(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0052956
(43) 공개일자 2016년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0148591
(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)
안진흥
경기 용인시 기흥구 탑실로 152, 210동 1703호 (공세동, 탑실마을대주피오레2단지)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 19 항

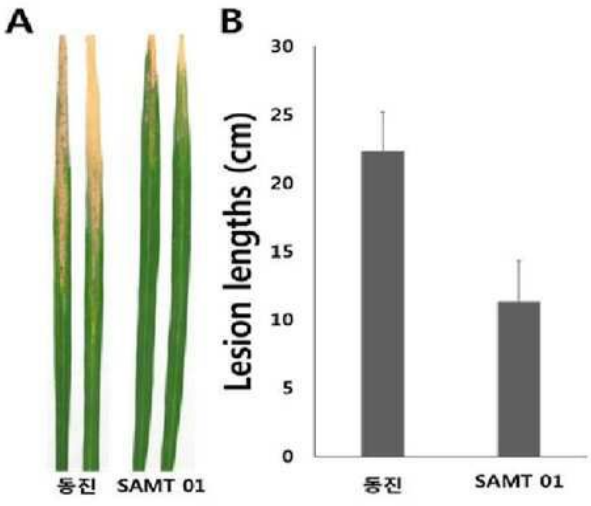
(54) 발명의 명칭 **흰잎 마름병 저항성 메틸전이효소 및 이를 이용한 형질 전환 식물체**

(57) 요 약

본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 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_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법에 관한 것이다.

본 발명은 벼에 내재적으로 존재하며 흰잎 마름병에 대한 저항성 유전자, LOC_Os01g50610의 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.

대 표 도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A2009726

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

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

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교(국제캠퍼스)

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 LOC_Os01g50610 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 LOC_Os01g50610 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_Os01g50610 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_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 LOC_Os01g50610 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 LOC_Os01g50610 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_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 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_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 벼 흰잎 마름병은 Xanthomonas oryzae pv. oryzae 에 의해서 발생되는 세균성 도관병으로, 발병시기는 7월 초~수확기이나 주로 7월 상순~8월 중순에 발병한다. 중간 기주식물인 줄풀 및 겨풀 등의 땅속줄기 또는 뿌리주위나 병든 볏짚 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 발생되는 잎에서의 발병 뿐만 아니라 이앙 후 분열기까지 주 전체가 발생되는 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_Os01g50610)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_Os01g50610 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 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_Os01g50610 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_Os01g50610 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체를 제공한다.

[0013] 본 발명에서는 메틸전이효소인 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성이 강화되도록, LOC_Os01g50610의 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_Os01g50610”는 Oryza sativa 1번째 유전체 (chromosome)에 존재하는 유전자로, 이의 발현물은 단백질 메틸전이효소의 일종이다. 상기 LOC_Os01g50610 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가지며, 상기 염기서열은 서열번호 3의 아미노산 서열로 코딩된다.

[0017] 본 발명에서 상기 식물 형질 전환체 제조에 사용되는 LOC_Os01g50610 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_Os01g50610 (TIGR, Os01g0701700 (RAP-DB))의 genome DNA 크기는 2844 bp (서열번호 1)이며 대표 coding sequence (LOC_Os01g50610.1)의 크기는 1140 bp (서열번호 2)로 5개의 exon과 4개의 intron으로 구성되며, 379 개의 아미노산으로 번역되어 단백질 (서열번호 3)이 만들어진다. 이 단백질은 plant methyltransferase domain (Methyltransf_7)을 암호화 한다 (도 1B).

[0019] 상기 LOC_Os01g50610 유전자는 벼에 내재적으로 존재하는 유전자로, 본 발명에서 용어, "내재적"이란 생물이 천연의 상태로 가지고 있는 것을 의미하는데, 본 발명에서는 식물, 바람직하게는 벼(Oriza 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_Os01g50610의 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_Os01g50610 유전자가 그 기능을 제대로 발현하지 못하는 것을 의미한다.

[0022] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 LOC_Os01g50610 유전자의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열(서열번호 4)을 삽입함으로써, LOC_Os01g50610 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였다(도 4). 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 상기 LOC_Os01g50610 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 형질전환 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_Os01g50610 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_Os01g50610의 발현 조절 부위에 서열번호 4의 발현 유도 서열을 삽입하는 형질전환을 통하여 LOC_Os01g50610에 해당하는 유전자의 활성이 강화되는 형질전환체를 제조하였으며, 이를 SAMT 01이라고 명명하였다.

[0028] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 LOC_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터를 제공한다.

[0029] 상기 메틸전이효소, LOC_Os01g50610 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_Os01g50610의 발현 조절 부위에 삽입할 수 있는 기능을 하는 재조합 벡터를 의미한다.

[0032] 상기 재조합 벡터는 LOC_Os01g50610 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_Os01g50610 유전자의 발현 조절 부위에 서열번호 4의 발현 유도 서열 포함하는 재조합 벡터를 제조하였으며, 이를 아그로박테리움을 통해 벼 세포에 도입하여, 내재적 유전자였던 LOC_Os01g50610 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_Os01g50610 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법을 제공한다.

