



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년01월17일
(11) 등록번호 10-1104830
(24) 등록일자 2012년01월04일

- (51) Int. Cl.
C12N 15/82 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2005-7019140
- (22) 출원일자(국제출원일자) 2004년04월09일
심사청구일자 2009년02월03일
- (85) 번역문제출일자 2005년10월07일
- (65) 공개번호 10-2006-0012581
- (43) 공개일자 2006년02월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2004/003995
- (87) 국제공개번호 WO 2004/090140
국제공개일자 2004년10월21일
- (30) 우선권주장
03076044.1 2003년04월09일
유럽특허청(EPO)(EP)
60/496,688 2003년08월21일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2002520062 A
US20020040490 A1
Development Cell, Vol.3, pp.51-61, (2002.07)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
바이엘 바이오사이언스 엔.브이.
벨기에 베-9052 겐트 테크놀로지파크 38
- (72) 발명자
드 블록 마르크
벨기에 베-9820 메렐베케 아브리코젠스트라트 26
- (74) 대리인
제일특허법인, 장성구

전체 청구항 수 : 총 14 항

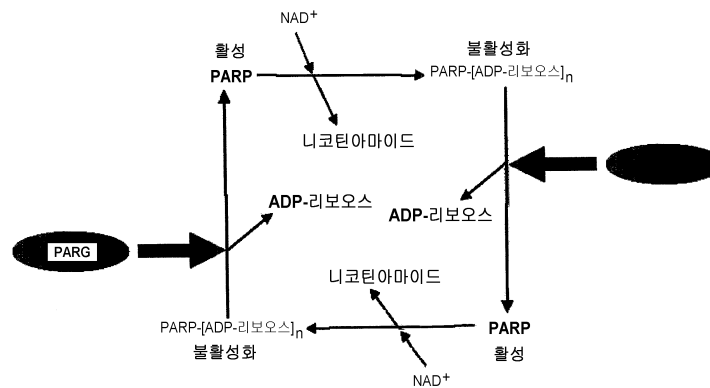
심사관 : 조정한

(54) 스트레스 조건에 대한 식물의 내성을 증가시키기 위한 방법 및 수단

(57) 요약

본 발명은 식물에서 내생성 PARP 단백질의 활성을 감소시킴으로써 가뭄, 강한 광 강도, 고온, 영양결핍 등을 비롯한 비생물적 스트레스 또는 나쁜 성장 조건에 대한 식물의 내성을 증가시키는 방법과 수단을 제공한다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 기능적으로 연결된 하기 (i) 내지 (iii)의 DNA 단편을 포함하는 키메라 유전자를 식물 세포에 제공하여 트랜스제닉 식물 세포를 생성하는 단계:

(i) 식물-발현성 프로모터, (ii) 전사되었을 때 ParG 억제성 RNA 분자를 생성하는 DNA 영역, 및 (iii) 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여하는 3' 말단 영역;

(b) 상기 트랜스제닉 식물 세포로부터 트랜스제닉 식물주 집단을 재생하는 단계; 및

(c) 상기 트랜스제닉 식물주 집단내에서 스트레스 내성 식물주를 확인하는 단계를 포함하는, 스트레스 조건에 대한 내성을 나타내는 식물을 제조하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

ParG 억제성 RNA 분자가 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 연속적 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

ParG 억제성 RNA 분자가 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 상보서열의 적어도 20개의 연속적 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 4

청구항 4은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서,

키메라 유전자가 ParG 억제성 RNA 분자를 암호화하는 DNA 영역과 3' 말단 영역 사이에 자가-스플라이싱 리보자임(self-splicing ribozyme)을 암호화하는 DNA 영역을 더 포함하는, 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

ParG 억제성 RNA가 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 연속적 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 센스 영역, 및 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 상보서열의 적어도 20개의 연속적 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 안티센스 영역을 포함하고, 이때 상기 센스 영역 및 안티센스 영역이 상기 적어도 20개의 연속적 뉴클레오타이드를 포함하는 이중 가닥 RNA 영역을 형성할 수 있는, 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 및 제 5 항중 어느 한 항에 있어서,

스트레스 조건이 열, 가뭄, 영양 결핍, 산화적 스트레스 및 강한 광 조건으로부터 선택되는, 방법.

청구항 7

청구항 7은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제 1 항 내지 제 3 항 및 제 5 항중 어느 한 항에 있어서,

트랜스제닉 식물주를 다른 식물주와 더 교배시켜 스트레스 내성 자손 식물을 수득하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 8

- (a) 식물의 ParG 암호화 유전자의 일부를 포함하는 적어도 100bp의 DNA 단편을 분리하는 단계;
- (b) 하기 (i) 내지 (iv)의 DNA 단편을 기능적으로 연결하여 키메라 유전자를 생성하는 단계:
 - (i) 식물-발현성 프로모터 영역, (ii) 상기 식물의 ParG 암호화 유전자의 일부를 상기 프로모터 영역과 비교하여 정방향으로 포함하는 상기 분리된 DNA 단편, (iii) 상기 식물의 ParG 암호화 유전자의 일부를 상기 프로모터 영역과 비교하여 역방향으로 포함하는 상기 분리된 DNA 단편, 및 (iv) 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여하는 3' 말단 영역;
- (c) 상기 키메라 유전자를 식물 세포에 제공하여 트랜스제닉 식물 세포를 생성하는 단계;
- (d) 상기 트랜스제닉 식물 세포로부터 트랜스제닉 식물주 집단을 재생하는 단계; 및
- (e) 상기 트랜스제닉 식물주 집단내에서 스트레스 내성 식물주를 확인하는 단계를 포함하는, 스트레스 조건에 대한 내성을 나타내는 식물을 제조하는 방법.

청구항 9

- (i) 식물-발현성 프로모터;
- (ii) 전사되었을 때 ParG 억제성 RNA 분자를 생성하는 DNA 영역; 및
- (iii) 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여하는 3' 말단 영역을 포함하는 DNA 분자.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

DNA 영역이 서열번호 1, 2 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 적어도 21 내지 100개 뉴클레오타이드, 또는 서열번호 3, 4, 15 또는 23의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 21 내지 100개 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, DNA 분자.

청구항 11

제 9 항 또는 제 10 항에 따른 DNA 분자를 포함하는 식물 세포.

청구항 12

제 11 항에 따른 식물 세포로 본질적으로 구성된 식물.

청구항 13

청구항 13은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제 12 항에 따른 식물을 다른 식물과 더 교배시키는 단계를 포함하는, 스트레스 내성 식물을 제조하는 방법.

청구항 14

제 9 항 또는 제 10 항에 따른 키메라 유전자를 포함하는, 제 12 항에 따른 식물의 종자 또는 증식물질.

청구항 15

청구항 15은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제 8 항에 따른 방법에 의해 수득되는 식물.

청구항 16

- (a) 기능적으로 연결된 하기 (i) 내지 (iii)의 DNA 단편을 포함하는 키메라 유전자를 식물 세포에 제공하여 트랜스제닉 식물 세포를 생성하는 단계:

(i) 식물-발현성 프로모터, (ii) 전사되었을 때 ParG 억제성 RNA 분자를 생성하고, 서열번호 1, 2 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 적어도 21 내지 100개 뉴클레오타이드, 또는 서열번호 3, 4, 15 또는 23의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 21 내지 100개 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 영역, 및 (iii) 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여하는 3' 말단 영역;

(b) 상기 트랜스제닉 식물 세포로부터 트랜스제닉 식물주 집단을 재생하는 단계; 및

(c) 상기 트랜스제닉 식물주 집단내에서 스트레스 내성 식물주를 확인하는 단계

를 포함하는, 스트레스 조건에 대한 내성을 나타내는 식물을 제조하는 방법.

청구항 17

(a) 식물 세포주, 식물 또는 식물주를 돌연변이 처리시키는 단계;

(b) 내생성 ParG 유전자에 돌연변이를 갖는 식물 세포 또는 식물을 확인하는 단계;

(c) 확인된 식물 세포 또는 식물을 스트레스 조건으로 처리시키는 단계; 및

(d) 대조용 식물에 비하여 스트레스 조건을 더 잘 견디는 식물 세포 또는 식물을 확인하는 단계

를 포함하는, 스트레스 조건에 대한 내성을 나타내는 식물을 제조하는 방법.

청구항 18

(a) ParG 억제제에 대한 내성을 나타내는 식물 세포주, 식물 또는 식물주를 선별하는 단계;

(b) 내생성 ParG 유전자에 돌연변이를 갖는 식물 세포 또는 식물을 확인하는 단계;

(c) 확인된 식물 세포 또는 식물을 스트레스 조건으로 처리시키는 단계; 및

(d) 대조용 식물에 비하여 스트레스 조건을 더 잘 견디는 식물 세포 또는 식물을 확인하는 단계

를 포함하는, 스트레스 조건에 대한 내성을 나타내는 식물을 제조하는 방법.

청구항 19

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 가뭄, 강한 광 세기, 고온, 영양결핍 등과 같은 나쁜 성장 조건에 대한 식물의 내성을 증가시키기 위해 식물에서 폴리(ADP-리보스) 글라이코하이드롤라아제를 사용하는 것에 관한 것이다. 비생물적 스트레스 조건에 대한 내성을 나타내는 식물을 제조하는 방법 및 수단도 제공된다.

배경기술

[0002] 흔히, 비생물적 스트레스는 나쁜 조건에 노출된 식물 세포의 DNA에 직접적으로 또는 간접적으로 손상을 줄 수 있다. 계놈 손상은, 수선하지 않고 방치하면, 세포 치사를 초래할 수 있다. 식물이 나타내는 스트레스 조건에 대한 내성은 나쁜 조건에 노출된 식물 세포가 그 손상을 감소 및/또는 수선하여서 생존하는 능력의 결과이다.

[0003] 다른 진핵생물처럼, 식물 세포는 정교한 DNA 수선 계를 발달시켜 왔다. DNA 가닥 중단에 의한 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)의 활성화는 DNA 손상에 대한 첫 세포 반응이다. PARP는 니코틴아마이드 다이뉴클레오타이드(NAD)의 전환에 의해 얻은 ADP-리보스 분자를 연속적으로 부가함으로써 단백질의 번역후 수식을 촉진하여 200개 이하의 ADP-리보스 잔기(식물에서 약 40 잔기)를 함유하는 다중분자 중합체를 형성한다. 폴리(ADP-리보스) 합성이 DNA 사슬 중단에 의존하는 의존성 및 DNA 수선, 복제 및 전사반응의 주요 이펙터(effector)를 함유하는 다중 단백질 복합체에 PARP가 존재하는 것은 상기 번역후 수식이 핵산의 대사 및 DNA 수선에 관여함을 강하게 암시한다. 폴리(ADP-리보스) 합성이 세포 주기 및 세포 치사의 조절에 관여함도 보여주는 증거도 있다.

[0004] 단백질의 폴리(ADP-리보실)화는 살아있는 세포에서는 일시적인 것이다. 폴리(ADP-리보스) 중합체는 신속하게 전환되며, 폴리(ADP-리보스)글라이코하이드롤라아제(PARG; E.C.3.21.143)의 엑소글라이코시다아제 및 엔도글라이

코시다아제 활성화에 의해 자유 ADP-리보스로 전환된다. 단백질 수용체 상의 ADP 리보스의 가장 기본 단위체는 다른 효소(ADP-리보실 단백질 리아제)의 작용으로 가수분해된다.

[0005] 세포 생존에 대한 PARP의 상술한 긍정적인(DNA-손상 관련된) 효과 이외에, PARP의 부정적인 효과도 있다. DNA 손상에 대해 PARP를 활성화시키는 과정은 NAD⁺ 수준의 급속 저하와 관련이 있으며, 이것은 PARP에 의해 전달된 각 ADP-리보스 단위체가 1분자의 NAD⁺를 소비하기 때문이다. 또한, NAD⁺ 고갈은 ATP 고갈을 초래하며, 이는 NAD⁺ 재합성이 NAD⁺ 1분자당 적어도(생합성 경로에 따라 좌우) 3분자의 ATP를 필요로 하기 때문이다. 또한 NAD⁺ 고갈은 당분해 과정 동안 ATP를 재합성하는데 필요한 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소 활성을 차단한다. 결국, NAD⁺는 전자 수송 및 산화 인산화반응을 통하여 ATP를 생성하는데 필요한 전자의 주요 전달자이다.

[0006] NAD⁺ 및 ATP 고갈의 생리적 결과는 DNA-손상 유도된 세포 치사의 측면에서 확립되어 왔다. 세포 자살의 완료는 ATP의 존재에 절대적으로 의존하며, 이 뉴클레오타이드가 없으면 이 유형의 세포 사멸은 세포자살에서 피사로 바뀐다. 이러한 세포성 용해는 인접 세포에 추가의 손상을 미치는 피사와 관련되어 있기 때문에, 다세포 생물의 경우 피사보다 세포자살에 의한 세포치사가 바람직하다.

[0007] 따라서 세포가 DNA 손상을 이겨 살아남을 가능성에 대한 폴리(ADP 리보실)화의 긍정적인 효과와 부정적인 효과의 균형을 신중히 숙고하는 것이 아주 중요하다.

[0008] WO 00/04173호는 내생성 폴리-(ADP-리보스)중합효소 (PARP) 유전자의 발현 및/또는 겔보기 활성화에 영향을 주는 "PCD 조절 키메라 유전자"를 도입함으로써, 진핵 세포 및 생물, 특히 식물 세포 및 식물에서 프로그래밍된 세포 치사(PCD)를 조절하는 방법을 개시한다. 프로그래밍된 세포치사는 억제되거나 유발될 수 있다. 상기 국제특허출원 공보에 기재된 발명은 특히 PCD를 조절하거나, 성장속도를 향상시키거나, 또는 스트레스 내성 세포 및 생물을 생성하기 위한, PARP 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 용도에 관한 것이다.

[0009] PARP를 암호화하는 유전자는 다수의 동물, 예컨대 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*)(수탁번호: NM-031339, NW-043030, AB019366), 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)(수탁번호: NT-039598, NM-003631, AF079557), 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)(수탁번호: NT-017696, NM-003631, AF005043), 보스 타우루스(*Bos taurus*)(수탁번호: NM-174138, U78975), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)(수탁번호: AF079556)에서 확인되어 있다.

[0010] 식물에서, 폴리(ADP-리보스)글라이코하이드롤라아제는, 아라비도시스 (*Arabidopsis*)에서 유전자의 시간-조절된 전사 및 영양성장기로부터 개화기(tej)로 가는 광기간 의존적 전환기가 영향을 받은 돌연변이에서 불활성화된 야생형 유전자의 유전자 지도-기초 클로닝에 의해 확인되었다. 이 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 수탁번호 AF 3964690(Panda et al., 2002 Dev. Cell. 3, 51-61)하의 뉴클레오타이드 데이터 베이스로부터 입수할 수 있다.

[0011] 발명의 개요

[0012] 본 발명은 기능적으로 연결된 식물-발현성 프로모터; 전사되었을 때 ParG 억제성 RNA 분자를 생성하는 DNA 영역; 및 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관련된 3' 말단 영역을 포함하는 키메라 유전자를 식물 세포에 제공하여 트랜스제닉 식물 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 스트레스 조건에 대한 내성을 나타내는 식물을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 트랜스제닉 식물 세포로부터 트랜스제닉 식물주 집단이 재생될 수 있고; 또 스트레스 내성 식물주는 트랜스제닉 식물주 집단내에서 확인된다. ParG 억제성 RNA 분자는 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자(내생성 ParG 유전자)의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 연속적 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. ParG 억제성 RNA 분자는 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자(내생성 ParG 유전자)의 뉴클레오타이드 서열의 상보서열의 적어도 20개의 연속적 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 다른 구체예로서, ParG 억제성 RNA는 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 연속적인 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 센스 영역 및 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 상보서열의 적어도 20개의 연속적 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 안티센스 영역을 포함할 수 있고, 상기 센스 및 안티센스 영역은 상기 적어도 20개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 이중 가닥 RNA 영역을 형성할 수 있다. 상기 키메라 유전자는 상기 ParG 억제성 RNA 분자를 암호화하는 DNA 영역 및 3' 말단 영역 사이에 자가-스플라이싱 리보자임을 암호화하는 DNA 영역을 더 포함할 수 있다. 스트레스 조건은 열, 가뭄, 영양결핍, 산화적 스트레스 또는 강한 광 조건으로부터 선택될 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 구체예로서, 관심을 갖고 있는 식물의 ParG 암호화 유전자의 일부를 포함하는 적어도 100bp의 DNA 단편을 분리하는 단계; 식물-발현성 프로모터 영역을 식물의 ParG 암호화 유전자의 일부를 포함하는 상기

분리된 DNA 단편에 프로모터 영역과 비교하여 정방향으로 연결하고; 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여된 3' 말단 영역을 식물의 ParG 암호화 유전자의 일부를 포함하는 상기 분리된 DNA 단편에 프로모터 영역과 비교하여 역방향으로 기능적으로 연결시켜 키메라 유전자를 생성하는 단계를 포함하는, 스트레스 조건에 대한 내성을 나타내는 식물을 제조하는 방법을 제공한다. 이들 키메라 유전자는 식물 세포에 제공되어 트랜스제닉 식물 세포를 생성한다. 이 트랜스제닉 식물 세포로부터 트랜스제닉 식물주 집단이 재생되며; 또 상기 트랜스제닉 식물주 집단내에서 스트레스 내성 식물주를 확인한다. 본 발명은 또한 상기 과정에 의해 얻은 스트레스 내성 식물 세포 및 식물에도 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 구체예로서, 식물 세포에 키메라 유전자를 제공함으로써 전사되었을 때 ParG 억제성 RNA 분자를 생성하는 DNA 영역을 포함하는 트랜스제닉 식물 세포를 생성하는 단계; 상기 트랜스제닉 식물 세포로부터 트랜스제닉 식물주 집단을 재생하는 단계; 및 상기 트랜스제닉 식물주 집단내에서 스트레스 내성 식물주를 확인하는 단계를 포함하는, 스트레스 조건에 대한 내성을 나타내는 식물을 제조하는 방법이 제공되며, 이 때 상기 DNA 영역은 식물-발현성 프로모터, 및 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여하는 3' 말단 영역에 기능적으로 연결된 서열번호 1, 2 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 적어도 21 내지 100개 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 3, 4, 15 또는 23의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 21 내지 100개 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0015] 본 발명은 전사되었을 때 ParG 억제성 RNA 분자를 생성하는 DNA 영역과 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여하는 3' 말단 영역에 기능적으로 연결된 식물-발현성 프로모터를 포함하는 DNA 분자도 제공한다. ParG 억제성 RNA 분자는 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자(내생성 ParG 유전자)의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 연속적인 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 상기 ParG 억제성 RNA 분자는 또한 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자(내생성 ParG 유전자)의 뉴클레오타이드 서열의 상보서열의 적어도 20개의 연속적인 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 다른 구체예로서, 상기 ParG 억제성 RNA는 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 연속적인 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 센스 영역 및 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 상보서열의 적어도 20개의 연속적인 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 안티센스 영역을 포함할 수 있으며, 상기 센스 및 안티센스 영역은 적어도 20개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 이중 가닥 RNA 영역을 형성할 수 있다. 키메라 유전자는 또한 ParG 억제성 RNA 분자를 암호화하는 DNA 영역과 3' 말단 영역 사이에 자가-스플라이싱 리보자임을 암호화하는 DNA 영역을 더 포함할 수 있다. 키메라 유전자는 또한 서열번호 1, 2 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 적어도 21 내지 100개 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 3, 4, 15 또는 23의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 21 내지 100개 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0016] 다른 구체예로서, 본 발명은 본 발명의 DNA 분자를 포함하는 식물 세포 및 이러한 식물 세포로 실질적으로 구성된 식물뿐만 아니라 이러한 식물을 다른 식물과 교배시키는 단계를 포함하는 스트레스 내성 식물의 제조 방법에도 관한 것이다. 본 발명의 키메라 유전자를 포함하는 식물의 종자 및 증식물질도 또한 제공된다.

[0017] 본 발명은 식물 세포주 또는 식물 또는 식물주를 돌연변이 처리시키는 단계; 내생성 ParG 유전자에서 돌연변이를 갖는 식물 세포 또는 식물을 확인하는 단계; 확인된 식물 세포 또는 식물을 스트레스 조건으로 처리시키고, 대조용 식물보다 상기 스트레스 조건을 더 잘 견디는 식물 세포 또는 식물을 확인하는 단계를 포함하는, 스트레스 내성 식물을 얻는 방법에 관한 것이다. 다르게는, ParG 억제제 내성에 대해 식물 세포 또는 식물을 선별할 수 있고, 상기 단락에 기재된 바와 같이 더 처리될 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한 내생성 ParG 유전자 내에 돌연변이를 갖는 스트레스 내성 식물 세포 또는 식물에도 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

[0022] 본 발명은 PARP 유전자 발현을 감소시키는 키메라 유전자를 포함하는 스트레스 내성 식물주로부터 얻은 세포가 형질전환되지 않은 식물주로부터 얻은 세포에 비하여 나쁜 조건하에서 더 높은 NAD/ATP 함량을 나타낸다는 것을 기초로 한다. 한편, 위성 바이러스에 기초한 일시적 침묵 RNA 벡터를 사용하여 담배에서 PARP를 암호화하는 유전자 발현을 침묵시키는 것은 동일 침묵 계를 사용한 PARP를 암호화하는 유전자의 침묵에서 관찰된 것과 유사한 표현형을 초래함이 밝혀졌다. 또한, 아라비도시스 및 담배와 같은 식물에서 PARG 암호화 유전자 발현의 침묵은 높은 광 조건에 의해 부여된 스트레스 조건과 같은 스트레스 조건에 대해 보다 증가된 내성을 나타내는 식물을

제조하였다.

