

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0052966 (43) 공개일자 2016년05월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0148603 (22) 출원일자 2014년10월29일 심사청구일자 2014년10월29일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내) (72) 발명자 이상원 경기 수원시 영통구 영통로290번길 25, 504동 203호 (영통동, 신나무실주공아파트) 박종찬 부산 부산진구 복지로 70, 206동 304호 (개금동, 현대아이아파트) 안진홍 경기 용인시 기흥구 탑실로 152, 210동 1703호 (공세동, 탑실마을대주피오레2단지) (74) 대리인 손민	

전체 청구항 수 : 총 19 항

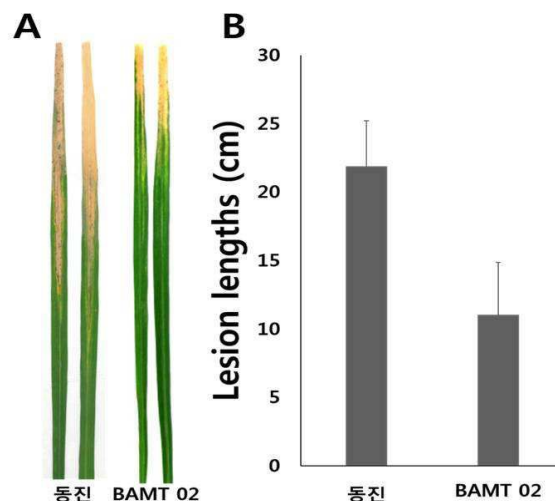
(54) 발명의 명칭 **흰잎 마름병 저항성 메틸전이효소 및 이를 이용한 형질 전환 식물체**

(57) 요약

본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s02g04500 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체, 상기 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터 및 상기 식물 형질 전환체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 상기 LOC_0s02g04500 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법에 관한 것이다.

본 발명은 벼에 내재적으로 존재하며 흰잎 마름병에 대한 저항성 유전자, LOC_0s02g04500의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열을 삽입함으로써, 흰잎 마름병에 대해 강력한 저항성을 갖는 형질전환 벼에 대한 것으로, 본 발명의 형질전환 벼를 이용하면 병 저항성을 통해 농약사용 절감, 생산성 향상 및 안전한 농산물 공급이 가능하게 되어 널리 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

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

명세서

청구범위

청구항 1

메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os02g04500 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 LOC_Os02g04500 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 LOC_Os02g04500 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 메틸전이효소로 코딩되는 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 4

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

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 벼 (*Oryza sp.*)는 동진벼인 식물 형질 전환체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 활성 강화는 LOC_Os02g04500 유전자의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열 또는 프로모터를 삽입하여 이루어지는 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 발현 유도 서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 8

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

청구항 9

메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os02g04500 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 LOC_0s02g04500 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 LOC_0s02g04500 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 메틸전이효소로 코딩되는 것인, 재조합 벡터.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 발현 유도 서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.

청구항 13

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

청구항 14

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

청구항 15

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

병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법.

청구항 16

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

청구항 17

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

청구항 18

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

청구항 19

메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s02g04500 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s02g04500 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체, 상기 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터 및 상기 식물 형질 전환체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 상기 LOC_0s02g04500 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 벼 흰잎 마름병은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 에 의해서 발생하는 세균성 도관병으로, 발병시기는 7월 초~수확기이나 주로 7월 상순~8월 중순에 발병한다. 중간 기주식물인 줄풀 및 겨풀 등의 땅속줄기 또는 뿌리주위나 병든 벼짚 및 벼 그루터기에서 세균의 월동이 가능하다. 세균이 편모(鞭毛)에 의해 물을 따라 전염하고 벼잎의 물구멍과 공기구멍 부위 및 절단된 뿌리로 침입한다. 병 발생은 해마다 발생이 많은 상습발생지 위주로 발생하나 침관수지역이 아닌 지역에서도 발생이 많다.
- [0003] 보통 출수기 전후에 나타나나 상습발생지나 다발생 발생지에는 본답 초기에 발병하며, 드물게는 묘판에서도 발병된다. 국내에서 최초 발병보고는 1930년 전라남도 해남군에서 처음 발견된 이래 1960년까지 남부 일부 지역에 제한적인 발생을 보이다 이병성 품종인 금남풍의 재배 확대로 전국적인 발생을 나타내었으며, 이후 다수계 품종 재배에 의한 밀양 23호에 의해 피해가 확대되어 재배기간 중 후기에 발생하는 잎에서의 발병 뿐만 아니라 이앙 후 분얼기까지 주 전체가 발생하는 금성형 증상을 보여 벼의 3대 병해의 하나로 간주된다.
- [0004] 벼 흰잎 마름병균은 그람음성세균으로 분류되고 벼의 세균성 위조병을 유발하는 식물병원세균으로 세계적으로 널리 분포하여 벼에 큰 피해를 주지만, 병원균이 벼의 도관 내에서 증식하므로 약제방제 효과는 매우 낮으며, 현재까지 이 병에 특이적인 살균제 또한 없는 실정이다.
- [0005] 또한, 기존의 작물에 대한 저항성 부여방법은 외래 유전자의 도입을 통해 식물체로 하여금 새로운 형질을 부여하는 기술이 대다수였다.
- [0006] 한편, 동진벼는 내병, 양질, 다수성 신품종육성을 목표로 1975년에 농촌진흥청에서 금남풍과 낙동벼 그리고 사도미노리를 교배하여 개발된 품종으로, 병해 저항성의 경우 줄무늬잎마름병에 강하고, 도열병에는 중간 정도의 저항성을 가지며, 흰잎 마름병과 기타 병충해에는 약한 편이다. 이에, 동진벼의 흰잎 마름병과 도열병에 대한 저항성 연구와 개량된 품종에 대한 육성 전략이 요구되고 있다.
- [0007] 이에 본 발명자들은 아직 극복되지 못한 벼 흰잎 마름병에 대한 저항성 유전자를 동정하기 위해 예의 연구 노력한 결과, 천연형 벼 동진의 보유 유전자 중 흰잎 마름병에 저항성을 부여하는 메틸전이효소 유전자(LOC_0s02g04500)를 동정해내어, 이를 활성화시킨 형질전환체가 흰잎 마름병에 저항성을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s02g04500 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s02g04500 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 상기 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 식물을 감염시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 감염된 식물의 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 식물의 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s02g04500 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s02g04500 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체를 제공한다.
- [0013] 본 발명에서는 메틸전이효소인 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 LOC_0s02g04500 유전자의 활성이 강화되도록, LOC_0s02g04500의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열을 삽입함으로써, 해당 유전자를 발현하여 흰잎 마름병에 대해 저항성을 갖춘 형질전환 벼를 제조하였다.
- [0014] 보다 상세하게는 본 발명자들은 아그로박테리움(Agrobacterium)을 이용한 형질전환 방법을 통해 만들어진 10만 개통의 벼 돌연변이 집단에서 흰잎 마름병에 저항성이 있는 식물 형질 전환체를 관찰하였다. 상기 식물 형질 전환체는 아그로박테리움(Agrobacterium)에 의해 유전자를 발현시키는 발현 유도 서열을 포함하는 T-DNA 가 genome 상에 삽입되어 삽입된 지역의 유전자 기능이 활성화된 식물체로, T-DNA의 삽입 위치는 genome DNA PCR과 염기서열 분석을 통해 확인할 수 있으며, 데이터 베이스에서 유전자 locus id를 찾을 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 용어 “메틸전이효소”는 메틸기전이를 촉매하는 효소의 총칭으로, 메틸기전달효소의 일종으로 기질인 아미노기, 히드록시기, 티올기를 메틸화하여 메틸화효소라고 부르는 경우도 있다
- [0016] 본 발명에서 용어, “LOC_0s02g04500”는 Oryza sativa 2번째 유전체 (chromosome)에 존재하는 유전자로, 이의 발현물은 단백질 메틸전이효소의 일종이다. 상기 LOC_0s02g04500 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가지며, 상기 염기서열은 서열번호 3의 아미노산 서열로 코딩된다.
- [0017] 본 발명에서 상기 식물 형질 전환체 제조에 사용되는 LOC_0s02g04500 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 유전자 일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 유전자 일 수 있으며, 또는 서열번호 3의 아미노산 서열로 코딩되는 유전자 일 수 있다.
- [0018] 상기 LOC_0s02g04500 (TIGR, Os02g0137600 (RAP-DB))의 genome DNA 크기는 2698 bp (서열번호 1)이며 대표 coding sequence (LOC_0s02g04500.1)의 크기는 1311 bp (서열번호 2)로 5개의 exon과 4개의 intron으로 구성되며, 436 개의 아미노산으로 번역되어 단백질 (서열번호 3)이 만들어진다. 이 단백질은 plant methyltransferase domain (Methyltransf_7)을 암호화 한다 (도 1B).
- [0019] 상기 LOC_0s02g04500 유전자는 벼에 내재적으로 존재하는 유전자로, 본 발명에서 용어, "내재적"이란 생물이 천연의 상태로 가지고 있는 것을 의미하는데, 본 발명에서는 식물, 바람직하게는 벼(Oryza sp.) 유전체 (chromosome)가 천연적으로 가지고 있는 유전자를 표시할 때 사용한다.
- [0020] 본 발명에서 용어, "활성 강화"는 특정 유전자의 활성을 강화시키는 것을 의미하고, 용어 “활성화”와 혼용하여 사용될 수 있다. 또한 불활성화된 유전자를 활성화시키거나 활성이 낮은 유전자의 활성을 높이는 것도 포함한다. 1) 해당하는 유전자를 1 카피 이상 도입, 2) 해당하는 유전자의 발현 조절 부위에 발현을 유도하는 서열을 삽입, 3) 활성이 강화된 형태로 변형시키는 방법으로 강화, 또는 4) 이의 조합에 의해 활성이 강화되도록 변형시킬 수 있다. 본 발명에서는 바람직하게는 LOC_0s02g04500의 발현 조절 부위에 발현을 유도하는 서열 또는 프로모터(promoter)를 삽입할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 4로 기재되는 발현 유도 서열을 포함하는 서열을 삽입할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 용어, "활성이 낮은 유전자"는 DNA, 즉 유전자 상으로는 존재하나 RNA로 전사(transcription)되는 비율이 낮거나, 단백질로 번역(translation) 되는 비율이 낮아서 본연의 기능을 발휘하지 못하는 것을 의미하고, 본 발명에서는 벼가 내재적으로 가지고 있는 유전자가 전사 또는 번역이 되는 비율이 낮아서 그 기능을 제대로 발현하지 못하는 것을 의미하고, 특히, LOC_0s02g04500 유전자가 그 기능을 제대로 발현하지 못하는 것을 의미한다.

