를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 RNAi 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 균주를 식물체에 접종하는 단계; 접종된 식물을 해충에게 섭식시켜 해충 저항성을 나타내는 식물을 선별하는 단계; 및 상기 선별된 식물에 해당하는 아그로박테리움 균주로부터 cDNA 단편을 분리하는 단계를 포함하는 해충 방제용 cDNA 단편을 선별하는 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 선별된, 서열번호 7 또는 8의 염기서열을 갖는 담배가루이 방제용 cDNA 단편을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 RNAi 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 균주를 식물체에 접종하는 단계; 및 접종된 식물을 해충에게 섭식시켜 해충 저항성을 나타내는 식물을 선별하는 단계를 포함하는 해충 저항성 식물의 제조 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 해충 저항성 식물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 서열번호 7 또는 8의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 해충 방제용 재조합 RNAi 벡터를 유효성분으로 함유하는 담배가루이 방제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 AltMV 유래 게이트웨이 발현벡터는 애기장대, 담배, 시금치, 토마토, 콩 등 기주범위가 다양하므로 다양한 작물에 RNAi 생산 기술을 적용할 수 있다. 또한, AltMV 유래 게이트웨이 발현벡터를 이용한 다양한 유전자 단편을 클로닝하여 효과적인 RNAi 타겟 유전자를 선별할 수 있으며, 더욱이 담배가루이 같은 다양한 해충을 제어할 수 있는 RNAi를 선별하는데 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명에 이용된 AltMV의 RNA 구조를 나타낸 것이다(1=TGB1, 2=TGB, 3=TGB3).

도 2는 본 발명에 이용된 AltMV의 게이트웨이 카세트 삽입 과정을 나타낸 것이다. ① 게이트웨이 카세트 삽입된 pUC-MCS:attR를 XmaI과 XbaI 제한효소로 절단된 AltMV-MCS에 연결한 후 상기 pUC-MCS:attR를 XmaI으로 절단하여(②) 동일 제한효소로 절단한 AltMV-MCS에 삽입함으로써 최종적으로 ③의 AltMV 게이트웨이 벡터를 제작하였다.

도 3은 본 발명에 이용된 담배가루이 cDNA library 삽입 방법을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 AltMV(*Alternanthera mosaci virus*) 유래 *TGB3*(triple gene block protein3)와 *CP*(coat protein) 유전자 사이에 게이트웨이 발현벡터 제조용 카세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 게이트웨이 발현벡터를 제공한다.

[0020] 본 발명에 있어서, "게이트웨이 발현벡터"는 게이트웨이 발현시스템 중 "목적 벡터(destination vector)"를 의미한다.

[0021] 상기 게이트웨이 발현시스템은 엔트리벡터와 목적벡터로 구성되며, 상기 엔트리벡터는 목적유전자의 양 말단에 attL1, attL2를 갖는 벡터이며, 목적벡터는 attR1, attR2를 포함하는 벡터이다. 상기 엔트리벡터와 상기 목적벡터는 재조합효소에 의해 LR 반응을 일으키며, 목적벡터의 attR1과 attR2를 엔트리벡터의 attL1과 attL2로 치환하게 된다. 이 과정에서 엔트리벡터에 포함되어 있던 목적유전자가 목적벡터로 전달되게 된다. 게이트웨이 발현 벡터 제조용 카세트에 의해 목적유전자를 엔트리벡터로부터 손쉽게 클로닝할 수 있어 다양한 형태의 클로닝이 가능하고 다량의 유전자를 클로닝할 때도 유리하다.

[0022] 본 발명에 있어서, "게이트웨이 발현벡터 제조용 카세트"는 게이트웨이 발현벡터를 제조할 수 있는 카세트를 의미하며, 제조하거나 시판되는 것을 이용할 수 있다.

[0023] 상기 게이트웨이 발현벡터 제조용 카세트 중 시판되는 "attR1-CmR-ccdB-attR2" 카세트는 'attR1 및 attR2' 재조합서열, 클로람페니콜 저항 유전자(CmR), 독소유전자(ccdB; clever gene)로 이루어진다.

[0024] 본 발명의 AltMV는 약 6.5kb의 게놈을 갖는 단일가닥 RNA 바이러스로서 게놈의 크기가 크지 않고, 하나의 바이러스 입자에 단일 RNA만 가지므로 유전적으로 조작하기에 편리하다. 몇몇의 바이러스는 식물의 방어기작 중 하나인 유전자 침묵을 극복하고자 유전자 침묵 억제자(gene silencing suppressor) 기능에 따라 바이러스의 복제와 식물에 나타나는 병징의 강도가 정해진다. 본 발명에 사용된 AltMV는 유전자 침묵 억제자 기능의 강도가 다양하여 RNAi 목적에 맞게 사용할 수 있다. 또한, 애기장대, 담배와 같은 모델식물과 더불어 시금치, 토마토, 콩 등의 식용작물까지 기주범위가 넓어서 다양한 작물에 RNAi 생산 기술을 적용하기에 적합하다.

[0025] 본 발명의 게이트웨이 발현벡터는 5'에서 3' 방향으로 AltMV(*Alternanthera mosaci virus*) 유래 *RdRp*(RNA dependent RNA polymerase), *TGB1*(triple gene block protein1), *TGB2*(triple gene block protein2), *TGB3*(triple gene block protein3), 게이트웨이 발현벡터 제조용 카세트 및 *CP*(coat protein) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0026] 상기 게이트웨이 발현벡터는 각각 서열번호 1, 2, 3, 4 및 5의 염기서열로 이루어진 AltMV 유래 *RdRp*(RNA dependent RNA polymerase), *TGB*(triple gene block protein)1, *TGB2*, *TGB3* 및 *CP*(coat protein) 유전자를 포함하며(도 1), 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, AltMV 유래 *RdRp*, *TGB1*, *TGB2*, *TGB3* 및 *CP* 유전자는 각각 서열번호 1, 2, 3, 4 및 5의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열 (추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제 (즉, 겹)를 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 게이트웨이 발현벡터의 개열지도는 도 2의 ③에 도시되어 있으며 서열번호 6의 전체 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 한다.

[0028] 본 발명은 상기 게이트웨이 발현벡터에 해충 cDNA 단편이 삽입된 것을 특징으로 하는 해충 방제용 재조합 RNAi 벡터를 제공한다.

