

벼물바구미 (*Lissorhoptrus oryzophilus*) 내충성 GM 벼에서 T-DNA와 게놈의 인접부위 분석

이진형 · 신공식 · 서석철 · 임성렬 · 임명호 · 우희종 · 친 양 · 권순종 · 박순기

Analysis of junction site between T-DNA and plant genome in *Lissorhoptrus oryzophilus* resistance GM rice

Jin-Hyoung Lee · Kong-Sik Shin · Seok-Cheol Suh · Seong-Lyul Rhim · Myung-Ho Lim · Hee-Jong Woo · Yang Qin · Soon-Jong Kweon · Soon-Ki Park

Received: 15 July 2014 / Revised: 12 September 2014 / Accepted: 25 September 2014

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Four transgenic rice lines harboring insect-resistant gene *cry3A* showed ideal field performances characterized by high considerable resistance to rice water weevil (*Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel). In this study, we estimated the insertion number of foreign genes, and analyzed the flanking sequences of T-DNAs in rice genome. As a result, T-DNA of BT12R1 line was inserted in exon region of rice chromosome 10. Two copies of T-DNAs were inserted in line BT12R2. BT12R3 line was analyzed at only left border flanking sequence. BT12R4 line was confirmed one copy of foreign gene insertion at the position 24,516,607 ~ 24,516,636 of rice chromosome 5, accompanied by a deletion of 30 bp known genomic sequences. This intergenic position was confirmed none of expressed gene and any deletion/addition of T-DNA sequence. In conclusion, these molecular data of rice water weevil resistant Bt rice would be used to conduct the biosafety and environment risk assessment for GM crop commercialization.

서론

벼물바구미(*Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel)는 딱정벌레목 바구미 과에 속하는 벼의 해충으로 국내외적으로 벼 재배에 치명적인 피해를 주고 있는 실정이다. 벼물바구미는 미국 동부에서 서식하던 고유 충이었으나 1880년대 이 지역에서 벼 해충으로 대두되었고(Webb 1914), 1959년 북부 캘리포니아에서 발견된 후 전세계로 널리 확산되었다(Lange and Grigarick 1959). 아시아 유입은 1976년에 일본의 아이치현에서 발견된 이후 10년 동안에 일본 전역으로 확산되었다(Japan Plant Protection Association 1986). 우리나라는 1988년 경남 하동에서 처음 발견되었으며(Uhm et al. 1989), 이와 비슷한 시점에 중국에 유입되어 아시아 전역으로 확산되었다(Zhai et al. 1997). 벼물바구미 성충은 벼 잎의 엽육을 갇아먹어 어린 묘에 피해를 주고, 유충은 뿌리로 이동하여 뿌리의 내부조직을 가해하여 초장과 뿌리의 감소, 생육지연 등의 피해로 벼 수확량의 20% 이상을 감소시킨다고 알려져 있다(Shang et al. 2004; zou et al. 2004; Saito et al. 2005).

벼물바구미 방제는 대부분 유기살충제를 사용하고 있으나, 살충제의 유해성과 비 목표인 무척추동물에 부정적인 영향을 미치게 되는 문제점으로 인해 새로운 방제 전략으로 빠른 시기의 이양, 이양 후 논 전면에서 수면처리 등의 방법이 이용되고 있고(Stout et al. 2002; Espino et al. 2009; Stout et al. 2011), 최근에는 효과적인 방제를 위한 생명공학기술을 이용한 저항성 작물 개발 연구가 이루어지고 있다.

Bacillus thuringiensis 균주로부터 분리한 *cryIII* 유전자는 딱정벌레목 해충에 살충성을 가지고 있어 효율적으로 딱

J.-H. Lee · K.-S. Shin (✉) · S.-C. Suh · M.-H. Lim · H.-J. Woo · Y. Qin · S.-J. Kweon · S.-K. Park
국립농업과학원 농업생명자원부
(Department of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Jeonju-si 560-500, Korea)
e-mail: kongsiks@korea.kr

S.-L. Rhim
(주)인우코퍼레이션
(Inwoo Cooperation Ltd., Weedang Bldg. 2Fl. #50-8, Banglee-Dong, Songpa-Gu, Seoul 130-050, Korea)

정벌레목 해충을 방제 할 수 있다고 알려져 있으며(Hoeft and Whiteley 1989; Krieg et al. 1989), *cryIII* 유전자를 이용한 형질전환으로 토마토(Rhim et al. 1995), 감귤(Rhim et al. 2004), 감자(Jouzani et al. 2008), 고구마(González et al. 2008), 옥수수(Hibbard et al. 2010) 등의 연구가 보고되었고, 또한 *cry3A* 유전자를 도입한 감자와 알팔파의 기내 및 포장실험 실험에서 딱정벌레목에 대한 살충성이 확인되었다(Zhou et al. 2012; Tohidfar et al. 2013).