- [0022] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 LOC_0s02g04500 유전자의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열(서열번호 4)을 삽입함으로써, LOC_0s02g04500 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였다(도 4). 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 상기 LOC_0s02g04500 유전자의 활성이 강화되도록 형질전환된 식물 형질 전환체가 흰잎 마름병에 대해 병 저항성을 가지는 것을 확인하였다(도 5).
- [0023] 본 발명에서 용어, "발현 유도 서열"은 유전자의 발현 조절 부위에 존재할 때 발현을 촉진하는 기능을 하는 서열을 제한없이 포함하며, 전사인자 결합 부위, 인핸서(enhancer), 조효소 결합 부위(co-factor binding region) 등을 포함한다. 본 발명에서 상기 유전자의 발현 조절 부위에 삽입되는 서열은 서열번호 4로 기재되는 발현 유도 서열을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 DNA 염기서열 상의 삽입, 결실 또는 대체 등의 변이를 통해 특정 형질이 발생하거나 사라지거나 조절되는 모든 행위를 의미하며, 특히 본 발명에서는 외부로부터 주어진 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것을 의미한다. 본 발명에서 용어, "형질 전환체"는 형질전환으로 인해 생성된 형질 전환 식물을 의미하며, 유전자 재조합 기술을 이용하여 특정 유전자의 변형 또는 활성의 변이가 유발되어 생성된 유전자 재조합체를 포함한다.
- [0025] 본 발명에서 용어, "식물 형질 전환체"는 형질전환의 대상이 될 수 있는 모든 식물을 포함하며, 특히, LOC_0s02g04500 유전자 또는 이에 해당하는 유전자가 불활성되거나 활성이 낮은 식물은 모두 제한없이 포함한다. 바람직하게는 상기 식물 형질 전환체는 벼(*Oryza sp.*)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 동진벼일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 식물 형질 전환체는 흰잎 마름병에 대한 저항성을 가질 수 있다.
- [0027] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 동진벼에 상기 내재적 유전자인 LOC_0s02g04500의 발현 조절 부위에 서열번호 4의 발현 유도 서열을 삽입하는 형질전환을 통하여 LOC_0s02g04500에 해당하는 유전자의 활성이 강화되는 형질전환체를 제조하였으며, 이를 BAMT 02라고 명명하였다.
- [0028] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s02g04500 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0029] 상기 메틸전이효소, LOC_0s02g04500 및 발현 유도 서열은 상기 설명한 바와 같다.
- [0030] 본 발명에서 용어, "병 저항성"은 각종 질병에 대해 발병이 잘 일어나지 않거나, 발병되더라도 병 진행의 속도가 현저히 느리거나, 회복이 되는 능력이 뛰어난 것을 의미한다. 본 발명에서 병 저항성은 흰잎 마름병에 대한 저항성을 의미할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 용어, "재조합 벡터"는 특정 서열이 변이, 삽입 또는 제거되는 유전자 재조합 과정을 거친 벡터를 의미하며, 바람직하게는 발현 유도 서열이 삽입된 벡터를 의미하고, 더욱 바람직하게는 해당 발현 유도 서열을 LOC_0s02g04500의 발현 조절 부위에 삽입할 수 있는 기능을 하는 재조합 벡터를 의미한다.
- [0032] 상기 재조합 벡터는 LOC_0s02g04500 유전자가 발현될 수 있도록, 발현조절 서열과 기능적으로 연결되어 있다. 예를 들어, 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한, 벡터는 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서는, LOC_0s02g04500 유전자의 발현 조절 부위에 서열번호 4의 발현 유도 서열 포함하는 재조합 벡터를 제조하였으며, 이를 아그로박테리움을 통해 벼 세포에 도입하여, 내재적 유전자였던 LOC_0s02g04500 유전자의 발현을 증가하였다.
- [0034] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 상기 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 식물을 감염시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 감염된 식물의 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 식물의 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법을 제공한다.