- [0029] 본 발명의 일 실시예에서, 도 3에 도시한 바와 같이, 해충 cDNA 단편, attL1, attL2를 포함하는 엔트리벡터와 attR1, attR2를 포함하는 게이트웨이 발현벡터는 재조합효소의 작용에 의해 LR반응(LR reaction)을 일으키며, 그 결과 해충 cDNA 단편을 포함하는 재조합 RNAi 벡터가 만들어진다.
- [0030] 게이트웨이 발현시스템의 "엔트리벡터"는 목적 유전자 단편과 목적 유전자 단편의 양 말단 방향으로 attL을 포함하고 있어, 재조합효소작용에 의해 게이트웨이 발현벡터의 attR과 LR반응을 일으킬 수 있는 벡터를 의미한다. 상기 재조합효소는 DNA 이중나선에 특별히 상보성이 있는 작은 DNA 조각을 대체시켜 재조합하는 과정을 이루게 하는 효소로서 일반적으로 Recombinase(Excisionase, Integrase 라고도 한다)라고 하며, Invitrogen사의 LR clonase일 수 있다.
- [0031] 용어 "RNAi(RNA interference)"는 목적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA와 상기 센스 RNA와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA로 구성되는 이중가닥 RNA를 세포 등에 도입하여 선택적으로 목적 유전자 mRNA의 분해를 유도하고 목적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 현상을 말한다.
- [0032] 본 발명의 해충은 이에 한정되지 않지만, 나비목 곤충, 초파리류, 점박이응애, 진딧물, 메뚜기, 독일바퀴 또는 담배가루이일 수 있으며, 바람직하게는 담배가루이다.
- [0033] 상기 해충 cDNA 단편은 나비목 곤충, 초파리류, 점박이응애, 진딧물, 메뚜기, 독일바퀴 또는 담배가루이 cDNA 단편일 수 있으며, 바람직하게는 담배가루이 cDNA 단편이며, 더 바람직하게는 서열번호 7 또는 8의 염기서열로 이루어진 담배가루이 cDNA 단편일 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 재조합 RNAi 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 균주를 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 재조합 RNAi 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 균주를 식물체에 접종하는 단계; 접종된 식물을 해충에게 섭식시켜 해충 저항성을 나타내는 식물을 선별하는 단계; 및 상기 선별된 식물에 해당하는 아그로박테리움 균주로부터 cDNA 단편을 분리하는 단계를 포함하는 해충 방제용 cDNA 단편을 선별하는 방법을 제공한다.
- [0036] 아그로박테리움 벡터 시스템 및 아그로박테리움을 통한 유전자 전이방법은 [Moloney et al., Plant Cell Reports 8:238(1989)] 등과 같은 다수의 문헌에 기재되어 있다.
- [0037] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 해충은 나비목 곤충, 초파리류, 점박이응애, 진딧물, 메뚜기, 독일바퀴 또는 담배가루이일 수 있으며, 바람직하게는 담배가루이일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 또한, 본 발명은 상기 해충 방제용 cDNA 단편을 선별하는 방법에 의해 선별된 서열번호 7 또는 8의 염기서열을 가지는 담배가루이 방제용 cDNA 단편을 제공한다. 구체적인 일 실시예에서, 본 발명자들은 담배가루이 cDNA 단편을 포함하는 재조합 RNAi 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 균주를 토마토에 접종하여 담배가루이 증식을 억제하는 서열번호 7 또는 8의 염기서열을 가지는 담배가루이 방제용 cDNA 단편을 선별하였다.
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 재조합 RNAi 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 균주를 식물체에 접종하는 단계; 및 접종된 식물을 해충에게 섭식시켜 해충 저항성을 나타내는 식물을 선별하는 단계를 포함하는 해충 저항성 식물의 제조 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명에 따른 A1tMV 유래 게이트웨이 발현벡터를 이용하여 제조된 재조합 RNAi 벡터는 애기장대, 담배, 시금치, 토마토, 콩 등 기주 범위가 다양하므로 다양한 작물에 RNAi 생산 기술을 적용할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 해충 저항성 식물을 제공한다.
- [0042] 또한, 본 발명은 서열번호 7 또는 8의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 해충 방제용 재조합 RNAi 벡터를 유효성분으로 함유하는 담배가루이 방제용 조성물을 제공한다. 일 실시예에서 서열번호 7 또는 8의 염기서열로 이루어진 담배가루이 cDNA 단편을 포함하는 재조합 RNAi 벡터가 형질전환된 토마토에서 담배가루이 증식이 억제되었다.
- [0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] **실시예 1: AltMV 유래 게이트웨이 발현벡터인 AltMV- attB 벡터 제작**

[0045] 게이트웨이 카세트가 삽입된 AltMV 유래 게이트웨이 발현벡터인 AltMV-attR 벡터를 만들기 위해, 기존에 존재하는 게이트웨이 벡터(Binary vector pSITE-2CA, GeneBank Accession EF212294)를 주형으로 하고, 게이트웨이 카세트 증폭을 위하여 제작한 프라이머[5' 프라이머 attR1_F_BglII: GAG AGA TCT ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCT GAA C(서열번호 9), 3' 프라이머 attR2_R_NheI: GAG GCT AGC ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT G(서열번호 10)]를 사용, PCR 기법을 이용하여 게이트웨이 카세트를 증폭하여 pUC MCS 벡터(AltMV의 TGB2 일부, TGB3, MCS, CP, 3 non-coding region이 포함되어 있는 벡터)에 제한효소 BglII 와 NheI를 이용하여 삽입하였다(도 2의①). 다음으로 AltMV MCS 벡터(AltMV의 RdRp, TGB1, TGB2 일부가 포함되어 있는 벡터)에 게이트웨이 카세트가 들어있는 pUC MCS:attR을 XmaI, XbaI 제한효소를 이용하여 삽입하여(도 2의②) 최종 게이트 발현 벡터를 제작하였다(도 2의③).

[0046] **실시예 2: B. tabaci cDNA 단편이 삽입된 AltMV- attB 벡터 제작**

[0047] 5 mg의 담배가루이(*Bemisia tabaci*) 성충의 전체 RNA를 Trizol reagent를 이용하여 추출한 후, mRNA만을 확보하고자 Invitrogen사의 FastTrack MAG mRNA isolation Kit를 이용하였다. 확보한 mRNA를 주형으로 하고, (N)25-attB2-Biotin 올리고머를 이용하여 first strand를 합성하였다. First strand cDNA는 1초 동안 Vcx 750 Watt ultrasonication 처리하여 RNA에 적합한 250-500bp 단편으로 제작되었다. 250-500bp의 cDNA 단편은 게이트웨이 시스템을 이용하기 위해 이중가닥의 5' attB1 어댑터(adapter)를 T4 DNA 리가제(ligase)를 이용하여 부착하였다. 클로닝의 효율을 높이고자, cDNA 단편 5' 말단의 어댑터 서열 프라이머(adapter sequence primer, 5' attB1-oligo)와 3' 랜덤 프라이머(random primer, Biotine-attB2-(N)25)을 이용하여 PCR로 cDNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 PCR 정제(purification)를 거쳐, BP recombination에 사용되었다(도 3).

[0048] 4.8 µg의 attB-flanked cDNA PCR 산물을 4.5 µg의 pDONR 207 벡터에 게이트웨이 BP recombination을 이용하여 클로닝하였다. 클로닝 산물은 One shot Top10 electrocompetent *E. coli* cell (Invitrogen) 50 µl에 형질전환하고, 한천 플레이트에 도말하여 37℃에서 배양한 후, 생성된 콜로니를 회수하여 mini prep.을 수행, BP cDNA library를 추출하였다(도 3).

[0049] BP recombination을 통해 얻은 *B. tabaci* pDONR207 cDNA library와 AltMV-attB 벡터를 LR recombination을 수행하여, 앞에서와 마찬가지로 대장균(*E. coli* cell)에 형질전환하여 AltMV-cDNA library를 추출하였다. AltMV-cDNA library는 식물에 agro-infiltration을 통해 접종하기 위해 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* EHA 105)에 형질전환하여 콜로니를 회수, 보관하였다.

[0050] **실시예 3: AltMV- attB 벡터에 삽입된 B. tabaci cDNA 단편 확인**

[0051] AltMV-cDNA library가 형질전환된 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* EHA 105) 콜로니를 무작위로 50 개 선택하여 각각의 콜로니를 분석하였다. PCR을 이용하여 att cloning site에 삽입된 *B. tabaci*의 cDNA 단편을 증폭한 후, National Center for Biotechnology Information(NCBI) BLAST search를 이용하여 각각의 유전자 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 서로 중복되지 않았으며, 삽입된 DNA 크기는 150bp부터 700bp까지 존재하였으나, 90%가 200-300bp의 RNAi에 적합한 크기를 가짐을 확인하였다(표 1). 표 1에서 보는 바와 같이, 담배가루이 유전자라고 확인되는 샘플은 27개, 다른 유전자 및 유전자 정보를 확인할 수 없는 샘플은 21개, 염기서열 분석을 실패한(sequencing fail) 샘플은 2개로 확인할 수 있었다.