- [0023] 본 발명을 특정 작용 모드에 한정시키는 것은 아니지만, PARG 유전자 발현의 침묵은 이하의 이유로 인하여 PARG 유전자 발현의 침묵과 유사한 표현형을 초래할 것으로 기대된다. 도 1로부터 알 수 있듯이, PARG에 의해 촉진되고 NAD를 소비하는 ADP 리보스의 중합 후에 PARG에 의해 촉진되는 폴리 ADP 리보스에 의한 해중합이 일어난다. PARG 단백질 자체의 폴리 ADP 리보실화는 PARG 단백질의 불활성화를 초래한다. ADP 리보스 중합반응/해중합반응 주기가 식물 세포에서 생겨서 NAD 결핍 및 그에 따른 ATP 결핍을 초래하는 속도는 PARG 유전자 발현의 감소 또는 PARG의 효소 작용에 의해 느려지거나 또는 중지될 수 있다. 그 결과, 식물 세포, 및 그러한 세포를 포함하는 식물은 나쁜 조건에 대해 더욱 내성이 된다. 여기서 제공된 데이터는 PARG 유전자 발현 또는 PARG 활성의 감소에 의한 상기 주기의 둔화 또는 중지를 통하여 유사한 효과를 얻을 수 있음을 보여준다.
- [0024] 본 발명은 나쁜 환경 조건에 대응한 식물 세포 치사의 감소, 및 ParG 유전자 발현양을 변경하는 것에 의해, 또는 식물 세포에서 PARG 단백질의 활성 또는 겔보기 활성을 변경하는 것에 의해 향상된 스트레스 내성에 관한 것이다. 따라서, ParG 유전자의 발현량은 키메라 유전자를 도입하여 ParG 유전자의 발현을 변경하는 것에 의해, 또는 발현 신호를 포함한 내생성 PARG 암호화 서열을 변경하는 것에 의해 유전적으로 제어될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일개 구체예로서,
- [0026] - 기능적으로 연결된 하기 DNA 단편들을 포함하는 키메라 유전자를 식물 세포에 제공하여 트랜스제닉 식물 세포를 생성하는 단계:
식물-발현성 프로모터; 전사되었을 때 ParG 억제성 RNA 분자를 생성하는 DNA 영역; 및 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여하는 3' 말단 영역;
- [0027] - 상기 트랜스제닉 식물 세포로부터 트랜스제닉 식물주 집단을 재생하는 단계; 및
- [0028] - 상기 트랜스제닉 식물주 집단내에서 스트레스 내성 식물주를 확인하는 단계를 포함하는, 스트레스 조건 또는 나쁜 성장조건에 대한 내성을 나타내는 식물의 제조 방법을 제공한다.
- [0029] 본 명세서에서 말하는 "스트레스 내성 식물" 또는 "스트레스 조건 또는 나쁜 성장 조건에 대한 내성을 나타내는 식물"은 비제한적으로 가뭄, 고온, 제한된 영양(특히 질소) 공급, 강한 광 세기와 같은 나쁜 성장 조건에 일정 시간 처리되면 본 발명의 방법에 따라 처리되지 않은 대조 식물에 비하여 더 잘 성장하는 식물(특히, 본 발명에 따라 얻은 식물)이다. 이것은 일반적인 식물의 외관으로부터 분명하며 예컨대 증가된 바이오매스 생산, 나쁜 조건하에서 지속적인 영양 성장 또는 더 많은 종자 생산에 의해 측정될 수 있다. 스트레스 내성 식물은 더 넓은 성장 스펙트럼을 가지며, 즉 이들은 수율 손실없이 더 넓은 범위의 기후적 및 기타 비생물적 변화를 견딜 수 있다. 생화학적으로, 스트레스 내성은 스트레스 조건하의 대조 식물과 비교하여 스트레스 내성 식물의 더 높은 NAD⁺ - NADH/ATP 함량 및 더 낮은 반응성 산소종의 생산량으로 드러난다. 스트레스 내성은 또한 동일 조건하에서 대조 식물과 비교하여 스트레스 내성 식물에서 더 높은 엽록소 함량, 더 높은 광합성 및 더 낮은 엽록소 형광으로 분명해진다.
- [0030] 스트레스 내성이 분명해지기 위해서 식물이 나쁜 조건하에서 연속적으로 성장할 필요는 없다는 것이 분명하다. 통상, 본 발명에 따른 식물 또는 식물 세포와 대조 식물 또는 식물 세포 사이의 스트레스 내성 차이는 성장하는 동안 비교적 단시간 동안 나쁜 조건에 직면하더라도 분명해질 것이다.
- [0031] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "ParG 억제성 RNA 분자"는 식물 세포의 내생성 PARG 암호화 유전자를 바람직하게는 전사후 유전자침묵을 통하여 감소시킬 수 있는 RNA 분자이다. ParG 억제성 RNA 분자가 ParG 암호화 유전자의 발현을 전사후 유전자침묵을 통하여 감소시킬 때에도, 이러한 RNA 분자는 예컨대 내생성 ParG 유전자의 DNA 메틸화를 안내하는 등의 세포내에서 다른 작용을 발휘하여, 궁극적으로 PARG 암호화 유전자의 발현 감소를 초래한다. 또한, 식물 세포의 내생성 PARG 암호화 유전자의 발현은 전사상 침묵에 의해, 예컨대 내생성 ParG 유전자의 프로모터 영역을 표적으로 한 RNAi 또는 dsRNA를 사용하는 것에 의해 감소될 수 있다.
- [0032] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "PARG 암호화 유전자" 또는 "ParG 유전자"는 PARG(폴리 ADP 리보스 글라이코하이드롤라제) 단백질을 암호화할 수 있는 유전자로서, PARG 단백질은 내생성 해당작용(endoglycolytic) 또는 외생성 해당작용(exoglycolytic)에 의해 자유 ADP 리보스 단위체를 방출함으로써 폴리 ADP-리보스의 해중합을 촉진한다.
- [0033] PARG 암호화 유전자는 서열번호 1(아기장대: 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)) 또는 서열번호 2

(솔라눔 튜버로숨(*Solanum tuberosum*)) 또는 서열번호 16(벼: 오리자 사티바(*Oryza sativa*))의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 그의 일부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 예컨대 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 15 또는 서열번호 23(옥수수: 제아 메이즈(*Zea mays*))의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 단편을 포함할 수 있다.

[0034] 그러나, 당해 분야의 숙련자들은 식물 종으로부터 얻은 상술한 PARG 암호화 유전자로부터 유도된 프로브를 사용한 혼성화(hybridization), 또는 심지어는 동물 종으로부터 얻은 상술한 PARG 암호화 유전자로부터 유도된 프로브를 사용한 혼성화에 의해서 다른 식물 종으로부터도 변이 DNA 서열을 분리할 수 있음은 잘 알 수 있을 것이다. 이를 위하여, 상기 프로브들은 상기 PARG 암호화 유전자 서열의 코딩 영역으로부터, 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 코딩 영역으로부터 얻은 적어도 40개의 연속된 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 가져야 한다. 그러나 상기 프로브는 상술한 ParG 유전자의 약 50, 60, 75, 100, 200 또는 500개의 연속된 뉴클레오타이드와 같은 ParG 유전자로부터 유도된 뉴클레오타이드 서열의 더 긴 영역을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 프로브는 동물로부터 얻은 상이한 PARG 단백질을 정렬하는 것에 의해 확인된 촉매 도메인의 고도로 보존되는 영역중의 하나를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함해야 한다. 이들 영역은 또한 아기장대로부터 확인된 PARG 단백질에도 존재하며 아미노산 서열 LXVDFANXXXGGG(위치 252의 아미노산에서부터 위치 264의 아미노산에 이르는 서열번호 1에 상응함; X는 임의의 아미노산일 수 있음), LXVDFANXXXGGGXXXXGXVQEEIRF(위치 252의 아미노산에서부터 위치 277의 아미노산에 이르는 서열번호 1에 상응) 또는 LXVDFANXXXGGGXXXXGXVQEEIRFXXXPE(위치 252의 아미노산에서부터 위치 282의 아미노산에 이르는 서열번호 1에 상응), TGXWGCCTXFXGD(위치 449의 아미노산에서부터 위치 460의 아미노산에 이르는 서열번호 1에 상응) 또는 TGXWGCXGAFXGDXXLKXXXQ(위치 449의 아미노산에서부터 위치 468의 아미노산에 이르는 서열번호 1에 상응)를 포함한다. 다른 보존된 영역은 아미노산 서열 DXXXRXXXXAIDA(위치 335의 아미노산에서부터 위치 344의 아미노산에 이르는 서열번호 1에 상응) 또는 REXXXKAXXGF(위치 360의 아미노산에서부터 위치 369의 아미노산에 이르는 서열번호 1에 상응) 또는 GXXXXSXTYGY(위치 303의 아미노산에서부터 위치 313의 아미노산에 이르는 서열번호 1에 상응)를 갖는다. 혼성화는 바람직하게는 엄격한(stringent) 조건하에서 이루어져야 한다.

[0035] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "엄격한 혼성화 조건"은 프로브와 표적 서열 사이에 95% 이상의 서열 동일성, 바람직하게는 97% 이상의 서열 동일성이 존재하면 혼성화가 일반적으로 생긴다는 것을 의미한다. 엄격한 조건의 예는 50% 폼아미드, 5 x SSC(150mM NaCl, 15mM 시트르산삼나트륨), 50mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5 x 덴하트 용액, 10% 황산 텍스트란, 및 연어 정자 DNA와 같은 변성되고 전단처리된 캐리어 DNA 20µg/ml를 포함하는 용액에서 철야로 교반한 다음 혼성화 지지체를 0.1 x SSC로 약 65°C에서 약 10분간 (2회) 세척하는 것이다. 다른 혼성화 및 세척 조건은 공지되어 있으며, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY(1989), 특히 11장]에 예시되어 있다.

[0036] 다르게는, ParG 암호화 유전자 또는 그의 일부는 상술한 PARG 암호화 유전자의 뉴클레오타이드 서열 또는 그의 상보적인 서열로부터 적어도 20개의 연속된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용한 PCR-기체 수법에 의해 분리할 수 있다. 이러한 프라이머는 상술한 바와 같은 보존된 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이러한 뉴클레오타이드 서열에 상보적일 수 있다. 상기 목적을 위해 사용될 수 있는 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 5, 6, 7 또는 8의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 올리고뉴클레오타이드는 예컨대 서열번호 17, 18, 19, 20, 21 또는 22의 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 같이 축퇴될 수 있다.

[0037] ParG 유전자로부터의 특정 PCR 단편은 예컨대 아라비도시스(*Arabidopsis*) 게놈 DNA 또는 cDNA를 주형 DNA로 사용하여 서열번호 5 및 6의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 조합을 사용함으로써 얻을 수 있거나, 또는 엄격한 어닐링 조건하에서 감자 게놈 DNA 또는 cDNA를 주형 DNA로서 사용하여 서열번호 7 및 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 조합을 사용함으로써 얻을 수 있다.

[0038] 분리된 서열은 기능성 PARG 단백질 또는 그의 일부를 암호화할 수 있다. 바람직하게는 분리된 서열은 예시된 바와 같은 PARG 단백질의 촉매적 도메인으로부터 고도로 보존되는 영역 1 또는 그 이상을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함해야 한다.

[0039] 그러나, 본 발명의 목적을 위해서는 분리된 서열이 기능적 ParG 단백질을 암호화하거나 또는 완전한 코딩 영역을 분리할 필요는 없다. 실제로, 본 발명에 필요한 것은 ParG 억제성 RNA를 생성할 수 있는, 식물로부터 확인되거나 분리된 내생성 ParG 유전자를 기본으로 하여 키메라 유전자가 고안되거나 제조될 수 있어야 하는 것이다. 몇몇 대체 방법을 이용하여 이러한 ParG 억제성 RNA 분자를 생성할 수 있다.

- [0040] 일 구체예로서, ParG 억제성 RNA 분자를 암호화하는 키메라 유전자는 소위 안티센스 기술을 기초로 한다. 즉, 키메라 유전자의 코딩 영역은 그 발현을 감소시키려 하는 식물 세포 또는 식물의 내생 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 상보서열의 적어도 20개의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 이러한 키메라 유전자는 분리되거나 확인된 ParG 유전자, 또는 이러한 유전자의 일부로부터 얻은 적어도 20개의 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 단편을 식물-발현성 프로모터, 및 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여된 3' 말단 형성 영역에 역방향으로 기능적으로 연결시키는 것에 의해 편리하게 작성할 수 있다. 분리된 ParG 유전자로부터 얻은 이러한 DNA 단편의 정확한 뉴클레오타이드 서열 또는 완전한 뉴클레오타이드 서열을 알 필요가 없음은 분명할 것이다.
- [0041] 다른 구체예로서, ParG 억제성 RNA 분자를 암호화하는 키메라 유전자는 소위 공동-억제 기술을 기초로 하고 있다. 다시 말해, 키메라 유전자의 코딩 영역은 식물 세포 또는 식물의 내생 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 그의 발현을 감소시키는 것을 목적으로 한다. 이러한 키메라 유전자는 분리되거나 확인된 ParG 유전자 또는 이러한 유전자의 일부로부터 얻은 적어도 20개의 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 단편을 식물-발현성 프로모터, 및 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여된 3' 말단 영역에 직접적인 방향으로 기능적으로 연결하는 것에 의해 편리하게 작성할 수 있다. 마찬가지로, 분리된 ParG 유전자로부터 얻은 사용된 DNA 단편의 정확한 뉴클레오타이드 서열을 알 필요가 없다.
- [0042] 내생 ParG 유전자의 발현을 감소시키려 하는 상술한 키메라 유전자의 효율은 비정상, 폴리아데닐화되지 않은 ParG 억제성 RNA 분자의 발현을 초래하는 DNA 요소의 삽입에 의해 더욱 향상될 수 있다. 이러한 목적에 적합한 1개 DNA 요소는 WO 00/01133 호에 기재된 바와 같은 자가-스플라이싱 리보자임(self-splicing ribozyme)을 암호화하는 DNA 영역이다.
- [0043] 식물 세포의 내생 ParG 유전자의 발현을 감소시킴에 있어서 상술한 키메라 유전자의 효율은 1개의 식물 세포에, 안티센스 ParG 억제성 RNA 분자를 암호화하는 상기 기재된 바와 같은 키메라 유전자 및 센스 ParG 억제성 RNA 분자를 암호화하는 상기 기재된 바와 같은 키메라 유전자를 동시에 삽입시키는 것에 의해 더욱 향상될 수 있으며, 상기 안티센스 및 센스 ParG 억제성 RNA 분자는 WO 95/53050 호에 기재된 바와 같이, 적어도 20개의 연속적인 뉴클레오타이드 사이의 염기쌍에 의해 이중 가닥 RNA 영역을 형성할 수 있다.
- [0044] WO 95/53050 호에 기재된 바와 같이, 이중 가닥 RNA 영역을 형성할 수 있는 센스 및 안티센스 ParG 억제성 RNA 영역은 바람직하게는 1개의 스페이서 영역에 의해 분리된 1개의 RNA 분자에 존재할 수 있다.
- [0045] 스페이서 영역은 인트론 서열을 포함할 수 있다. 이러한 키메라 유전자는 그 발현을 감소시키려고 하는 분리되거나 확인된 내생 ParG 유전자에서 얻은 적어도 20개의 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 단편을, 식물-발현성 프로모터, 및 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여된 3' 말단 형성 영역에 역방향으로 기능적으로 연결시키는 것에 의해 편리하게 작성할 수 있다. 이러한 키메라 유전자를 작성하기 위하여, WO 02/059294 호에 기재된 벡터를 사용할 수 있다.
- [0046] 따라서 본 발명의 일 구체예는,
- [0047] - 식물-발현성 프로모터; 전사되었을 때 ParG 억제성 RNA 분자를 생성하며, 상기 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 영역; 또는 전사되었을 때 ParG 억제성 RNA 분자를 생성하며, 상기 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 상보서열의 적어도 20개의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 영역; 또는 전사되었을 때 ParG 억제성 RNA 분자를 생성하고, 상기 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 20개의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 센스 영역, 및 상기 식물 세포에 존재하는 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 상보서열의 적어도 20개의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 안티센스 영역(이때, 상기 센스 영역 및 안티센스 영역은 상기 적어도 20개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 이중 가닥 RNA 영역을 형성할 수 있다)을 포함하는 DNA 영역의 기능적으로 연결된 DNA 단편을 포함하는 키메라 유전자를 식물 세포에 제공하여 트랜스제닉 식물 세포를 생성하는 단계;
- [0048] - 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관여된 3' 말단 영역을 포함하는 키메라 유전자를 식물 세포에 제공하여 트랜스제닉 식물 세포를 생성하는 단계;
- [0049] - 상기 트랜스제닉 식물 세포로부터 트랜스제닉 식물주 집단을 재생하는 단계; 및

- [0050] - 상기 트랜스제닉 식물주 집단내에서 스트레스 내성 식물주를 확인하는 단계를 포함하는 스트레스 내성 식물주를 얻는 방법에 관한 것이다.
- [0051] 본 명세서에 기재된 바와 같이 "포함하는"은 상술한 특징, 정수, 단계 또는 성분의 존재를 특정하는 것으로 이해되지만, 1 이상의 특징, 정수, 단계 또는 성분 또는 그의 그룹의 존재 또는 부가를 제외하는 것은 아니다. 따라서, 예컨대 핵산 또는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 포함하는 단백질은 실제로 인용된 것 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산을 포함할 수 있으며, 즉 더 큰 핵산 또는 단백질에 협지될 수 있다. 기능적으로 또는 구조적으로 정의된 DNA 영역을 포함하는 키메라 유전자는 부가적인 DNA 영역을 포함할 수 있다.
- [0052] 따라서 약 20nt의 ParG 코딩 영역의 안티센스 또는 센스 RNA 영역의 최소 뉴클레오타이드 서열은 대형 RNA 분자 내에 포함될 수 있어 20nt 내지 표적 유전자의 크기와 동일한 길이만큼 다양할 수 있음이 분명하다.
- [0053] 상술한 안티센스 또는 센스 뉴클레오타이드 영역은 약 21nt 내지 약 5000nt 길이, 예컨대 21nt, 40nt, 50nt, 100nt, 200nt, 300nt, 500nt, 1000nt, 2000nt 또는 약 5000nt 또는 그 이상의 길이일 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명의 목적을 위해서는, 사용된 억제성 ParG RNA 분자의 뉴클레오타이드 서열 또는 키메라 유전자의 암호화 영역이 식물 세포에서 그 발현을 감소시키려는 내생성 ParG 유전자와 완전히 동일하거나 또는 이에 상보적일 필요는 없다. 서열이 더 길수록, 전체 서열 확인에 필요한 요건은 엄격함이 덜하다. 따라서, 센스 또는 안티센스 영역은 내생성 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열 또는 그의 상보적인 서열에 대하여 약 40% 또는 50% 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100%의 전체적인 서열 상동성을 가질 수 있다. 그러나, 상술한 바와 같이 안티센스 또는 센스 영역은 내생성 ParG 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 약 100% 서열 동일성을 갖는 20개의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 포함해야 한다. 바람직하게는 약 100% 서열 동일성을 갖는 스트레치는 약 50, 75 또는 100nt이어야 한다.
- [0055] 본 발명의 목적을 위하여, %로 나타낸, 2개의 관련 뉴클레오타이드 서열의 "서열 동일성"은 비교한 위치 수로 나눈 동일 잔기를 갖는 2개의 적합하게 정렬된 서열에서 위치의 수(x100)를 지칭한다. 겹, 즉 어떤 잔기가 1개의 서열에 존재하지만 다른 서열에는 존재하지 않는 정렬에서의 위치가 비-동일 잔기 위치로 간주된다. 2개 서열의 정렬은 니들맨 및 분슈 알고리즘(Needleman and Wunsch 1970) 컴퓨터-보조된 서열 정렬에 의해 실시되며, 겹 생성 페널티가 50이고 겹 연장 페널티가 3인 디폴트 스코어링 매트릭스를 이용한 위스콘신 패키지(Wisconsin Package) 버전 10.1(Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA)의 일부인 GAP와 같은 표준 소프트웨어 프로그램을 이용하여 편리하게 실시될 수 있다.
- [0056] RNA 분자의 뉴클레오타이드 서열이 상응하는 DNA 분자의 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 정의될 때마다, 뉴클레오타이드 서열 중의 티민(T)은 우라실(U)로 교체되어야 한다. 언급되는 것이 RNA 분자인지 DNA 분자인지는 본문의 내용으로부터 명확할 것이다.
- [0057] 특정 식물 변종 또는 식물 종에서 특정 ParG 유전자에 대한 억제성 ParG 유전자를 생성할 수 있는 키메라 유전자는 다른 식물 변종 또는 식물 종에서 ParG 유전자 발현을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 실제로, ParG 억제성 RNA 영역 및 ParG 유전자 사이에 충분한 상동성이 존재하거나, 또는 ParG 유전자가 19개 뉴클레오타이드의 동일 스트레치를 공유한다면, 다른 유전자의 발현은 하향 조절될 것이다.
- [0058] 핵산 대사에서 ParG의 잠재적 역할의 측면에서, ParG 억제성 RNA에 의한 내생성 ParG 유전자의 발현이 완전하게 억제되지 않는 것이 유리할 수 있다. ParG 억제성 RNA를 암호화하는 키메라 유전자의 도입을 통한 유전자 침묵에 의하여 특정 유전자의 발현을 하향조절하는 것은 상이한 정도의 ParG 유전자의 침묵의 분포를 나타내는 상이한 트랜스제닉 주의 집단을 초래할 것이다. 이러한 집단은 원하는 침묵 정도에 따라 내생성 ParG 유전자가 침묵되어 있는 개별 트랜스제닉 식물주를 함유할 것이다. 당해 분야의 숙련자들은 이러한 식물주를 강한 광 세기, 산화성 스트레스, 가뭄, 열 등과 같은 특성의 나쁜 조건으로 처리시키고 그 처리를 충분히 이겨서 가장 잘 생존하는 식물주를 선별하는 것에 의해 식물주를 용이하게 확인할 수 있다.
- [0059] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "프로모터"는 전사를 개시하는 동안 DNA-의존적 RNA 중합효소에 의해 인식되어 결합되는(직접적으로 또는 간접적으로) DNA를 의미한다. 프로모터는 전사 개시 부위, 및 전사 개시 인자 및 RNA 중합효소에 대한 결합 부위를 포함하며, 유전자 발현 조절 단백질이 결합될 수 있는 다양한 다른 부위(예컨대 인핸서)를 포함할 수 있다.
- [0060] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "조절 영역"은 단백질 또는 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA와 같은 주어진 DNA 서열의 전사를 주도하고 전사 타이밍과 수준을 제어(즉, 조절)하는데 관여하는 DNA를 의미한다. 예컨대, 5' 조절

영역(또는 "프로모터 영역")은 코딩 서열의 상류(즉, 5')에 위치하는 DNA 서열로서 프로모터와 5'-비번역 리더 서열을 포함한다. 3' 조절 영역은 코딩 서열의 하류(즉, 3')에 존재하는 DNA 서열로서 1 이상의 폴리아데닐화 시그널을 비롯한 적합한 전사 종결(및/또는 조절) 시그널을 포함한다.