[0040] 본 발명의 LOC_Os01g50610 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_Os01g50610의 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_Os01g50610의 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_Os01g50610의 발현을 조절하는 부위에 T-DNA를 포함한 유전자 발현 유도 서열이 삽입된 SAMT 01 유전자 변형 벼의 게놈 DNA의 일부분을 나타내는 구조도이다.

도 3은 SAMT 01 유전자 변형 벼에서 T-DNA 삽입위치를 PCR로 확인한 도면이다.

도 4는 SAMT 01 유전자 변형 벼에서 LOC_Os01g50610의 발현을 확인하는 RT-PCR 결과를 보여주는 도면이다.

도 5는 SAMT 01 유전자 변형 벼의 흰잎 마름병에 대한 저항성을 실험한 결과를 보여주는 도면으로, 도 5의 A는 천연형 벼 및 SAMT 01 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_Os01g50610이 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 아가로즈겔(agarose gel)로 전기영동 한 후 EtBr(ethidium bromide) 용액에 염색하여 UV lamp하에서 염기 크기에 해당하는 band를 절단하여 아가로즈겔(agarose gel) 정제법으로 정제하였다.

[0056] 추출한 PCR 산물을 상기 제한효소 BamH Ⅰ/Kpn Ⅰ으로 절단하였다. 또한, 재조합 벡터인 pGA2772 벡터를 제한효소 BamH Ⅰ/Kpn Ⅰ로 절단하여, 절단된 벡터를 상기 아가로즈겔 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 디스트(leaf disc)법으로 형질전환하였다. 구체적으로는 벼잎을 대략 5 x 5 mm 크기로 잘라서 200 ㎕의 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㎍ NAA, 1mg BA, 500㎍ 세포탁심, 1 mg 포스피노트리신(phospinothricin), 0.7% 피토 한천(phyto agar), pH 5.6)으로 옮기고, 새로운 배지로 옮겨 주었다. 유도된 발아는 1.5 내지 2 cm 정도 자라면 루트-인덕션 배지(MSO배지에 250㎍ 세포탁심, 10mg 포스피노트리신, 0.7% 피토 한천, pH 5.6)로 옮겨 주었다.

[0059] 발현 유도체가 삽입된 상기 유전자 형질전환 벼를 SAMT 01로 명명하였으며, 이의 유전자 구조는 도 2에 개시된

바와 같다. 구체적으로는, 동진 벼의 첫 번째 유도체에 존재하는 LOC_Os01g50610의 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 SAMT 01에 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] SAMT 01은 LOC_Os01g50610 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] SAMT 01_F (서열번호 6)

[0067] 5’-TCTGCCACATCTTTTGACCT- 3’

[0068] SAMT 01_R (서열번호 7)

[0069] 5’- GCCCATCTCTCTCATTCACA- 3’

[0070] iR2 (서열번호 8)

[0071] 5’- CAGGACGTAACATAAGGGACTGA- 3’

[0072] **실시예 3. 형질전환 벼의 유전자 활성 검증**

[0073] LOC_Os01g50610 유전자의 발현 조절 부위에 발현 유도체를 삽입한 형질전환 벼 (SAMT 01)에서 LOC_Os01g50610 유전자 활성을 역전사 효소 PCR (RT-PCR, reverse transcriptase-PCR)로 확인 하였다.

[0074] 구체적으로는, 형질전환 벼 (SAMT 01)의 잎 0.1g에서 total RNA를 추출하였다. 이를 주형으로 하여 LOC_Os01g50610의 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_Os01g50610의 발현이 높아졌다는 것을 확인할 수 있었다.

[0076] RT-SAMT 01_F (정방향, 서열번호 11)

[0077] 5’- CAACGACTTCAACACCATCTT -3’

[0078] RT-SAMT 01_R (역방향, 서열번호 12)

[0079] 5' - GAAGGAACCTGACCTGGGAG -3'

[0080] **실시예 4. 형질전환 벼(SAMT 01)의 벼 흰잎 마름병에 대한 저항성 검정**

[0081] 상기 실시예 2에서 제조된 형질전환 벼가 흰잎 마름병에 대해 저항성을 보이는지 확인하기 위해, LOC_Os01g50610 발현 조절부위에 발현 유도체가 삽입된 형질전환 벼인 SAMT 01과 대조군으로 천연형 동진벼를 6주간 생장시켜 흰잎 마름병을 유발하는 균주인 Xanthomonas oryzae pv. oryzae (strain : PXO99Az)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 SAMT 01 형질전환체는 평균 병증의 길이가 천연형 동진벼의 반 정도에 불과하여 (천연형 vs. SAMT 01 : 22.3cm vs. 11.3cm), 흰잎 마름병에 대한 강력한 저항성을 가짐을 확인할 수 있었다.