표 1

[0052] 50개 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 콜로니의 EST Blast search data

No.	EST blast search	size (bp)	Accession number
1	U_U-R_Forward-3491.b1 Bemisia tabaci forward SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence	231	JK485896.1
2	unknown	101	unknown
3	unknown	771	unknown
4	TOMOV-BT006_E08 Whitefly Bemisia tabaci(reared on TOMOV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA5', mRNA sequence.	95	EE599425.1

5	FP919033 Acyrthosiphon pisum whole insect males Acyrthosiphon pisum cDNA clone ACIOAAF8YK08 5', mRNA sequence.	139	FP919033.1
6	U_U-U_Forward-3830.b1 Bemisia tabaci forward SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence.	593	JK486234.1
7	BT-TYLCV-017-1-A5-T3_A05 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	364	EE600339.1
8	unknown	255	unknown
9	BT-TOMOV-017-1-A10-T3_A10 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TOMOV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	390	EE597788.1
10	HBT004_H01_T3_015 Whitefly Bemisia tabaci (non-viruliferous)cDNA library Bemisia tabaci cDNA5',mRNA sequence.	342	EE597198.1
11	2_Reverse-4323 Bemisia tabaci reverse SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence.	300	JK487193.1
12	unknown	316	unknown
13	BT-TYLCV-059-1-F4-T3_F04 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA5', mRNA sequence.	203	EE602025.1
14	BT_TYLCV003_A09 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	64	EE600011.1
15	unknown	114	unknown
16	ID0AAA3BF12FM1 ApMS Acyrthosiphon pisum cDNA clone ID0AAA3BF12 5', mRNA sequence	653	CN761972.1
17	BT_TYLCV003_A09 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants)cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	177	EE600011.1
18	unknown	84	unknown
19	Sequencing fail		Sequencing fail
20	unknown	79	unknown
21	U_U-I_Forward-2627.b1 Bemisia tabaci forward SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence.	314	JK485039.1
22	unknown		unknown
23	unknown		unknown
24	BT-HINST-001-1-H11-T3_H11 Whitefly Bemisia tabaci instar (crawler to pupae) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	206	EE602760.1
25	U_U-I_Forward-3278.b1 Bemisia tabaci forward SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence.	322	JK485683.1
26	BT-HINST-004-1-H3-T3_H03 Whitefly Bemisia tabaci instar (crawler to pupae) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	215	EE602910.1
27	unknown	156	unknown
28	unknown	267	unknown
29	unknown	269	unknown
30	unknown	734	unknown
31	CATF10874.fwd CATF Artemisia annua, Tanzanian, from Sandeman Seeds, 1-2kb Artemisia annua cDNA clone CATF10874 5', mRNA sequence	341	EY058051.1
32	BT-HINST-021-1-A9-T3_A09 Whitefly Bemisia tabaci instar (crawler to pupae) cDNA library Bemisia tabaci cDNA5',mRNA sequence.	135	EE603681.1
33	NACBU27TF Aedes aegypti infected with Brugia Malayi Aedes aegypti cDNA clone NACBU27,mRNA sequence.	501	DV366139.1
34	BT-TYLCV-018-1-H5-T3_H05 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence	155	EE600421.1
35	unknown	238	unknown
36	BT-TOMOV-014-1-H12-T3_H12 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TOMOV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence	162	FM143549.1
37	BT-TYLCV-048-1-B11-T3_B11 Whitefly Bemisia tabaci(reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA5',mRNA sequence.	203	EE601565.1
38	unknown	143	unknown
39	BT-TYLCV-059-1-F4-T3_F04 Whitefly Bemisia tabaci(reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	385	EE602025.1
40	BT-TYLCV-020-1-D4-T3_D04 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants)cDNA library Bemisia tabaci cDNA5',mRNA sequence.	202	EE600496.1
41	3_Reverse-4493 Bemisia tabaci reverse SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence.	293	JK487347.1

42	BT-TYLCV-021-1-A7-T3_A07 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA	573	EE600529.1
43	BT-TYLCV-054-1-E11-T3_E11 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	227	EE674663.1
44	unknown	239	unknown
45	Sequencing fail.		Sequencing fail.
46	unknown	573	unknown
47	BT-TYLCV-060-1-E4-T3_E04 Whitefly Bemisia tabaci(reared on TYLCV infected plants)cDNA library Bemisia tabaci cDNA5',mRNA sequence.	137	EE602067.1
48	unknown	500	unknown
49	unknown	265	unknown
50	A_Forward-1888 Bemisia tabaci forward SSH library Bemisia tabaci cDNA,mRNA sequence.	230	JK486690.1

실시예 4: 담배가루이 제어효과 확인

50개의 콜로니에 삽입된 담배가루이의 cDNA library를 확인한 후 각각의 콜로니를 토마토에 접종하여 바이러스에 의하여 삽입된 RNAi 발현을 유도하였다. 접종 20일 후 담배가루이를 방사하여 담배가루이의 증식을 억제하는 토마토균을 아래의 표 2와 같이 분리하여 바이러스에 의한 담배가루이의 제어효과를 확인하고 제어 cDNA 단편을 선별할 수 있었다. No. 7(서열번호 7) 과 No. 8(서열번호 8)의 유전자가 담배가루이 제어 효과가 있는 RNAi를 유도하는 cDNA 단편이었다(표 2).

표 2

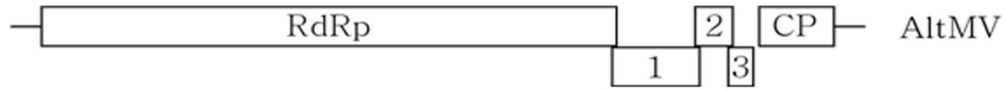
50개 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 콜로니의 담배가루이 제어효과 확인

No	EST blast search	담배가 루이 개체수	Accession number
1	U_U-R_Forward-3491.b1 Bemisia tabaci forward SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence	20	JK485896.1
2	unknown	25	unknown
3	unknown	14	unknown
4	FTOMOV-BT006_E08 Whitefly Bemisia tabaci(reared on TOMOV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA5', mRNA sequence.	25	EE599425.1
5	FP919033 Acyrthosiphon pisum whole insect males Acyrthosiphon pisum cDNA clone ACIOAAF8YK08 5', mRNA sequence.	33	FP919033.1
6	U8_U-U_Forward-3830.b1 Bemisia tabaci forward SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence.	25	JK486234.1
7	BT-TYLCV-017-1-A5-T3_A05 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	2	EE600339.1
8	unknown	0	unknown
9	BT-TOMOV-017-1-A10-T3_A10 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TOMOV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	23	EE597788.1
10	HBT004_H01_T3_015 Whitefly Bemisia tabaci (non-viruliferous)cDNA library Bemisia tabaci cDNA5',mRNA sequence.	33	EE597198.1
11	2_Reverse-4323 Bemisia tabaci reverse SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence.	25	JK487193.1
12	unknown	28	unknown
13	BT-TYLCV-059-1-F4-T3_F04 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA5', mRNA sequence.	33	EE602025.1
14	BT_TYLCV003_A09 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	11	EE600011.1
15	unknown	45	unknown
16	IDOAAA3BF12FM1 ApMS Acyrthosiphon pisum cDNA clone IDOAAA3BF12 5', mRNA sequence	36	CN761972.1