- [0061] 본 발명의 일 구체예로서, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 본 발명의 다른 구체예로서, 프로모터 활성화는 비제한적인 호르몬, 화학 화합물, 기계적 충격, 비생물적 또는 생물적 스트레스 조건 등과 같은 외부 또는 내부 자극에 의해 향상될 수 있다(유도성 프로모터). 프로모터의 활성화는 일시적으로 또는 공간적 방식으로 조절될 수 있다(조직 특이적 프로모터; 발달학적으로 조절되는 프로모터).
- [0062] 본 발명의 목적을 위하여, 프로모터는 식물-발현성 프로모터이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "식물-발현성 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 제어(개시)할 수 있는 DNA 서열을 의미한다. 이것은 어떤 식물 기원의 프로모터라도 포함하지만, 식물 세포에서 전사를 지시할 수 있는 비-식물 기원의 프로모터도 포함하며, 즉 CaMV35S(Hasper et al., 1988)와 같은 바이러스성 또는 세균 기원의 특정 프로모터, 지하의 클로버 바이러스 프로모터 4호 또는 7호(WO 9606932 호), 또는 비제한적인 종자 특이적 프로모터를 비롯한 조직 특이적 또는 기관 특이적 프로모터를 포함하는 T-DNA 유전자 프로모터(예컨대 WO89/03887 호), 기관-프리모르디아 특이적 프로모터 (An et al., 1996), 줄기 특이적 프로모터(Keller et al., 1988), 잎 특이적 프로모터(Hudspeth et al., 1989), 메소필 특이적 프로모터(광 유도성 루비스코 프로모터와 같은), 뿌리 특이적 프로모터(Keller et al., 1989), 덩이줄기 특이적 프로모터(Keil et al., 1989), 도관 조직 특이적 프로모터(Peleman et al., 1989), 스타멘-선별적 프로모터(WO 89/10396 호, WO 92/13956 호), 열개 영역(dehiscence zone) 특이적 프로모터(WO 97/13865 호) 등의 특정 프로모터이다.
- [0063] 키메라 유전자를 식물에 도입하는 방법은 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있고 또 아그로박테륨-매개 형질전환, 입자 건 전달, 미량주입, 손상되지 않은 세포의 선택적 투과성, 폴리에틸렌글리콜 매개 원형질 형질전환, 원형질의 선택적 투과성, 리포솜 매개 형질전환, 실리콘-휘스커 매개 형질전환 등을 포함한다. 이렇게 하여 얻은 형질전환된 세포는 성숙한 수정가능한 식물로 재생될 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 트랜스제닉 식물 세포 및 식물주는 WO 00/04173 호에 기재된 바와 같이 PARP 유전자의 발현을 감소시키는 키메라 유전자를 더 포함할 수 있다. 이들 추가의 키메라 유전자는 본 발명의 트랜스제닉 식물주를 PARP 유전자 발현 감소성 키메라 유전자를 함유하는 트랜스제닉 식물과 교배하는 것에 의해 도입될 수 있다. 트랜스제닉 식물 세포 또는 식물주는 본 발명의 키메라 유전자를 PARP 유전자 발현 감소성 키메라 유전자를 포함하는 트랜스제닉 식물 세포에 도입하거나 형질전환시키는 것에 의해 또는 그 역으로 실시하는 것에 의해 얻을 수 있다. 다르게는, PARP 및 PARG 억제성 RNA 영역은 1개 키메라 유전자에 의해 암호화될 수 있고 1개의 RNA 분자로서 전사될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 키메라 유전자(또는 그에 상응하는 억제성 RNA 분자)는 WO 00/63397 호 또는 WO 02/13964 호에 기재된 바와 같이 바이러스성 RNA 벡터와 같은 바이러스성 벡터를 사용하여 일시적 방식으로 식물 세포에 도입될 수 있다.
- [0066] 본 발명의 명세서를 읽어보면, PARG 활성이 감소된 돌연변이 식물 세포 및 식물주는 본 명세서에 기재된 트랜스제닉 식물 세포 및 식물주와 동일한 효과를 위해 사용될 수 있음을 당해 분야의 숙련자라면 잘 알 수 있을 것이다. 식물 세포 또는 식물의 ParG 유전자에서 돌연변이는 EMS 돌연변이법과 같은 화학적 돌연변이법이 민감성 검출 방법(예컨대 변성 HPLC)과 조합된 당해 분야의 숙련자에게 공지된 스크리닝 방법을 이용하여 용이하게 확인될 수 있다. 이러한 수법의 일례는 문헌[McCallum et al., Plant Physiology 123 439-442] 또는 WO 01/75167 호에 기재된 바와 같은 소위 "게놈에서 표적 유도된 국소 병반" 방법이다. 그러나, 특정의 게놈 영역 또는 대립 유전자에서 돌연변이를 검출하기 위한 다른 방법도 또한 가능하며, 기존의 또는 새로이 생성된 삽입 돌연변이 식물주의 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함하며, 이들 돌연변이 식물주의 게놈 DNA의 풀은 삽입된 DNA 단편에 특이적인 프라이머 및 삽입하려고 하는 게놈 영역 또는 대립유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR 증폭 처리된다(예컨대 Maes et al., 1999, Trends in Plant Science, 4, pp 90-96).
- [0067] 식물 세포주 및 식물주는 갈로탄닌과 같은 ParG 억제제에 대한 내성을 나타내는 식물 세포주 또는 식물주를 선별함으로써 돌연변이처리될 수 있다. [Ying, et al. (2001), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(21), 12227-12232; Ying, W., Swanson, R.A. (2000). NeuroReport 11(7), 1385-1388].
- [0068] 따라서, ParG 유전자에서 돌연변이를 포함하는 식물 세포 및 식물주를 확인하기 위한 방법도 유용하다. 돌연변이 세포 또는 식물주 집단은 상이한 비생물적 스트레스 처리될 수 있으며, 이들의 표현형 또는 생존은 쉽게 측

정될 수 있다. 부가적으로, 스트레스받은 세포의 NAD 및/또는 ATP 함량을 측정해서 스트레스를 받지 않은 세포의 측정치와 비교한다. 스트레스 내성 세포에서, 스트레스 조건하의 NAD 함량의 감소는, 스트레스를 받지 않은 세포와 비교할 때, 상응하는 대조 세포에 대하여 더 낮아야 한다.

- [0069] 본 발명의 목적은 본 발명에 따른 키메라 유전자 또는 RNA 분자를 함유하는 식물 세포 및 식물을 제공하는 것이다. 전통적인 육종 방법에 의해 제조된, 본 발명의 키메라 유전자 유전자를 포함하는 식물의 배우자, 종자, 배, 접합체 또는 체세포, 자손 또는 잡종(하이브리드) 또한 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0070] 본 명세서에 기재된 방법으로 얻은 식물은, 전통적인 육종 수법에 의해 다른 식물과 교배되어 본 발명의 키메라 유전자를 포함하는 스트레스 내성 자손 식물을 제조할 수 있다.
- [0071] 본 명세서에 기재된 방법과 수단은 모든 식물 세포 및 식물, 단자엽 식물 및 쌍자엽 식물 세포 및 식물에 적합한 것으로 믿어지며, 비제한적인 예로서 목면, 브라시카(Brassica) 채소, 평지, 밀, 옥수수, 보리, 알팔파, 땅콩, 해바라기, 벼, 귀리, 사탕수수, 콩, 잔디, 보리, 호밀, 소금, 사탕수수, 채소(치커리, 상추, 토마토, 주키니호박, 피망, 가지, 오이, 메론, 양파, 부추), 담배, 감자, 사탕무, 파파야, 파인애플, 망고, 아기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 뿐만 아니라 원예, 화초원에 또는 임업(포플라, 전나무, 유칼립투스 등)에 이용되는 식물도 포함한다.
- [0072] 이하의 비제한적인 실시예는 본 발명에 따른 식물에서 스트레스 내성을 증가시키는 방법 및 수단을 개시한다.
- [0073] 실시예에서 특별히 언급하지 않는 한, 모든 재조합 DNA 수법은 문헌[Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 및 Volumes 1 and 2 of Ausubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA]에 기재된 표준 수준에 따라 실시한다. 식물 분자실험용 표준 물질 및 방법은 BIOS Scientific Publications Ltd(UK) 및 Blackwell Scientific Publications, UK에 의해 공동 발행된 문헌[R.D.D. Croy, Plant Molecular Biology Labfax (1993)]에 기재되어 있다. 표준 분자 생물학 수법에 대한 다른 참고문헌은 문헌[Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 및 Volumes I and II of Brown (1998) Molecular Biology LabFax, Second Edition, Academic Press (UK)]를 포함한다. 중합효소 연쇄반응에 대한 표준 물질 및 방법은 문헌[Dieffenbach 및 Dveksler (1995) PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 및 McPherson et al. (2000) PCR - Basics: From Background to Bench, First Edition, Springer Verlag, Germany]에서 찾아 볼 수 있다.
- [0074] 발명의 상세한 설명 및 실시예 전체에서, 서열에 대한 설명은 다음과 같다:
- [0075] 서열번호 1: 아기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 얻은 ParG 단백질의 아미노산 서열.
- [0076] 서열번호 2: 솔라눔 튜베로숨(*Solanum tuberosum*)으로부터 얻은 ParG 단백질의 아미노산 서열.
- [0077] 서열번호 3: 아기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 얻은 ParG 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열.
- [0078] 서열번호 4: 솔라눔 튜베로숨(*Solanum tuberosum*)으로부터 얻은 ParG 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열.
- [0079] 서열번호 5: ParG 단백질을 암호화하는 DNA 단편의 일부의 PCR 증폭에 적합한 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0080] 서열번호 6: ParG 단백질을 암호화하는 DNA 단편의 일부의 PCR 증폭에 적합한 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0081] 서열번호 7: ParG 단백질을 암호화하는 DNA 단편의 일부의 PCR 증폭에 적합한 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0082] 서열번호 8: ParG 단백질을 암호화하는 DNA 단편의 일부의 PCR 증폭에 적합한 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0083] 서열번호 9: 아라비도시스(*Arabidopsis*) ParG 유전자 서열을 기본으로 하는, ParG 발현을 감소시키는 키메라 유전자를 함유하는 T-DNA 벡터의 뉴클레오타이드 서열.
- [0084] 서열번호 10: PARG 단백질의 보존된 서열 1의 아미노산 서열.

- [0085] 서열번호 11: PARG 단백질의 보존된 서열 2의 아미노산 서열.
- [0086] 서열번호 12: PARG 단백질의 보존된 서열 3의 아미노산 서열.
- [0087] 서열번호 13: PARG 단백질의 보존된 서열 4의 아미노산 서열.
- [0088] 서열번호 14: PARG 단백질의 보존된 서열 5의 아미노산 서열.
- [0089] 서열번호 15: 벼(*Oryza sativa*)로부터 얻은 ParG 단백질의 뉴클레오타이드 서열.
- [0090] 서열번호 16: 벼(*Oryza sativa*)로부터 얻은 ParG 단백질의 아미노산 서열.
- [0091] 서열번호 17: ParG 단백질을 암호화하는 DNA 단편의 일부를 PCR 증폭시키기에 적합한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 PG1의 뉴클레오타이드 서열.
- [0092] 서열번호 18: ParG 단백질을 암호화하는 DNA 단편의 일부를 PCR 증폭시키기에 적합한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 PG2의 뉴클레오타이드 서열.
- [0093] 서열번호 19: ParG 단백질을 암호화하는 DNA 단편의 일부를 PCR 증폭시키기에 적합한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 PG3의 뉴클레오타이드 서열.
- [0094] 서열번호 20: ParG 단백질을 암호화하는 DNA 단편의 일부를 PCR 증폭시키기에 적합한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 PG4의 뉴클레오타이드 서열.
- [0095] 서열번호 21: ParG 단백질을 암호화하는 DNA 단편의 일부를 PCR 증폭시키기에 적합한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 PG5의 뉴클레오타이드 서열.
- [0096] 서열번호 22: ParG 단백질을 암호화하는 DNA 단편의 일부를 PCR 증폭시키기에 적합한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 PG6의 뉴클레오타이드 서열.
- [0097] 서열번호 23: 옥수수(*Zea mays*)로부터 얻은 ParG 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열.
- [0098] 서열번호 24: PARG 발현을 감소시킬 수 있는 키메라 유전자를 포함하는 T-DNA 벡터의 뉴클레오타이드 서열.
- [0099] 서열번호 25: PARG 발현을 감소시킬 수 있는 키메라 유전자를 포함하는 T-DNA 벡터의 뉴클레오타이드 서열.

실시예

- [0100] **실시예 1. PARP 유전자 발현을 감소시키는 키메라 유전자를 함유하는 트랜스제닉 스트레스 내성 식물주의 에너지 생산 효율에 대한 스트레스 영향의 분석**
- [0101] WO 00/04173 호에 기재된 바와 같은 PARP 유전자 발현을 감소시키는 키메라 유전자를 포함하는 트랜스제닉 브라씨카 나푸스(*Brassica napus*) 식물의 배축을 생장 배지상에서 5일간 배양하였다. 외식편(explant)을 30mg/L 아스피린 또는 아세틸살리실산(산화성 스트레스 조건을 초래)을 포함하는 액체 배지에 전달하여 1일 동안 두었다. 대조 실험에서는 비-트랜스제닉 브라씨카 나푸스(*Brassica napus*) 식물의 배축 N90-740을 동일 생장 배지상에서 배양한 다음 30mg/L 아스피린을 포함하는 액체 배지에서 하루 배양하였다. 또한, 트랜스제닉 주 및 대조용 주의 배축을 아스피린을 갖지 않는 동일 생장 배지 상에서 배양하였다.
- [0102] 배양 기간 후, 125개 외식편의 ATP 함량을 각 실험당 측정하였다. 부가적으로, 125개 외식편당 3시간 동안 소비된 산소량을 측정하였다. 결과를 하기 표 A에 요약하였다. 표준오차는 6% 미만이다. 대조 식물에서 소비된 산소 mg당 ATP의 몰비는 산화성 스트레스가 가해진 대조 식물에서는 감소하는 반면, 스트레스 조건하에서 스트레스 내성 트랜스제닉 식물주에서의 동일비율은 실질적으로 증가하였고 대조 식물에 비하여 현저히 더 높았다(약 24%). 따라서 이 스트레스 내성 트랜스제닉 식물은 일정한 에너지 생산 효율을 유지한 반면, 대조 식물주는 감소된 에너지 생산효율을 나타내었다. 또한, 산화적 스트레스 처리받지 않은 대조 식물에서 슈퍼옥시드 생산율로 표시된 슈퍼옥시드 생산은 스트레스 조건하의 스트레스 내성 식물에서는 증가하지 않았다.

표 A

5일간 배양된 브라씨카 나푸스(*Brassica napus*) 배축 외식편의 에너지 생산효율에 대한 스트레스의 영향

식물주	스트레스	125개 외식편당 ATP 몰수	125개 외식편이 3시간 동안 소비한 O ₂ mg/L	소비된 O ₂ mg 당 ATP 몰수	슈퍼옥시드 생산
N90-740 (대조군)	없음	12.4 x 10 ⁻⁷	2.96	4.19 x 10 ⁻⁷	100%
	30mg/L 아스피린	13.2 x 10 ⁻⁷	4.06	3.5 x 10 ⁻⁷	167%
트랜스제닉 식물	없음	9.3 x 10 ⁻⁷	2.33	3.99 x 10 ⁻⁷	108%
	30mg/L 아스피린	11.4 x 10 ⁻⁷	2.82	4.04 x 10 ⁻⁷	100%

[0103]

[0104]

다른 실험으로서, WO 00/04173 호에 기재된 바와 같은 PARP 유전자 발현을 감소시키는 키메라 유전자를 포함하는 4개의 상이한 트랜스제닉 아라비도시스(*Arabidopsis*) 주의 NAD⁺ 및 ATP 함량을 높은 광 조건 및 낮은 광 조건하에서 측정하고, 동일 조건하의 형질전환되지 않은 대조용 식물주에 대해 얻은 값과 비교하였다. 4개의 상이한 식물주는 열 및/또는 가뭄 조건을 견디는 이들의 능력에 의해 드러나듯이 상이한 정도의 스트레스 내성을 나타내었다. 높은 광 스트레스 하의 NAD 및 ATP 함량에 대해 얻은 값을 낮은 광 조건하의 NAD 및 ATP 함량에 대한 값의 %로서 표시하고 도 2에 플롯팅하였다.

[0105]

이 결과는 높은 광 스트레스는 대조용 식물 세포 및 최소한 스트레스 내성 트랜스제닉 식물주에서 현저한 NAD 감소를 초래한다. 트랜스제닉 식물주의 스트레스 내성이 높을수록, 높은 광 스트레스 조건하에서 NAD 감소는 덜 현저하다.

[0106]

다른 실험으로서, WO 00/04173 호에 기재된 바와 같은 PARP 유전자 발현을 감소시키는 키메라 유전자를 포함하는 트랜스제닉 옥수수 주와 형질전환되지 않은 옥수수 주 사이의 교배로부터 생긴 분리된 집단의 NAD⁺ 및 ATP 함량을 영양(질소) 결핍 조건하에서 측정하였고, 동일 조건하에서 형질전환되지 않은 대조 식물주에 대해 얻은 값과 비교하였다. 도 3은 수득한 결과를 그래프로 표시한 것이다. 반접합체 및 쌍을 이루지 않는 식물주는 선별 마커 유전자의 존재를 확인하는 것에 의해 구별되었다. NAD 및 ATP 함량은 형질전환되지 않은 대조용 식물 또는 비접합체 식물에서보다 반접합체성, 스트레스 내성 식물에서 훨씬 더 높았다.

[0107]

실시예 2. ParG 유전자 발현을 감소시키는 키메라 유전자의 제조

[0108]

아라비도시스(*Arabidopsis*) 및 관련 식물에서 PARP 유전자의 발현을 감소시키기 위하여, 이중 가닥 RNA를 형성할 수 있는 센스 및 안티센스 영역을 모두 포함하는 dsRNA를 발현할 수 있는 키메라 유전자를 제조하였다. 이러한 dsRNA는 전사후 유전자침묵에 의해 서열 상동성을 공유하는 유전자의 발현을 감소시키는데 아주 효과적이다. 키메라 유전자는 다음 DNA 단편을 포함한다:

[0109]

● 꽃양배추 모자이크 바이러스로부터 얻은 프로모터 영역(CaMV 35S);

[0110]

● 아가장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 얻은 ParG 유전자로부터의 163bp를 정방향으로 포함하는 DNA 단편 (Genbank Accession number AF394690, 뉴클레오타이드 위치 973-1135);

[0111]

● 플라베리아(*Flaveria*)로부터 얻은 pdk 유전자로부터의 인트론 2를 암호화하는 DNA 단편;

[0112]

● 아가장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 얻은 ParG 유전자로부터의 163bp를 역방향으로 포함하는 DNA 단편 (Genbank Accession number AF394690, 뉴클레오타이드 위치 973-1135);

[0113]

● 아그로박테륨 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense*)로부터 얻은 옥토핀 합성효소로부터의 3' 미번역 말단의 단편.

[0114]

키메라 유전자를, 제조제 포스포노트리신에 대한 내성을 제공하는 선별가능한 마커 유전자와 함께 T-DNA로부터 좌우 경계 서열 사이의 T-DNA 벡터에 도입하였다.

- [0115] 감자 및 관련 식물에서 PARG 유전자의 발현을 감소시키기 위하여, 아라비돕시스(*Arabidopsis*) PARG 단백질의 N-말단 부분과 높은 서열 동일성을 갖는 단백질을 암호화할 수 있는 감자로부터 cDNA 서열의 센스 및 안티센스 영역 모두를 포함하는 dsRNA를 발현할 수 있는 키메라 유전자를 제조하였다. 키메라 유전자는 하기 DNA 단편을 포함한다:
- [0116] ● 꽃양배추 모자이크 바이러스로부터 얻은 프로모터 영역(CaMV 35S);
- [0117] ● 솔라눔 튜베로숨(*Solanum tuberosum*)으로부터 얻은 ParG 상동체로부터의 적어도 100bp의 서열을 정방향으로 포함하는 DNA 단편(Genbank Accession number BE340510);
- [0118] ● 플라베리아(*Flaveria*)로부터 얻은 pdk 유전자로부터의 인트론 2를 암호화하는 DNA 단편;
- [0119] ● 솔라눔 튜베로숨(*Solanum tuberosum*)으로부터 얻은 ParG 상동체로부터의 적어도 100bp의 서열을 역방향으로 포함하는 DNA 단편(Genbank Accession number BE340510);
- [0120] ● 아그로박테룸 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense*)로부터 얻은 옥토펜 합성효소로부터의 3' 미번역 말단의 단편.
- [0121] 키메라 유전자를, 제조제 포스포노트리신에 대한 내성을 제공하는 선별가능한 마커 유전자와 함께 T-DNA로부터 좌우 경계 서열 사이의 T-DNA 벡터에 도입하였다.
- [0122] **실시예 3. ParG 유전자 발현을 감소시키는 키메라 유전자를 포함하는 트랜스제닉 식물주의 분석.**
- [0123] 실시예 2의 키메라 유전자를 아그로박테룸 매개 형질전환에 의해 각각 아라비돕시스(*Arabidopsis*) 또는 감자에 도입하였다.
- [0124] 수득한 트랜스제닉 식물주 집단을 대조 식물과 함께 이하의 스트레스 조건으로 처리하였다:
- [0125] ● 일정 일수 동안(온실) 또는 일정 시간(시험관내) 동안 증가된 열
- [0126] ● 일정 일수 동안 가뭄
- [0127] ● 일정 일수 동안 높은 광 조건
- [0128] ● 영양 결핍.
- [0129] 상술한 스트레스 조건을 잘 견디어 생존한 개별 식물주를 선별하였다.
- [0130] 상술한 식물의 NAD 함량 및 ATP 함량을 대조 및 스트레스 조건하에서 측정하였다.
- [0131] **실시예 4. 식물 세포에서 NAD, ATP 및 슈퍼옥시드 라디칼의 정량 측정.**
- [0132] 식물 조직에서 ATP의 정량은, 기본적으로 문헌[Rawlyer et al.(1999), Plant Physiol. 120, 293-300]에 기재된 바와 같이 실시되었다. A2S3 배지 상에서 4-5일간 배양되거나 또는 시험관내 배양된 아라비돕시스(*Arabidopsis*) 식물에서 2주간 배양된 배측 외식편의 ATP 함량의 측정에 어세이를 이용하였다. 모든 조작은 특별히 언급하지 않는 한 파쇄된 얼음상에서 실시하였다.
- [0133] ATP 추출
- [0134] - 액체 질소를 사용하여 식물 물질을 동결시킨다.
- [0135] ● 100 배측 외식편
- [0136] ● ±700mg 아라비돕시스 식물(뿌리+싹)(18일 된 C24 식물 약 32-37)
- [0137] - 냉동된 배측을 모르타르에 넣고 6% 과염소산을 부가한다.
- [0138] - 실온에서 막자를 사용하여 추출을 실시할 수 있다. 추출 후, 샘플을 가능한 빨리 얼음에 둔다.
- [0139] - 4°C에서 24,000g(Sorvall, SS34 로터, 14,000rpm에서)으로 10분간 원심분리한다.
- [0140] - 5M K₂CO₃를 사용하여 상청액을 중화시킨다(350μl의 5M K₂CO₃를 3ml의 상청액에 부가).
- [0141] - 상기 기재된 바와 같이 방사에 의해 KClO₄를 제거한다.