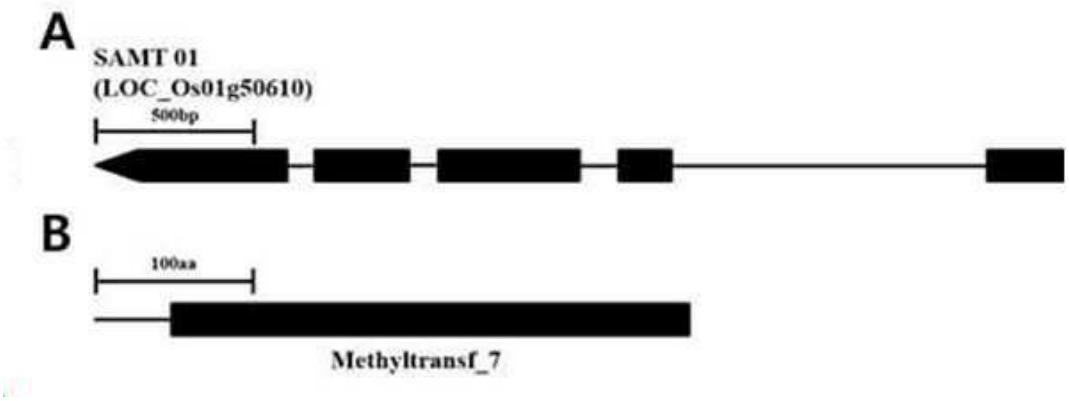
[0083] 이와 같은 결과를 통하여, 본 발명의 형질전환 벼 SAMT 01은 내재적 유전자 LOC_Os01g50610를 활성화시킴으로써 흰잎 마름병에 대한 저항성을 가질 수 있음을 확인하였다.

[0084]

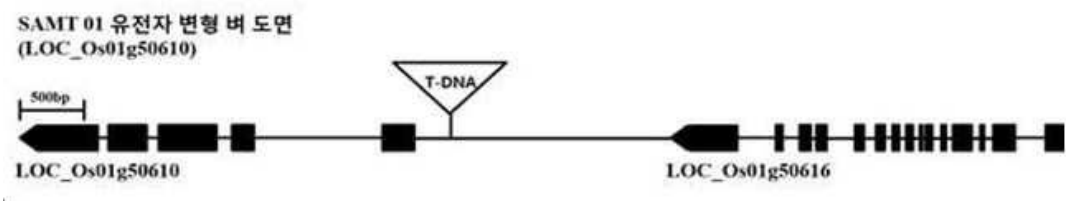
[0085] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

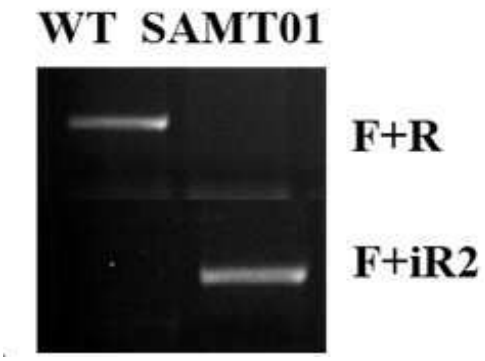
도면1



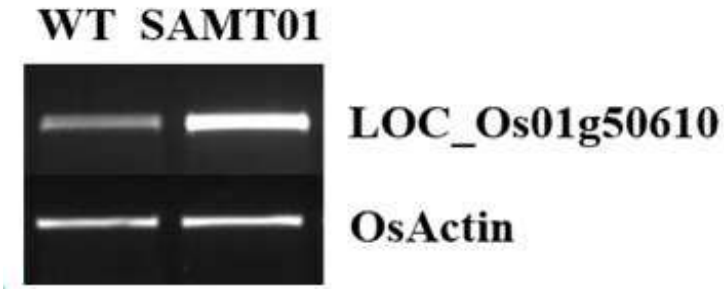
도면2



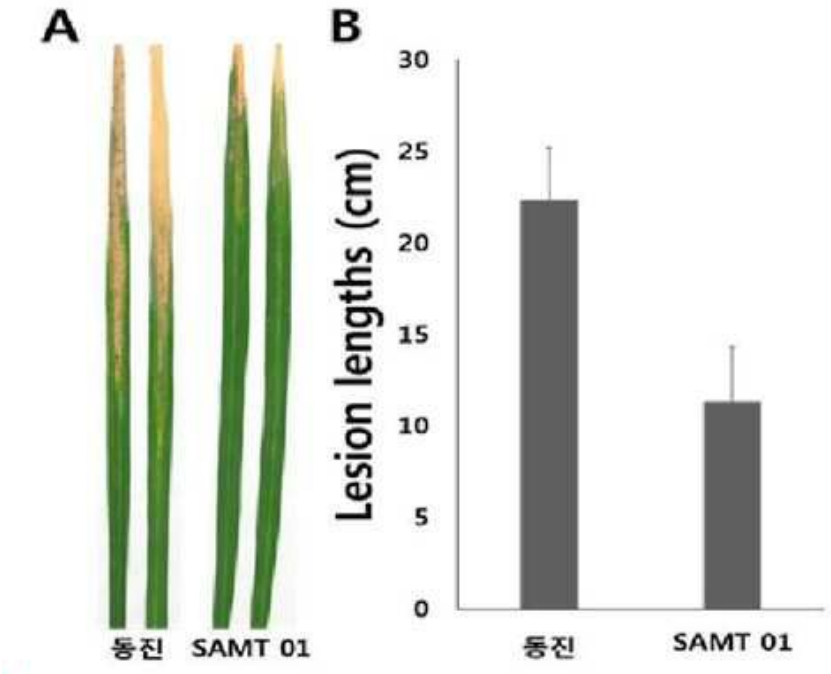
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Methyltrasnferase gene resistant to a bacterial blight, and the transgenic plant using the same