17	BT_TYLCV003_A09 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants)cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	27	EE600011.1
18	unknown	22	unknown
19	sequencing fail	33	sequencing fail
20	unknown	45	unknown
21	U_U-I_Forward-2627.b1 Bemisia tabaci forward SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence.	29	JK485039.1
22	unknown	33	unknown
23	unknown	9	unknown
24	BT-HINST-001-1-H11-T3_H11 Whitefly Bemisia tabaci instar (crawler to pupae) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	22	EE602760.1
25	U_U-I_Forward-3278.b1 Bemisia tabaci forward SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence.	33	JK485683.1
26	BT-HINST-004-1-H3-T3_H03 Whitefly Bemisia tabaci instar (crawler to pupae) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	19	EE602910.1
27	unknown	28	unknown
28	unknown	22	unknown
29	unknown	32	unknown
30	unknown	29	unknown
31	CATF10874.fwd CATF Artemisia annua, Tanzanian, from Sandeman Seeds, 1-2kb Artemisia annua cDNA clone CATF10874 5', mRNA sequence	33	EY058051.1
32	BT-HINST-021-1-A9-T3_A09 Whitefly Bemisia tabaci instar (crawler to pupae) cDNA library Bemisia tabaci cDNA5',mRNA sequence.	19	EE603681.1
33	NACBU27TF Aedes aegypti infected with Brugia Malayi Aedes aegypti cDNA clone NACBU27,mRNA sequence.	22	DV366139.1
34	BT-TYLCV-018-1-H5-T3_H05 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence	23	EE600421.1
35	unknown	25	unknown
36	BT-TOMOV-014-1-H12-T3_H12 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TOMOV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence	31	FM143549.1
37	BT-TYLCV-048-1-B11-T3_B11 Whitefly Bemisia tabaci(reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA5',mRNA sequence.	22	EE601565.1
38	unknown	25	unknown
39	BT-TYLCV-059-1-F4-T3_F04 Whitefly Bemisia tabaci(reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	35	EE602025.1
40	BT-TYLCV-020-1-D4-T3_D04 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants)cDNA library Bemisia tabaci cDNA5',mRNA sequence.	29	EE600496.1
41	3_Reverse-4493 Bemisia tabaci reverse SSH library Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence.	25	JK487347.1
42	BT-TYLCV-021-1-A7-T3_A07 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA	23	EE600529.1
43	BT-TYLCV-054-1-E11-T3_E11 Whitefly Bemisia tabaci (reared on TYLCV infected plants) cDNA library Bemisia tabaci cDNA 5', mRNA sequence.	21	EE674663.1
44	unknown	19	unknown
45	sequencing fail.	18	sequencing fail.
46	unknown	17	unknown
47	BT-TYLCV-060-1-E4-T3_E04 Whitefly Bemisia tabaci(reared on TYLCV infected plants)cDNA library Bemisia tabaci cDNA5',mRNA sequence.	22	EE602067.1
48	unknown	25	unknown
49	unknown	26	unknown
50	A_Forward-1888 Bemisia tabaci forward SSH library Bemisia tabaci cDNA,mRNA sequence.	28	JK486690.1