- [0142] ATP의 정량적 생물발광 측정:
- [0143] - 시그마사가 제조한 ATP 생물발광 어세이 키트를 사용한다(FL-AA).
- [0144] - 추출물을 6000x로 희석(약 6mL 추출물로부터 100 μ L를 취하고, 이것을 1000배 희석함). ATP 생물발광 어세이 키트의 'ATP 어세이 혼합 희석 완충액'(FL-AAB)을 이용하여 희석을 실시하였다.
- [0145] - 터너 디자인(미국 서니베일 소재)의 TD-20/20 루미노미터를 이용하여 생성된 광량을 측정한다.
- [0146] - 표준 곡선: 키트(FL-AAS)의 ATP 표준을 10mL의 물(2×10^{-6} 몰)에 용해시킨다.
- [0147] 식물 조직중의 NAD⁺ 및 NADH의 정량은 하기 식물 물질을 사용하여 카프(Karp) 등(1983) 또는 필리포빅(Filipovic) 등(1999)에 의해 기재된 바와 같이 실시하였다:
- [0148] 브라씨카 나푸스(*Brassica napus*): 5일 배양된 배추 외식편/샘플 150개
- [0149] 아라비도시스(*Arabidopsis*): 시험관내에서 성장한 18일된 식물 1000mg(짹 + 뿌리)/샘플(± 60 C24 식물에 상응).
- [0150] 어세이 용액
- [0151] (A) NADH의 측정용: 25 mM 인산칼륨 완충액 pH 7
- [0152] 0.1mM DTT
- [0153] 3 μ M FMN(플루카 제조, 83810)
- [0154] 30 μ M n-도데칸알(시그마 제조, D-7384)
- [0155] (B) NAD⁺ + NADH 측정용:
- [0156] NADH 만을 측정하기 위함
- [0157] + 2 μ g/mL 알코올 탈수소효소(로슈 제조, 102 717)
- [0158] 추출
- [0159] - 액체 질소를 사용하여 냉동한다.
- [0160] - 냉동된 식물 물질을 냉각된 모르타르(-20 $^{\circ}$ C에서 냉각)에 넣고 5mL 추출 완충액을 부가한다.
- [0161] - 막자를 사용하여 물질을 분쇄한다.
- [0162] - 4 $^{\circ}$ C에서 24000g(소르발, SS34 로터, 14000rpm)으로 15분간 원심분리한다.
- [0163] - 분석을 위해 1mL의 상청액을 취한다.
- [0164] 어세이
- [0165] NADH
- [0166] -390 μ L의 어세이 용액 A
- [0167] - + 10 μ L 추출물
- [0168] - +2 μ L NAD(P)H:FMN 산화환원효소
- [0169] - +100 μ L 루시페라제 용액
- [0170] NAD⁺ + NADH
- [0171] - 390 μ L의 어세이 용액 B
- [0172] - + 10 μ L 추출물
- [0173] - 실온에서 2분간
- [0174] - +2 μ L NAD(P)H:FMN 산화환원효소

- [0175] - +100 μ L 루시페라제 용액
- [0176] 생성된 광량은 터너 디자인(미국 썬베일 소재)의 TD-20/20 루미노미터를 이용하여 측정한다.
- [0177] NADH-표준
- [0178] NADH 저장용액: 1 mM (7.1 mg/10mL H₂O)
- [0179] NADH: 이나트륨 염, 로슈 제조, 107 735
- [0180] 10mM 인산칼륨 완충액 pH7을 사용한 일련의 희석: (10^{-2}); 5×10^{-3} ; 2×10^{-3} ; 10^{-3} ; 5×10^{-4} .
- [0181] 390 μ L의 어세이 용액 A에 10 μ L의 희석물을 부가하여 반응을 실시한다.
- [0182] 표준 곡선 만들.
- [0183] 문헌[De Block 및 De Brouwer (2002) Plant Physiol. Biochem. 40, 845-852]에 기재된 바와 같이 XTT의 환원량을 검출하는 것에 의해 슈퍼옥시드 라디칼 생산을 측정하였다.
- [0184] 브라씨카 나푸스(*Brassica napus*)
- [0185] 배지 및 반응 완충액
- [0186] 과종 배지(배지 201):
- [0187] 1/2 농축된 무라시게 및 스크그 염
- [0188] 2% 수크로오스
- [0189] pH 5.8
- [0190] 0.6% 한천 완충액 (Difco Bacto Agar)
- [0191] 250mg/l 트리아실린
- [0192] 캘러스 유도 배지 A2S3:
- [0193] MS 배지, 0.5g/l Mes(pH 5.8), 3% 수크로오스, 40mg/l 아데닌-SO₄,
- [0194] 0.5% 아가로오스, 1mg/l 2,4-D, 0.25mg/l NAA, 1mg/l BAP, 250 mg/l
- [0195] 트리아실린
- [0196] 배양 배지:
- [0197] 25mM K-포스페이트 완충액 pH 5.8
- [0198] 2% 수크로오스
- [0199] 25ml 배지에 대해 1방울의 Tween20
- [0200] 반응 완충액:
- [0201] 50mM K-포스페이트 완충액 pH 7.4
- [0202] 1mM 나트륨, 3'-{1-[페닐아미노-카본일]-3,4-테트라아졸륨}-비스(4-메톡시-6-나이트로) = XTT(bts, 독일, cat n° 2525)
- [0203] 25 ml 완충액에 대해 1방울의 Tween20
- [0204] 종자의 멸균 - 종자의 발아전 처리 - 묘목의 성장. 종자를 70% 에탄올에 2분간 침지시킨 다음 0.1% Tween20을 함유하는 차아염소산나트륨 용액(약 6% 활성 염소 함유)에서 15분간 표면멸균시킨다. 마지막으로, 종자를 1리터의 멸균 수돗물로 헹군다. 멸균 수돗물에서 종자를 1시간 이상동안 배양한다(발아를 억제할 수 있는 성분이 종자로부터 확산되도록). 종자를 50ml의 멸균 수돗물(+250mg/l 트리아실린)을 함유하는 250ml 엘렌마이어 플라스크에 둔다. 약 20시간 동안 진탕시킨다. 어린 뿌리가 돌출한 종자를 약 125ml의 과종 배지를 함유하는, Duchefa로부터 구입한 시험관 벤트 용기에 두었다(10개 종자/용기, 오염에 의한 종자의 손실을 감소시키기 위해 너무

많지 않도록). 이들 종자를 $\pm 24^{\circ}\text{C}$ 및 10-30:아인슈타인/ $\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}$ 에서 16시간의 일조시간으로 발아시킨다.

- [0205] 배축 외식편의 예비배양 및 스트레스 유도
- [0206] - 과중한지 12-14일 후 배축을 약 7-10 mm 절편으로 절단한다.
- [0207] - 배축 외식편(25개 배축/옵틸룩스 페트리디시, Falcon S1005, 덴마크)을 배지 A2S3상 25°C 에서 5일간 배양한다 (10-30/아인슈타인/ $\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}$).
- [0208] XTT-어세이
- [0209] - 150개의 배축 외식편을 50ml Falcon관으로 옮긴다.
- [0210] - 반응 완충액으로 세척한다(XTT 갖지 않음).
- [0211] - 20mL 반응 완충액 + XTT 부가.
- [0212] (외식편은 가라앉지만 진공 침윤되지 않는다)
- [0213] - 26°C 의 암소에서 약 3시간 동안 배양한다.
- [0214] - 470 nm에서 반응 배지의 흡수를 측정.
- [0215] 아기장대(*Arabidopsis thaliana*)
- [0216] 배지 및 반응완충액
- [0217] 식물 배지:
- [0218] 1/2 농축된 무라시게 및 스퀴그 염
- [0219] B5 비타민
- [0220] 1.5% 수크로오스
- [0221] pH 5.8
- [0222] 0.7% Difco 한천
- [0223] 배양 배지:
- [0224] 10mM K-포스페이트 완충액 pH 5.8
- [0225] 2% 수크로오스
- [0226] 25ml 배지에 대해 1방울의 Tween20
- [0227] 반응 완충액:
- [0228] 50mM K-포스페이트 완충액 pH 7.4
- [0229] 1mM 나트륨, 3'-(1-[페닐아미노-카본일]-3,4-테트라아졸륨)-비스(4-메톡시-6-나이트로) = XTT(bts, 독일, cat n° 2525)
- [0230] 25ml 완충액에 대해 1방울의 Tween20
- [0231] 아라비돕시스(*Arabidopsis*) 식물
- [0232] - 아라비돕시스 식물주: 시험하기 위한 대조용 식물주
- [0233] - 아라비돕시스 종자의 멸균:
- [0234] 2분. 70% 에탄올
- [0235] 10분. 탈색(6% 활성 염소) + 20ml 용액에 대해 1방울의 Tween20
- [0236] 멸균 수돗물로 5회 세척
- [0237] - 종자의 발아전 처리:

- [0238] 12 ml 멸균 수돗물을 함유하는 9cm 옵틸록스 페트리디시(Falcon 제조)에서 실시.
- [0239] 밤새 내지 24시간 동안 낮은 광
- [0240] - 아라비돕시스 식물의 생장
- [0241] ±125ml의 식물 배지를 함유하는 팔콘이 제조한 인테그리드 조직 배양 디스크(nr. 3025)에 종자를 파종한다: 1 종자/그리드.
- [0242] 식물을 24°C, 30 μ 아인슈타인 s⁻¹ m⁻², 16 시간 주간 - 8시간 야간의 조건에서 약 3주간 생장시킨다(추대 형성 전).
- [0243] XTT-어세이
- [0244] 대조 조건(스트레스 없음)
- [0245] - 한천 플레이트로부터 싹(뿌리 포함)을 수거하고, 이것을 반응 완충액(XTT 포함하지 않음)을 함유하는 50ml Falcon 관에 직접 넣었다.
- [0246] 스트레스받은 싹
- [0247] - 싹을, 반응 완충액(XTT포함하지 않음)을 함유하는 50ml Falcon 관으로 전달한다.
- [0248] - 반응 완충액을 XTT를 함유하는 완충액(40 mL/관)으로 교체한다.
- [0249] - 싹은 가라앉아야 하지만, 진공 침투되지 않는다.
- [0250] - 26°C 암소에서 약 3시간 동안 배양한다.
- [0251] - 470 nm에서 반응 배지의 흡수를 측정한다.
- [0252] 클라크 폴라로그래프 전극을 이용하여 산소 소비를 측정하는 것에 의한 호흡량 측정은 다음과 같은 방식으로 실시하였다:
- [0253] 식물 물질
- [0254] 브라씨카 나푸스(*Brassica napus*)
- [0255] 150-200* 배측 외식편
- [0256] 25°C에서 5일간 배양 (참조 프로토콜 활력 어세이)
- [0257] * 150개 외식편 에러 < 10%; 200개 외식편 에러 < 6%
- [0258] 아라비돕시스
- [0259] 시험관내 식물(싹 + 뿌리)에서 C24±1000mg* (18일된 식물 약 50개에 상응)
- [0260] 파종하기 전에 발아전 처리된 종자
- [0261] 24°C에서 18일간 생장
- [0262] (시험관내 생장 아라비돕시스에서 프로토콜 참조).
- [0263] * 에러 < 8%
- [0264] 배양 배지
- [0265] 브라씨카 나푸스(*Brassica napus*)
- [0266] 25mM K-포스페이트 완충액 pH 5.8
- [0267] 2% 수크로오스
- [0268] Tween20(1방울/25ml)
- [0269] 아라비돕시스

- [0270] 10mM K-포스페이트 완충액 pH 5.8
- [0271] 2% 수크로오스
- [0272] Tween20(1방울/25ml)
- [0273] 사용하기 전에, 적어도 수시간 동안 잘 교반함으로써 배지에 공기를 쫓아 준다(산소로 포화).
- [0274] 어세이
- [0275] - 배양 배지로 충전된 100ml 유리 병(Schott, 독일)에 외식편을 넣는다. 각 병에는 동일 중량의 싹을 넣는다($\pm 700\text{mg}$).
- [0276] - 병에 가득 채워 넘치게 하고 긴밀하게 폐쇄한다(대량의 공기 기포 피함).
- [0277] - 외식편을 함유하지 않는 배양 배지(blanco)를 병에 채운다.
- [0278] - 24°C에서 낮은 광으로 3-4시간(브라씨카 나푸스), 3시간(아라비돕시스)동안 배양한다.
- [0279] - 배양하는 동안 서서히 진탕시킨다(외식편 주변의 배지의 산소 결핍을 피하기 위해).
- [0280] - 손으로 쥐는 용존산소 미터(Cyberscan DO 310; Eutech Instruments, 싱가포르)를 이용하여 배양 배지의 산소 함량(mg/l)을 측정한다.
- [0281] - mg/l 소모 산소 = [산소] blanco - [산소]샘플
- [0282] **실시예 5. ParG 유전자 발현을 감소시키는 키메라 유전자를 포함하는 트랜스제닉 식물주의 분석**
- [0283] 실시예 2의 키메라 유전자를 아그로박테륨 매개 형질전환에 의해 아라비돕시스(*Arabidopsis*)와 담배(*Nicotiana tabacum*) 품종 Petit Havana SR1에 도입하였다.
- [0284] 트랜스제닉 종자를 MS염/2; B5 비타민; 1.5% 수크로오스; pH 5.8 및 0.7% Difco 한천을 함유하는 배지상에서 발아시켰다. 발아된 종자를 14 내지 18일간 약 $30 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ 의 낮은 광(광합성 양자 플럭스) 처리시킨 후, 광세기를 약 6배 증가시켰다(광합성 양자 플럭스 약 $190 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$). 1일 후, 효소적 사이클링 방법[Karp et al. (1983) Anal. Biochem. 128, pp175-180]을 이용하여 NAD 및 NADH 함량을 측정하였다. 묘목의 일부를 높은 광 조건하에서 약 3일 내지 며칠 배양시킨 후 손상을 평가하였다. 손상은 어린 잎과 싹의 선단이 어두워지고, 오래된 잎이 탈색되며 성장이 둔화되는 것으로부터 눈으로 확인할 수 있다. 아라비돕시스에 대한 결과를 표 1에 요약하고 담배에 대한 결과는 표 2에 요약한다.

표 1

아라비돕시스(컬럼비아)의 분석. ±R은 어두운 착색이 일부 관찰된 것을 나타낸다.

ND: 측정되지 않음.

	높은 광 내성	1g 조직내의 NAD+NADH 함량($10^{-3} \mu\text{M}$)	대조용과 비교한 TTC-감소능(%)
비-트랜스제닉 대조용	S	17.3	100
트랜스제닉 주 9	R	28.2	ND
트랜스제닉 주 10	R	31.7	ND
트랜스제닉 주 11	±R	26.5	ND
트랜스제닉 주 12	S	19.4	ND
트랜스제닉 주 26	R	33.2	55
트랜스제닉 주 27	S	21.3	100
트랜스제닉 주 28	±R	26.5	75
트랜스제닉 주 29	S	17.7	102
트랜스제닉 주 30	R	28.3	66

[0285]

표 2

담배(*Nicotiana tabacum*) 품종 Petit Havana SR1의 분석. ±R은 어두운 착색이 일부 관찰된 것을 나타낸다. R/S는 내성 표현형이 아주 분명하지는 않음을 나타낸다.

	높은 광 내성	대조용과 비교한 TTC-감소능(%)
비-트랜스제닉 대조용	S	100
트랜스제닉 주 1	R/S	88
트랜스제닉 주 2	±R	79
트랜스제닉 주 3	R	53

[0286]

트랜스제닉 식물에서 높은 광 스트레스에 대한 내성과 세포의 NAD+NADH 함량 사이에는 긍정적인 상관관계가 있다. TTC 감소능과 높은 광 내성 사이에는 반대되는 상관관계가 관찰될 수 있다.

[0287]

실시예 6. 곡류 식물에 사용하기에 적합한 ParG 유전자 발현 감소성 키메라 유전자의 제조.

[0288]

곡류, 예를 들면 벼 또는 옥수수 및 관련 식물에서 PARG 유전자의 발현을 감소시키기 위하여, PARG 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 높은 서열 동일성을 갖는 단백질을 암호화할 수 있는, 벼로부터 얻은 뉴클레오타이드 서열의 센스 및 안티센스 영역을 둘 모두 포함하는 dsRNA를 발현할 수 있는 키메라 유전자를 제조한다. 이러한 키메라 유전자는 다음 DNA 단편을 포함한다:

[0289]

● 꽃양배추 모자이크 바이러스로부터 얻은 프로모터 영역(CaMV 35S);

[0290]

● 벼(*Oryza sativa*)로부터 얻은 ParG 상동체로부터의 적어도 100bp의 서열을 정방향으로 포함하는 DNA 단편(서열번호 15);

[0291]

● 플라베리아(*Flaveria*)로부터 얻은 pdk 유전자로부터의 인트론 2를 암호화하는 DNA 단편;

[0292]

● 벼(*Oryza sativa*)로부터 얻은 ParG 상동체로부터의 적어도 100bp의 서열을 역방향으로 포함하는 DNA 단편(서열번호 15);

[0293]

● 아그로박테륨 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense*)로부터 얻은 옥토펜 합성효소로부터의 3' 미번역 말

[0294]

단의 단편.

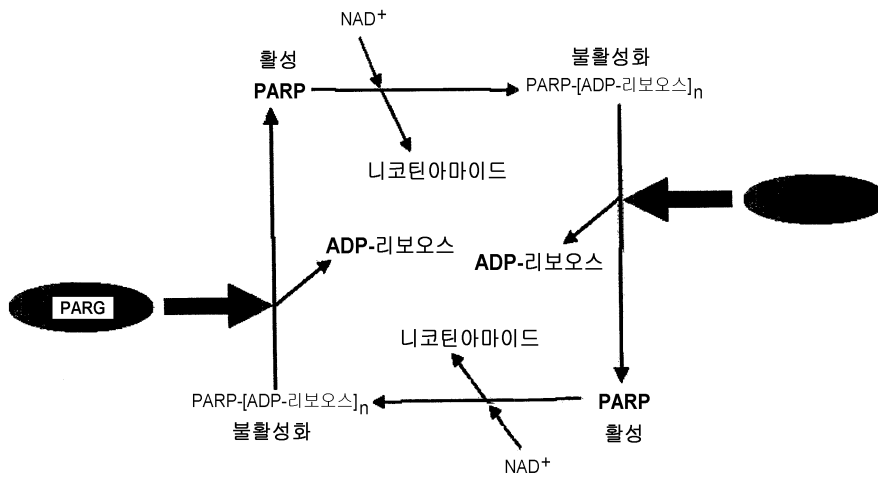
- [0295] 키메라 유전자를, 예컨대 제초제 포스포노트리신에 대한 내성을 제공하는 선별가능한 마커 유전자와 함께 T-DNA로부터 좌우 경계 서열 사이의 T-DNA 벡터에 도입하였다.
- [0296] 벼 또는 옥수수 및 관련 식물과 같은 곡류에서 PARG 유전자의 발현을 감소시키기 위하여, PARG 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 높은 서열 동일성을 갖는 단백질을 암호화할 수 있는, 벼로부터 얻은 뉴클레오타이드 서열의 센스 및 안티센스 영역을 둘 모두 포함하는 dsRNA를 발현할 수 있는 키메라 유전자를 작성한다. 이러한 키메라 유전자는 다음 DNA 단편을 포함한다:
- [0297] ● 꽃양배추 모자이크 바이러스로부터 얻은 프로모터 영역(CaMV 35S);
- [0298] ● 옥수수(*Zae mays*)로부터 얻은 ParG 상동체로부터의 적어도 100bp의 서열을 정방향으로 포함하는 DNA 단편(서열번호 23);
- [0299] ● 플라베리아(*Flaveria*)로부터 얻은 pdk 유전자로부터의 인트론 2를 암호화하는 DNA 단편;
- [0300] ● 옥수수(*Zae mays*)로부터 얻은 ParG 상동체로부터의 적어도 100bp의 서열을 역방향으로 포함하는 DNA 단편(서열번호 23);
- [0301] ● 아그로박테륨 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense*)로부터 얻은 옥토펜 합성효소로부터의 3' 미번역 말단의 단편.
- [0302] 키메라 유전자를, 예컨대 제초제 포스포노트리신에 대한 내성을 제공하는 선별가능한 마커 유전자와 함께 T-DNA로부터 좌우 경계 서열 사이의 T-DNA 벡터에 도입하였다. 앞 단락에서 기재한 바와 같은 2개의 상이한 키메라 유전자를 포함하는 2개 예의 T-DNA 벡터의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 24 및 25에 예시되어 있다.
- [0303] **실시예 7. ParG 유전자 발현을 감소시키는 키메라 유전자를 포함하는 트랜스제닉 식물주의 분석.**
- [0304] 실시예 6의 키메라 유전자를 아그로박테륨 매개 형질전환에 의해 벼 또는 옥수수에 각각 도입한다.
- [0305] 얻은 트랜스제닉 주 집단은 대조용 식물과 함께 하기 스트레스 조건으로 처리시켰다:
- [0306] ● 일정 일수 동안(온실) 또는 일정 시간(시험관내) 동안 증가된 열
- [0307] ● 일정 일수 동안 가뭄
- [0308] ● 일정 일수 동안 강한 광 조건
- [0309] ● 영양 결핍.
- [0310] 상술한 스트레스 조건 또는 적어도 그 하나를 잘 견디어 생존한 개별 식물주를 선별하였다.
- [0311] 상술한 식물에 대한 NAD 함량 및 ATP 함량은 대조 및 스트레스 조건하에서 측정하였다.

도면의 간단한 설명

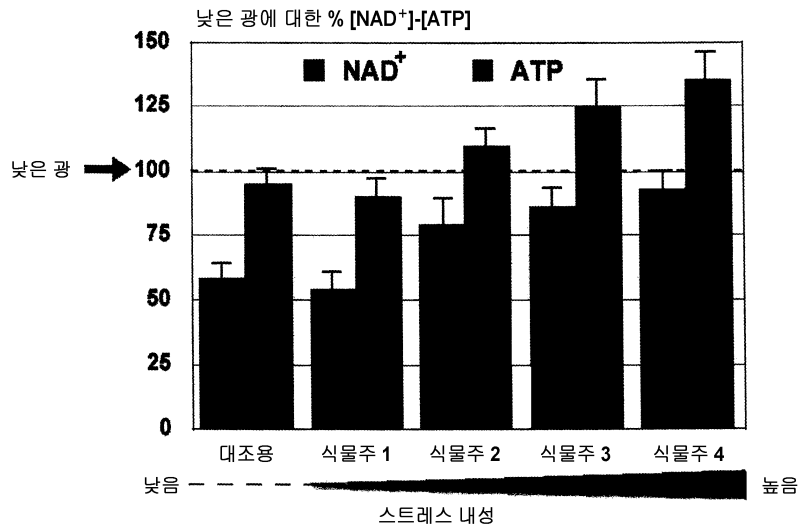
- [0019] 도 1은 진핵생물 세포에서 PARP/PARG의 작용에 의한 폴리-ADP 리보스 중합반응/해중합 반응 주기의 개략도이다.
- [0020] 도 2는 강한 광 스트레스 하에서 아라비도시스(*Arabidopsis*)주의 NAD⁺ 및 ATP 함량의 다이어그램이다. 짙은 색 막대표시는, 낮은 광 조건하에서 측정된 NAD 함량에 대한 %값으로 표시된, 강한 광 조건하에서 측정된 NAD 함량을 도시한다. 옅은 색 막대표시는, 낮은 광 조건하에서 측정된 ATP 함량에 대한 %값으로 표시된, 강한 광 조건하에서 측정된 ATP 함량을 도시한다.
- [0021] 도 3은 질소 결핍 스트레스 하의 옥수수 주의 NAD⁺ 및 ATP 함량의 다이어그램이다. 짙은 색 막대표시는 NAD 함량을 나타내는 반면에, 옅은 색 막대표시는 ATP 함량을 나타낸다.

도면

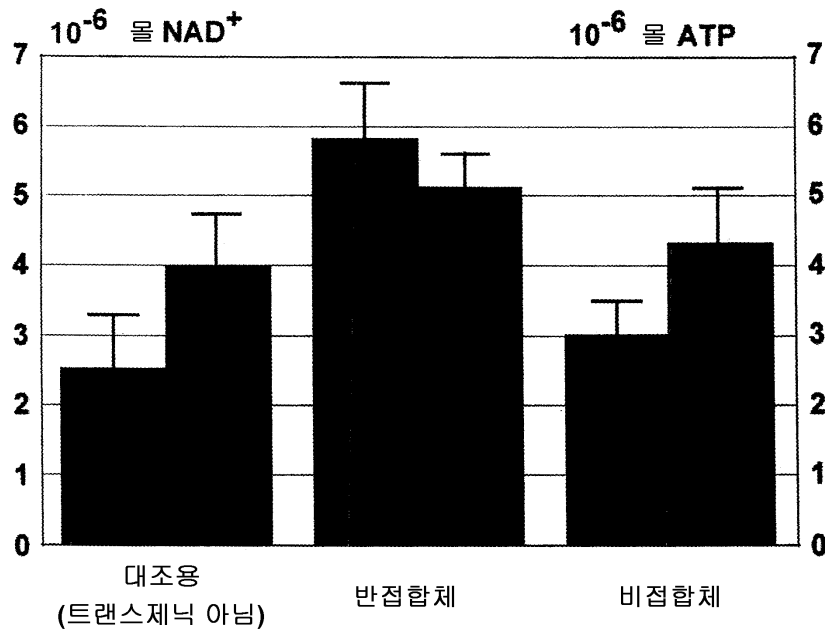
도면1



도면2



도면3



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer BioScience N.V.
De Block, Marc

<120> Methods and means for increasing the tolerance of plants to stress conditions.