<130> KPA141020-KR

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2844

<212> DNA

<213> LOC_Os01g50610

<400> 1

atgttcctct tatgtgtgtg cgtgcgtgca cagttcgtgc aagttgggag gagacgcttg 60

ccaatggctg gagccacatg atcgagccag cgattctgat tccgttggcc tgcctataaa 120

taccccgagg agcgagcact gcagatgcca aggcagaggc caaggtttct tctctgctag 180

ctaactagtg ggctgcttgg gtggggagcc cgggccggca gatatcctgt ctgaaaccct 240

taggtatgta ttttccctca aatggctggt taatttcggc tccgaaatgg cagttcgcat 300

actatcatgc gaatggcatt gtcttcttcg ccatcacttg tataaagtca ctagtgcaca 360

tgtagctttc aagaatcaag aggatgatca ctgctagcta gcttatgcgt ctgtttagtt 420

aggccaagca gcagcctgtg ttgtgttacc tactcatttc caattgcacc cattgcatca 480

ggaaccttcc atctttcact tgtaaaaatc ttactgcatc tgttttgcct gttcaaacat 540

ggattttcca tgctctctca agtgtgaagc agatcgtttg caacttgcag ttgtgtttag 600

gagccatagt agacagggta tcaattaagc acaaaggtca tgttgcatgc atgactcaaa 660

gtttttttt ccttcatttt tttttgggtg ggaagaaaaa gtttggacca atggttttac 720

gccagctttt atctcctgta gcatttcacg cactttcacg ttgtgttttt tctccctccc 780

gggagtcaat ctttcgccgt acgtgatatg ataatatcga atccgagccc atatgtcctt 840

gaagagactg acagaattgt actttatctg aaacccggtt gctcggtcgg tcacaccaaa 900

ctgagccaaa aaggagatcc gagttagaca aatcgcgcct tgtttgcata aagcggccta 960

aacttagatg cccatattac tatcacatta ttctgaagaa tttttgttca gaaaacaaac 1020

attattctga agaatctctt ttgcacatcg cgtgtagcaa ttgttcgtca gtagcttgct 1080

acgttctaca gttctctgca cgagtggcct aggtagatac tgtatttttt tttaatatct 1140

tgtgcgaaat gggtgtacaa aagcagagtc ctgaacatgt acgcactgca ttgcgtgatc 1200

acagggacag ggacttcgaa ttcttggagg caatggcgtc ctcgttgctc cactgctccg 1260

acaagctgcc gttcatgaac gtggagaccg tcctccacat gaaggaaggc ctcggcgaga 1320

ccagctacgc gcagaactcg tcgcttcagg cgagcacctt gcttccttgc cgctcatggc 1380

cattgattct ttttgatccg tgcatgcatt ttttttccgag ttctggctct gagccatggc 1440

gtggccattc ttgcagagga ggggcatgga cacgctgaag agcctcatca ccaactcggc 1500

ggcggacgtg tacctgtcgc agatgccgga gaggttcgcc gtcgccgacc tcgggtgctc 1560

gtcggggccg aacgcgctgt gcctggcgga ggacatcatc gggagcatcg gccgcatctg 1620

ctgccggtcg tcgcggccgc cgccggagtt ctcggtgctc ctcaacgacc tcccgaccaa 1680

cgacttcaac accatcttct tcagcctgcc ggagttcacc gaccgtctca aggccgccgc 1740

caagtccgac gagtggggcc gccccatggt gttcctctcc ggcgtcccgg gctccttcta 1800

cggcaggctc ttcccggcca agagcgttca cttcgtctgc tcctgctcca gcctgcactg 1860

gctctcccag gtacttaact cctctgacac tgttgcattg tttgatctaa cgattaaccg 1920

gtgtttaagt gggaaatttt ctaaatactt caggttcctt ctgggcttct tgacgagatg 1980

aacaggccga tcaacaaggg aaagatgtac atatcaagca cgagcccccct ggccgtgcca 2040

gtggcctacc tgaggcagtt tcagagagac ttcagcctgt tcctcaagtc gcgcgcggcg 2100

gaggtcttct ccggcggccg gatggtcctc gccatgctcg gcaggcaggc cgacggctat 2160

atcgacaggc gtaccacctt cctctgggag ctcctctcgg agtcgttcgc ctccctggtc 2220

gcacaggtga gcagatagcc tgatactcat cagtattcag aactctgaac tgataatctg 2280

aacctgacgg caatgcaatg ggtgggtgca ggggctggtc gaggaggaca aggtggacgc 2340

gtacaacgtg ccgttctacg cgccgtcgat aggggagatc gaggaggagg tgaggcggga 2400

gggatcgttc aggatggact acgtgcagac gtacgagatc aacctgagca gcagcggcga 2460