도면

도면1

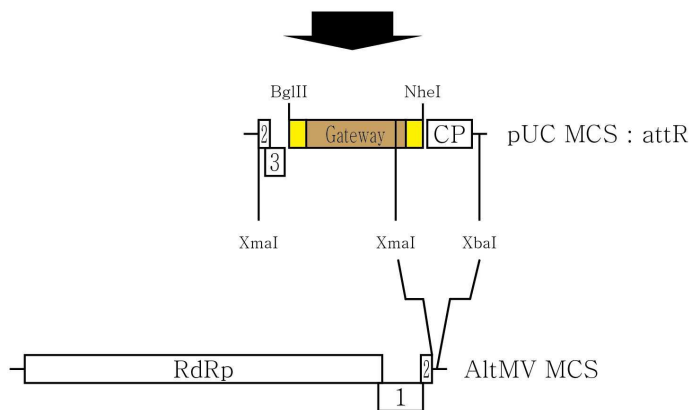


도면2

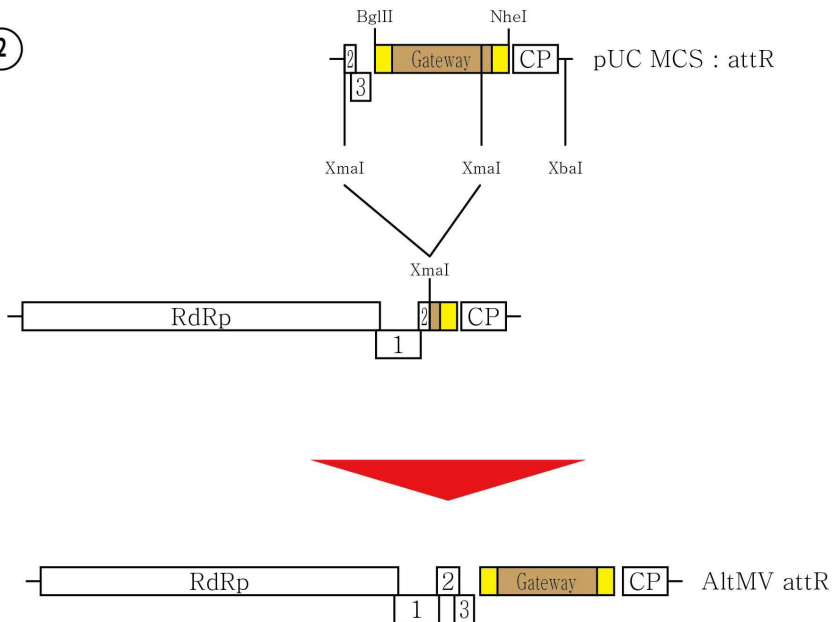
PCR Product



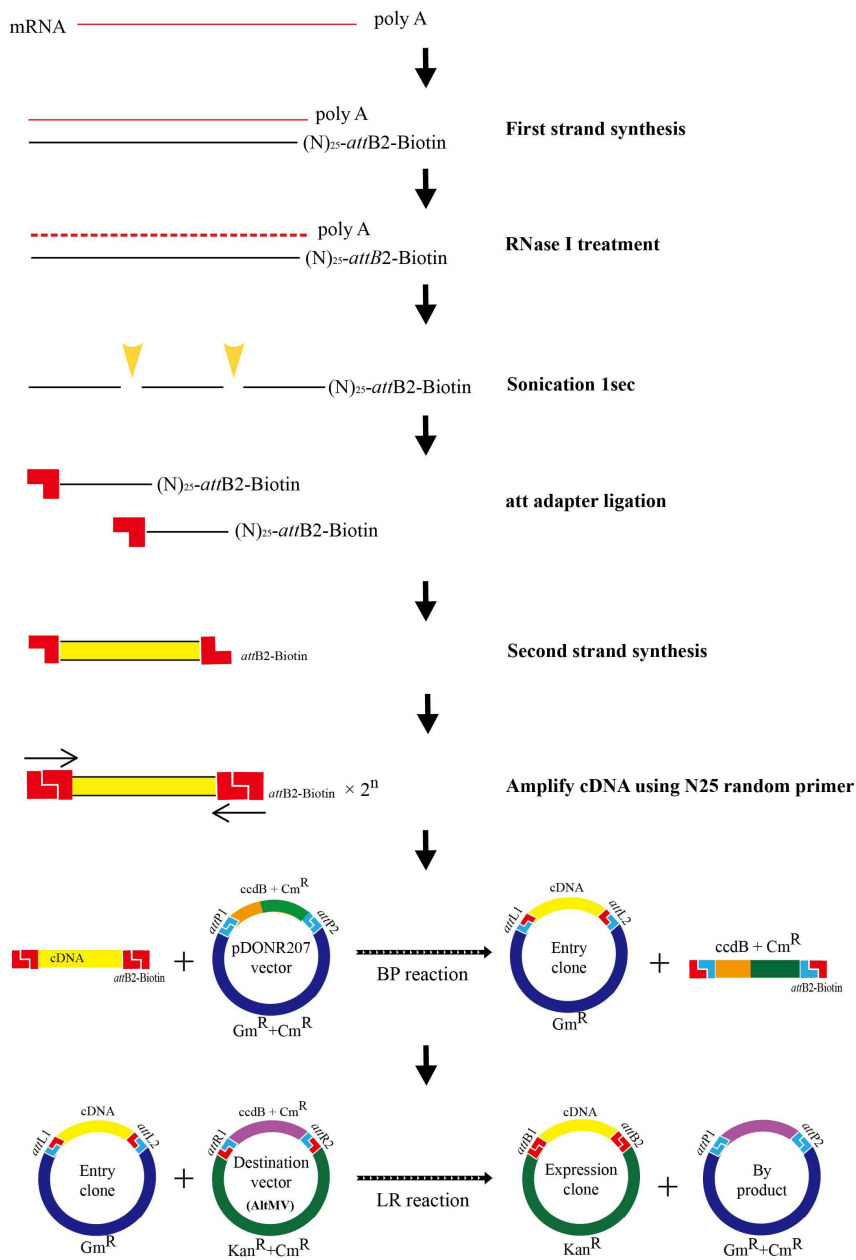
①



②



도면3



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> AltMV gateway expression vector and uses thereof
- <130> PN15067
- <160> 10
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 4625
- <212> DNA

<213> Alternanthera mosaic virus

<400> 1

atggcccact ttctgtccgt tcttgaccaa atgaatgacc ccagccttcg ggcggtcatc	60
caggaagaag cttaccgcga aataaagaaa accatcgagg aaaccaaaca gtacaaccct	120
tacgcccagg atccagcggc ggctgactca ttagaaaaat taggaataga atctaacccc	180
ttctcagtcc gcgtcatcac acacgcggcc gcgaagtcaa tagaattaga catgtacaaa	240
atcacgggtt attccctccc gaaggagaat ccaattactt tcttttcat gaagaggctc	300
aaacttcaat atttccacag agggccacag catggagact tattccttaa tgcttgtatt	360
gagccaaagg acgtcaccag gtacgcctta gaagacctct ttaaaccctc cacaacccca	420
gaaatccaaa ccagagtggc attcattgga gacacactac atttcttcc tctagggggc	480
atcagagaga tatttacaag ctcaaaaaag ctccaaactc tctatgcaac aatggtacta	540
ccccccaag ccatgcacag aatgcactca attcaccca gcattctacga gctagaattc	600
catgaaaaaa attttatata caagccggga ggacatgccg gggcgtctta ttgccacgaa	660
tactcacaac ttcagtggct caaggtcgga aaatttgagt ggtgcgacaa gaaatatcag	720
aagcactacg tgacatcaca gattctggaa accaagggtg caaatcacct ttttgtgttc	780
cagcgcggca atttcgccac ccctacctac cgaactttcg gggtagagac aaaatttgtc	840
acactccac ccatattcct cccaagaaa tacaacgcgc ggtaccgat aaagaaaact	900
gtggcgagc agctatttct ttacatcaag tccgtgaaaa cagtcacgga gagagacatc	960
tgggccaag ttagacagat cataaagacc gctgagctcc aaagctactc ggcaaaagag	1020
ctcgactca ttgtcaacta ctactgtctc atctctaagc tggactcggc cacatgtttt	1080
gacaatgtgc tcacaggggg tgtgtctcaag aagctcttta aaccatcgt ggcttggtgg	1140
tccaccttca aagggaagat cttcggaag gaggagtctg aacaacttat ggaggcgctt	1200
gagtgggtcg acgtgtcact gtctacaaa gtggagacat acagccaggc caacccaaac	1260
aatcagccca aggtgatgtt cgggtacgag tggctcagca cagaaacggg aacccagga	1320
acagaggagg acgccgtcc cgaaacccca caagaggacg aggaccaca tgaaagatat	1380
atccaggccc tccaaacact gacgaaggcc ctgcaccagg agagtgtcc accaccaaca	1440
gaaccagccc agtgtccag caccagtaat ccacaacagg aggagcactt ccgcccacc	1500
cacaacctcc aactgatga aacccaagc tctcaggaag ctgaattcc ttgtgtgcc	1560
actgcccgtg cggcacggaa ctcaaagttt tctcagccga gtttccacc attccccac	1620
tatcgacgg cgatcggtc aagaacaggg aagcattctt ctttcgaga gatggtactc	1680
cctacagcta cactgggggt tcccacgat ccagaggatg gccgacttcc cttgaccaga	1740

tcctggccac tgctgagttg gtgaggcccc tccccactt caaccaatgc ctcattcaaa	1800
aataccaaag aggcgcctcc atccccctcc acagagacga cgagccatgc tacgatgcgg	1860
accaccaagt gctcacaatc aacctcaccg gtgaagcaga attcaaaatc agctgcaaag	1920
ctggttcagg gagttgcacg ttagtagaga accagttcca cctgtccccc cccggtttcc	1980
aaaagacaca caagcacagt gtggtctcac ttagcgcggg gcgagtctcc ctcacattcc	2040
gtccactgt caagcagagc gttacctctg aagagggtga ctgtgtagaa cccgacaatc	2100
tgccgtggaa ggcttgctc ggaaagctga gaaacctggg cttcaggggc atgcagctgc	2160
aatacgatec aaatggggcc ttgatctcac caatcgaaag cgtcaagtca ctcccgaagt	2220
gtccccgga aaaggtcgac ccctccctcc tcaaaatgct agataatcag gctcgcgcac	2280
caactccatt ctgcccagc cccatcaggg caaaagctta ctctcagac gtcaaaaact	2340
ctcgaattgg cgcattactc cgacagcagg gcaaagattg gggccaccgc ttcgattcac	2400
ttgtggagaa tgggcagagg cagctagcca tcagtgtgat ccatggggcc ggtggctctg	2460
ggaaatcgag ggctttgcag atgtacctga aggacaaccc agatgctgat gtcacgatag	2520
tgctaccaac taacgagctg aggctcgact ggctgaagaa gttgccacc ttcccggcag	2580
accagatcaa aaccttcgag aaggccctgc tggctccac aaagcccaca gttatcttcg	2640
atgactacgg caaactgcc acccgggtaca ttgaatcctt ctattctac atgtcatcag	2700
ctgagcttct ggigtccacc ggtgactcca agcagagcgt gcatcacgag tctaagaga	2760
atgcgatgag cagcctcacc gaaccttca ctctggaagc tgataagtac tcacgtatt	2820
acatcaatgc cacacacaga aacaagcgtg atttggccaa caagctaggg gtctactcag	2880
aggtcacggg gataacatcc atcacccaag gcaaccaccc tgtgccggga cttcacctgc	2940
tcgtccctc actctacaag aaggaggctt tcagcgaaat gggtcacaag gtttccactt	3000
atgcgggctg tcagggcctc acagcccccac gcgtgcaaat tctgctctca gaagagacta	3060
gcatgtgttc ccgcgaagtc atttacaccg ccctctccc agccgttcac tccattcact	3120
ttgtcaactg cgccccaaac aatcaggctt tctgggccaa gctggagagc acaccttacc	3180
tgaaagcttt cctctccacg ctccgagaag acgcggcacc tgtcgtgaaa ccgaaagagg	3240
aagcaccagc tccagttgat ccccaaaga cccacatccc agttgactca gccatgccaa	3300
tttatgagga cttactggat cagatgccgg aaaagcatga gagggagatc ttttcagaaa	3360
ggcatgggca cagcaattgc gtgcaaacgg aggatacctt tgtgcaaatg ttcagtcacc	3420
agcaggctaa ggacgaaacc cttctctggg ctaccatcga ggcgagactg gtcatttcca	3480