<130> BCS 03 2002 W01

<150> EP03076044.1

<151> 2003-04-09

<150> US 60/496,688

<151> 2003-08-21

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 548

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Glu Asn Arg Glu Asp Leu Asn Ser Ile Leu Pro Tyr Leu Pro Leu
 1 5 10 15

Val Ile Arg Ser Ser Ser Leu Tyr Trp Pro Pro Arg Val Val Glu Ala
 20 25 30

Leu Lys Ala Met Ser Glu Gly Pro Ser His Ser Gln Val Asp Ser Gly
 35 40 45

Glu Val Leu Arg Gln Ala Ile Phe Asp Met Arg Arg Ser Leu Ser Phe
 50 55 60

Ser Thr Leu Glu Pro Ser Ala Ser Asn Gly Tyr Ala Phe Leu Phe Asp
 65 70 75 80

Glu Leu Ile Asp Glu Lys Glu Ser Lys Arg Trp Phe Asp Glu Ile Ile
 85 90 95

Pro Ala Leu Ala Ser Leu Leu Leu Gln Phe Pro Ser Leu Leu Glu Val
 100 105 110

His Phe Gln Asn Ala Asp Asn Ile Val Ser Gly Ile Lys Thr Gly Leu
 115 120 125

Arg Leu Leu Asn Ser Gln Gln Ala Gly Ile Val Phe Leu Ser Gln Glu
 130 135 140

Leu Ile Gly Ala Leu Leu Ala Cys Ser Phe Phe Cys Leu Phe Pro Asp
 145 150 155 160

Asp Asn Arg Gly Ala Lys His Leu Pro Val Ile Asn Phe Asp His Leu
 165 170 175

Phe Ala Ser Leu Tyr Ile Ser Tyr Ser Gln Ser Gln Glu Ser Lys Ile
 180 185 190

Arg Cys Ile Met His Tyr Phe Glu Arg Phe Cys Ser Cys Val Pro Ile
 195 200 205

Gly Ile Val Ser Phe Glu Arg Lys Ile Thr Ala Ala Pro Asp Ala Asp
 210 215 220

Phe Trp Ser Lys Ser Asp Val Ser Leu Cys Ala Phe Lys Val His Ser
 225 230 235 240

Phe Gly Leu Ile Glu Asp Gln Pro Asp Asn Ala Leu Glu Val Asp Phe
 245 250 255

Ala Asn Lys Tyr Leu Gly Gly Gly Ser Leu Ser Arg Gly Cys Val Gln
 260 265 270

Glu Glu Ile Arg Phe Met Ile Asn Pro Glu Leu Ile Ala Gly Met Leu
 275 280 285

Phe Leu Pro Arg Met Asp Asp Asn Glu Ala Ile Glu Ile Val Gly Ala
 290 295 300

Glu Arg Phe Ser Cys Tyr Thr Gly Tyr Ala Ser Ser Phe Arg Phe Ala
 305 310 315 320

Gly Glu Tyr Ile Asp Lys Lys Ala Met Asp Pro Phe Lys Arg Arg Arg
 325 330 335

Thr Arg Ile Val Ala Ile Asp Ala Leu Cys Thr Pro Lys Met Arg His
 340 345 350

Phe Lys Asp Ile Cys Leu Leu Arg Glu Ile Asn Lys Ala Leu Cys Gly
 355 360 365

Phe Leu Asn Cys Ser Lys Ala Trp Glu His Gln Asn Ile Phe Met Asp
 370 375 380

Glu Gly Asp Asn Glu Ile Gln Leu Val Arg Asn Gly Arg Asp Ser Gly
 385 390 395 400

Leu Leu Arg Thr Glu Thr Thr Ala Ser His Arg Thr Pro Leu Asn Asp
 405 410 415

Val Glu Met Asn Arg Glu Lys Pro Ala Asn Asn Leu Ile Arg Asp Phe
 420 425 430

Tyr Val Glu Gly Val Asp Asn Glu Asp His Glu Asp Asp Gly Val Ala
 435 440 445

Thr Gly Asn Trp Gly Cys Gly Val Phe Gly Gly Asp Pro Glu Leu Lys
 450 455 460

Ala Thr Ile Gln Trp Leu Ala Ala Ser Gln Thr Arg Arg Pro Phe Ile
 465 470 475 480

Ser Tyr Tyr Thr Phe Gly Val Glu Ala Leu Arg Asn Leu Asp Gln Val
 485 490 495

Thr Lys Trp Ile Leu Ser His Lys Trp Thr Val Gly Asp Leu Trp Asn
 500 505 510

Met Met Leu Glu Tyr Ser Ala Gln Arg Leu Tyr Lys Gln Thr Ser Val
 515 520 525

Gly Phe Phe Ser Trp Leu Leu Pro Ser Leu Ala Thr Thr Asn Lys Ala
 530 535 540

Ile Gln Pro Pro
 545

<210> 2
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Solanum tuberosum

<400> 2

Met Glu Asn Arg Glu Asp Val Lys Ser Ile Leu Pro Phe Leu Pro Val
 1 5 10 15

Cys Leu Arg Ser Ser Ser Leu Phe Trp Pro Pro Leu Val Val Glu Ala
 20 25 30

Leu Lys Ala Leu Ser Glu Gly Pro His Tyr Ser Asn Val Asn Ser Gly
 35 40 45

Gln Val Leu Phe Leu Ala Ile Ser Asp Ile Arg Asn Ser Leu Ser Leu
 50 55 60

Pro Asp Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ala Ser Asp Gly Phe Ser Leu Leu
 65 70 75 80

Phe Asp Asp Leu Ile Pro Arg Asp Glu Ala Val Lys Trp Phe Lys Glu
 85 90 95

Val Val Pro Lys Met Ala Asp Leu Leu Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu
 100 105 110

Glu Ala His Tyr Glu Lys Ala Asp Gly Gly Ile Val Lys Gly Val Asn
 115 120 125

Thr Gly Leu Arg Leu Leu Glu Ser Gln Gln Pro Gly Ile Val Phe Leu
 130 135 140

Ser Gln Glu Leu Val Gly Ala Leu Leu Ala Cys Ser Phe Phe Cys Tyr
 145 150 155 160

Ser Leu Pro Met Ile Glu Val Ser Val
165

<210> 3

<211> 1647

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

atggagaate gcgaagatct taactcaatt ctccgtacc ttccacttgt aattcgttgc 60

tcgtcgtgt attggcccgc gcgtgtggtg gaggcgttaa aggcaatgtc tgaaggacca 120

tctcacagcc aagtgactc aggagaggtt ctacggcaag ctattttcga tatgagacga 180

tccttatctt tcttactct cgagccatct gcttctaata gctacgcatt tctctttgac 240

gaattgattg atgagaaaaga atcaaaagaga tggttcgatg agattatccc agcattggcg 300

agcttacttc tacagtttcc atctctgtta gaagtgcatt tccaaaatgc tgataatatt 360

gttagtggaa tcaaaaccgg tcttcgtttg ttaaattccc aacaagctgg cattgttttc 420

ctcagccagg agttgattgg agctcttctt gcatgctctt tcttttgitt gtttccggat 480

gataatagag gtgcaaaaaca ccttccagtc atcaactttg atcatttggt tgcaagcctt 540

tatataagtt atagtcaaag tcaagaaagc aagataagat gtattatgca ttactttgaa 600

aggttttgct cctgcgtgcc tattggtatt gtttcatttg aacgcaagat taccgctgct 660

cctgatgctg atttctggag caagtctgac gtttctcttt gtgcatttaa ggttcactct 720

tttgggttaa ttgaagatca acctgacaat gctctcgaag tggactttgc aaacaagtat 780

ctcggagggtg gttccctaag tagagggtgc gtgcaggaag agatagcctt catgattaac 840

cctgaattaa tcgctggcat gcttttcttg cctcggatgg atgacaatga agctatagaa 900

atagttggtg cggaagatt ttcatgttac acagggtatg catcttcgtt tcggtttgct 960
 ggtgagtaca ttgacaaaaa ggcaatggat cctttcaaaa ggcaagaac cagaattggt 1020
 gcaattgatg cattatgtac accgaagatg agacacttta aagatatatg tcttttaagg 1080
 gaaattaata aggcaciatg tggcttttta aattgttagca aggcttggga gcaccagaat 1140
 atattcatgg atgaaggaga taatgaaat cagcttgcg gaaacggcag agattctggt 1200
 cttctgcgta cagaaactac tgcgtcacac cgaactccac taaatgatgt tgagatgaat 1260
 agagaaaagc ctgctaaca tcttatcaga gatttttatg tggaaggagt tgataacgag 1320
 gatcatgaag atgatggtgt cgcgacaggg aattggggat gtggtgtttt tggaggagac 1380
 ccagagctaa aggctacgat acaatggctt gctgcttccc agactcgaag accatttata 1440
 tcatattaca cctttggagt agaggcactc cgaaacctag atcaggtgac gaagtggatt 1500
 ctttccata aatggactgt tggagatctg tggaacatga tgttagaata ttctgetcaa 1560
 aggctctaca agcaaaccag tgttggcttc ttttcttggc tacttccatc tctagctacc 1620
 accaacaag ctatccagcc gccttga 1647

<210> 4
 <211> 598
 <212> DNA
 <213> Solanum tuberosum

<400> 4
 gcaatggaga atagagaaga cgtgaagtca atccttcct ttttgccggt gtgtctccga 60
 tcatcttctc ttttctggcc gccctagtt gttgaagcac tgaaagcct ctctgaagc 120
 cctcattaca gcaatgttaa ctccggccaa gtcctcttcc tcgcaatctc cgacattcgg 180

aattcccttt cactacctga ttcttcaatt tcctcttctg cttcagacgg attttctctc 240
 ttatttgatg atttaattcc tagggatgaa gctgttaaat ggttcaaaga agtggtgccg 300
 aaaatggcgg atttgctatt gcggttgcct tccttattgg aggctcacta tgagaaggct 360
 gatggtgga ttgttaaagg agtcaacact ggtcttcgct tattggaatc acaacagcct 420
 ggcattgttt tcctcagtca ggaattagtc ggtgctcttc ttgcatgttc cttcttttgc 480
 tattccctac caatgataga ggtatctgta tgatcagtat gacgagaaat ttgaaaataa 540
 attgaagtgc attcttcaat attttgagag gattggctca ttgatacctg cgggctac 598

<210> 5
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide primer ParGAt1

<400> 5
 ggatccctg caggacaaaa aggcaatgga tcctttc 37

<210> 6
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide primer ParGAt2

<400> 6
 gcacgaattc gcggccgcgg tgctccaag ccttgctac 39

<210> 7
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer ParGSt1

<400> 7

ggatccctg caggctcact atgagaagc tgatggtgg

39

<210> 8

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer ParGSt2

<400> 8

gcacgaattc gcggccgct catactgac atacagatac ctc

43

<210> 9

<211> 13466

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> nucleotide sequence of pTVE428

<220>

<221> misc_feature

<222> (198)..(222)

<223> Right T-DNA border

<220>

<221> misc_feature

<222> (983)..(273)

<223> 3' ocs (3' untranslated end of octopine synthase gene)

<220>

<221> misc_feature

<222> (995)..(1155)

<223> part of poly (ADP-ribose) glycohydrolase

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1929)..(1188)
 <223> intron 2 from the Pdk gene of Flaveria

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2122)..(1962)
 <223> part of poly (ADP-ribose) glycohydrolase

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3476)..(2131)
 <223> 35S promoter region from Cauliflower Mosaic Virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3948)..(3737)
 <223> 3' untranslated end of gene 7 from Agrobacterium tumefaciens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4521)..(3970)
 <223> bar coding region

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6247)..(4522)
 <223> PSSuAra promoter region

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6415)..(6439)
 <223> left border region of T-DNA of Agrobacterium tumefaciens

<400> 9
 agattcgaag ctcgggtcccg tgggtgttct gtcgtctcgt tgtacaacga aatccattcc 60

cattccgcgc tcaagatggc ttcccctcgg cagttcatca gggctaaatc aatctagccc 120

acttgtccgg tgaatgggc tgcactccaa cagaaacaat caaacaaca tacacagcga 180

cttattcaca cgcgacaaat tacaacggta tatatcctgc cagtactcgg cegtgcaccg 240

cggtagcccg gaattaagct tgcatgccig caggctctgc tgagcctcga catgttgcg 300

caaaattcgc cctggaccgg cccaacgatt tgcgtcact gtcaaggttt gacctgcact 360

tcatttgggg cccacataca ccaaaaaat gctgcataat tctcggggca gcaagtcggt 420

taccggccg ccgtgctgga ccgggttga tggtgcccg aactttcgg agagcggacg 480

gccaatctc aacttcaagg aatctcacc atgcgcgcc gcggggaacc ggagttcct 540

tcagtgaac ttattagtc gccgctcgt gtgtcgtaga tactagccc tgggccttt 600

tgaaattga ataagattta tgtaatcagt ctttaggtt tgaccggtt tcccgtttt 660

tttaaaattg gatttgaat aataaaacgc aattgttgt tattgtggcg ctctatcata 720

gatgtcgta taaacctatt cagcacaata tattgtttc attttaatat tgtacatata 780

agtagtaggg tacaatcagt aaattgaacg gagaatatta ttcataaaaa tacgatagta 840

acgggtgata tattcattag aatgaaccga aaccggcgg aaggatctga gctacacatg 900

ctcaggtttt ttacaactg cacaacagaa ttgaaagcaa atatcatgcg atcataggcg 960

tctcgcatat ctattaaag caggactcta gagacaaaa ggcaatggat ctttcaaaa 1020

ggcgaagaac cagaattgtt gcaattgat cattatgtac accgaagatg agacacttta 1080

aagatatatg tctttaagg gaaattaata aggcactatg tggcttttta aattgtagca 1140

aggcttggga gcaccatcga tttcgaacc agcttcccaa ctgtaatcaa tccaaatgta 1200

agatcaatga taacacaatg acatgatcta tcatgttacc ttgtttatc atgttcgact 1260

aattcattta attaatagtc aatccattta gaagttaata aaactacaag tattatttag 1320

aaattaataa gaatgttgat tgaaaataat actatataaa atgatagatc ttgcgctttg 1380
 ttatattagc attagattat gttttgttac attagattac tgtttctatt agtttgatat 1440
 tatttgttac ttiagcttgt tatttaatat ttgttttatt gataaattac aagcagattg 1500
 gaatttctaa caaatatfff attaacffff aactaaaat atttagtaat ggtatagata 1560
 ttaattata taataaacta ttaatcataa aaaaatatta ttttaattta tttattctta 1620
 ttttactat agtattttat cattgatatt taattcatca aaccagctag aattactatt 1680
 atgattaaaa caaatattaa tgctagtata tcatctfaca tgttcgatca aattcattaa 1740
 aaataatata cttactctca acttttatct tcttcgtctt acacatcact tgtcatatff 1800
 ttttacatta ctatgttgtt tatgfaaaca atatatffat aaattatfff ttcacaatta 1860
 taacaactat attattataa tcatactaaf taacatcact taactatfff atactaaaag 1920
 gaaaaaagaa aafaattatt tcctfaccaa gctgggttac cggfctccc aagccttget 1980
 acaatttaa aagccacata gtgccttatt aattccctt aaaagacata tatctttaa 2040
 gtgtctcacc ttcgggttac ataatgcac aattgcaaca attctggffc ttcgcctfff 2100
 gaaaggatcc attgcctfff tgcctcgag cgtgtcctct ccaaatgaaa tgaacttct 2160
 tatatagagg aagggtcttg cgaaggatag tgggattgtg cgtcatccct tacgtcagt 2220
 gagatgtcac atcaatccac ttgctttgaa gacgtggttg gaacgtcttc tttttccacg 2280
 atgctcctcg tgggtggggg tccatctttg ggaccactgt cggcagagag atcttgaatg 2340
 atagcctffc ctttatcgca atgatggcat ttgtaggagc caccttctt tttactgtc 2400
 ctttcgatga agtgacagat agctgggcaa tggaatccga ggaggtttcc cgaaattatc 2460

ctttgttga aagtctcaat agccctttgg tcttctgaga ctgtatcttt gacatttttg 2520

gagtagacca gagtgcctg cccaccaatg ttgacgaaga ttttcttctt gtcattgagt 2580

cgtaaaagac tcigtatgaa ctgttcgcca gtcttcacgg cgagtctgt tagatcctcg 2640

atttgaatct tagactccat gcatggcctt agattcagta ggaactacct ttttagagac 2700

tccaatctct attacttgcc ttggtttatg aagcaagcct tgaatcgtcc atactggaat 2760

agtacttctg atcttgagaa atatgtcttt cctgtgttc ttgatgcaat tagtcctgaa 2820

tcttttgact gcatctttaa ctttcttggg aaggtatttg atctcctgga gattgttact 2880

cgggtagatc gtcttgatga gacctgctgc gtaggcctct ctaaccatct gtgggtcagc 2940

attctttctg aaattgaaga ggctaacctt ctattatca gtggtgaaca tagtgcctc 3000

accttcacct tcgaactcc ttcttagatc gtaaagatag aggaaatcgt ccattgtaat 3060

ctccggggca aaggagatct cttttggggc tggatcactg ctgggccttt tggttcctag 3120

cgtagaccag tgggcttttt gctttgggtg gcttgttagg gccttagcaa agctcttggg 3180

cttgagtga gcttctcctt tgggatgaa gttcaacctg tctgtttgct gacttgtgt 3240

gtaccgctca gctgctgctc ttgcctctgt aatagtgga aatttcttgt gtgcaactcc 3300

gggaacgccg ttgttgccg cttttgtaca acccagtc tctatatac cggcatgtgg 3360

accgttatac acaacgtagt agttgatag aggtgttga atacccgatt ctgctctgag 3420

aggagcaact gtgctgttaa gctcagattt ttgtgggatt ggaattaatt cgtcgagcgg 3480

ccgctcgacg agcgcgccga tatecgatc gcccgggccg gccatttaa tgaattcgag 3540

ctcggtaacc aaacgcggcc gcaagctata acttcgtata gcatacatta tacgaagtta 3600

ttcgactcta gaggatccca attcccatgc atggagtcaa agattcaaat agaggacact 3660

tctcgaacte ggccgtcgaa ctccggcgtc gactacatgg tcgataagaa aaggcaattt 3720

gtagatgta aticccatct tgaaagaaat atagtttaaa tatttattga taaaataaca 3780

agtcaggat tatagtccaa gcaaaaacat aaatttattg atgcaagttt aaattcagaa 3840

atatttcaat aactgattat atcagctggt acattgccgt agatgaaaga ctgagtgcca 3900

tattatgtgt aatacataaa ttgatgatat agctagctta gctcatcggg ggatcctaga 3960

cgcgtgagat cagatctcgg tgacgggcag gaccggacgg ggcggtaccg gcaggctgaa 4020

gtccagctgc cagaaacca cgatcatcca gttcccgtgc ttgaagccgg ccgcccgcag 4080

catgcccggg ggggcatatc cgagcgcctc gtgcatgcgc acgctcgggt cgttgggcag 4140

cccgatgaca gcgaccacgc tcttgaagcc ctgtgcctcc agggacttca gcaggtaggt 4200

gtagagcgtg gagcccagtc ccgtccgctg gtggcggggg gagacgtaca cggtcgactc 4260

ggccgtccag tcgtaggcgt tgcgtgcctt ccaggggccc gcgtaggcga tgccggcgac 4320

ctcgcctcc acctcggcga cgagccaggg atagcgtcc cgacagcga cgaggctcgc 4380

ctccactcc tgcggttctt gcggtcgggt acggaagttg accgtgcttg tctcgaatga 4440

gtggttgacg atggtgcaga ccgccggcat gtccgcctcg gtggcacggc ggatgtcggc 4500

gggcgtcgt tctgggtcca ttgttcttct ttactctttg tgtgactgag gtttggctca 4560

gtgctttggt catctatata taatgataac aacaatgaga acaagctttg gactgatcgg 4620

agggtctagg atacatgaga ttcaagtgga ctaggatcta caccgttggga ttttgatgt 4680

ggatatgtgt gaggttaatt ttacttggta acggccacaa aggcctaagg agagggtttg 4740

agacccttat cggttgaac cgctggaata atgccacgtg gaagataatt ccatgaatct 4800

tatcgttate tatgagtgaa attgtgtgat ggtggagtgg tgcttgctca ttttacttgc 4860

ctggtggact tggcccttcc cttatgggga atttatattt tacttactat agagctttca 4920

taccTTTTT ttaccttga tttagttaat atataatggt atgattcatg aataaaaatg 4980

ggaaatTTTT gaatttgtac tgctaaatgc ataagattag gtgaaactgt ggaatatata 5040

TTTTTTTcat ttaaaagcaa aatttgcctt ttactagaat tataaatata gaaaaatata 5100

taacattcaa ataaaaatga aaataagaac tttcaaaaaa cagaactatg tttaatgtgt 5160

aaagattagt cgcacatcaa gtcatctgtt acaatatggt acaacaagtc ataagcccaa 5220

caaagttagc acgtctaata aactaaaga gtccacgaaa atattacaaa tcataagccc 5280

aaacaagtta ttgatcaaaa aaaaaaacg cccaacaaag ctaaacaag tccaaaaaaa 5340

acttctcaag tctccatctt cctttatgaa cattgaaaac tatacacaaa acaagtcaga 5400

taaatctctt tctgggctg tcttccaac ctctacatc acttccctat cggattgaat 5460

gttttacttg tacttttcc gttgcaatga tattgatagt atgtttgtga aaactaatag 5520

ggttaacaat cgaagtcatg gaatatggat ttggtccaag atttccgag agctttctag 5580

tagaaagccc atcaccagaa atttactagt aaaataaatc accaattagg tttcttatta 5640

tgtgccaaat tcaatataat tatagaggat atttcaaatg aaaacgtatg aatgttatta 5700

gtaaatggtc aggtaagaca ttaaaaaaat cctacgtcag atattcaact ttaaaaattc 5760

gatcagtgtg gaattgtaca aaaatttggg atctactata tatatataat gctttacaac 5820

acttgattt tttttggag gctggaattt ttaatctaca tatttgTTTT ggccatgcac 5880

caactcattg tttagtgtaa tactttgatt ttgtcaaata tatgtgttcg tgtatatttg 5940

tataagaatt tctttgacca tatacacaca cacatatata tatatatata tatattatat 6000

atcatgcact ttaattgaa aaaataatat atatataat agtgcatttt ttctaacaac 6060

catatatgtt gcgattgac tgcaaaaaata ctgctagagt aatgaaaaat ataacttatt 6120

gctgaaatta ttcagatgt taagattttc ttaaagtaaa ttcittcaaa ttttagctaa 6180

aagtcttgta ataactaaag aataatacac aatctcgacc acggaaaaaa aacacataat 6240

aaatttgaat ttgaccgcg gtaccggaa ttgggttata attacctcag gtcgaggaat 6300

taattcggta cgtacctaat aacttcgtat agcatacatt atacgaagtt atatgatct 6360

cgaggcatta cggcattacg gcaactcgca gggtccaat tcgagcatgg agccatttac 6420

aattgaatat atcctgccgc cgctgccgct ttgcaccggg tggagcttgc atgttggttt 6480

ctacgcagaa ctgagccggt taggcagata atttcattg agaactgagc catgtgcacc 6540

ttcccccaa cacggtgagc gacggggcaa eggagtgac cacatgggac ttttaaacat 6600

catccgtcgg atggcgttgc gagagaagca gtcgatccgt gagatcagcc gacgcaccgg 6660

gcaggcgcgc aacacgatcg caaagtattt gaacgcaggt acaatcgagc cgacgttcac 6720

ggtaccggaa cgaccaagca agctagctta gtaaagccct cgctagattt taatgcggat 6780

gttgcgatta cttcgccaac tattgcgata acaagaaaaa gccagccttt catgatatat 6840

ctccaattt gtgtagggt tattatgcac gcttaaaaat aataaaagca gacttgacct 6900

gatagtttg ctgtgagcaa ttatgtgctt agtgcaccta acgcttgagt taagccgcgc 6960

cggaagcgg cgtcggcttg aacgaattgt tagacattat ttgccgacta ctttggtgat 7020

ctcgctttc acgtagtga caaattcttc caactgatct gcgcgcgagg ccaagcgatc 7080

ttcttttgt ccaagataag cctgtctagc ttcaagtatg acgggctgat actgggccgg 7140

caggcgctcc attgccagc cggcagcgac atccttcggc gcgatcttgc cggttactgc 7200
 gctgtaccaa atgcgggaca acgtaagcac tacatttcgc tcatcgccag cccagtcggg 7260
 cggcgagtcc catagcgta aggtttcatt tagcgctca aatagatcct gttcaggaac 7320
 cggatcaaag agttcctccg ccgctggacc taccaaggca acgctatggt ctcttgcttt 7380
 tgtcagcaag atagccagat caatgtcgat cgtggctggc tcgaagatac ctgcaagaat 7440
 gtcattgccc tgccattctc caaattgcag ttcgctgta gctggataac gccacggaat 7500
 gatgtcgtcg tgcacaacaa tgggtacttc tacagcgagg agaatctcgc tctctccagg 7560
 ggaagccgaa gtttccaaaa ggtcgttgat caaagctcgc cgcgttggtt catcaagcct 7620
 tacggtcacc gtaaccagca aatcaatata actgtgtggc ttcaggccgc catccactgc 7680
 ggagccgtac aaatgtacgg ccagcaacgt cggttcgaga tggcgctcga tgacccaac 7740
 tacctctgat agttgagtcg atacttcggc gatcacccgt tccctcatga tgtttaactt 7800
 tgttttaggg cgactgcctt gctgcgtaac atcgttgctg ctccataaca tcaaaccatcg 7860
 acccacggcg taacgcgctt gctgcttggg tccccgaggc atagactgta ccccaaaaaa 7920
 acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcgccgta ccaccgctgc gttcgggtcaa 7980
 ggttctggac cagttgcgtg agcgcatagc ctacttgcct tacagcttac gaaccgaaca 8040
 ggcttatgtc cactgggttc gtgccttcat ccgtttccac ggtgtgcgtc acccgcaac 8100
 ctgggcagc agcgaagtgc aggcatttct gtcttgctg gcgaacgagc gcaaggtttc 8160
 ggtctccacg catcgtcagg cattggcggc ctgctgttc ttctacggca agtgctgtgc 8220
 acggatctgc cctggcttca ggagatcgga agacctcggc cgtccgggag ctgcccgtg 8280
 gtgctgacce cggatgaagt ctctagagct ctgaggggtt cgcacctcgc gttttctgga 8340