cgcgaggagg gacggcagga cggtgtcgat ggcgatcagg gccatccagg agtccatgct 2520

cagccaccac ttcggcccgg agatcgtcga cgcgctcttc gccaagtaca ccgagctcgt 2580

caccgcgtcc atggagaggg aggaggtgaa gagcgtccag attggggtcg tcctcaccag 2640

gttgtgacac aaaccacaaa gctgtgacga ctgaccagag cgatttgtac cagtttatag 2700

tttgacccca tgtttctgaa ttctaatgtg tgaccatgtg gtgtttagtt gttgtattga 2760

gtaactgatg atattaacaa attccatgtg tacttaactg gtaggatgga aagaaattaa 2820

tggaaagtgg attaacaagt gtgt 2844

<210> 2

<211> 1140

<212> DNA

<213> Coding Sequence

<400> 2

atggcgtcct cgttgctcca ctgctccgac aagctgccgt tcatgaacgt ggagaccgtc 60

ctccacatga aggaaggcct cggcgagacc agctacgcgc agaactcgtc gcttcagagg 120

aggggcatgg acacgctgaa gagcctcatc accaactcgg cggcggacgt gtacctgtcg 180

cagatgccgg agaggttcgc cgtcgccgac ctcgggtgct cgtcggggcc gaacgcgctg 240

tgcctggcgg aggacatcat cgggagcatc ggccgcatct gctgccggtc gtcgcggccg 300

ccgccggagt tctcggtgct cctcaacgac ctcccgacca acgacttcaa caccatcttc 360

ttcagcctgc cggagttcac cgaccgtctc aaggccgccg ccaagtccga cgagtggggc 420

cgccccatgg tgttcctctc cggcgtcccg ggctccttct acggcaggct cttcccggcc 480

aagagcgttc acttcgtctg ctcctgctcc agcctgcact ggctctccca ggttccttct 540

gggcttcttg acgagatgaa caggccgatc aacaagggaa agatgtacat atcaagcacg 600

agccccctgg ccgtgccagt ggcctacctg aggcagtttc agagagactt cagcctgttc 660

ctcaagtcgc gcgcggcgga ggtcttctcc ggcggccgga tggtcctcgc catgctcggc 720

aggcaggccg acggctatat cgacaggcgt accaccttcc tctgggagct cctctcggag 780

tcgttcgcct ccctggtcgc acaggggctg gtcgaggagg acaaggtgga cgcgtacaac 840

gtgccgttct acgcgccgtc gataggggag atcgaggagg aggtgaggcg ggagggatcg 900

ttcaggatgg actacgtgca gacgtacgag atcaacctga gcagcagcgg cgacgcgagg 960

agggacggca ggacggtgtc gatggcgatc agggccatcc aggagtccat gctcagccac 1020

cacttcggcc cggagatcgt cgacgcgctc ttcgccaagt acaccgagct cgtcaccgcg 1080

tccatggaga gggaggaggt gaagagcgtc cagattgggg tcgtcctcac caggttgtga 1140

1140

<210> 3

<211> 379

<212> PRT

<213> LOC_Os01g50610

<400> 3

Met Ala Ser Ser Leu Leu His Cys Ser Asp Lys Leu Pro Phe Met Asn

1 5 10 15

Val Glu Thr Val Leu His Met Lys Glu Gly Leu Gly Glu Thr Ser Tyr

20 25 30

Ala Gln Asn Ser Ser Leu Gln Arg Arg Gly Met Asp Thr Leu Lys Ser

35 40 45

Leu Ile Thr Asn Ser Ala Ala Asp Val Tyr Leu Ser Gln Met Pro Glu
50 55 60
Arg Phe Ala Val Ala Asp Leu Gly Cys Ser Ser Gly Pro Asn Ala Leu
65 70 75 80
Cys Leu Ala Glu Asp Ile Ile Gly Ser Ile Gly Arg Ile Cys Cys Arg
85 90 95

Ser Ser Arg Pro Pro Pro Glu Phe Ser Val Leu Leu Asn Asp Leu Pro
100 105 110
Thr Asn Asp Phe Asn Thr Ile Phe Phe Ser Leu Pro Glu Phe Thr Asp
115 120 125
Arg Leu Lys Ala Ala Ala Lys Ser Asp Glu Trp Gly Arg Pro Met Val
130 135 140
Phe Leu Ser Gly Val Pro Gly Ser Phe Tyr Gly Arg Leu Phe Pro Ala
145 150 155 160
Lys Ser Val His Phe Val Cys Ser Cys Ser Ser Leu His Trp Leu Ser
165 170 175
Gln Val Pro Ser Gly Leu Leu Asp Glu Met Asn Arg Pro Ile Asn Lys
180 185 190
Gly Lys Met Tyr Ile Ser Ser Thr Ser Pro Leu Ala Val Pro Val Ala
195 200 205
Tyr Leu Arg Gln Phe Gln Arg Asp Phe Ser Leu Phe Leu Lys Ser Arg
210 215 220
Ala Ala Glu Val Phe Ser Gly Gly Arg Met Val Leu Ala Met Leu Gly
225 230 235 240