accccaaggc caattggcaa gaattcatgg agaaaagacc gattggagat gtgctctttg 3540

 gtttctacag agaagcgatg gggctgcca ctgaacctat tgcctttgaa ccacagcttt 3600
 gggagtcttg catccatgag gtccagcgta cctacttggc aaagcccatc aacatgctga 3660
 agaatggaca ggctcggcaa tccccgatt atgatccaaa catgatatct ctctttctga 3720
 agtcccagtg ggtgaagaaa atggagaagt tgggcgcctt aaagatcaag cccggacaaa 3780
 ctattgcctc ctccaccag gccactgtca tgcgttctgg cacgatggct aggtacatga 3840
 ggagaatcgc ggaaattttc cagcctaaga acattgccat caactgcgag atgaccccag 3900
 aagatctcac agattgggccc gtgggtttctg ccggccagtg gaaattcgcc ggcccttctt 3960

 tagccaatga cticacagca ttcgatcagt cacaagatgg ggcgatgctt cagtttgagg 4020
 tcctcaaagc caaacaccac agcattccag aggatgtctt ggacgcttac ctacacatca 4080
 aaacaaactc gaagatcttc ttgggtacat tgaccattat gagactcacg ggtgaaggcc 4140
 ccactttcga tgcaaacact gagtgcaca tcgctttcac ccatgcaaaa tticagattc 4200
 caaagggtac agcccagctt tacgcggggg atgactcggc aattgatggc aacccccag 4260
 tgagagagag tticagattg gttgagcaga aattgaagct gaggtcaaaa ccggcgatcg 4320
 cgatgcagga aaaaggagac tgggcagaat tctgtggata caggattacg cccaaagggt 4380

 tcatcaagga tccaaagaaa cticacgca gtctggtgct tgaaaagaag agaggttaatt 4440
 tgaagaatgt gctgaggctc tatgagcttg acctggcctt ggcatatcag caccgggatg 4500
 aacttcacga attactctct gaggaggagc tgcgtcttca ctacgacag gttcgtacgc 4560
 tagttaagtc aggtggagga gaggttttga aaacttttct tccaaagat gaatcacttt 4620
 actaa 4625

 <210> 2
 <211> 699
 <212> DNA
 <213> Alternanthera mosaic virus
 <400> 2

 atgaatcact ttactaacct cctcattgaa gagggttacg tccggacgaa cgaaatcctc 60

 tcagatactc tagtcgtcca tgctgtagct ggcgttgcca agtccaccct catccgcaaa 120
 ttcatccatc agcatccaca ggcccgcgcg tacaccacag gattccctga cccccaaat 180
 ctgaaggcc gattcattca ggcttttaag aacctgacc caaaccactt caacatcctt 240
 gacgagtatt gtgcagaacc tctaagcggc agttggaacg tgctcatcgc cgacccctg 300
 caacatagat ctcaagctct tcgacccac tacatcaaaa gagagtcca caggctagga 360

gtagccacgt gtgaacttct caccagagtg gggctcccag tttgtccaa caagactgag	420
gatcaagttg attaccaggg cattttcgaa gggccccctt tcggcaccgt gattgctctg	480
gactccactg tcagagccct cctcgtaaag cacggaattc caccactctg cccagctgag	540
gtcctcgggt ctgagtttga gcaaacgaca gtagtctcgg aggttccgct tagccaggtc	600
aagttcaagc acgctctgta catcgtcttc acccgccaca agaagtctct ccatgtccgg	660
gtccccccac tcctgacac cccccgcga ttactctaa	699
<210> 3	
<211> 333	
<212> DNA	
<213> Alternanthera mosaic virus	
<400> 3	
atgtccgggc tccccactc cctgacacc cccgccgatt actctaagcc agtgcttgca	60
gcagcagtag gagttagttt agcttttagta ataaactctt tcttggctta taggcttccc	120
tcgccggggg acaatattca tcaactgcc tttggagggt cctaccggga cggaactaag	180
agcatccact acaattgcc tagggcccag agtcagatct caggtagctc accgttctctg	240
ataatcctga tactctcagc cctcatctat gccctatctt gtagaggcgg ccatcaccgt	300
gtcgtcttgc ataggtgtcc ttgctgctct tag	333
<210> 4	
<211> 192	
<212> DNA	
<213> Alternanthera mosaic virus	
<400> 4	
atgccctatc ttgtagagge ggccatcacc gtgctcgctt gcataggtgt ccttgtgct	60
cttaggccag ggtcccatcc ttgcaccatt ctgctaactg gacactctgc gaccattagc	120
ggaaactgcg gacctgtcgc accagagacc atcagggtc tttggagacta cttaaccggg	180
cttaggtttt ag	192
<210> 5	
<211> 624	
<212> DNA	
<213> Alternanthera mosaic virus	
<400> 5	
atgtctacac catttctca agtcactcag gaacagatga acgccttcac tccacatacc	60

acatccaatc tccttccatc accggagcag ttgaccacca ttgccaacct cttggttgct	120
gccaaggtgc ctgccgcctc aaccacgacc atcgccctgg agcttggttaa cttctgttat	180
gacaatggct ccagtaccta cacagcgggtg gtgggccctt cttcacttgc agaggtctca	240
ctctcccagg tcgctaacat cgtcaaagcc tcaggcacct ctctccgcaa attctgcaga	300
ttctttgtct caatcatctg gaacctcaga acagacaaga cgccccagc caactgggaa	360
gccaatgggt tcaaaccgac agagaagttt gcagccttcg atttcttcga tggagtggag	420
aatccggcgg ccatgcagcc accaggagggt ttggttagga ctcccagcca agcagaaagg	480
atcgccaacg ctactaaca gcaggtaaac ctctttcagg ccgcggcaca ggataataac	540
ttcgccagca actctgcatt catcaccaag ggccaattgt cctccaactc accaaccatt	600
caatacctcc caccacctga gtga	624
<210> 6	
<211> 8497	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> vector	
<400> 6	
gaaaagtaaa gcaaagcaaa gcaaagcaaa gaaactgaaa gtctatattt gcccttcgag	60
gagatcgatt acccatcccg gctagatcaa cagtatggcc cactttcggt ccgttcttga	120
ccaaatgaat gaccccagcc ttccggcggt catccaggaa gaagcttacc gcgaaataaa	180
gaaaaccatc gcggaaacca aacagtacaa cccttacgcc caggatccag cggcggctga	240
ctcattagaa aaattaggaa tagaatctaa ccctttctca gtccgcgctc atacacacgc	300
ggccgcgaag tcaatagaat tagacatgta caaaatcacg gggttactccc tcccgaagga	360
gaatccaatt actttccttt tcatgaagag gtccaaactt caatacttcc acagaggccc	420
acagcatgga gacttatctc ttaatgcttg tattgagcca aaggacgtca ccaggtacgc	480
cttagaagac ctctttaaac cctccacaac ccagaaaac caaaccagag tggcattcat	540
tggagacaca ctacacttcc ttctctagg ggccatcaga gagatattta caagctcaca	600
aaagtccaa actctctatg caacaatggt actaccccc gaagccatgc acagaatgca	660
ctcaattcac ccagcatct acgagctaga attccatgaa aaaaatttta tatacaagcc	720
gggaggacat gccggggcgt cttattgcca cgaatactca caacttcagt ggctcaaggt	780
cgaaaaattt gagtgggtgcg acaagaaata tcagaagcac tacgtgacat cacagattct	840
ggaaaccaag ggtgcaaact acctttttgt gtccagcgc ggcaatttcg ccaccctac	900