aggcgagcat cgtttgttcg cccagcttct gtatggaacg ggcatgcgga tcagtgaggg 8400
 tttgcaactg cgggtcaagg atctggattt cgatcacggc acgatcatcg tgcgggaggg 8460
 caagggtcc aaggatcggg ccttgatggt acccgagagc ttggcaccca gcctgcgcga 8520
 gcagggatcg atccaacccc tccgctgctc tagtgcagtc ggcttctgac gttcagtgca 8580
 gccgtcttct gaaaacgaca tgtcgcacaa gtccctaagtt acgcgacagg ctgccccct 8640
 gcccttttcc tggcgttttc ttgtcgcgtg ttttagtcgc ataaagtaga atacttgca 8700
 ctagaaccgg agacattacg ccatgaacaa gagcggccgc gctggcctgc tgggctatgc 8760
 ccgcgtcagc accgacgacc aggacttgac caaccaacgg gccgaactgc acgcggccgg 8820
 ctgcaccaag ctgttttccg agaagatcac cggcaccagg cgcgaccgcc cggagctggc 8880
 caggatgctt gaccacctac gccctggcga cgtttgaca gtgaccagc tagaccgct 8940
 ggccccgagc acccgcgacc tactggacat tgccgagcgc atccaggagg ccggcgcggg 9000
 cctgcgtagc ctggcagagc cgtgggccga caccaccag ccggccggcc gcatggtgtt 9060
 gaccgtgttc gccggcattg ccgagttcga gcgttccta atcatcgacc gcaccggag 9120
 cgggcgcgag gccccaagg cccgagcgt gaagtttggc ccccgcccta cctcacc 9180
 ggcacagatc gcgcacgccc gcgagctgat cgaccaggaa ggccgaccg tgaaagaggc 9240
 ggctgcactg cttggcgtgc atcgtcgcac cctgtaccgc gcacttgagc gcagcgagga 9300
 agtgacgcc accgaggcca ggcggcgcgg tgccttcctg gaggacgcat tgaccaggc 9360
 cgacgcctg gcggccgccc agaatgaacg ccaagaggaa caagcatgaa accgcaccag 9420
 gacggccagg acgaaccgtt ttccattacc gaagagatcg aggcggagat gatcgcggcc 9480

gggtacctgt tgcagccgcc cgcgcacgtc tcaaccgtgc ggctgcatga aatcctggcc 9540
 ggtttgtctg atgccaagct ggcggcctgg cggccagct tggccgctga agaaaccgag 9600
 cgcccgctc taaaaagggt atgtgtattt gagtaaaaca gcttgcgtca tgcggtcgct 9660
 gcgtatatga tgcgatgagt aaataaaca atacgcaagg ggaacgcatg aaggttatcg 9720
 ctgtacttaa ccagaaaggc gggtcaggca agacgacat cgcaacccat ctagcccgcg 9780
 ccctgcaact cgccggggcc gatgttctgt tagtcgattc cgatccccag ggcagtgccc 9840
 gcgattgggc ggcctgctgg gaagatcaac cgtaaccgt tgtcggcatc gaccgccga 9900
 cgattgaccg cgacgtgaag gccatcggcc ggcgcgactt cgtagtgatc gacggagcgc 9960
 cccagcggc ggacttggct gtgtccgca tcaaggcagc cgacttcgtg ctgattccgg 10020
 tgcagccaag cccttacgac atatgggcca cgcgcacct ggtggagctg gttaaagcagc 10080
 gcattgaggt cacggatgga aggctacaag cggcctttgt cgtgtcgcgg gcgatcaaag 10140
 gcacgcgat cggcggtag gttgccgagg cgctggccgg gtacgagctg cccattcttg 10200
 agtcccgtat cacgcagcgc gtgagctacc caggcactgc cgcccccgc acaaccgttc 10260
 ttgaatcaga acccgagggc gacgtgccc gcgaggtcca ggcgctggcc gctgaaatta 10320
 aatcaaaact catttgagtt aatgaggtaa agagaaaatg agcaaaagca caaacacgct 10380
 aagtccggc cgtccgagc cacgcagcag caaggctgca acgttgcca gcctggcaga 10440
 cagccagcc atgaagcggg tcaacttca gttgccggcg gaggatcaca ccaagctgaa 10500
 gatgtacgc gtacccaag gcaagacat taccgagctg ctatctgaat acatcgcga 10560
 gctaccagag taaatgagca aatgaataaa tgagtagatg aatcttagcg gctaaaggag 10620
 gcggcatgga aatcaagaa caaccaggca ccgacgccgt ggaatgcccc atgtgtggag 10680

gaacggcgcg ttggccaggc gtaagccgct gggttgtctg ccggccctgc aatggcactg 10740
 gaacccccaa gcccgaggaa tcggcgtgac ggtcgcaaac catccggccc ggtacaaatc 10800
 ggcgcgcgcg tgggtgatga cctggtggag aagttgaagg ccgcgcaggc cgcccagcgg 10860
 caacgcatcg aggcagaagc acgccccggt gaatcgtggc aagcggccgc tgatcgaatc 10920
 cgcaaagaat cccggcaacc gccggcagcc ggtgcgccgt cgattaggaa gccgccaag 10980
 ggcgacgagc aaccagattt ttctgttccg atgctctatg acgtgggcac ccgcatagt 11040
 cgcagcatca tggacgtggc cgttttccgt ctgtcgaagc gtgaccgacg agctggcgag 11100
 gtgatccgct acgagcttcc agacgggcac gtagaggttt ccgacgggcc ggccggcatg 11160
 gccagtgtgt gggattacga cctggtactg atggcggttt cccatctaac cgaatccatg 11220
 aaccgatacc gggaaggaa gggagacaag cccggcccg tgttccgtcc acacgttgcg 11280
 gacgtactca agttctgccg gcgagccgat ggcggaaagc agaaagacga cctggtagaa 11340
 acctgcattc ggttaaacac cacgcacgtt gccatgcagc gtacgaagaa ggccaagaac 11400
 ggcccctgg tgacggtatc cgagggtgaa gccttgatta gccgctaaa gatcgtaaag 11460
 agcgaaccg ggcggccgga gtacatcgag atcgagctag ctgattggat gtaccgcgag 11520
 atcacagaag gcaagaacc ggacgtgctg acggttcacc ccgattactt tttgatgat 11580
 cccggcatcg gccgttttct ctaccgctg gcacgcccg ccgacggcaa ggcagaagcc 11640
 agatggttgt tcaagacgat ctacgaacgc agtggcagcg ccgagagtt caagaagttc 11700
 tgtttcaccg tgcgaagct gatcgggtca aatgacctgc cggagtacga tttgaaggag 11760
 gaggcggggc aggttgccc gatcctagtc atcgctacc gcaacctgat cgaggcgaa 11820

gcatccgccc gttcctaatag tacggagcag atgctagggc aaattgccct agcaggggaa 11880
 aaaggtcgaa aaggtctctt tcctgtggat agcacgtaca ttgggaacct aaagccgtac 11940
 attgggaacc ggaacctgta cattgggaac ccaaagccgt acattgggaa cgggtcacac 12000
 atgtaagtga ctgataaaa agagaaaaa ggcgattttt ccgcctaaaa ctctttaaaa 12060
 cttattaaaa ctcttaaac ccgcctggcc tgtgcataac tgtctggcca gcgcacagcc 12120
 gaagagctgc aaaaagcgc tacccttcgg tcgctgcgt ccctacgccc cggcgttcg 12180
 cgtcggccta tcgcgccgc tggccgctca aaaatggctg gcctacggcc aggcaatcta 12240
 ccagggcgcg gacaagccgc gccgtgcca ctgcaccgcc ggcgcccaca tcaagcacc 12300
 ctgcctcgcg cgtttcggtg atgacggtga aaacctctga cacatgcagc tcccggagac 12360
 ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc 12420
 ggggtgttggc ggggtgtcggg gcgcagccat gaccagctca cgtagcgata gcggagtgt 12480
 tactggctta aciatgcggc atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcggtgt 12540
 gaaataccgc acagatgctg aaggagaaaa taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg 12600
 ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactaaag 12660
 gcggtataac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 12720
 gccagcaaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc 12780
 cggccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgaca 12840
 ggactataaa gataccagc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttcgg 12900
 acctgccc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 12960
 catagctcac gctgtagta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa getgggctgt 13020

gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tegtcttgag 13080

tccaaccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc 13140

agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 13200

actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga 13260

gttggtagct ctgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt tttgtttgc 13320

aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atccgaaaa cgcaagcgca 13380

aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta 13440

tggacagcaa gcaaccgga attgcc 13466

<210> 10
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Consensus sequence 1 of PARG protein

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X represents any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(10)
 <223> X represents any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(17)
 <223> X represents any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> X represents any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(29)
 <223> X represents any amino acid

<400> 10

Leu Xaa Val Asp Phe Ala Asn Xaa Xaa Xaa Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Gly Xaa Val Gln Glu Glu Ile Arg Phe Xaa Xaa Xaa Pro Glu
 20 25 30

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Consensus sequence 2 for PARG protein

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X represents any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X represents any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(14)
 <223> X represents any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(19)
 <223> X represents any amino acid

<400> 11

Thr Gly Xaa Trp Gly Cys Gly Ala Phe Xaa Gly Asp Xaa Xaa Leu Lys
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Gln
 20

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Consensus sequence 3 for PARG protein

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(4)
 <223> X represents any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(9)
 <223> X represents any amino acid

<400> 12

Asp Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Ile Asp Ala
 1 5 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus sequence 4 for PARG protein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(4)

<223> X represents any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(8)

<223> X represents any amino acid

<400> 13

Arg Glu Xaa Xaa Lys Ala Xaa Xaa Gly Phe
 1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> conserved PARG region

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(5)

<223> X represents any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X represents any amino acid

<400> 14

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Tyr Thr Gly Tyr

1 5 10

<210> 15
 <211> 1530
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1530)
 <223>

<400> 15
 atg gag gcg cgc ggc gac ctg cgc tgc atc ctg ccc tac ctc ccc gtc 48
 Met Glu Ala Arg Gly Asp Leu Arg Ser Ile Leu Pro Tyr Leu Pro Val
 1 5 10 15

gtg ctc cgc ggc ggc gcg ctc ttc tgg cgc ccg gcg gcg cag gag gcg 96
 Val Leu Arg Gly Gly Ala Leu Phe Trp Pro Pro Ala Ala Gln Glu Ala
 20 25 30

ctc aag gcg ctg gcg ctg ggc ccc gac gtg agc cgc gtc tcc tcc ggc 144
 Leu Lys Ala Leu Ala Leu Gly Pro Asp Val Ser Arg Val Ser Ser Gly
 35 40 45

gac gtc ctc gcc gac gcc ctc acc gac ctc cgc ctc gcg ctc aac ctc 192
 Asp Val Leu Ala Asp Ala Leu Thr Asp Leu Arg Leu Ala Leu Asn Leu
 50 55 60

gac cca ctc ccg cgc cgc gcc gcc gag ggc ttc gcg ctc ttc ttc gac 240
 Asp Pro Leu Pro Arg Arg Ala Ala Glu Gly Phe Ala Leu Phe Phe Asp
 65 70 75 80

gac ctc ctg tgc cgg gcg cag gcg cgg gac tgg ttc gac cac gtc gcc 288
 Asp Leu Leu Ser Arg Ala Gln Ala Arg Asp Trp Phe Asp His Val Ala
 85 90 95

ccc tcc ctc gcc cgc ctc ctc ctc cgc ctc ccc acg ctg ctc gag ggc 336
 Pro Ser Leu Ala Arg Leu Leu Leu Arg Leu Pro Thr Leu Leu Glu Gly
 100 105 110

cac tac cgc gcc gcc ggc gac gag gct cgc ggg ctc cgc atc ctg agc 384
 His Tyr Arg Ala Ala Gly Asp Glu Ala Arg Gly Leu Arg Ile Leu Ser

115	120	125	
tcg cag gat gcc ggg ctc gtg ctc ctc agc cag gag ctc gcc gcc gcg			432
Ser Gln Asp Ala Gly Leu Val Leu Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ala Ala			
130	135	140	
ctg ctc gcc tgc gcg ctc ttc tgc ctg ttc ccc acc gcc gat agg gcc			480
Leu Leu Ala Cys Ala Leu Phe Cys Leu Phe Pro Thr Ala Asp Arg Ala			
145	150	155	160
gag gcg tgc ctc ccg gcg atc aat ttc gat agc cta ttt gcg gca ctg			528
Glu Ala Cys Leu Pro Ala Ile Asn Phe Asp Ser Leu Phe Ala Ala Leu			
165	170	175	
tgt tat aat tcg agg caa agc cag gag cag aag gtg agg tgc ctt gtt			576
Cys Tyr Asn Ser Arg Gln Ser Gln Glu Gln Lys Val Arg Cys Leu Val			
180	185	190	
cac tat ttt gac agg gtg acc gct tct aca cct act ggt tcc gtt tcg			624
His Tyr Phe Asp Arg Val Thr Ala Ser Thr Pro Thr Gly Ser Val Ser			
195	200	205	
ttt gag cgt aag gtt ctt cct cgc cgt cct gaa tct gat ggc att acg			672
Phe Glu Arg Lys Val Leu Pro Arg Arg Pro Glu Ser Asp Gly Ile Thr			
210	215	220	
tac cct gac atg gat act tgg atg aaa tct ggt gtt ccc ctt tgc aca			720
Tyr Pro Asp Met Asp Thr Trp Met Lys Ser Gly Val Pro Leu Cys Thr			
225	230	235	240
ttc cgg gta ttt tcc tca ggc ttg ata gaa gat gag gaa caa gaa gcc			768
Phe Arg Val Phe Ser Ser Gly Leu Ile Glu Asp Glu Glu Gln Glu Ala			
245	250	255	
ctt gaa gtt gac ttt gca aat aga tat ttg gga ggt ggc gca ctt tcc			816
Leu Glu Val Asp Phe Ala Asn Arg Tyr Leu Gly Gly Gly Ala Leu Ser			
260	265	270	
aga ggc tgc gtg cag gaa gaa atc cgg ttc atg ata aac cca gaa ttg			864
Arg Gly Cys Val Gln Glu Glu Ile Arg Phe Met Ile Asn Pro Glu Leu			
275	280	285	
atc gtg ggc atg ctc ttc atg gtt tca atg gaa gat aat gaa gct ata			912
Ile Val Gly Met Leu Phe Met Val Ser Met Glu Asp Asn Glu Ala Ile			

290	295	300	
gaa att gtt ggt gca gaa agg ttc tca cag tac atg ggg tat ggt tcc			960
Glu Ile Val Gly Ala Glu Arg Phe Ser Gln Tyr Met Gly Tyr Gly Ser			
305	310	315	320
tca ttc cgt ttt act ggt gac tac tta gat agc aaa ccc ttt gat gcg			1008
Ser Phe Arg Phe Thr Gly Asp Tyr Leu Asp Ser Lys Pro Phe Asp Ala			
325	330	335	
atg ggt aga cgg aaa act agg ata gtg gca att gat gct ttg gac tgt			1056
Met Gly Arg Arg Lys Thr Arg Ile Val Ala Ile Asp Ala Leu Asp Cys			
340	345	350	
cca act agg tta cag ttt gaa tct agt ggt ctt cta agg gaa gtg aac			1104
Pro Thr Arg Leu Gln Phe Glu Ser Ser Gly Leu Leu Arg Glu Val Asn			
355	360	365	
aag gct ttt tgt gga ttt ttg gat caa tca aat cat cag ctc tgt gca			1152
Lys Ala Phe Cys Gly Phe Leu Asp Gln Ser Asn His Gln Leu Cys Ala			
370	375	380	
aag ctt gtc cag gat tta aat aca aag gat aac tgt cca agt gtc att			1200
Lys Leu Val Gln Asp Leu Asn Thr Lys Asp Asn Cys Pro Ser Val Ile			
385	390	395	400
cct gat gaa tgc ata gga gtt tca act gga aac tgg ggt tgc ggg gct			1248
Pro Asp Glu Cys Ile Gly Val Ser Thr Gly Asn Trp Gly Cys Gly Ala			
405	410	415	
ttt ggt gga aac cct gaa atc aag agc atg att caa tgg att gct gca			1296
Phe Gly Gly Asn Pro Glu Ile Lys Ser Met Ile Gln Trp Ile Ala Ala			
420	425	430	
tca cag gca ctc cga tct ttt att aac tac tac act ttt gag tcc gaa			1344
Ser Gln Ala Leu Arg Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Thr Phe Glu Ser Glu			
435	440	445	
tca ctg aaa aga tta gaa gag gtg acc cag tgg ata ttg cgc cat agg			1392
Ser Leu Lys Arg Leu Glu Glu Val Thr Gln Trp Ile Leu Arg His Arg			
450	455	460	
tgg acg gtt ggc gag ttg tgg gac atg ctt gtg gag tat tca tcc cag			1440
Trp Thr Val Gly Glu Leu Trp Asp Met Leu Val Glu Tyr Ser Ser Gln			

His Tyr Arg Ala Ala Gly Asp Glu Ala Arg Gly Leu Arg Ile Leu Ser
 115 120 125

Ser Gln Asp Ala Gly Leu Val Leu Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ala Ala
 130 135 140

Leu Leu Ala Cys Ala Leu Phe Cys Leu Phe Pro Thr Ala Asp Arg Ala
 145 150 155 160

Glu Ala Cys Leu Pro Ala Ile Asn Phe Asp Ser Leu Phe Ala Ala Leu
 165 170 175

Cys Tyr Asn Ser Arg Gln Ser Gln Glu Gln Lys Val Arg Cys Leu Val
 180 185 190

His Tyr Phe Asp Arg Val Thr Ala Ser Thr Pro Thr Gly Ser Val Ser
 195 200 205

Phe Glu Arg Lys Val Leu Pro Arg Arg Pro Glu Ser Asp Gly Ile Thr
 210 215 220

Tyr Pro Asp Met Asp Thr Trp Met Lys Ser Gly Val Pro Leu Cys Thr
 225 230 235 240

Phe Arg Val Phe Ser Ser Gly Leu Ile Glu Asp Glu Glu Gln Glu Ala
 245 250 255

Leu Glu Val Asp Phe Ala Asn Arg Tyr Leu Gly Gly Gly Ala Leu Ser
 260 265 270

Arg Gly Cys Val Gln Glu Glu Ile Arg Phe Met Ile Asn Pro Glu Leu
 275 280 285

Ile Val Gly Met Leu Phe Met Val Ser Met Glu Asp Asn Glu Ala Ile
 290 295 300

Glu Ile Val Gly Ala Glu Arg Phe Ser Gln Tyr Met Gly Tyr Gly Ser

305	310	315	320
Ser Phe Arg Phe Thr Gly Asp Tyr Leu Asp Ser Lys Pro Phe Asp Ala	325	330	335
Met Gly Arg Arg Lys Thr Arg Ile Val Ala Ile Asp Ala Leu Asp Cys	340	345	350
Pro Thr Arg Leu Gln Phe Glu Ser Ser Gly Leu Leu Arg Glu Val Asn	355	360	365
Lys Ala Phe Cys Gly Phe Leu Asp Gln Ser Asn His Gln Leu Cys Ala	370	375	380
Lys Leu Val Gln Asp Leu Asn Thr Lys Asp Asn Cys Pro Ser Val Ile	385	390	395
Pro Asp Glu Cys Ile Gly Val Ser Thr Gly Asn Trp Gly Cys Gly Ala	405	410	415
Phe Gly Gly Asn Pro Glu Ile Lys Ser Met Ile Gln Trp Ile Ala Ala	420	425	430
Ser Gln Ala Leu Arg Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Thr Phe Glu Ser Glu	435	440	445
Ser Leu Lys Arg Leu Glu Glu Val Thr Gln Trp Ile Leu Arg His Arg	450	455	460
Trp Thr Val Gly Glu Leu Trp Asp Met Leu Val Glu Tyr Ser Ser Gln	465	470	475
Arg Leu Arg Gly Asp Thr Asn Glu Gly Phe Leu Thr Trp Leu Leu Pro	485	490	495
Lys Asp Ile Pro Asn Gly Asp Val Asp Tyr Met Cys Glu	500	505	

<210> 17
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG1

<400> 17
 atgtbccaca rmtckccrac mgtec 25

<210> 18
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG2

<400> 18
 gggtytccwc caaaarcgcc rcawcccc 28

<210> 19
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG3

<400> 19
 gctatagaaa twgtyggtgy rgaaag 26

<210> 20
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG4

<400> 20
 agrggstgyg trcaggarga ratmcg 26

<210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n=any nucleotide

<400> 21
 atggargaya aygargcnat hga 23

<210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> degenerate oligonucleotide primer PG6