- [0035] 본 발명에서 용어, "아그로박테리움"은 그람양성의 세균으로, 식물의 뿌리나 줄기의 상처를 통해 식물세포에 감염되어, 자신이 가지고 있는 유전자를 식물 세포의 유전체에 삽입하여 식물세포의 형질전환을 일으키는 암종세균의 일종이다. 본 발명에서 상기 아그로박테리움은 바람직하게는 아그로박테리움 투메파키엔스(Agrobacterium tumefaciens)일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 용어, "캘러스(callus)"란, 식물에 상처가 났을 때 생기는 분화되지 않은 부정형의 세포덩어리로 즉, 미분화세포를 의미하며, 특히, 본 발명에서는 식물의 잘린 부위에 아그로박테리움 등 형질전환용 암종세균을 감염시켰을 때 감염된 세포가 미분화상태로 상처부위에 덩어리진 것을 의미한다. 즉, 본 발명에서는 암종세균에 감염되어 형질전환된 세포만이 암종 덩어리를 생성하는 특징을 이용하여 형질전환된 미분화세포를 얻을 수 있는데 이것이 캘러스 형태로 생성되게 된다.
- [0037] 상기 병 저항성이 증진된 형질전환체의 제조방법은, 바람직하게는 수득된 캘러스를 뿌리 및 성체로 분화시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 캘러스는 상기 설명한대로 미분화된 상태의 세포 덩어리에 불과하기 때문에, 이를 온전한 종자로 수득하기 위해서는 뿌리 및 성체로 분화하는 것을 유도하는 것이 필요할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 수득된 캘러스를 루트-인덕션 배지에서 배양하여 뿌리 및 성체로 분화하는 것을 유도하였다(실시예 2).
- [0039] 또 하나의 양태로, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_0s02g04500 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 LOC_0s02g04500 유전자, 활성 강화 및 병 저항성 등은 상기 설명한 바와 같다.
- [0041] 본 발명에서, 상기 용어 "증진"은 본 발명에서 대조군 벼와 비교하여 적어도 5% 또는 10%, 바람직하게는 적어도 20% 또는 40%, 더욱 바람직하게는 50%, 60%, 70% 또는 80% 이상의 병 저항성을 의미하며, 벼가 원래 가지고 있는 병 저항성에 비해 상기 유전자를 도입하여 병 저항성이 증가되는 것을 의미한다.

발명의 효과

- [0042] 본 발명은 벼에 내재적으로 존재하는 흰잎 마름병에 대한 저항성 유전자, LOC_0s02g04500의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열을 삽입함으로써, 흰잎 마름병에 대해 강력한 저항성을 갖는 형질전환 벼에 대한 것으로, 본 발명의 형질전환 벼를 이용하면 병 저항성을 통해 농약사용 절감, 생산성 향상 및 안전한 농산물 공급이 가능하게 되어 널리 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 흰잎 마름병에 대한 저항성과 관련된 유전자로 선별된 LOC_0s02g04500의 구조에 대한 개요도로, 도 1의 A는 유전자 상의 구조를 나타내며, 도 1의 B는 유전자가 발현된 단백질의 구조를 나타낸다. 이에 표시된 Methyltransf_7은 메틸전이효소 활성 부분 (methyltransferase domain)을 의미한다.
- 도 2는 LOC_0s02g04500의 발현을 조절하는 부위에 T-DNA를 포함한 유전자 발현 유도 서열이 삽입된 BMT 02 유전자 변형 벼의 게놈 DNA의 일부분을 나타내는 구조도이다.
- 도 3은 BMT 02 유전자 변형 벼에서 T-DNA 삽입위치를 PCR로 확인한 도면이다.
- 도 4는 BMT 02 유전자 변형 벼에서 LOC_0s02g04500의 발현을 확인하는 RT-PCR 결과를 보여주는 도면이다.
- 도 5는 BMT 02 유전자 변형 벼의 흰잎 마름병에 대한 저항성을 실험한 결과를 보여주는 도면으로, 도 5의 A는 천연형 벼 및 BMT 02 유전자 변형 벼의 흰잎 마름병균을 가위 접종법으로 접종한 결과를 보여주는 사진이고, 도 5의 B는 이의 감염에 의해 파괴된 벼 잎의 길이를 측정하여 평균 낸 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한

것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0045] **실시예 1. Bioinformatics를 통한 형질전환 타겟 유전자 선별**

[0046] 동진벼의 유전체가 보유한 식물체의 질환 저항성과 밀접한 관련이 있을 것으로 예측되는 메틸전이효소 230개를 동정하였다. 이 중, microarray data를 바탕으로 MeV v2.0 프로그램을 이용하여 흰잎 마름병에 저항성을 가질 확률이 높은 유전자를 108개 선별하였다. 선별된 유전자에 대하여 형질전환체를 제조하여 병 저항성을 갖는 유전자를 동정해 내는 과정에서, 본 발명의 LOC_Os02g04500이 흰잎 마름병에 저항성을 갖는 유전자로 선별되었다.

[0047] **실시예 2. 발현 유도체 삽입된 형질전환 벼 제조**

[0048] **2-1. 벼 형질전환용 재조합 벡터 제조**

[0049] 타겟 유전자의 발현 조절 부위의 염기서열에 발현 유도 서열을 삽입하기 위해 벡터를 제작하였다. 먼저, 유전체 삽입을 위한 T-DNA, 삽입위치의 왼쪽 유전자 서열을 확인하기 위한 N-GUS, 서열번호 4의 유전자의 발현 유도 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하기 위한, 담배 잎 모자이크바이러스 35S 프로모터 유래 DNA, 삽입위치의 오른쪽 유전자 서열을 확인하기 위한 L-0.5/1.5를 가지는 벡터를 제작하였다. 삽입된 유전체로부터 타겟 유전자의 확인과 증폭을 위한 프라이머는 아래와 같다.

[0050] Enhancer-F (정방향, 서열번호 9)

[0051] 5'- gatccccaacatggtggagc -3'

[0052] Enhancer-R (역방향, 서열번호 10)

[0053] 5'- ggatctagatatcacatcaa -3'

[0054] PCR 증폭 조건은 처음 DNA의 열변성을 위하여 94℃에서 3분간 1 cycle, 그리고 94℃ 1분, 58℃에서 1분, 72℃에서 2분간으로 총 35 cycle을 실시하였으며, 최종 DNA 합성은 7분으로 하였다.

[0055] 해당 증폭된 PCR 산물을 1.0%의 아가로스겔(agarose gel)로 전기영동 한 후 EtBr(ethidium bromide) 용액에 염색하여 UV lamp하에서 염기 크기에 해당하는 band를 절단하여 아가로스겔(agarose gel) 정제법으로 정제하였다.

[0056] 추출한 PCR 산물을 상기 제한효소 BamH I /Kpn I 으로 절단하였다. 또한, 재조합 벡터인 pGA2772 벡터를 제한효소 BamH I /Kpn I 로 절단하여, 절단된 벡터를 상기 아가로스겔 정제법으로 정제하였다. 상기 PCR 산물에 의한 DNA 단편을 절단된 재조합 벡터에 삽입하여, 조절부위 발현 유도체 서열 (Enhance sequence, 서열번호 4)이 삽입된 재조합 벡터 pGA2772 vector를 제조하였다.