Arg Gln Ala Asp Gly Tyr Ile Asp Arg Arg Thr Thr Phe Leu Trp Glu
245 250 255
Leu Leu Ser Glu Ser Phe Ala Ser Leu Val Ala Gln Gly Leu Val Glu
260 265 270
Glu Asp Lys Val Asp Ala Tyr Asn Val Pro Phe Tyr Ala Pro Ser Ile
275 280 285
Gly Glu Ile Glu Glu Glu Val Arg Arg Glu Gly Ser Phe Arg Met Asp
290 295 300

Tyr Val Gln Thr Tyr Glu Ile Asn Leu Ser Ser Ser Gly Asp Ala Arg

305 310 315 320

Arg Asp Gly Arg Thr Val Ser Met Ala Ile Arg Ala Ile Gln Glu Ser

325 330 335

Met Leu Ser His His Phe Gly Pro Glu Ile Val Asp Ala Leu Phe Ala

340 345 350

Lys Tyr Thr Glu Leu Val Thr Ala Ser Met Glu Arg Glu Glu Val Lys

355 360 365

Ser Val Gln Ile Gly Val Val Leu Thr Arg Leu

370 375

<210> 4

<211> 1361

<212> DNA

<213> Inserting Sequence

<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

cagtggtccc aaagatggac ccccacccac gaggaacatc gtggaaaaag aagacgttcc 300

aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctag atccccaaca tggtggagca 360

cgacactctc gtctactcca agaatatcaa agatacagtc tcagaagacc agagggctat 420

tgagactttt caacaaaggg taatatcggg aaacctcctc ggattccatt gcccagctat 480

ctgtcacttc atcgaaagga cagtagaaaa ggaagatggc ttctacaaat gccatcattg 540

cgataaagga aaggctatcg ttcaagatgc ctctaccgac agtggtccca aagatggacc 600

cccacccacg aggaacatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt 660

ggattgatgt gatatctaga tccccaacat ggtggagcac gacactctcg tctactccaa 720

gaatatcaaa gatacagtct cagaagacca gagggctatt gagacttttc aacaaagggt 780

aatatcggga aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttca tcgaaaggac 840

agtagaaaag gaagatggct tctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt 900

tcaagatgcc tctaccgaca gtggtcccaa agatggaccc ccacccacga ggaacatcgt 960

ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctagat 1020

ccccaacatg gtggagcacg acactctcgt ctactccaag aatatcaaag atacagtctc 1080

agaagaccag agggctattg agacttttca acaaagggta atatcgggaa acctcctcgg 1140

attccattgc ccagctatct gtcacttcat cgaaaggaca gtagaaaagg aagatggctt 1200

ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggctatcgtt caagatgcct ctaccgacag 1260

tggtcccaaa gatggacccc cacccacgag gaacatcgtg gaaaaagaag acgttccaac 1320

cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tatctagatc c 1361

<210> 5

<211> 10377

<212> DNA

<213> T-DNA

<400> 5

gtttacccgc caatatatcc tgtcaaacac ggatccgagg taccaggtac caggtgagtt 60

ccattcttac taccacggtg ctatttttt tgctatgtgg ctaattacat gactaacttg 120

gggtgctaaa tcttacaggt tatatgcagg ttatatgcag gtcccgggta ggtcagtccc 180

ttatgttacg tcctgtagaa accccaaccc gtgaaatcaa aaaactcgac ggcctgtggg 240

cattcagtct ggatcgcgaa aactgtggaa ttgatcagcg ttggtgggaa agcgcgttac 300

aagaaagccg ggcaattgct gtgccaggca gttttaacga tcagttcgcc gatgcagata 360

ttcgtaatta tgcgggcaac gtctggtatc agcgcgaagt ctttataccg aaaggttggg 420

caggccagcg tatcgtgctg cgtttcgatg cggtcactca ttacggcaaa gtgtgggtca 480

ataatcagga agtgatggag catcagggcg gctatacgcc atttgaagcc gatgtcacgc 540

cgtatgttat tgccgggaaa agtgtacgta tcaccgtttg tgtgaacaac gaactgaact 600

ggcagactat cccgccggga atggtgatta ccgacgaaaa cggcaagaaa aagcagtctt 660

acttccatga tttctttaac tatgccggaa tccatcgcag cgtaatgctc tacaccacgc 720

cgaacacctg ggtggacgat atcaccgtgg 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 tatctacccg cttcgcgtcg gcatccggtc agtggcagtg aagggccaac 1020

agttcctgat taaccacaaa ccgttctact ttactggctt tggtcgtcat gaagatgcgg 1080

acttacgtgg caaaggattc gataacgtgc tgatggtgca cgaccacgca ttaatggact 1140

ggattggggc caactcctac cgtacctcgc attaccctta cgctgaagag atgctcgact 1200

gggcagatga acatggcatc gtggtgattg atgaaactgc tgctgtcggc tttaacctct 1260

ctttaggcat tggtttcgaa gcgggcaaca agccgaaaga actgtacagc gaagaggcag 1320

tcaacgggga aactcagcaa gcgcacttac aggcgattaa agagctgata gcgcgtgaca 1380

aaaaccaccc aagcgtggtg atgtggagta ttgccaacga accggatacc cgtccgcaag 1440

tgcacgggaa tatttcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgacccg acgcgtccga 1500