ctaccgaact ttcggggtag agacaaaatt tgtcacactc ccacccatat tcctcccaaa	960
gaaatacaac gcgcggtacc cgataaagaa aactgtggcg cagcagctat ttctttacat	1020
caagtccgtg aaaacagtca cggagagaga catctgggcc aaagttagac agatcataaa	1080
gaccgctgag ctccaaagct actcggcaaa agagctcgca ctcatgttca actactactt	1140
gctcatctct aagctggact cggtcacatg ttttgacaat gtgtcacag ggggtgtgct	1200
caagaagctc tttaaacca tcgtggcttg gtggtccacc ttcaaaggga agatcttcgg	1260
gaaggaggag ttgaacaac ttatggaggc gcttgagtgg gtcgacgtgt cactgtccta	1320
caaagtggag acatacagcc aggccaaccc aaacaatcag cccaaggtga tgttcgggta	1380
cgagtggctc agcacagaaa cgggaacccc aggaacagag gaggacgccg ctcccgaac	1440
cccacaagag gacgaggacc cacatgaaag atatatccag gccctccaa cactgacgaa	1500
ggccctcgac caggagagtg ctccaccacc aacagaacca gccagtgct ccagcaccag	1560
taatccaaa caggaggagc acttcgccc accccacaac ctccactg atgaaacccc	1620
aagctctcag gaagctcgaa ttctttgct tgccactgcc cgtgcggcac ggaactcaaa	1680
gttttctcag ccgagtttcc acccattecc ccactatcgc acggcgatcg gctcaagaac	1740
aggggaagcat tcttcttttc gagagatggi actccctaca gctacactgg gggttccac	1800
gcatccagag gatggccgac tttctttgac cagatcctgg ccactgctga gttggtgagg	1860
cccctcccc acttcaacca atgctcctc caaaaatacc aaagaggcgc ctccatcccc	1920
ttccacagag acgacgagcc atgctacgat gcggaccacc aagtgtcac aatcaacctc	1980
accggtgaag cagaattcaa aatcagctgc aaagctggtt cagggagttg cacgttagta	2040
gagaaccagt tccacctgtc ccccccggt ttccaaaaga cacacaagca cagtgtggtc	2100
tcacttagcg cggggcgagt ctccctcaca ttccgctcca ctgtcaagca gagcgttacc	2160
tctgaagagg gtgactgtgt agaaccgac aatctgccgt ggaaggcctg gctcggaaag	2220
ctgagaaacc tgggcttcag gggcatgcag ctgcaatag atccaaatgg ggccttgatc	2280
tcaccaatcg aaagcgtcaa gtcactcccg aagtgtccc cggaagaggt cgaccctcc	2340
ctctcaaaa tgetagataa tcaggctcgc gcaccaactc cattctcgcc cagccccatc	2400
agggcaaaag ctactcctc agacgtcaaa aactctcgaa ttggcgcat actccgacag	2460
cagggcaaag attggggcca ccgcttcgat tcacttgttg agaattggga gaggcagcta	2520
gccatcagtg tgatccatgg ggccggtggc tctgggaaat cgagggcgtt gcagatgtac	2580
ctgaaggaca acccagatgc tgatgtcac atagtgtac caactaacga gctgaggctc	2640
gactggctga agaagttgcc caccttcccg gcagaccaga tcaaaacctt cgagaaggcc	2700
ctgctggctc ccacaaagcc cacagttatc ttcatgact acggcaaact gccagccggg	2760

tacattgaat ccttctcatt ctacatgtca tcagctgagc ttctgggtgct caccggtgac	2820
tccaagcaga gcgtgcatca cgagtctaata gagaatgcga tgagcagcct catcgaaccc	2880
ttcactctgg aagctgataa gtactcacgc tattacatca atgccacaca cagaaacaag	2940
cgatgatttg ccaacaagct aggggtctac tcagaggtca cggggataac atccatcacc	3000
caaggcaacc accctgtgcc gggacttcac ctgctcgtcc cctcactcta caagaaggag	3060
gctttcagcg aaatgggtca caaggtttcc acttatgcgg gctgtcaggg cctcacagcc	3120
ccacgcgtgc aaattctgct ctcaagaag actagcatgt gttcccgcga agtcatttac	3180
accgccctct cccgagccgt tcaatccatt cactttgtca actgcggccc aaacaatcag	3240
gctttctggg ccaagctgga gagcacacct tacctgaaag ctttcctctc cagctccga	3300
gaagacgcgg cacctgtcgt gaaaccgaaa gaggaagcac cagctccagt tgatcccca	3360
aagaccaca tccagttga ctacagcatg ccaatttatg aggacttact ggatcagatg	3420
ccggaagagc atgagaggga gatcttttca gaaaggcatg ggcacagcaa ttgcgtgcaa	3480
acggaggata cttttgtgca aatgttcagt caccagcagg ctaaggacga aacccttctc	3540
tgggtacca tcgaggcgag actggtcatt tccaaccca aggccaattg gcaagaattc	3600
atggagaaaa gaccgattgg agatgtgctc ttgggtttct acagagaagc gatggggctg	3660
cccactgaac ctattgcctt tgaaccacag ctttgggagt cttgcatcca tgaggtccag	3720
cgtacctact tggcaaagcc catcaaatg ctgaagaatg gacaggctcg gcaatcccc	3780
gattatgac caaacatgat atctctcttt ctgaagtccc agtgggtgaa gaaaatggag	3840
aagttaggcg ccttaaagat caagcccga caaactattg cctccttcca ccaggccact	3900
gtcatgctgt tcggcacgat ggctaggtag atgaggagaa tgcgggaaat ttccagcct	3960
aagaacattg ccatcaactg cgagatgacc ccagaagatc tcacagattg ggccgtgggt	4020
tctgccggcc agtggaaatt cgccggccct tctttagcca atgacttcac agcattcgat	4080
cagtcacaag atggggcgat gcttcagttt gaggtcctca aagccaaaca ccacagcatt	4140
ccagaggatg tcttggacgc ttacctacac atcaaaacaa actcgaagat cttcttgggt	4200
acattgacca ttatgagact cacgggtgaa ggccccactt tcgatgaaa cactgagtgc	4260
aacatcgctt tcacccatgc aaaatttcag attccaaagg gtacagcca gctttacgcg	4320
ggggatgact cggcaattga tggcaacccc ccagttagag agagtttcag attggttgag	4380
cagaaattga agctgaggtc aaaaccggcg atcgcgatgc agggaaaagg agactgggca	4440
gaattctgtg gatacaggat tacgccccaa ggtttcatca aggatccaaa gaaacttcac	4500