[0057] **2-2. 형질전환체 제조**

[0058] 상기 제조된 벡터를 전기충격 방법(electroporation)을 이용하여 아그로박테리움 투메파키엔스(Agrobacterium tumefaciens)에 도입하였다. 배양실에서 무균상태로 자란 동진벼에 리프 디스크(leaf disc)법으로 형질전환하였다. 구체적으로는 벼잎을 대략 5 x 5 mm 크기로 잘라서 200 μ l의 아그로박테리움이 포함된 MSO 액체 배지(MS 염 4.3g, 수크로스 30g/L, pH 5.6 내지 5.8)에 넣었다가 암조건에서 2 내지 3일 동안 배양하고, 배양된 잎 절편을 캘러스-슈트(callus-shoot) 유도 배지(MSO배지에 100 μ g NAA, 1mg BA, 500 μ g 세포탁심, 1 mg 포스피노트리신(phosphinothricin), 0.7% 피토 한천(phyto agar), pH 5.6)으로 옮기고, 새로운 배지로 옮겨 주었다. 유도된 발아는 1.5 내지 2 cm 정도 자라면서 루트-인덕션 배지(MSO배지에 250 μ g 세포탁심, 10mg 포스피노트리신, 0.7% 피토 한천, pH 5.6)로 옮겨 주었다.

[0059] 발현 유도체가 삽입된 상기 유전자 형질전환 벼를 BAMT 02로 명명하였으며, 이의 유전자 구조는 도 2에 개시된

바와 같다. 구체적으로는, 동진 벼의 첫 번째 유도체에 존재하는 LOC_Os02g04500의 발현 조절 부위로 예측되는 상류부분 (upstream region)에 T-DNA 서열 (서열번호 5)을 삽입하여, 도 2와 같은 유전체 구조를 가진 형질전환체를 제작하였다.

[0060] **2-3. 재조합 벡터의 벼 유전체 삽입위치 확인**

[0061] T-DNA 삽입에 의해 만들어진 BAMT 02에 대한 inverse-PCR 및 염기 서열 분석을 통해 T-DNA가 삽입된 염색체를 분석하였다.

[0062] 상기 선발된 계통의 벼 종자를 MSO 배지에 28℃에서 10일간 배양하였다. 이렇게 배양한 개체들의 잎 100mg을 채취하여 액체질소를 이용하여 급냉각한 후 분쇄하였다. 분쇄된 잎에서 one step buffer (1M Tris (pH9.5) 5ml, 0.5M EDTA 1ml, KCl 3.73g을 넣고 물로 50ml을 맞춰 조제)을 이용하여 DNA를 추출하였다.

[0063] BAMT 02은 LOC_Os02g04500 유전자의 발현조절 상류부분에 T-DNA가 삽입된 계통으로 T-DNA 삽입위치에서 앞뒤에서 만들어진 프라이머 (서열번호 6 및 서열번호 7)와 T-DNA 삽입서열 중 iR2 프라이머 (서열번호 8)를 이용하여 PCR로 유전형 분석을 하였다.

[0064] PCR 반응은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 1분, 57℃에서 1분, 72℃에서 1분 을 38회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 7분을 진행하였다. PCR 산물은 agarose gel을 이용하여 전기영동으로 확인하였다(도 3). 이를 통해 유전형을 선발하였다.

[0065] 이에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[0066] BAMT 02_F (서열번호 6)

[0067] 5' - GTTGTGTGTGCTCCAT- 3'

[0068] BAMT 02_R (서열번호 7)

[0069] 5' - TCAATGCGCACAGTTTACAG- 3'

[0070] iR2 (서열번호 8)

[0071] 5' - CAGGACGTAACATAAGGGACTGA- 3'

[0072] **실시예 3. 형질전환 벼의 유전자 활성 검증**

[0073] LOC_Os02g04500 유전자의 발현 조절 부위에 발현 유도체를 삽입한 형질전환 벼 (BAMT 02)에서 LOC_Os02g04500 유전자 활성을 역전사 효소 PCR (RT-PCR, reverse transcriptase-PCR)로 확인 하였다.

[0074] 구체적으로는, 형질전환 벼 (BAMT 02)의 잎 0.1g에서 total RNA를 추출하였다. 이를 주형으로 하여 LOC_Os02g04500의 발현을 확인할 수 있는 RNA 역전사용 프라이머와 역전사 효소 (reverse transcriptase DNA polymerase)를 이용하여 역전사 효소 PCR을 수행하였다.

[0075] 도3 에서 확인할 수 있듯이, 천연형 동진벼에 비하여 본 발명의 형질전환 벼에서는 유전자 LOC_Os02g04500의 발현이 높아졌다는 것을 확인할 수 있었다.

[0076] RT-BAMT 02_F (정방향, 서열번호 11)

[0077] 5' - TGATCTTGAAGTTGGCGTA -3'

[0078] RT-BAMT 02_R (역방향, 서열번호 12)

[0079] 5' - ACACCCTTGTTCAGTCTTA -3'

[0080] **실시예 4. 형질전환 벼(BAMT 02)의 벼 흰잎 마름병에 대한 저항성 검정**

[0081] 상기 실시예 2에서 제조된 형질전환 벼가 흰잎 마름병에 대해 저항성을 보이는지 확인하기 위해, LOC_Os02g04500 발현 조절부위에 발현 유도체가 삽입된 형질전환 벼인 BAMT 02과 대조군으로 천연형 동진벼를 6 주간 생장시켜 흰잎 마름병을 유발하는 균주인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (strain : PX099Az)를 가위에 묻혀 접종한 2주 후 병증을 측정하였다 (도 5). 병증 측정은 접종한 부위로부터 감염되어 파괴된 상처 길이 (Lesion Lengths)를 측정하여 천연형 동진벼와 비교하였다.

[0082] 도 5의 B에서 확인할 수 있듯이 BAMT 02 형질전환체는 평균 병증의 길이가 천연형 동진벼의 반 정도에 불과하여 (천연형 vs. BAMT 02 : 21.9cm vs. 11cm), 흰잎 마름병에 대한 강력한 저항성을 가짐을 확인할 수 있었다.

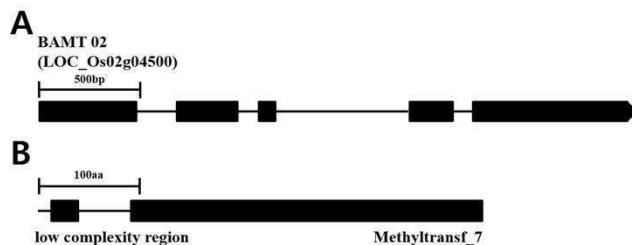
[0083] 이와 같은 결과를 통하여, 본 발명의 형질전환 벼 BAMT 02은 내재적 유전자 LOC_Os02g04500를 활성화시킴으로써 흰잎 마름병에 대한 저항성을 가질 수 있음을 확인하였다.