tcacctgcgt caatgtaatg ttctgcgacg ctcacaccga taccatcagc gatctctttg 1560

atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat ttggaaacgg 1620

cagagaaggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat cagccgatta 1680

tcatcaccga atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac accgacatgt 1740

ggagtgaaga gtatcagtgt gcatggctgg atatgtatca ccgcgtcttt gatcgcgtca 1800

gcgccgtcgt cggtgaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg caaggcatat 1860

tgcgcgttgg cggtaacaag aaagggatct tcactcgcga ccgcaaaccg aagtcggcgg 1920

cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg cagcagggag 1980

gcaaacaatg aatcaacaac tctcctggcg caccatcgtc ggctacagcc tcgggaattg 2040

ctaccgagct cgaatttccc cgatcgttca aacatttggc aataaagttt cttaagattg 2100

aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc tgttgaatta cgttaagcat 2160

gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggtttttat gattagagtc 2220

ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa 2280

ttatcgcgcg cggtgtcatc tatgttacta gatcgggaat taattcatcg ataggctagt 2340

catggtgact gtacgttgta agtgcagcaa actgccgacg cgatgcaaac tgtacacgtt 2400

aacatgccac tcacctggaa cgcacaatgg ccactaggtg 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 cttgaaacat actaagttcc acagtcgaga gtaaaccgta 2700

atcaacacaa gaaacaaaca taaaattgaa caaacgcgca tattataagt gacgaagcgg 2760

tctcacataa aacagggcac acaggttaca acaacgaggg ttgtaagccc attaagcccc 2820

aaacatcaga tcaccacaag caaatgtctc gaagacacac gcacacggca acaggataac 2880

tccacactgg cagatcatgg gatagcagca gttatcaatc aggccttgac acacagaaca 2940

tcaagccccc agacgacgac gactcctcta gatcccggtc ggcatctact ctattccttt 3000

gccctcggac gagtgctggg gcgtcggttt ccactatcgg cgagtacttc tacacagcca 3060

tcggtccaga cggccgcgct tctgcgggcg atttgtgtac gcccgacagt cccggctccg 3120

gatcggacga ttgcgtcgca tcgaccctgc gcccaagctg catcatcgaa attgccgtca 3180

accaagctct gatagagttg gtcaagacca atgcggagca tatacgcccg gagccgcggc 3240

gatcctgcaa gctccggatg cctccgctcg aagtagcgcg tctgctgctc catacaagcc 3300

aaccacggcc tccagaagaa gatgttggcg acctcgtatt gggaatcccc gaacatcgcc 3360

tcgctccagt caatgaccgc tgttatgcgg ccattgtccg tcaggacatt gttggagccg 3420

aaatccgcgt gcacgaggtg ccggacttcg gggcagtcct cggcccaaag catcagctca 3480

tcgagagcct gcgcgacgga cgcactgacg gtgtcgtcca tcacagtttg ccagtgatac 3540

acatggggat cagcaatcgc gcatatgaaa tcacgccatg tagtgtattg accgattcct 3600

tgcggtccga atgggccgaa cccgctcgtc tggctaagat cggccgcagc gatcgcatcc 3660

atggcctccg cgaccggctg cagaacagcg ggcagttcgg tttcaggcag gtcttgcaac 3720

gtgacaccct gtgcacggcg ggagatgcaa taggtcaggc tctcgctgaa ttccccaatg 3780

tcaagcactt ccggaatcgg gagcgcggcc gatgcaaagt gccgataaac ataacgatct 3840

ttgtagaaac catcggcgca gctatttacc cgcaggacat atccacgccc tcctacatcg 3900

aagctgaaag cacgagattc ttcgccctcc gagagctgca tcaggtcgga gacgctgtcg 3960

aacttttcga tcagaaactt ctcgacagac gtcgcggtga gttcaggctt tttcatatct 4020

cattgccccc cgggatccgt cgagtcagcc tgaaaggaca 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 atacatcggt aacaaatgaa catattcata 4500

tgacatagct gtaaaacatc atgatctatc atatcaacta gaggggatct cggcatgtat 4560

cattctattg catctagaac catagcattt ccatgtgaca aacaattttg aaacatacat 4620

tgctcagatc taccataaga acaccatgtt catgacagca tcgaccatga tttccacatt 4680

taacagcatc ccgaggtcag atccagtgtt tagaactatc atttcagcaa aattcacaaa 4740

ataaatcctc caattcgcct acatatatcc attccacgca tcctaggacc agatccacca 4800

taccagtata cacgaacact aaacatttca tcagatccgc taactacgac agagaaaacg 4860
cagatccaga caaccagatc caccgacaaa taaacacagc ccccccacatc caacaaccgc 4920
gaatccaccc 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 tatagggcca 5160
gacagcctgg acctctcagg agcggaagcg aagggatggg ggagtttttc gttttacccc 5220