<400> 22
 ccaytgdagc atrctytttda gytc 24

<210> 23
 <211> 603
 <212> DNA
 <213> zea mays

<400> 23
 tagggctgtg tgcaggagga aatccgcttc atgataaacc ccgaattgat tgtgggtatg 60

ctattcttgt cttgtatgga agataacgag gctatagaaa tctttggtgc agaacggttc 120

tcacagtata tgggttatgg ttctctcttt cgttttgttg gtgactatit agatacaaaa 180
 ccctttgatt cgatgggcag acggagaact aggattgtgg ctatcgatgc ttggactgt 240
 ccagctaggt tacactatga atctggctgt ctctaaggg aagtgaacaa ggcattttgt 300
 ggatttttcg atcaatcgaa acaccatctc tatgcgaagc tttccagga ttgcacaac 360
 aaggatgact ttcaagcat caattccagt gactacgtag gattttcaac aggaaactgg 420
 ggttgggtg cttttgggtg aaacctgaa atcaagagca tgattcagtg gattgctgca 480
 tcacaggctc ttgcccttt tgtaattac tacacttttg agaactgtc tctgcaaaga 540
 ttagaggagg tgatccagtg gatacggctt catggctgga ctgtcggcga gctgtggaac 600
 ata 603

<210> 24
 <211> 12987
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> T-DNA vector comprising a chimeric ParG expression reducing gene

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)
 <223> complement of Left T-DNA border

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (58)..(318)
 <223> complement of 3' nos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (337)..(888)
 <223> bar coding region

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (889)..(1721)
 <223> 35S promoter

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1728)..(3123)
 <223> 35S promoter

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3133)..(3311)
 <223> part of ParG homologue of Zea mays

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3344)..(4085)
 <223> Pdk intron

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4119)..(4297)
 <223> part of ParG homologue of Zea mays (inverted)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4310)..(5020)
 <223> 3' OCS

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5066)..(5042)
 <223> Right T-DNA border

<400> 24
 cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atcttcccga 60

tctagtaaca tagatgacac cgcgcgcat aattatcct agtttgcgcg ctatattttg 120

ttttctatcg cgtattaaat gtataattgc gggactctaa tcataaaaac ccatctcata 180

aataacgtca tgcattacat gttaattatt acatgcttaa cgtaattcaa cagaaattat 240

atgataatca tcgcaagacc ggcaacagga ttcaatctta agaaacttta ttgccaaatg 300

tttgaacgat ctgcttcgga tcctagacgc gtgagatcag atctcggatga cgggcaggac 360

cggacggggc ggiaccggca ggctgaagtc cagctgccag aaaccacgt catgccagtt 420

cccgtgcttg aagccggccg cccgcagcat gccgcggggg gcatatccga ggcctcgtg 480

catgcgcacg ctcggtcgt tgggcagccc gatgacagcg accacgtct tgaagccctg 540

tgctccagg gacttcagca ggtgggtgta gagcgtggag cccagtcccg tccgctggtg 600

gcggggggag acgtacacgg tcgactcggc cgtccagtcg taggcgttgc gtgccttcca 660

ggggcccgcg taggcgatgc cggcgacctc gccgtccacc tcggcgacga gccagggata 720

gcgtccccgc agacggacga ggtcgtccgt ccaactctgc ggttctcgc gctcgtacg 780

gaagttgacc gtgcttctct cgatgtagtg gttgacgatg gtgcagaccg ccggcatgtc 840

gcctcgggtg gcacggcggg tgtcggccgg gcgtcgttct ggggccatgg ttatagagag 900

agagatagat ttatagagag agactggtga tttcagcgtg tcctctcaa atgaaatgaa 960

cttccttata tagaggaagg gtcttcgaa ggatagtggg attgtgcgtc atcccttacg 1020

tcagtggaga tgcacatca atccacttgc tttgaagacg tggttggaac gtcttctttt 1080

tccacgatgc tctcgtggg tgggggtcca tctttgggac cactgtcggc agaggcatct 1140

tgaatgatag cttttcttt atcgcaatga tggcatttgt aggagccacc ttccttttct 1200

actgtccttt cgatgaagtg acagatagct gggcaatgga atccgaggag gtttcccgaa 1260

attatccttt gttgaaaagt ctcaatagcc ctttggctct ctgagactgt atctttgaca 1320

tttttggagt agaccagagt gtcgtgctcc accatgttga cgaagatttt ctctttgtca 1380

ttgagtcgta aaagactctg tatgaactgt tcgccagtct tcacggcgag ttctgttaga 1440

tcctcgattt gaatcttaga ctccatgcat ggccttagat tcagtaggaa ctacctttt 1500

agagactcca atctctatta cttgccttgg tttatgaagc aagcctttaa tcgtccatac 1560

tggaatagta ctctgatct tgagaataat gcttttctct gtgttcttga tgcaattagt 1620

cctgaatctt ttgactgcat ctttaacctt cttgggaagg tatttgatct cctggagatt 1680

gttactcggg tagatcgtct tgatgagacc tgctgcgtag gaacggcgcc gcgtatacgt 1740

atcgatatct tcgaattcga gctcgtcgag cggccgctcg acgaattaat tccaatccca 1800

caaaaatctg agcttaacag cacagttgct cctctcagag cagaatcggg tattcaacac 1860

cctcatatca actactacgt tgtgtataac ggtccacatg ccggtatata cgatgactgg 1920

ggttgtacaa aggcggcaac aaacggcgtt cccggagtgg cacacaagaa atttgccact 1980

attacagagg caagagcagc agctgacgcg tacacaaca gtcagcaaac agacaggttg 2040

aacttcatcc ccaaggaga agctcaactc aagccaaga gctttgctaa ggcctaaca 2100

agcccacaa agcaaaaagc ccaactggctc acgctaggaa ccaaaaggcc cagcagtgat 2160

ccagcccaa aagagatctc ctttgcctcg gagattaca tggacgattt cctctatctt 2220

tacgatctag gaaggaagtt cgaagtgaa ggtgacgaca ctatgttcac cactgataat 2280

gagaaggtta gcctcttcaa tttcagaaag aatgctgacc cacagatggt tagagaggcc 2340

tacgcagcag gtctcatcaa gacgatctac ccgagtaaca atctccagga gatcaaatac 2400

cttccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga ctaattgcat caagaacaca 2460

gagaaagaca tattttcaca gatcagaagt actattccag tatggacgat tcaagccttg 2520

cttcataaac caaggcaagt aatagagatt ggagtctcta aaaaggtagt tcctactgaa 2580

tctaaggcca tgcattggagt ctaagattca aatcgaggat ctaacagaac tcgccgtgaa 2640

gactggcgaa cagttcatac agagtctttt acgactcaat gacaagaaga aaatcttcgt 2700

caacatggtg gagcacgaca ctctggtcta ctccaaaat gtcaaagata cagtctcaga 2760

agaccaaagg gctattgaga cttttcaaca aaggataatt tcgggaaacc tcctcggatt 2820

ccattgccca gctatctgtc acttcacga aaggacagta gaaaaggaag gtggctccta 2880

caaatgcat cattgcgata aaggaaaggc tatcattcaa gatctctctg ccgacagtgg 2940

tcccaaagat ggacccccac ccacaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac 3000

gtcttcaaag caagtggatt gatgtgacat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc 3060

ccactatcct tcgcaagacc ctctctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggac 3120

acgctcgagc ccgaattgat tgtgggtatg ctattcttgt cttgtatgga agataacgag 3180

gctatagaaa tctttggtgc agaacggttc tcacagtata tgggttatgg ttctctcttt 3240

cgctttgttg gtgactatct agataccaaa ccctttgatt cgatgggcag acggagaact 3300

aggattgtgg cggtaaccca gcttggtgaa gaaataatta ttttctttt tccttttagt 3360

ataaaatagt taagtgatgt taattagtat gattataata atatagttgt tataattgtg 3420

aaaaaataat ttataaatat attgtttaca taacaacat agtaatgtaa aaaaatatga 3480

caagtgatgt gtaagacgaa gaagataaaa gttgagagta agtatattat ttttaatgaa 3540

tttgatcgaa catgtaagat gatatactag cattaatatt tgttttaac ataataagtaa 3600

ttctagctgg ttgatgaat taaatatcaa tgataaaata ctatagtaaa aataagaata 3660
 aataaattaa aataatattt ttttatgatt aatagtttat tatataatta aatatctata 3720
 ccattactaa atattttagt ttaaaagtta ataaatattt tgttagaaat tccaactgac 3780
 ttgtaattta tcaataaaca aatatataaa taacaagcta aagtaacaaa taatatcaaa 3840
 ctaatagaaa cagtaatcta atgtaacaaa acataatcta atgctaatat aacaaagcgc 3900
 aagatctatc attttatata gtattatttt caatcaacat tcttattaat ttctaaataa 3960
 tactttagt tttattaact tctaaatgga ttgactatta attaaatgaa ttagtcgaac 4020
 atgaataaac aaggtaacat gatagatcat gtcatttgtt tatcattgat cttacatttg 4080
 gattgattac agttgggaag ctgggttcga aatcgatagc cacaatccta gttctccgtc 4140
 tgcccatcga atcaaagggt ttggtatcta aatagtcacc aacaaagcga aaggaggaac 4200
 cataacccat atactgtgag aaccgttctg caccaaagat ttctatagcc tcggttatctt 4260
 ccatacaaga caagaatagc ataccacaaa tcaattcggg tctagagtcc tgctttaatg 4320
 agatatcgga gacgcctatg atcgcatgat atttgctttc aattctgttg tgcacgttgt 4380
 aaaaaacctg agcatgtgta gctcagatcc ttaccgccgg tttcggttca ttctaatgaa 4440
 tatatcacc gttactatcg tatttttatg aataatattc tccgttcaat ttactgattg 4500
 tacctacta cttatatgta caatattaaa atgaaaacaa tatattgtgc tgaataggtt 4560
 tatagcgaca tctatgatag agcgcacaaa taacaaacaa ttgcgtttta ttattacaaa 4620
 tccaatttta aaaaagcgg cagaaccggt caaacctaaa agactgatta cataaatctt 4680
 attcaaattt caaaagcccc caggggctag tatctacgac acaccgagcg gcgaactaat 4740

aacgttcaact gaagggaaact ccggttcccc gccggcgcgc atgggtgaga ttccttgaag 4800
 ttgagtattg gccgtccgct ctaccgaaag ttacgggcac cattcaacc ggtccagcac 4860
 ggcgccggg taaccgactt gctgccccga gaattatgca gcattttttt ggtgtatgtg 4920
 ggccccaaat gaagtgcagg tcaaaccttg acagtgcga caaatcgttg gccgggtcca 4980
 gggcgaattt tgcgacaaca tgtcaggct cagcaggacc tgcaggtcga cggccgagta 5040
 ctggcaggat atatacgtt gtaatttgc gcgtgtgaat aagtcgctgt gtatgtttgt 5100
 ttgattgttt ctgttgaggt gcagccatt tcaccgaca agtcggctag attgatttag 5160
 ccctgatgaa ctgccaggg gaagccatct tgagcgcgga atgggaatgg atttcgttgt 5220
 acaacgagac gacagaacac ccacgggacc gagcttcgat cgagcatcaa atgaaactgc 5280
 aatttattca tatcaggatt atcaatacca ttttttgaa aaagccgttt ctgtaatgaa 5340
 ggagaaaact caccgaggca gttccatagg atggcaagat cctggtatcg gtcctcgatt 5400
 ccgactcgtc caacatcaat acaacctatt aatttccct cgtcaaaaat aaggttatca 5460
 agtgagaaat caccatgagt gacgactgaa tccggtgaga atggcaaaag tttatgcatt 5520
 tctttccaga ctgtttcaac aggccagcca ttacgctcgt catcaaaatc actcgcata 5580
 accaaaccgt taitcattcg tgattgcgcc tgagcgagac gaaatcgcg gctgttaaaa 5640
 ggacaattac aaacaggaat cgaatgcaac cggcgcagga acactgccag cgcataca 5700
 atattttcac ctgaatcagg atattcttct aatacctgga atgctgtttt tccggggatc 5760
 gcagtgtgta gtaacctgc atcatcagga gtacggataa aatgcttgat ggtcgggaaga 5820
 ggcataaatt ccgtcagcca gtttagtctg accatctcat ctgtaacatc attggcaacg 5880
 ctaccttgc catgtttcag aaacaactct ggccatcgg gcttccata caatcgatag 5940

attgtcgcac ctgattgcc gacattatcc gaatctggca attccggttc gettgetgtc 6000
 cataaaaccg cccagtctag ctatcgccat gtaagcccac tgcaagctac ctgctttctc 6060
 ttgcgcttg cgttttccgg atcttcttga gatccttttt tctcgcggt aatctgtctc 6120
 ttgcaaaca aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccgatca agagctacca 6180
 atctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaatac tgccttcta 6240
 gigtaccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt 6300
 ctgctaacc tgttaccagt ggctgtgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 6360
 gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc 6420
 acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcta 6480
 tgagaaagcg ccacgttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccgt aagcggcagg 6540
 gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcttgta tctttatagt 6600
 cctgtcgggt ttcgccact ctgacttgag cgtcgatfff tgtgatgctc gtcagggggg 6660
 cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg 6720
 cttttgctc acatgttctt tcttgcgtta tcccctgatt ctgtggataa cgtattacc 6780
 gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg 6840
 agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgatct gtgcgttatt 6900
 tcacaccga tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgata gttaagccag 6960
 tatacactcc gctatceta cgtgactggg tcatggetgc gccccgacac cgcceaacac 7020
 ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcacc cgcttacaga caagctgtga 7080

ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcacgaaa cgcgcgaggc 7140
 aggttgcctt gaigtggcgg ccggcggctc agtggcgacg gcgcggcttg tccgcgcctt 7200
 ggtagattgc ctggccctag gccagccatt ttgagcggc cagcggccgc gataggccga 7260
 cgcgaagcgg cggggcgtag ggagcgcagc gaccgaaggg taggcgcttt ttgcagctct 7320
 tcggctgtgc gctggccaga cagttatgca caggccaggc gggttttaag agttttaata 7380
 agttttaaag agttttaggc ggaaaaatcg cttttttct cttttatc agtcacttac 7440
 atgtgtgacc ggttccaat gtacggcttt gggttcccaa tgtacgggtt ccggttccca 7500
 atgtacgctt ttgggttccc aatgtacgtg ctatccacag gaaagagacc ttttcgacct 7560
 ttttccctg ctagggcaat ttgccttagc atctgctccg tacattagga accggcggat 7620
 gcttcgcctt cgatcaggtt gcggtagcgc atgactagga tcgggccagc ctgccccgcc 7680
 tcctcctca aatcgtactc cggcaggtca ttgaccga tcagcttgcg cacggtgaaa 7740
 cagaacttct tgaactctcc ggcgctgcca ctgcgttctg agatcgtctt gaacaacat 7800
 ctggcttctg ccttgcctgc ggccggcgt gccaggcggg agagaaaacg gccgatgccg 7860
 ggatcgtca aaaagtaatc ggggtgaacc gtcagcacgt ccgggttctt gccttctgtg 7920
 atctcgggt acatccaatc agctagctcg atctcgatgt actccggccg cccggttctg 7980
 ctctttacga tctttagcgg gctaatcaag gcttcacct cggataccgt caccaggcgg 8040
 ccgttcttgg ccttcttctg acgtgcatg gcaacgtgcg tgggtttta cgaatgcag 8100
 gtttctacca ggtcgtcttt ctgctttccg ccatcgctc gccggcagaa cttgagtacg 8160
 tccgcaacgt gtggacggaa cacgcggccg ggttctctc ccttccctc ccggtatcgg 8220
 ttcattgatt cggttagatg ggaaaccgcc atcagtacca ggtcgtaatc ccacacactg 8280

gccatgccgg ccggccctgc ggaaacctct acgtgccctg ctggaagctc gtagcggatc 8340

acctgccag ctctcgggtc acgcttcgac agacggaaaa cggccacgtc catgatgctg 8400

cgactatcgc gggtgcccac gtcatagagc atcggaacga aaaaatctgg ttgctcgtcg 8460

cccttggcgg gcttccaat cgacggcgca ccggctgccg gcggttgccg ggattctttg 8520

cggattcgat cagcggccgc ttgccacgat tcaccggggc gtgcttctgc ctcgatgcgt 8580

tgccgtggg cggcctgcgc ggccttcaac ttctccacca ggtcatcacc cagcgcgcg 8640

ccgatttcta ccggccgga tggtttgcga ccgtcacgcc gattcctcgg gcttgggggt 8700

tccagtcca ttgcaggcc ggcagacaac ccagccgctt acgcctggcc aaccgccct 8760

tcctccacac atggggcatt ccacggcgtc ggtgcctggt tgttcttgat ttccatgcc 8820

gcctccttta gccgctaaaa ttcatctact catttattca tttgctcatt tactctgta 8880

gctgcgcgat gtattcagat agcagctcgg taatggtctt gccttggcgt accgcgtaca 8940

tcttcagctt ggigtgatcc tccgccgca actgaaagt gaccgccttc atggctggcg 9000

tgtctgccag gctggccaac gttgcagcct tgctgctcgc tgcgctcgga cggccggcac 9060

ttagcgtggt tigtctttg ctcatcttct cttacctca ttaactcaa tgagtttga 9120

tttaatttca gcggccagcg cctggacctc gcgggcagcg tcgccctcgg gttctgattc 9180

aagaacggtt gtccggcgg cggcagtgcc tggtagctc acgcgctcgc tgatacggga 9240

ctcaagaatg ggcagctcgt acccggccag cgcctcggca acctcaccgc cgatgcgcgt 9300

gcctttgac gcccgcgaca cgaaaagc cgtttgtagc cttccatccg tgacctcaat 9360

gcgctgctta accagctcca ccaggtcggc ggtggcccat atgtcgtaag ggcttggctg 9420

caccggaatc agcacgaagt cggctgcctt gatcgcgac acagccaagt cgcgcctg 9480

ggcgctccg tcgatacta cgaagtccg cggccgatg gccttcacgt cgcggtcaat 9540

cgtcggcgg tcgatgccg caacggttag cggttgatct tcccgcacgg cgcaccaatc 9600

gcgggactg ccctgggat cggaatcgc taacagaaca tcggccccg cgagttgcag 9660

ggcggggct agatgggtg cgatggctg cttgcctgac ccgccttct ggtaagtac 9720

agcgataacc ttcatgcgtt cccttgcgt attgtttat ttactcatcg catcatatac 9780

gcagcgaccg catgaccaa gctgttttac taaatacac atcaccttt tagacggcgg 9840

cgctcgttt cttcagcgc caagctggcc ggccaggccg ccagcttgc atcagacaaa 9900

ccggccagga tttcatgcag ccgcacggt gagacgtgc cggcggtc gaacacgtac 9960

ccggccgga tcattccgc ctgatctct tcgtaatga aaaacggtc gtctggcgc 10020

tcctggtgc gttcatgct tgttctctt ggcttcatt ctggcgcc gccagggct 10080

cgccctcgt caatgcgtc tcacggaagg caccgcgcc cctggcctc gtggcgctca 10140

cttctcgt gcgtcaagt gcgcgtaca ggctcgagc atgcaccca agcagtgag 10200

ccgcctttt caggtgcgg ctttctggt cgatcagct cggggcgtc gcgatctgtg 10260

ccgggtgag gtagggcgg gggccaaact tcacgcctc ggcttggcg gcctcgcgc 10320

cgctccgggt gcgctgatg attaggaac gctcgaact ggcaatgcc gcgaacacgg 10380

tcaacacat cggccggcc ggcgtggtg tctcgccca cggctctgc aggctacga 10440

ggccccgcc ggcctctgg atgcctcgg caatgtccag taggtcggg gtgctcggg 10500

ccaggcgtc tagcctggtc actgtcaca cgtcgccagg gcgtaggtg tcaagcatc 10560

tggccagct cggcggtc gcctggtc cgtgatctt ctggaaaac agcttgggtc 10620

agccggccgc gtgcagttcg gcccgttggt tggtaagtc ctggtcgtcg gtgctgacgc 10680
 gggcatagcc cagcaggcca gcggcggcgc tcttgttcat ggcgtaatgt ctccggttct 10740
 agtcgcaagt attctacttt atgcgactaa aacacgcgac aagaaaacgc caggaaaagg 10800
 gcaggcggc agcctgtcgc gtaacttagg acttggtcga catgtcgttt tcagaagacg 10860
 gctgcactga acgtcagaag ccgactgcac tatagcagcg gaggggttgg atcgatccct 10920
 gctcgcgag gctgggtgcc aagctctcgg gtaacatcaa ggcccgatcc ttggagccct 10980
 tgcctcccg cagcatgac gtgccgtgat cgaatccag atccttgacc cgcagttgca 11040
 aaccctcact gatccgatg cccgttccat acagaagctg ggcaacaaa cgatgctcgc 11100
 ctccagaaa accgaggatg cgaaccactt catccgggt cagcaccacc ggcaagcgc 11160
 cggacggcgg aggtcttccg atctctgaa gccaggcag atccgtgcac agcacttgc 11220
 gtagaagaac agcaaggccg ccaatgcctg acgatgcgtg gagaccgaaa ctttgcgctc 11280
 gttgccagc caggacagaa atgcctcgc ttcgctgctg cccaaggtt cgggtgacg 11340
 cacaccgtgg aaacgatga aggcacgaac ccagtggaca taagcctgtt cggttcgtaa 11400
 gctgtaatgc aagtagcgtg tgcgctcac caactgtcc agaacctga cgaacgcag 11460
 cggtgtaac ggcgcagtgg cggttttcat ggcttattat gactgttttt ttgggtaca 11520
 gtctatgcct cgggcatcca agcagcaagc gcgttacgcc gtgggtcgat gtttgatgtt 11580
 atggagcagc aacgatgta cgcagcaggg cagtcgcctt aaaacaaagt taaacatcat 11640
 gaggaagcg gtgatcgcg aagtatcgc tcaactatca gaggtagtgg gcgtcatcga 11700
 gcgcatctc gaaccgacgt tgctggcctt acatttgtac ggctccgcag tggatggcgg 11760

cctgaagcca cacagtgata ttgatttgcg ggttacggcg accgtaaggc ttgatgaaac 11820

aacgcggcga gctttgatca acgacctttt ggaaacttcg gcttcccctg gagagagcga 11880

gattctccgc gcigtagaag tcaccattgt tgtgcacgac gacatcattc cgtggcggtta 11940

tccagctaag cgcgaaactgc aatttggaga atggcagcgc aatgacattc ttgcaggtat 12000

cttcgagcca gccacgatcg acattgatct ggctatcttg ctgacaaaag caagagaaca 12060

tagcgttgcc ttggtaggtc cagcggcgga ggaactcttt gatccggttc ctgaacagga 12120

tctattttag gcgctaaatg aaaccttaac gctatggaac tcgccgcccg actgggctgg 12180

cgatgagcga aatgtagtgc ttacgttgc cgcatttgg tacagcgcag taaccggcaa 12240

aatcgcgccg aaggatgtcg ctgccgactg ggcaatggag cgctgcccg cccagtatca 12300

gcccgcata ctgaaagcta gacaggctta tcttggacaa gaagaagatc gcttggcctc 12360

gcgcgcagat cagtgggaag aatttgcaca ctacgtgaaa ggcgagatca ccaagtagt 12420

cggcaataa tgictaaca ttcgttcaag ccgacgccgc ttcgcggcgc ggcttaactc 12480

aagcgttaga tgcactaagc acataattgc tcacagccaa actatcaggt caagtctgct 12540

tttattattt ttaagcgtgc ataataagcc ctacacaaat tgggagatat atcatgaaag 12600

gctggctttt tcttgttacc gcaatagttg gcgaagtaat cgcaacatcc gcattaaat 12660

ctagcgaggg ctttactaag ctacgttgcg ttgtcgttcc ggtaccgtga acgtcggctc 12720

gattgtacct gcgttcaaat actttgcgat cgtgttgcgc gcctgcccg tgcgtcggct 12780

gatctcacgg atcgactgct tctctcgcaa cgccatccga cggatgatgt ttaaaagtcc 12840

catgtggatc actccgttgc cccgtcgtc accgtgttgg ggggaaggtg cacatggctc 12900

agttctcaat ggaaattatc tgcctaaccg gctcagttct gcgtagaaac caacatgcaa 12960

gctccaccgg gtgcaaagcg gcagcgg

12987

<210> 25
 <211> 13226
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> T-DNA vector comprising a chimeric ParG expression reducing gene