gcgagtcctgg tgcttgaaaa gaagagaggt aatttgaaga atgtgctgag gtcctatgag	4560
cttgacctgg ccttggcata tcagcaccgg gatgaacttc acgaattact ctctgaggag	4620
gagctgcgtc ttactacga caccgttcgt acgctagtta agtcaggtagg aggagaggtt	4680
ttgaaaactt ttcttcccaa agatgaatca ctttactaac ctctcattg aagagggtta	4740
cgtccggacg aacgaaatcc tctcagatac tctagtcgtc catgctgtag ctggcgctgg	4800
caagtccacc ctcatccgca aattcateca tcagcatcca caggcccgcg cgtacaccca	4860
cggagtcctt gaccccccaa atcttgaagg ccgattcatt caggctttta agaaccctga	4920
cccaaaccac ttcaacatcc ttgacgagta ttgtgcagaa cctctaagcg gcagttggaa	4980
cgtgctcatc gccgaccccc tgcaacatag atctcaagct cttcgacccc actacatcaa	5040
aagagagtcc cacaggctag gagtagccac gtgtgaactt ctcaccagag tggggctccc	5100
agttttgtcc aacaagactg aggatcaagt tgattaccag ggcattttcg aagggccctt	5160
tttcggcacc gtgattgctc tggactccac gtgcagagcc ctctcgtaa agcacggaat	5220
tccaccactc tgcccagctg aggtcctcgg gtctgagttt gagcaaacga cagtagtctc	5280
ggaggttccg cttagccagg tcaagttcaa gcacgctctg tacatcgctc tcaccgcca	5340
caagaagtct ctccatgtcc gggctcccc actccctgac accccccgcg gattactcta	5400
agccagtgtc tgcagcagca gtaggagtta gtttagcttt agtaataaac tctttcttgg	5460
tctataggct tcctcgcgcc ggggacaata ttcatcaact gccctttgga ggttcctacc	5520
gggacggaac taagagcatc cactacaatt cgcctagggc ccagagtcag atctcaggtg	5580
cgtcaccgtt cctgataatc ctgatactct cagccctcat ctatgcccta tctttagtag	5640
gcggccatca ccgtgctcgc ttgcataggt gtcttctgtg ctcttaggcc aggggtcccat	5700
ccttgacca ttctgctaac tggacactct gcgaccatta gcggaaactg cggacctgtc	5760
gcaccagaga ccatcagggc tcttggagac tacttaaccg ggcttaggtt ttagcattag	5820
tttgattatc ctatcgtcat cctagttgaa gtcacatgt ctaattcgat tatcctattg	5880
tcatcctagt tgaagtccac atgggatcca cgcgtagatc tacaagtttg tacaaaaaag	5940
ctgaacgaga aacgtaaaaat gatataaata tcaatatatt aaattagatt ttgcataaaa	6000
aacagactac ataatactgt aaaacacaac atatccagtc atattggcgg ccgcattagg	6060
cacccaggc tttacacttt atgcttcgg ctcgataaat gtgtggattt tgagttagga	6120
tccgtcgaga ttttcaggag ctaaggaagc taaaatggag aaaaaaatca ctggatatac	6180
caccgttgat atatccaat ggcatcgtaa agaacatttt gaggcatttc agtcagttgc	6240

tcaatgtacc tataaccaga ccgttcagct ggatattacg gcctttttaa agaccgtaaa	6300
gaaaaataag cacaagtttt atccggcctt tattcacatt ctgccccgcc tgatgaatgc	6360
tcatccggaa ttccgtatgg caatgaaaga cggtgagctg gtgatatggg atagtgttca	6420
cccttgttac accgttttcc atgagcaaac tgaacgttt tcatcgctct ggagtgaata	6480
ccacgacgat ttccggcagt ttctacacat atattcgcaa gatgtggcgt gttacggtga	6540
aaacctggcc tatttccta aagggtttat tgagaatatg ttttcgtct cagccaatcc	6600
ctgggtgagt ttaccagtt ttgatitaaa cgtggccaat atggacaact tcttcgcccc	6660
cgttttcacc atgggcaaat attatacgca aggcgacaag gtgctgatgc cgctggcgat	6720
tcaggttcat catgccgttt gtgatggcct ccatgtcggc agaatgctta atgaattaca	6780
acagtactgc gatgagtggc agggcggggc gtaaacgct ggatccggct tactaaaagc	6840
cagataacag tatgcgtatt tgcgcgtga tttttgcggt ataagaatat atactgatat	6900
gtataccga agiatgtcaa aaagaggtat gctatgaagc agcgtattac agtgacagtt	6960
gacagcgaca gctatcagtt gctcaaggca tatatgatgt caatatctcc ggtctggtaa	7020
gcacaacat gcagaatgaa gcccgctgtc tgcgtgccga acgctggaaa gcggaaaatc	7080
aggaagggat ggctgaggtc gcccgtttta ttgaaatgaa cggtctcttt gctgacgaga	7140
acaggggctg gtgaaatgca gtttaaggtt tacacctata aaagagagag ccgttatcgt	7200
ctgtttgtgg atgtacagag tgatattatt gacacgccg ggcgacggat ggtgatcccc	7260
ctggccagt cagctctgt gtcagataaa gtctcccgtg aactttacc ggtgggtcat	7320
atcggggatg aaagctggcg catgatgacc accgatatgg ccagtgtgcc ggtctccgtt	7380
atcggggaag aagtggctga tctcagccac cgcgaaaatg acatcaaaaa cgccattaac	7440
ctgatgttct ggggaatata aatgtcaggc tcccttatac acagccagtc tgcaggtcga	7500
ccatagtgc tggatatgtt gtgttttaca gcattatgta gtctgtttt tatgcaaaat	7560
ctaatttaat atattgat atatatcatt ttacgtttct cggttcagctt tcttgtacaa	7620
agtgtgtcta gccaccagag accatcaggg ctcttgaga ctacttaacc gggcttaggt	7680
tttagcatta gtttgattat cctatcgtca tctagtga agtcatcatg tetacacat	7740
ttctcaagt cactcaggaa cagatgaacg ccttactcc acataccaca tccaatctcc	7800
ttccatcacc ggagcagttg accaccattg ccaacctctt ggttctgcc aaggctcctg	7860
ccgctcaac cagcaccatt gccctggagc ttgttaactt ctgttatgac aatggtcca	7920
gtacttacac agcgggtgtg ggcccttctt cacttgcaga ggtctcactc tcccaggtcg	7980
ctaacatcgt caaagctca ggcacctctc tccgaaatt ctgcagatc tttgtccaa	8040
tcatctggaa ctcagaaca gacaagacgc cccagccaa ctgggaagcc aatgggttca	8100

aaccgacaga gaagtttgca gccttcgatt tcttcgatgg agtggaaaat cggcgggcca 8160
 tgcagccacc aggagggttg gttaggactc ccagccaagc agaaaggatc gccaacgcca 8220
 ctaacaagca ggtaaacctc tttcaggccg cggcacagga taataacttc gccagcaact 8280
 ctgcattcat caccaagggc caattgtcct ccaactcacc aaccattcaa tacctccac 8340

cacctgagtg atttctccac ccagttcaag cccgttgttt tcgcaatttt gttggggcta 8400
 tcgagtttcc aaaattgctt ccgcttctgt agacctaaat tacagcctaa tggggggttt 8460
 aatacctatt tacgccccaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 8497

<210> 7
 <211> 364
 <212> DNA
 <213> Bemisia tabaci
 <400> 7

gctatcgagg ctgttgagg gttgctgttg ttgcggttgt tgttgttgtt gcggttgttg 60
 tcgttgagct gggaagagct ggaagaggag ctggagtcgc tgctagagct ggatgagctg 120
 gaggaggaag aagaggagct gctgctggag tcactggatg agctgctgct agagtcgcta 180

gatgaagagc tgctgctgga gtaggaggag tcctggctct tggcgtactt gttgttcttg 240
 tagtacttgt tgtactggga gttggagggg tcgtagtatt tggcgttctt gtaggcggat 300
 tcgtagtatt tgcgttgtt gttgtatttg tatccgtatc cggcgttcgc tgcgcgctag 360
 gtaa 364

<210> 8
 <211> 255
 <212> DNA
 <213> Bemisia tabaci
 <400> 8

tttgagagct ttgattctcc tcttcaccgg agcaggagga ttcgcgatca tttcttgatt 60
 aagccttctt tgaagagctg caagaataac aggccgtctg aaaacctggg cgatgttgct 120

gtcatctcca gtatcttctt ccattccttc agtctcatca ttactgtcaa cttttgttg 180
 gtctgcagcc attgttgatt cagatagtta acgtgcacga gaaaaagac acttccacgg 240
 cccacatgtc attgc 255

<210> 9
 <211> 34
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gagagatcta caagtttgta caaaaaagct gaac 34

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gaggctagca ccactttgta caagaaagct g 31