[0084]

[0085] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

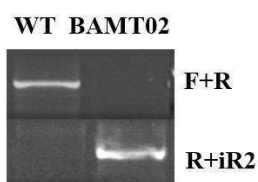
도면1



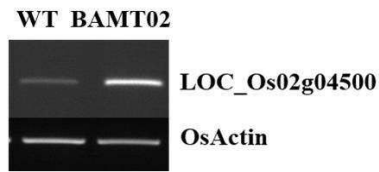
도면2



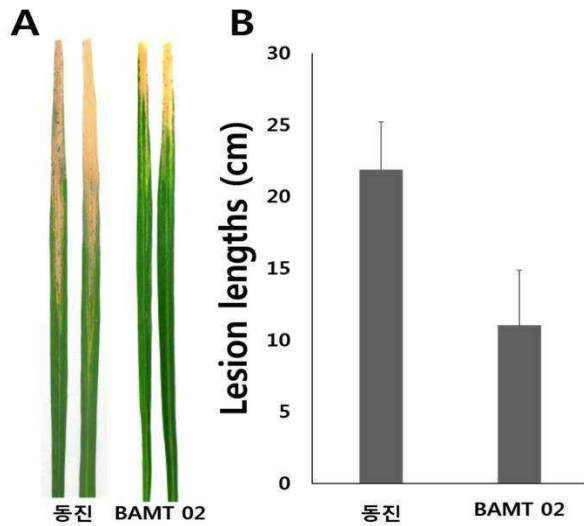
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Methyltransferase gene resistant to a bacterial blight and the transgenic plant using the same
- <130> KPA141030-KR
- <160> 12
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 2698
- <212> DNA
- <213> Oryza sativa
- <400> 1

gtgtttctat ccgcgccttg cccgccgtcg cgtgtggctc tcgcctcgac gaccatggcg 60

atgttcgcgc ggcgcctcct cgtcttccac ctccgcccg cgcgcgatcc cctcgcagcc 120

gccattgccg ctccccaccg ccgccgcaag cacgacgccg tcgcgtgcag agccgctgcg 180

gggaagggga cgagcaaggc cagggcgagg gacaaggacg gcagtaagcg gcagcagagg 240

cgggcgctgg aggagcacct caagcggcgc acgcgctccg gcgccgcctt cgacgccggc	300
ctctaccggc ggcactccca cgcggagcac gtccccgtca tgctcggcga ggtcctcgcc	360
gcgttcggcc gccctctccc gctccgctcc ttcgtcgact gcaccctcgg cgcggccggc	420
cactcgctcg ccgtcagtag tagttccccc tctgtttctc ccttacaatt ccagttacct	480
ttacattgct cggcgacgat agctgctcga cgaaatgctg cttcttcttc ttggctcttt	540
agtgttatcc gttgtgtgat cgttgatgcg caccagctgt ttgatagaat gcctattcgg	600
cttgtgcaat agatgatgga ggcacacccg gagatggaac tgtacattgg gatggatgtc	660
gacccctctg cgctggagat tggccggagc cgtatcgagg ccttccttgc caatagggaa	720
actaatggag atgacgaaga tgcctcgag ggaacactgc gtgcatacac tcacgccaag	780
aatttcaagt acatcaagca tgttcttggc agcgtggatg agaacattgc tgttggaacg	840
tctggagttg atggaatcct cattgacctt ggcatgtcat ccatgcaggt caggtgttcc	900
gtaaaacgca gtgaaattga tggtaagcct cctttatttc ccatttagtc atctgaatgc	960
cctgttgtac tatccacagg tgaacagatc agacagggga tttagcgttc ttcaggatgg	1020
gccacttgac atgcgatgg atcctaaggt cagtgttgct ttgctctagt ttactgccc	1080
ttccttcctt ccacttgcat acgaaaatgc attgccaca aattttcttc tagttgaagg	1140
gctatgaaca ttgattgaca aaactacagt cttacatctt catcttgta aagtctagtt	1200
ttgctggagc ttggaaaaca tgatcccaaa acatttttat gcataatgca ttcataatgc	1260
aatgcaaact tgtataaaat ctttcagaa atttctaaaa cattgaatca cactccagtc	1320
cattttatct ggatctgtct tgactgtagt tacacttggt ttgacaattg gtatttcact	1380
ttttgcaaac aatgttaacc cagtaaatta atacattata ttacttgaag tgcaacacat	1440
ccttaccaat ggctgttct tttccatatg aataaaactac cgttagattt gccatgtcca	1500
aaaatttcaa aagaacgtag atttagtgcc actttatcat ttgcagtaat ccataatcaa	1560
ctagcaaagt gacaaagccc caaaatagca cataatctta atcttggttg ccttgaaatc	1620
ttgtactac acctaaccta tataatgagat tagacaggca actttgaaag cagaagatat	1680
cttgaattct tggcctgac ttgaagttgg gcgtatcctg cgtgattatg gtgaggaaag	1740
taattggcag tcccttcaga agcggattgt taaagcccgg gctatggggg gtttgactc	1800
gacaggggag cttgtcaaac ttatccaaag aacgtgtacc agttcagggg gtatgtatga	1860
tgatggtatc tciaaatgtg gttatatgat ttgtgtatgt atgacctgat gttttatgac	1920
aaacttataa actgcaggaa ggcaaggttg gattaagact gcaacaaggg tgtttcaggc	1980
cctaagaatc gcagttaatg atgaactccg aactctagaa gatgcacttc atgcatgctt	2040
tgattgccta gcaacagatg gtcgccttgc agtaatctca ttccacagtt tggaggatag	2100

aatagtgaag cagacctttc tggaacttat tcatgaagat gaaatagatg atgatgaaga	2160
cgacttgggtg agtgctgaca ttgatagtga agatgaaccc tggtttaagc agagagtga	2220
aggaaagaat ggaaccattc taacgaaaag accaatatct ccttcacaag aggaggaaga	2280
actgaatcag aggtgcagaa gtgccaagct cagagttatt cagaaggcgt gaacctggat	2340
taatcatatg atgactaaat tctgagctct gaggagcagt gaggacatcc atgcgtgaac	2400
tcatataaca tgtaatgat cgcgcttgca gttgcaacaa taataactgg aaaaactagc	2460
tcgagaggat gaaatggcca tcctgtttct gcagttaact tagagagtag agcttaggta	2520
agtcaaaaa ttaatctcac tatttgcacc accattttgt accccattca tgtacactaa	2580
actctctaac aatagttttt actgcatctc ttcttgtttt ttttttttgg ttatgcagga	2640
agcctctgat taaattgcat attttaccag ctaattaaac atatgatggt tgtttgac	2698
<210> 2	
<211> 1311	
<212> DNA	
<213> Oryza sativa	
<400> 2	
atggcgatgt tcgcgcggcg cctcctcgtc ttccacctcc gcccgcccgc gcacccctc	60
gcagccgcca ttgccgctcc ccaccgcccgc cgcaagcacg acgccgtcgc gtgcagagcc	120
gctgcgggga aggggacgag caaggccagg gcgagggaca aggacggcag taagcggcag	180
cagagcgggg cgctggagga gcacctcaag cggcgcacgc gctccggcgc cgccttcgac	240
gccggcctct accggcggca ctcccacgcg gaggacgtcc ccgtcatgct cggcgaggtc	300
ctcgccgctg tcgcgcggcc tctcccgtc cgctccttcg tcgactgcac cctcggcgcg	360
gccggccact cgctcgccat gatggaggca caccggaga tggaactgta cattgggatg	420
gatgtcgatc cctctgcgtt ggagattggc cggagccgta tcgaggcctt ccttgccaat	480
agggaaacta atggagatga cgaagatgcc tcgcagggaa cactgcgtgc atacactcac	540
gccaagaatt tcaagtacat caagcatgtt cttggcagcg tggatgagaa cattgctgtt	600
ggaacgtctg gatttgatgg aatcctcatt gaccttggca tgtcatccat gcaggatgaac	660
agatcagaca ggggatttag cgttcttcag gatgggccac ttgacatgcg catggatcct	720
aaggcaactt tgaaagcaga agatatcttg aattcttggc ctgatcttga agttggcgt	780
atcctgcgtg attatggiga ggaaagtaat tggcagtcctc ttcagaagcg gattgttaaa	840
gcccgggcta tggggggttt gcactcgaca ggggagcttg tcaaacttat ccaaagaacg	900
tgtaccagtt cagggggaag gcaaggttgg attaaactg caacaagggt gtttcaggcc	960

ctaagaatcg cagttaatga tgaactccga actctagaag atgcacttca tgcattgcttt 1020
gattgcctag caacagatgg tcgccttgca gtaattctcat tccacagttt ggaggataga 1080
atagtgaagc agacctttct ggaacttatt catgaagatg aaatagatga tgatgaagac 1140
gacttggtga gtgctgacat tgatagtga gatgaaccct ggtttaagca gagagtgcaa 1200

ggaaagaatg gaaccattct aacgaaaaga ccaatatctc cttcacaaga ggaggaagaa 1260
ctgaatcaga ggtgcagaag tgccaagctc agagttattc agaaggcgtg a 1311