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)
 <223> Left T-DNA border (C)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (58)..(318)
 <223> 3' nos (C)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (337)..(888)
 <223> bar coding region (C)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (889)..(1721)
 <223> 35S3 promoter region (C)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1778)..(3123)
 <223> 35S promoter region

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3130)..(3431)
 <223> part of ParG homologue of Zea mays

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3464)..(4205)
 <223> Pdk-intron

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4238)..(4536)
 <223> part of ParG homologue of Zea mays (C)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4549)..(5259)
 <223> 3' ocs

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5281)..(5305)
 <223> Right T-dNA border (C)

<400> 25
 cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atcttcccga 60

 tctagtaaca tagatgacac cgcgcgcat aatttatcct agtttgcgcg ctatatattg 120

 ttttctatcg cgtattaat gtataattgc gggactctaa tcataaaaac ccatctcata 180

 aataacgtca tgcattacat gttaattatt acatgcttaa cgtaattcaa cagaaattat 240

 atgataatca tcgcaagacc ggcaacagga ttcaatctta agaaacttta ttgccaaatg 300

 ttngaacgat ctgcttcgga tcctagacgc gtgagatcag atctcggtga cgggcaggac 360

 cggacggggc ggiaccggca ggctgaagtc cagctgccag aaaccacgt catgccagtt 420

 cccgtgcttg aagccggccg cccgcagcat gccgcggggg gcatatccga ggcctcgtg 480

 catg'gcacg ctcgggtcgt tgggcagccc gatgacagcg accacgctct tgaagccctg 540

tgcctccagg gacttcagca ggtgggtgta gagcgtggag cccagtcccg tccgctggtg 600
 gcggggggag acgtacacgg tcgactcggc cgtccagtcg taggcgttgc gtgccttcca 660
 ggggcccgcg taggcgatgc cggcgacctc gccgtccacc tcggcgacga gccagggata 720
 gcgctcccgc agacggacga ggtcgtccgt ccactcctgc ggttcctgcg gctcgttacg 780
 gaagttagcc gtgcttgtct cgatgtagtg gttgacgatg gtgcagaccg ccggcatgct 840
 cgctcggtg gcacggcgga tgtcggcccg gcgtcgttct gggccatgg ttatagagag 900
 agagatagat ttatagagag agactggtga tttcagcgtg tcctctcaa atgaaatgaa 960
 cttccttata tagaggaagg gtcttgcgaa ggatagtggtg attgtgcgtc atcccttacg 1020
 tcagtggaga tgcacatca atccacttgc tttgaagacg tggttggaac gtcttctttt 1080
 tccacgatgc tectcgtggg tgggggtcca tctttgggac cactgtcggc agaggcatct 1140
 tgaatgatag ccttctctt atcgaatga tggcatttgt aggagccacc ttccttttct 1200
 actgtccttt cgatgaagtg acagatagct gggcaatgga atccgaggag gtttcccgaa 1260
 attatccttt gttgaaaagt ctcaatagcc ctttggctct ctgagactgt atctttgaca 1320
 tttttggagt agaccagagt gtcgtgctcc accatgttga cgaagatttt cttcttgc 1380
 ttgagtcgta aaagactctg tatgaactgt tcgccagtct tcacggcgag ttctgttaga 1440
 tcctcgattt gaatcttaga ctccatgcat ggccttagat tcagtaggaa ctacctttt 1500
 agagactcca atctctatta cttgccttgg tttatgaagc aagccttgaa tcgtccatac 1560
 tggaatagta cttctgatct tgagaaatat gtctttctct gtgttcttga tgcaattagt 1620
 cctgaatctt ttgactgcat ctttaacctt cttgggaagg tatttgatct cctggagatt 1680

gttactcggg tagatcgtct tgatgagacc tgcctcgttag gaacgcggcc gcgtatacgt 1740

atcgatatct tcgaattcga gctcgtcagc cggccgctcg acgaattaat tccaatccca 1800

caaaaatctg agcttaacag cacagttgct cctctcagag cagaatcggg tattcaacac 1860

cctcatatca actactacgt tgtgtataac ggtccacatg ccggtatata cgatgactgg 1920

ggttgtacaa aggcggcaac aaacggcgtt cccggagttg cacacaagaa atttgccact 1980

attacagagg caagagcagc agctgacgcg tacacaacaa gtcagcaaac agacaggttg 2040

aacttcatcc ccaaaggaga agctcaactc aagcccaaga gctttgctaa ggcctaaca 2100

agcccaccaa agcaaaaagc ccaactggctc acgctaggaa ccaaaaggcc cagcagtgat 2160

ccagcccaaa aagagatctc ctttgccccg gagattacaa tggacgattt cctctatctt 2220

tacgatctag gaaggaagtt cgaaggtgaa ggtgacgaca ctatgttcac cactgataat 2280

gagaaggtta gcctcttcaa tttcagaaaag aatgctgacc cacagatggt tagagaggcc 2340

tacgcagcag gtctcatcaa gacgatctac ccgagtaaca atctccagga gatcaaatac 2400

cttccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga ctaattgcat caagaacaca 2460

gagaaagaca tatttctcaa gatcagaagt actattccag tatggacgat tcaaggcttg 2520

cttcataaac caaggcaagt aatagagatt ggagtctcta aaaaggtagt tcctactgaa 2580

tctaaggcca tgcattggagt ctaagattca aatcgaggat ctaacagaac tcgccgtgaa 2640

gactggcgaa cagttcatal agagtctttt acgactcaat gacaagaaga aaatcttctg 2700

caacatggtg gagcacgaca ctctggtcta ctccaaaaat gtcaaagata cagtctcaga 2760

agaccaaagg gctattgaga cttttcaaca aaggataatt tcgggaaacc tcctcggatt 2820

ccattgcca gctatctgtc acttcatcga aaggacagta gaaaaggaag gtggctccta 2880

caaatgccat cattgcgata aaggaaagc tatcattcaa gatctctctg cgcacagtgg 2940
 tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac 3000
 gtcttcaaag caagtggatt gatgtgacat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc 3060
 ccactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggac 3120
 acgctcgagg aatctggctg tctcctaagg gaagtgaaca aggcattttg tggatttttc 3180
 gatcaatcga aacaccatct ctatgcgaag cttttccagg attgcacaa caaggatgac 3240
 ttttcaagca tcaattccag tgagtacgta ggagtttcaa caggaaactg gggttgtggt 3300
 gcttttggtg gaaaccctga aatcaagagc atgattcagt ggattgctgc atcacaggct 3360
 cttegcctt ttgtaatta ctacactttt gagaacgtgt ctctgcaaag attagaggag 3420
 gtgatccagt gggtagccca gcttggtaag gaaataatta ttttctttt tecttttagt 3480
 ataaaatagt taagtgatgt taattagat gattataata atatagttgt tataattgtg 3540
 aaaaaaatat ttataaatat attgtttaca taaacaacat agtaatgtaa aaaaatga 3600
 caagtgatgt gtaagacgaa gaagataaaa gttgagagta agtatattat ttttaatgaa 3660
 ttgatcgaa catgtaagat gatatactag cattaatatt tgttttaatc ataatagtaa 3720
 ttctagctgg ttgatgaat taaatatcaa tgataaata ctatagtaa aataagaata 3780
 aataaattaa aataatattt ttttatgatt aatagtttat tatataatta aatatctata 3840
 ccattactaa atatttttagt ttaaaagtta ataaatattt tgtagaaat tccaatctgc 3900
 ttgtaattta tcaataaaca aaatattaa taacaagcta aagtaacaaa taatatcaaa 3960
 ctaatagaaa cagtaatcta atgtaacaaa acataatcta atgctaatat aacaaagcgc 4020

aagatctatc attttatata gtattatfff caatcaacat tcttattaat ttctaaataa 4080
tacttgtagt tttattaact tctaaatgga ttgactatta attaaatgaa ttagtcgaac 4140
atgaataaac aaggtaacat gatagatcat gtcattgtgt tatcattgat cttacatttg 4200
gattgattac agttgggaag ctgggttcga aatcgatcac tggatcacct cctctaactt 4260
ttgcagagac acgttctcaa aagtgtagta attaacaaaa gggcgaagag cctgtgatgc 4320
agcaatccac tgaatcatgc tcttgatttc agggtttcca ccaaaagcac cacaacccca 4380
gtttcctggt gaaactccta cgtactcact ggaattgatg cttgaaaagt catccttggt 4440
gtgcaaatcc tggaaaagct tcgcatagag atggtgtttc gattgatcga aaaatccaca 4500
aaatgccttg ttcacttccc ttaggagaca gccagattct ctagagtcct gctttaatga 4560
gatatgcgag acgcctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt gcacgttgta 4620
aaaaacctga gcatgtgtag ctcagatcct taccgccggt ttcggttcat tctaatgaat 4680
atatcaccgg ttactatcgt atttttatga ataatatctt ccgittcaatt tactgattgt 4740
accctactac ttatatgtac aatattaaaa tgaaaacaat atattgtgct gaataggttt 4800
atagcgacat ctatgataga gcgccacaat aacaacaat tgcgttttat tattacaaat 4860
ccaattttaa aaaaagcggc agaaccggtc aaacctaaaa gactgattac ataaatctta 4920
ttcaaatttc aaaaggcccc aggggctagt atctacgaca caccgagcgg cgaactaata 4980
acgttactg aagggaactc cggttccccg cggcgcgca tgggtgagat tccttgaagt 5040
tgagtattgg ccgtccgctc taccgaaagt tacgggcacc attcaaccgg gtccagcacg 5100
gcggcggggt aaccgacttg ctgccccgag aattatgcag catttttttg gtgtatgtgg 5160
gccccaatg aagtgcaggt caaaccttga cagtgcagac aaatcgttgg gcgggtccag 5220

ggcaatttt ggcacaacat gtcgaggctc agcaggacct gcaggctgac ggccgagtac 5280
 tggcaggata tataccgttg taatttgtcg cgtgtgaata agtcgctgtg tatgtttgtt 5340
 tgattgtttc tgttggagtg cagcccattt caccggacaa gtcggctaga ttgatttagc 5400
 cctgatgaac tgccgagggg aagccatctt gagcgcggaa tgggaatgga tttcgttgta 5460
 caacgagacg acagaacacc cacgggaccg agcttcgatc gagcatcaaa tgaactgca 5520
 atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa aagccgtttc tgtaatgaag 5580
 gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc ctggtatcgg tctgcgattc 5640
 cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttccctc gtcaaaaata aggttatcaa 5700
 gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa tggcaaaagt ttatgcattt 5760
 ctttccagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc atcaaaatca ctcgcatcaa 5820
 ccaaaccgtt attcattcgt gattgcgcct gagcagacg aaatcgccg ctgttaaaag 5880
 gacaattaca aacaggaatc gaatcaacc ggcgcaggaa cactgccagc gcatcaacaa 5940
 tattttcacc tgaatcagga tattcttcta atacctggaa tgctgttttt cgggggatcg 6000
 cagtgtgag taacatgca tcatcaggag tacggataaa atgcttgatg gtcggaagag 6060
 gcataaatc cgtcagccag tttagtctga ccatctcacc tgtaacatca ttggcaacgc 6120
 tacctttgcc atgtttcaga aacaactctg gcgcatcggg cttccatac aatcgataga 6180
 ttgtcgacc tgattgcccg acattatccg aatctggcaa ttccggttcg cttgctgtcc 6240
 ataaaaccgc ccagtctagc tatcgccatg taagcccact gcaagctacc tgctttctct 6300
 ttgcgcttgc gttttccgga tctttttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct 6360

tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa 6420
 ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag 6480
 thtagccgta gtiaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc 6540
 tgctaactct gtiaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg 6600
 actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca 6660
 cacagcccag ctgggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 6720
 gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa agcggcacag gtatccgta agcggcaggg 6780
 tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc 6840
 ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 6900
 ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgcctggc 6960
 cttttgctca caigtctttt cctgcgttat ccctgattc tgtggataac cgtattaccg 7020
 cctttgagtg agctgatacc gctcggcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga 7080
 gcgaggaagc ggaagagcgc ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggiattt 7140
 cacaccgat atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagt 7200
 atacactccg ctatcgctac gtgactgggt catggctgcg ccccgacacc cgccaacacc 7260
 cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gttacagac aagctgtgac 7320
 cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttaccgtca tcaccgaaac gcgagaggca 7380
 ggggtgccttg atgtgggcgc cggcggtcga gtggcgacgg cgcggcttgt ccgcgcctg 7440
 gtagattgcc tgccctagc ccagccattt ttgagcggcc agcggccgcg ataggccgac 7500
 gcgaagcggc ggggcgtagg gagcgcagcg accgaagggt aggcgctttt tgcagctctt 7560

cggctgtgcg ctggccagac agttatgcac aggccaggcg ggttttaaga gttttaataa 7620
 gttttaaaga gttttaggcg gaaaaatcgc cttttttctc ttttatatca gtcacttaca 7680
 tgtgtgaccg gticccaatg tacggctttg ggttccaat gtacgggttc cggttcccaa 7740
 tgtacggctt tgggttccca atgtacgtgc tatccacagg aaagagacct tttcgacctt 7800
 tttccctgc tagggcaatt tgcctagca tctgctcgt acattaggaa cggcgggatg 7860
 cttegcctc gatcaggtg cggtagcgca tgactaggat cgggccagcc tgccccgct 7920
 cctccttcaa atcgactcc ggcaggtcat ttgaccgat cagcttgcgc acggtgaaac 7980
 agaacttctt gaactctccg gcgctgccac tgcgttcgta gatcgtcttg aacaaccatc 8040
 tggcttctgc cttgctcgc gcgcggcgtg ccaggcggta gagaaaacgg cggatgccgg 8100
 gatcgatcaa aaagtaatcg gggatgaaccg tcagcacgtc cgggttcttg ctttctgtga 8160
 tctcgcggta catccaatca gctagctcga tctcgatgta ctccggccgc cgggttctgc 8220
 tctttacgat ctgttagcgg ctaatcaagg cttcacctc ggataccgtc accaggcggc 8280
 cgttcttggc cttcttcgta cgctgcatgg caacgtcgt ggtgtttaac cgaatgcagg 8340
 tttctaccag gtcgtctttc tgctttccgc catcggctcg ccggcagaac ttgagtacgt 8400
 ccgcaacgtg tggacggaac acgcggcccg gcttgtctcc cttcccttc cggtatcgg 8460
 tcatggattc ggttagatgg gaaaccgcca tcagtaccag gtcgtaatcc cacacactgg 8520
 ccatgccggc cggccctgcg gaaacctcta cgtgcccgtc tggaagctcg tagcggatca 8580
 cctcgcagc tcgtcggta cgcttcgaca gacggaaaac ggccacgtcc atgatcgtc 8640
 gactatcgcg ggtgcccacg tcatagagca tcggaacgaa aaaatctggt tgctcgtcgc 8700

ccttggggcg cttcctaate gacggcgcaac cggctgcccg cggttgccgg gattctttgc 8760
 ggattcgatc agcggcccgt tgccacgatt caccggggcg tgcttctgcc tcgatgcgtt 8820
 gccgtgggc ggctgcccgc gccttcaact tctccaccag gtcacaccc agcggcccgc 8880
 cgatttgatc cgggccgat ggtttgcgac cgtcacccc attcctcggg cttgggggtt 8940
 ccagtccat tgcagggccg gcagacaacc cagccgctta cgcctggcca accgcccgtt 9000
 cctccacaca tggggcattc cacggcgtcg gtccctggtt gttcttgatt ttccatgccg 9060
 cctcctttag ccgctaaaat tcatctactc atttattcat ttgctcattt actctggtag 9120
 ctgcgcgatg tattcagata gcagctcggc aatggtcttg ccttggcgta ccgctacat 9180
 cttcagcttg gtgtgatcct ccgcccgaac ctgaaagtg acccgcttca tggctggcgt 9240
 gtctgccagg ctggccaacg ttgcagcctt gctgctcgt gcctcggac ggcccgaact 9300
 tagcgtgttt gtgcttttgc tcattttctc tttacctcat taactcaaat gagttttgat 9360
 ttaatttcag cggccagcgc ctggacctcg cgggcagcgt cgcctcggg ttctgattca 9420
 agaacggttg tgccggcggc ggcagtgcct ggtagctca cgcctcgtg gatacgggac 9480
 tcaagaatgg gcagctcgtc cccggccagc gcctcggcaa cctcaccgc gatgcgcgtg 9540
 cctttgatcg cccgcgacac gaaaaggcc gctttagacc ttccatcgt gacctaatg 9600
 cgctgcttaa ccagctccac caggtcggcg gtggccata tgtcgtagg gcttggctgc 9660
 accggaatca gcacgaagtc ggctgccttg atcgcggaca cagccaagtc cggcgcctgg 9720
 ggcgtccgt cgatcactac gaagtccgc cggccgatgg ccttcacgtc gcggtcaatc 9780
 gtggggcgt cgatccgac aacggttagc gttgatctt cccgcacggc cgcccaatcg 9840
 cgggcaactgc cctggggatc ggaatcgact aacagaacat cggccccgc gagttgcagg 9900

gcgcgggcta gatgggttgc gatggtcgtc ttgacctgacc cgccctttctg gtttaagtaca 9960
 gcgataacct tcatgcgttc ccccttgcgia tttgtttatt tactcatcgc atcatatacg 10020
 cagcgaccgc atgacgcaag ctgttttact caaatacaca tcaccttttt agacggcggc 10080
 gctcggtttc ttcagcgcc aagctggccg gccaggccgc cagcttgca tcagacaaac 10140
 cggccaggat tcatgcagc cgcacggttg agacgtcgc gggcggctcg aacacgtacc 10200
 gggcccgat catctccgc tcgatctctt cggtaatgaa aaacggttcg tcttgccgt 10260
 ctggtgctg tttcatgctt gttctcttg gcgttcattc tcggcggccg ccaggcgtc 10320
 ggctcggtc aatgcgtcct cacggaaggc accgcgccgc ctggcctcgg tggcgtcac 10380
 ttctcgtg cgtcaagtg cgcggtacag ggtcgagcga tgcacgcaa gcagtgcagc 10440
 cgctctttc acggtgcggc ctctctggtc gatcagctcg cggcgtgcg cgatctgtgc 10500
 cggggtgagg gtagggcggg ggccaaactt cacgcctcgg gccttggcgg cctcgcgcc 10560
 gctccgggtg cggctgatga ttagggaacg ctggaactcg gcaatgccg cgaacacggt 10620
 caacaccatg cggccggccg gcgtggtggt gtcggccac ggctctgcca ggctacgag 10680
 gcccgcgcc gcctctgga tgcgctcggc aatgtccagt aggtcgcggg tgctgcggc 10740
 caggcgtct agcctgtca ctgtcacaac gtcgccaggg cgtaggtggt caagcatcct 10800
 ggccagctcc gggcgtcgc gcctggtgcc ggtgatcttc tcgaaaaca gcttggtgca 10860
 gccggccgcg tgcagttcgg cccgttggtt ggtcaagtcc tggctcgtcg tgctgacgcg 10920
 ggcatagccc agcaggccag cggcggcgt ctgttcatg gcgtaatgtc tccggttcta 10980
 gtcgcaagta ttctacttta tgcgactaaa acacgcgaca agaaaacgcc aggaaaaggg 11040

cagggcggca gcctgtcgcg taacttagga cttgtgcgac atgtcgtttt cagaagacgg 11100
 ctgcactgaa cgtcagaagc cgactgcact atagcagcgg aggggttgga tcgatccctg 11160
 ctcgcgagg ctgggtgcc a gctctcggg taacatcaag gcccgatcct tggagccctt 11220
 gccctcccgc acgatgatcg tgccgtgatc gaaatccaga tccttgacce gcagttgcaa 11280
 accctcactg atccgatgc ccgttccata cagaagctgg gccaacaac gatgctcgcc 11340
 ttccagaaaa ccgaggatgc gaaccacttc atccggggtc agcaccaccg gcaagcggcc 11400
 ggacggccga ggtcttccga tctcctgaag ccagggcaga tccgtgcaca gcacttgccg 11460
 tagaagaaca gcaaggccgc caatgcctga cgatgcgtgg agaccgaaac cttgcgctcg 11520
 ttgccagcc aggacagaaa tgctcgact tcgctgctgc ccaaggttgc cgggtgacgc 11580
 acaccgtgga aacggatgaa ggcacgaacc cagtggacat aagcctgttc ggttcgtaag 11640
 ctgtaatgca agtagcgtat gcgctcacgc aactggtcca gaaccttgac cgaacgcagc 11700
 ggtggtaacg gcgcagtggc ggttttcatg gcttgttatg actgtttttt tggggtacag 11760
 tctatgcctc gggcatccaa gcagcaagcg cgttacccg tgggtcgatg tttgatgtta 11820
 tggagcagca acgatgttac gcagcagggc agtcgccta aaacaagtt aaacatcatg 11880
 agggaagcgg tgatcgcca agtatcgact caactatcag aggtagttgg cgtcatcgag 11940
 gccatctcg aaccgacgtt gctggccgta ctttgtacg gtcgccagt ggatggcggc 12000
 ctgaagccac acagtgatat tgatttctg gttacggtga ccgtaaggct tgatgaaca 12060
 acgcgcgag ctttgatcaa cgacctttg gaaacttcgg cttcccctgg agagagcgag 12120
 attctccgcg ctgtagaagt caccattgtt gtgcacgacg acatcattcc gtggcgttat 12180
 ccagctaage gcgaactgca atttggagaa tggcagcgca atgacattct tgcaggtatc 12240

ttcgagccag ccacgatcga cattgatctg gctatcttgc tgacaaaagc aagagaacat 12300
 agcgttgccct tggtaggtcc agcggcggag gaactctttg atccggttcc tgaacaggat 12360
 ctatttgagg cgctaaatga aaccttaacg ctatggaact cgccgcccgga ctgggctggc 12420
 gatgagcgaa atgtagtgct tacgttgtcc cgcatttggg acagcgcagt aaccggcaaa 12480
 atcgcgccga aggatgtcgc tgccgactgg gcaatggagc gcctgccggc ccagtatcag 12540
 cccgtcatac ttgaagctag acaggttat ctggacaag aagaagatcg ctggcctcg 12600
 cgcgcagatc agttggaaga atttgtccac tacgtgaaag gcgagatcac caaggtagtc 12660
 ggcaaataat gtctaacaat tcgttcaagc cgacgccgct tcgcggcgcg gcttaactca 12720
 agcgttagat gcaactaagca cataattgct cacagccaaa ctatcaggtc aagtctgctt 12780
 ttattatfff taagcgtgca taataagccc tacacaaatt gggagatata tcatgaaagg 12840
 ctggctffff ctgttatcg caatagttgg cgaagtaatc gcaacatccg cattaanaatc 12900
 tagcgagggc ttiaactaagc tagcttgctt ggtcgttccg gtaccgtgaa cgtcggctcg 12960
 attgtacctg cgttcaaata ctttgcgac gtgttgcgcg cctgcccggt gcgtcggctg 13020
 atctcacgga tcgactgctt ctctcgaac gccatccgac ggatgatggt taaaagtccc 13080
 atgtgatca ctccgttccc ccgtcgtca ccgtgttggg gggaaggtgc acatggctca 13140
 gttctcaatg gaaattatct gcctaaccgg ctcagttctg cgtagaaacc aacatgcaag 13200
 ctccaccggg tgcaaagcgg cagcgg 13226