ctttgacgtc ttcaaaattc actcgcatct cacatcgtgc ctgcaaaggt cgggtggttg 5280
gatcatatcg agaatattta ataagttagg gagctttctg ataatatcca ccgcaaggag 5340
gccatttcgt ttgcactcgg ttgaagtcca tacccgcctc tcgttagttt cactgacagg 5400
tgggtccaga ggcttccttc gtgtgcggtt agcgagtgca cgcgtcgctc caagaaaaag 5460
cagtaggtga cctggccacc tcgttgtagg tgcgaccgat gcagacgtcc cgcttgccgg 5520
tgggcccacg ttacagctgg gtcccacata tcggtgggtg cgatgagttg ttcggtgcgt 5580
aggagtagat tggatcccaa cgggtggttg cgtcgtcggc ggccctgccg attttatttt 5640

cgatttttga aatgcgagag cgggagaacg gcaccgttgg cttggctgtg gatgccgtta 5700
gccgcaccgg actattcggc ccagttccat tttggcccaa cttgaaacag cgcggagcac 5760
aagacggggg agcccattta ggcccgtaat ctcagccctg tagaaagtcc gtgtcgttgc 5820
gatggaccag aaagcccata aaccttggag gcgttctctg ctgggaataa aataagttca 5880
cactctgtcc ctcaacttta cgtcgagttt gtttgacatc gctaatgccc agtaccagaa 5940
atcttggata caaataaggt ttgatataaa gtggcacgtg gtgaatggca tcgtttgaaa 6000
aatcttcaga tcgagcgggc ttcacaagcc gtaagtgcaa gtgccaaaat ttgtgaagaa 6060

aattacttcc ttcatttcac aatgtaagtt attttagcat tttccacatt catattgata 6120
tcaataaatt tagatagata tatatgtctg aattcgtacc gttaacgagc tctagaagct 6180
tcagtactac gcgtctcgac ctgcaggcat gcaagcttgg cactggccgt cgttttacaa 6240
cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatcccccct 6300
ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc 6360
agcctgaatg gcgaatggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt 6420
tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag 6480

ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc 6540

gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca 6600

tcaccgaaac gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata ggttaatgtc 6660

atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc 6720

cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc 6780

tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc 6840

gcccttattc cctttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcaccc agaaacgctg 6900

gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat 6960

ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc 7020

acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa 7080

ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa 7140

aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt 7200

gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct 7260

tttttgcaca acatgggggа tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat 7320

gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg 7380

cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg 7440

atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt 7500

attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggtctcgcg gtatcattgc agcactgggg 7560

ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg 7620

gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg 7680

tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa 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 cagagcgcag 7980

ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta 8040

gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat 8100

aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg 8160

ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg 8220

agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac 8280

aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct tccagggggа 8340

aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt 8400

ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta 8460

cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttcctgcgtt atcccctgat 8520

tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg 8580

accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaaccgcct 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 ctcggattcc attgcccagc tatctgtcac 9000

ttcatcgaaa ggacagtaga aaaggaagat ggcttctaca aatgccatca ttgcgataaa 9060

ggaaaggcta tcgttcaaga tgcctctacc gacagtggtc ccaaagatgg acccccaccc 9120

acgaggaaca tcgtggaaaa agaagacgtt ccaaccacgt cttcaaagca agtggattga 9180

tgtgatatct agatccccaa catggtggag cacgacactc tcgtctactc caagaatatc 9240

aaagatacag tctcagaaga ccagagggct attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcg 9300

ggaaacctcc tcggattcca ttgcccagct atctgtcact tcatcgaaag gacagtagaa 9360

aaggaagatg gcttctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggctat cgttcaagat 9420

gcctctaccg acagtggtcc caaagatgga cccccaccca cgaggaacat cgtggaaaaa 9480

gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatcta gatccccaac 9540

atggtggagc acgacactct cgtctactcc aagaatatca aagatacagt ctcagaagac 9600

cagagggcta ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatcgg gaaacctcct cggattccat 9660

tgcccagcta tctgtcactt catcgaaagg acagtagaaa aggaagatgg cttctacaaa 9720

tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc gttcaagatg cctctaccga cagtggtccc 9780

aaagatggac ccccacccac gaggaacatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct 9840

tcaaagcaag tggattgatg tgatatctag atccccaaca tggtggagca cgacactctc 9900

gtctactcca agaatatcaa agatacagtc tcagaagacc agagggctat tgagactttt 9960

caacaaaggg taatatcggg aaacctcctc ggattccatt gcccagctat ctgtcacttc 10020

atcgaaagga cagtagaaaa ggaagatggc ttctacaaat gccatcattg cgataaagga 10080

aaggctatcg ttcaagatgc ctctaccgac agtggtccca aagatggacc cccacccacg 10140

aggaacatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt 10200

gatatctaga tccgaaacta tcagtgtcta gctagagtcg agaattcagt acattaaaaa 10260

cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag cgtcaatttc agtacattaa aaacgtccgc 10320

aatgtgttat taagttgtct aagcgtcaat ttgtttacac cacaatatat cctgcca 10377

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SAMT 01_F

<400> 6

tctgccacat cttttgacct 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SAMT 01_R

<400> 7

gcccatctct ctcattcaca 20

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iR2

<400> 8

caggacgtaa cataagggac 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> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT-SAMT 01_F

<400> 11

caacgacttc aacaccatct t 21

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT-SAMT 01_R

<400> 12

gaaggaacct gacctgggag 20