<210> 3
<211> 436
<212> PRT
<213> Oryza sativa
<400> 3

Met Ala Met Phe Ala Arg Arg Leu Leu Val Phe His Leu Arg Pro Pro

1 5 10 15

Ala His Pro Leu Ala Ala Ala Ile Ala Ala Pro His Arg Arg Arg Lys

20 25 30

His Asp Ala Val Ala Cys Arg Ala Ala Ala Gly Lys Gly Thr Ser Lys

35 40 45

Ala Arg Ala Arg Asp Lys Asp Gly Ser Lys Arg Gln Gln Arg Arg Ala

50 55 60

Leu Glu Glu His Leu Lys Arg Arg Thr Arg Ser Gly Ala Ala Phe Asp

65 70 75 80

Ala Gly Leu Tyr Arg Arg His Ser His Ala Glu His Val Pro Val Met

85 90 95

Leu Gly Glu Val Leu Ala Ala Phe Arg Arg Pro Leu Pro Leu Arg Ser

100 105 110

Phe Val Asp Cys Thr Leu Gly Ala Ala Gly His Ser Leu Ala Met Met

115 120 125

Glu Ala His Pro Glu Met Glu Leu Tyr Ile Gly Met Asp Val Asp Pro

130 135 140

Ser Ala Leu Glu Ile Gly Arg Ser Arg Ile Glu Ala Phe Leu Ala Asn

145 150 155 160

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

165 170 175
 Ala Tyr Thr His Ala Lys Asn Phe Lys Tyr Ile Lys His Val Leu Gly

 180 185 190
 Ser Val Asp Glu Asn Ile Ala Val Gly Thr Ser Gly Val Asp Gly Ile
 195 200 205
 Leu Ile Asp Leu Gly Met Ser Ser Met Gln Val Asn Arg Ser Asp Arg
 210 215 220
 Gly Phe Ser Val Leu Gln Asp Gly Pro Leu Asp Met Arg Met Asp Pro
 225 230 235 240
 Lys Ala Thr Leu Lys Ala Glu Asp Ile Leu Asn Ser Trp Pro Asp Leu
 245 250 255

 Glu Val Gly Arg Ile Leu Arg Asp Tyr Gly Glu Glu Ser Asn Trp Gln
 260 265 270
 Ser Leu Gln Lys Arg Ile Val Lys Ala Arg Ala Met Gly Gly Leu His
 275 280 285
 Ser Thr Gly Glu Leu Val Lys Leu Ile Gln Arg Thr Cys Thr Ser Ser
 290 295 300
 Gly Gly Arg Gln Gly Trp Ile Lys Thr Ala Thr Arg Val Phe Gln Ala
 305 310 315 320
 Leu Arg Ile Ala Val Asn Asp Glu Leu Arg Thr Leu Glu Asp Ala Leu

 325 330 335
 His Ala Cys Phe Asp Cys Leu Ala Thr Asp Gly Arg Leu Ala Val Ile
 340 345 350
 Ser Phe His Ser Leu Glu Asp Arg Ile Val Lys Gln Thr Phe Leu Glu
 355 360 365
 Leu Ile His Glu Asp Glu Ile Asp Asp Asp Glu Asp Asp Leu Val Ser
 370 375 380
 Ala Asp Ile Asp Ser Glu Asp Glu Pro Trp Phe Lys Gln Arg Val Gln
 385 390 395 400

 Gly Lys Asn Gly Thr Ile Leu Thr Lys Arg Pro Ile Ser Pro Ser Gln
 405 410 415

Glu Glu Glu Glu Leu Asn Gln Arg Cys Arg Ser Ala Lys Leu Arg Val

420

425

430

Ile Gln Lys Ala

435

<210> 4

<211> 1361

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> promoter

<400> 4

gatccccaac atggtggagc acgacactct cgtctactcc aagaatatca aagatacagt 60

ctcagaagac cagagggcta ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatcgg gaaacctcct 120

cggattccat tgcccagcta tctgtcactt catcgaaagg acagtagaaa aggaagatgg 180

cttctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc gttcaagatg cctctaccga 240

cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggaacatc gtggaaaaag aagacgttcc 300

aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctag atccccaaca tgggtggagca 360

cgacactctc gtctactcca agaatatcaa agatacagtc tcagaagacc agagggttat 420

tgagactttt caacaaaggg taatatcggg aaacctctc ggattccatt gccagctat 480

ctgtcacttc atcgaaagga cagtagaaaa ggaagatggc ttctacaaat gccatcattg 540

cgataaagga aaggctatcg ttcaagatgc cttaccgac agtgggtccca aagatggacc 600

cccaccacg aggaacatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt 660

ggattgatgt gatattctaga tccccaacat ggtggagcac gacactctcg tctactccaa 720

gaatatcaaa gatacagttc cagaagacca gagggctatt gagacttttc aacaaaggg 780

aatatcggga aacctctcg gattccattg ccagctatc tgtcacttca tcgaaaggac 840

agtagaaaag gaagatggct tctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt 900

tcaagatgcc tctaccgaca gtgggtccca agatggaccc ccaccacga ggaacatcgt 960

ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctagat 1020

ccccaacatg gtggagcacg acactctcgt ctactccaag aatatcaaag atacagtctc 1080

agaagaccag agggctattg agacttttca acaaagggtg atatcgggaa acctcctcgg 1140

attcatttgc ccagctatct gtcacttcat cgaaaggaca gtagaaaagg aagatggctt 1200

ctacaaatgc catcatttgc ataaaggaaa ggctatcgtt caagatgcct ctaccgacag 1260

tgggtccaaa gatggacccc caccacgag gaacatcgtg gaaaaagaag acgttccaac 1320

cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tatctagatc c 1361

<210> 5

<211> 10377

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T-DNA

<400> 5

gtttaccgc caatataatcc tgtcaaacac ggatccgagg taccaggtac caggtgagtt 60

ccattcttac taccacggtg ctatTTTTT tgctatgtgg ctaattacat gactaacttg 120

gggtgctaaa tcttacaggt tatatgcagg ttatatgcag gtcccgggta ggtcagtcct 180

ttatgttacg tctgtagaa accccaaccc gtgaaatcaa aaaactcgac ggcctgtggg 240

cattcagctt ggatcgcgaa aactgtggaa ttgatcagcg ttggtgggaa agcgcgttac 300

aagaaagccg ggcaattgct gtgccaggca gttttaacga tcagttcgcc gatgcagata 360

ttcgttaatta tgcgggcaac gtctgggtatc agcgcgaagt ctttataccg aaaggttggg 420

caggccagcg tatcgtgctg cgtttcgaatg cggtcactca ttacggcaaa gtgtgggtca 480

ataatcagga agtgatggag catcagggcg gctatacgcc atttgaagcc gatgtcacgc 540

cgtatgttat tgcggggaaa agtgtacgta tcaccgtttg tgtgaacaac gaactgaact 600

ggcagactat cccgccggga atgggtatta ccgacgaaaa cggcaagaaa aagcagtcct 660

acttccatga tttctttaac tatgccggaa tccatcgag cgtaatgctc tacaccacgc 720

cgaacacctg ggtagacgat atcacctggg tgacgcatgt cgcgcaagac tgtaaccacg 780

cgtctgttga ctggcaggtg gtggccaatg gtgatgtcag cgttgaactg cgtgatgcgg 840

atcaacaggt ggttgcaact ggacaaggca ctagcgggac tttgcaagtg gtgaatccgc 900

acctctggca accgggtgaa ggttatctct atgaactgtg cgtcacagcc aaaagccaga 960

cagagtgtga tatctaccg cttcgcgtcg gcatccggtc agtggcagtg aaggccaac 1020

agttcctgat taaccacaaa ccgttctact ttactggctt tggctgcat gaagatgcgg 1080

acttacgtgg caaaggattc gataacgtgc tgatgggtga cgaccacgca ttaatggact 1140

ggattggggc caactctac cgtacctgc attacctta cgtgaagag atgctcgact 1200

gggcagatga acatggcatc gtgggtattg atgaaactgc tgctgtcggc tttaacctct 1260

ctttaggcat tggtttcgaa gcgggcaaca agccgaaaga actgtacagc gaagaggcag 1320

tcaacgggga aactcagca gcgcacttac aggcgattaa agagctgata gcgcgtgaca 1380

aaaaccaccc aagcgtgggtg atgtggagta ttgccaacga accggatacc cgtccgcaag 1440

tgacgggaa tatttcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccg acgcgtccga	1500
tcacctgcgt caatgtaatg ttctgcgacg ctacacccga taccatcagc gatctctttg	1560
atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat ttggaaacgg	1620
cagagaaggt aciggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat cagccgatta	1680
tcacaccga atacggcggtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac accgacatgt	1740
ggagtgaaga gtatcagtggt gcatggctgg atatgtatca ccgcgtcttt gatcgcgtca	1800
gcgccgtcgt cggtagaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg caaggcatat	1860
tgcgcgttgg cggtaacaag aaagggatct tctactcgca ccgcaaaccg aagtcggcgg	1920
cttttctgct gcaaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg cagcaggag	1980
gcaacaatg aatcaacaac tctcctggcg caccatcgtc ggctacagcc tcgggaattg	2040
ctaccgagct cgaatttccc cgatcgttca aacatttggc aataaagttt cttagattg	2100
aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc tgttgaatta cgtaagcat	2160
gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggtttttat gattagagtc	2220
ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa	2280
ttatcgcgcg cggltgtatc tatgttacta gatcggaat taattcatcg ataggctagt	2340
catggtgact gtacgttgta agtgcagcaa actgccgacg cgatgcaaac tgtacacgtt	2400
aacatgccac tcacctggaa cgcacaatgg ccactagggtg cggccgtagt gtggatttca	2460
aagagagaga gagagagaga gagctaatca cgtaaacgta aacacagcag atagcagaga	2520
tgttgattag gcaaaacagt ataaaagcca atccaataaa ctacatttag cgaagtgcta	2580
tactaatgca ctaataacga actgttcttt tcttaagatc ggagccagta atgggttgtc	2640
agcaggagaa gcacgtaaac cttgaacat actaagtacc acagtcgaga gtaaaccgta	2700
atcaacacaa gaaacaaaca taaaattgaa caaacgcgca tattataagt gacgaagcgg	2760
tctcacataa aacagggcac acaggttaca acaacgaggg ttgtaagccc attaagcccc	2820
aaacatcaga tcaccacaag caaatgtctc gaagacacac gcacacggca acaggataac	2880
tccacactgg cagatcatgg gatagcagca gttatcaatc aggccttgac acacagaaca	2940
tcaagcccc agacgacgac gactcctcta gatcccggtc ggcatctact ctattccttt	3000
gccctcggac gagtgtctggg gcgtcggttt ccactatcgg cgagtacttc tacacagcca	3060
tcggtccaga cggccgcgct tctgcgggcg atttgtgtac gcccgacagt cccgggtccg	3120
gatcggacga ttgcgtcgca tcgaccctgc gcccaagctg catcatcgaa attgccgtca	3180
accaagctct gatagagttg gtcaagacca atgcggagca tatacgcccc gagccgcggc	3240

gatcctgcaa gctccggatg cctccgctcg aagtagcgcg tctgctgctc catacaagcc	3300
aaccacggcc tccagaagaa gatgttggcg acctcgtatt gggaatcccc gaacatcgcc	3360
tcgctccagt caatgaccgc tgttatgcgg ccattgtccg tcaggacatt gttggagccg	3420
aaatccgctg gcacgaggtg ccggacttcg gggcagtcct cggcccaaag catcagctca	3480
tcgagagcct gcgcgacgga cgcactgacg gtgtcgtcca tcacagtttg ccagtatac	3540
acatggggat cagcaatcgc gcatatgaaa tcacgccatg tagtgtattg accgattcct	3600
tgcggtccga atgggccgaa cccgctcgtc tggctaagat cggccgcagc gatcgcatcc	3660
atggcctccg cgaccggctg cagaacagcg ggcagttcgg ttccaggcag gtcttgcaac	3720
gtgacaccct gtgcacggcg ggagatgcaa taggtcaggc tctcgtgaa ttccccaatg	3780
tcaagcactt ccggaatcgg gagcgcggcc gatgcaaagt gccgataaac ataacgatct	3840
ttgtagaaac catcggcgca gctatttacc cgcaggacat atccacgccc tcctacatcg	3900
aagctgaaag cagcagattc ttgcacctcc gagagctgca tcaggtcgga gacgctgtcg	3960
aacttttcga tcagaaactt ctgcacagac gtgcggtga gttcaggctt ttccatatct	4020
cattgcccc cgggatccgt cgagtcagcc tgaaggaca aaatacatgt tagcgcctta	4080
gtggtacatt attatttcag tacagcaaga taacacaatt caaaagactg acccataata	4140
aataactagt cctcaattta aaatttgagt tcctaaatag acatctatga atatgctgta	4200
catcggcact acagaaaata cgattcccaa taattgaaca attgtacttt atttagttgt	4260
tactacaaca atggaagata caagatcgtt tcaaaactac catacatgca tggagtattt	4320
gttccacaga tctggaaaaa acagatctga cgggcagtgt caccaaacac tagacatatg	4380
tatttgtatt aggtggatga cgtgtacaaa catgactacc agatctagaa ttagaacgcg	4440
gcgtgctttg gaaatgttaa gtagatccaa atacatcggg aacaaatgaa catattcata	4500
tgacatagct gtaaaacatc atgatctatc atatcaacta gaggggatct cggcatgtat	4560
cattctattg catctagaac catagcattt ccatgtgaca aacaattttg aaacatacat	4620
tgctcagatc taccataaga acaccatgtt catgacagca tcgaccatga ttccacatt	4680
taacagcatc ccgaggtcag atccagtgtt tagaactatc atttcagcaa aattcacaaa	4740
ataaatctc caattgcct acatatatcc attccacgca tcctaggacc agatccacca	4800
taccagtata cacgaacact aaacatttca tcagatccgc taactacgac agagaaaacg	4860
cagatccaga caaccagatc caccgacaaa taaacacagc cccccacatc caacaaccgc	4920
gaatccacc agatctgacc cagaagcagg cacgaagaac acgggggggtg agggagatgg	4980

gacgcggatc caagcttggc ggcggattgg gttgatgctg cgacggcggc ggagaaggga	5040
gagaggggag aggaggaaaa gcgcggaggc gcggagagag gcgagtacga agacgccttt	5100
ctctgcgttg tctcggctta gggtttgcga tccccgcact ccgcccgttt tataggcca	5160
gacagcctgg acctctcagg agcgggaagcg aagggaatggg ggagtttttc gttttacccc	5220
ctttgacgtc ttcaaaattc actcgcactc cacatcgtgc ctgcaaaggt cgggtggttg	5280
gatcatatcg agaataattt ataagttagg gagctttctg ataatatcca ccgcaaggag	5340
gccatttcgt ttgcactcgg ttgaagtcca taccgcctc tcgttagttt cactgacagg	5400
tgggtccaga ggcttccctc gtgtcgggtt agcgagtga cgcgtcgtc caagaaaaag	5460
cagtaggtga cctggccacc tcgtttagg tgcgaccgat gcagacgtcc cgcttgccgg	5520
tgggcccacg ttacagctgg gtccacata tcggtgggtg cgatgagttg ttcggtcgt	5580
aggagtagat tggatccca cgggtggttg cgtcgtcggc ggccctgccg attttatttt	5640
cgatttttga aatgcgagag cgggagaacg gcaccgttgg cttggctgtg gatgccgtta	5700
gccgcaccgg actattcggc ccagttccat ttggcccaa cttgaaacag cgcggagcac	5760
aagacggggg agcccattha ggcccgtaat ctacgccctg tagaaagtcc gtgtcgttgc	5820
gatggaccag aaagcccata aaccttgag gcgttctctg ctgggaataa aataagttca	5880
cactctgtcc ctcaacttha cgtcgagttt gtttgacatc gctaatgcc agtaccagaa	5940
atcttgata caaataaggt ttgatataaa gtggcacgtg gtgaatggca tcgtttgaaa	6000
aatcttcaga tcgagcgggc ttcacaagcc gtaagtcaa gtgccaaat ttgtgaagaa	6060
aattacttcc ttcatttcac aatgtaagt attttagcat tttccacatt catattgata	6120
tcaataaatt tagatagata tatagtctg aattcgtacc gttaacgagc tctagaagct	6180
tcagtactac gcgtctcgac ctgcaggcat gcaagcttgg cactggccgt cgttttaca	6240
cgctgtgact gggaaaacce tggcgttacc caacttaac gccttcagc acatccccct	6300
ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttcca acagttgcgc	6360
agcctgaatg gcgaatggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcactc gtgcggtatt	6420
tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgata gtttaagccag	6480
ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg cctgacggg cttgtctgct cccggcatcc	6540
gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca	6600
tcaccgaaac gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata ggtaaatgtc	6660
atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc	6720
cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc	6780
tgataaatgc ttcaataata ttgaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc	6840

gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcaccc agaaacgctg	6900
gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat	6960
ctcaacacg gtaagatcct tgagagtttt cgtcccgaag aacgttttcc aatgatgagc	7020
acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtg ttgacgccgg gcaagagcaa	7080
ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa	7140
aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat aacctagagt	7200
gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct	7260
tttttgaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat	7320
gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg	7380
cgcaactat taactggcga actacttact ctgcttccc ggcaacaatt aatagactgg	7440
atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttcggc tggctggttt	7500
attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg	7560
ccagatggta agccctccc tctctagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg	7620
gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggttaactg	7680
tcagaccaag ttactcata tatacttttag attgatitaa aacttcattt ttaatttaaa	7740
aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt	7800
tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt	7860
tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt	7920
ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag	7980
ataccaaata ctgtccttct agtgiagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta	8040
gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat	8100
aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagtac cggataaggc gcagcggtcg	8160
ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgaccta caccgaactg	8220
agatacctac agcgtgagct atgagaaaag gccacgttc ccgaaggag aaaggcggac	8280
aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga	8340
aacgcctggt atctttatag tctgtcggg ttctgccacc tctgacttga gcgtcgattt	8400
ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggctttttta	8460
cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttctgcgtt atcccctgat	8520
tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg	8580
accgagcgca gcgagtcagt gagcaggagaa gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct	8640
ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa	8700

gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcattaggc accccaggct	8760
ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac	8820
acaggaaaca gctatgacca tgattacgaa ttgatcccca acatggtgga gcacgacact	8880
ctcgtctact ccaagaatat caaagataca gtctcagaag accagagggc tattgagact	8940
tttcaacaaa gggtaatatc gggaaacctc ctcggtattcc attgccccagc tatctgtcac	9000
ttcatcgaaa ggacagtaga aaaggaagat ggcttctaca aatgccatca ttgcgataaa	9060
ggaaaggcta tcgttcaaga tgcttctacc gacagtggtc ccaaagatgg acccccaccc	9120
acgaggaaca tcgtggaaaa agaagacgtt ccaaccacgt cttcaaagca agtggattga	9180
tgtgatatct agatccccaa catggtggag caccgacctc tcgtctactc caagaatatac	9240
aaagatacag tctcagaaga ccagagggtc attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcg	9300
ggaaacctcc tcggattcca ttgccccagc atctgtcact tcatcgaaag gacagtagaa	9360
aaggaagatg gcttctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggctat cgttcaagat	9420
gcctctaccg acagtgggcc caaagatgga cccccacca cgaggaacat cgtggaaaaa	9480
gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatac gatccccaac	9540
atggtggagc acgacactct cgtctactcc aagaatatca aagatacagt ctcagaagac	9600
cagagggtca ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatcgg gaaacctcct cggattccat	9660
tgcccagcta tcgtcactt catcgaaagg acagtagaaa aggaagatgg cttctacaaa	9720
tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc gttcaagatg cctctaccga cagtgggtccc	9780
aaagatggac cccccccac gaggaacatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct	9840
tcaaagcaag tggattgatg tgatatctag atccccaaca tggaggagca cgacactctc	9900
gtctactcca agaatatcaa agatacagtc tcagaagacc agagggtat tgagactttt	9960
caacaaaggg taatatcggg aaacctctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttc	10020
atcgaaagga cagtagaaaa ggaagatggc ttctacaaat gccatcattg cgataaagga	10080
aaggctatcg ttcaagatgc ctctaccgac agtgggtcca aagatggacc cccaccacg	10140
aggaacatcg tggaataaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt	10200
gatatctaga tccgaaacta tcagtgtcta gctagagtcg agaattcagt acattaaaaa	10260
cgccgcaat gtgttattaa gttgtctaag cgtcaatttc agtacattaa aaacgtccgc	10320
aatgtgttat taagttgtct aagcgtcaat ttgtttacac cacaatatat cctgccca	10377
<210> 6	
<211> 20	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BAM 02_F

<400> 6

gttgtgtgtg ttgcctccat 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BAM 02_R

<400> 7

tcaatgcgca cagtttacag 20

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iR2

<400> 8

caggacgtaa cataaggac tga 23

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Enhancer-F

<400> 9

gatccccaac atggtggagc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Enhancer-R

<400> 10

ggatctagat atcacatcaa 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BAMT02-F

<400> 11
 tgatcttgaa gttgggcgta 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BAMT02-R

<400> 12
 acacccttgt tgcagtctta 20