최근 국립농업과학원에서는 *cry3A* 유전자 형질전환 벼를 육성하였으며, GMO 포장 내 생물검정 연구를 통해 벼물바구미에 대한 내충성을 확인하였다(Lee et al. 2013). 이와 같이 외래유전자를 도입하여 형질전환된 GM작물을 상업화하기 위해서는 해당 GM작물에 대한 위해성 평가 과정이 선행 되어야 하며, 이를 위해서는 개발 작물의 분자생물학적 안정성 확인으로 도입유전자의 구조 및 도입위치가 규명되어야 한다. 최근 연구에서 도입유전자를 운반하는 과정 중에 LB나 RB 인접부위의 운반체 backbone 유전자 일부 또는 전체 유전자가 함께 식물체의 gDNA에 도입되는 사례를 보여주고 있다(Kononov et al. 1997; Kim et al. 2003; Kim and Lee 2007). 이러한 경우 식물체의 genomic DNA에 운반체의 염기서열이 삽입되는 비율은 20~50% 정도이나 높게는 75%까지도 나타난다(De Buck et al. 2000; Kuraya et al. 2004). 또한 border의 상당부분이 결실되거나 전체 border의 염기서열 외에 도입된 T-DNA의 일부만도 절단되어 결실되는 경우도 보고되었다(Stahl et al 2002; Kim et al 2003; Kuraya et al 2004).

따라서, 본 연구에서는 벼물바구미 내충성 형질전환 벼 4 계통의 T-DNA 도입위치를 확인하고, 이중 생물검정 결과가 보다 우수한 BT12R4 계통의 염색체내의 도입유전자의 구조를 분석하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에서는 농촌진흥청 국립농업과학원에서 육성된 형질전환 벼 4계통(BT12R1, BT12R2, BT12R3 그리고 BT12R4)

의 벼물바구미 내충성 벼를 실험재료로 사용하였고, 대조제로는 형질전환 모본인 낙동벼(*Oryza sativa* cv. Nagdong)를 활용하였다(Lee et al. 2013). 형질전환 벼는 모두 벼 뿌리 특이프로모터(RcG2)와 nopaline synthase terminator (Tnos)를 사용하여 프로모터와 딱정벌레목 살충성 유전자인 *cry3A*를 상시 발현되도록 T-DNA를 구성한 식물형질전환 벡터 BT12R이 사용되었으며(Fig. 1), *Agrobacterium* strain LBA4404를 이용한 *Agrobacterium*-매개 형질전환 방법으로 제조되었다(Hiei et al. 1994). 선발마커는 bar 유전자를 사용하였으며 Southern, northern, western blot 분석을 수행하여 전이 유전자가 1 사본 삽입되고 벼물바구미에 내충성을 보이는 4계통의 형질전환벼를 선발하여 인접서열 분석에 사용하였다.

도입유전자 도입위치 확인

형질전환 벼에서 total DNA의 추출은 Qiagen 사의 DNeasy Plant mini Kit (USA)를 이용하였으며, 제작사에서 제공하는 실험지침에 따라 실험을 수행하였다. 추출된 total DNA는 NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc. Wilmington, DE, USA)를 이용하여 농도를 측정하고, 260/280 nm 값이 1.8-2.0 사이인 DNA용액을 실험에 이용하였다. 형질전환 벼에서 도입유전자의 삽입위치 확인은 Bugert et al. (2001)이 보고한 PCR-walking 방법을 개량하여 사용하였다. 실험에 사용된 primer는 Table 1에 나타내었고 구체적 실험방법은 다음과 같다. 500 ng의 total DNA는 2 U의 *HincII*, *HaeIII* 제한효소를 이용하여 각각 DNA를 완전절단 시킨 뒤 5 U의 T4 DNA ligase (Takara, Japan)과 50 pmol의 adaptor DNA를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켜 도입유전자 위치 확인을 위한 PCR 주형을 제조하고 두 단계의 PCR을 수행하였다. 일차 PCR은 전체 20 ul pre-mixture 반응물 안에 0.5 pmol의 Ada1과 LB1 또는 RB1 primer를 첨가하여 PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA)를 이용하여 반응시켰다. 일차 PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 전 처리한 후, 94°C에서 30초, 67°C에서 1분, 72°C에서 1분간을 기본주기로 하여 총 20회 반복 반응하고 72°C에서 10분간 최종 증폭시켰다. 이차 PCR은 일차 PCR 생성물 5 ul을 주형으로 하여 Ada2

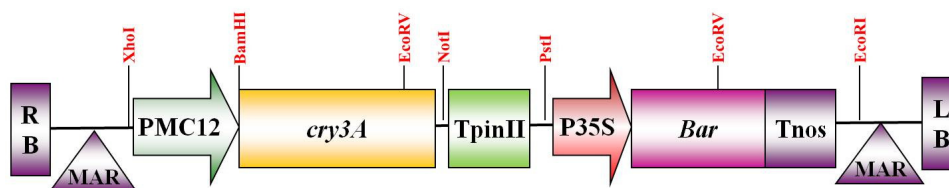


Fig. 1 Schematic diagram of the T-DNA region of the vector BT12R. PMC12: modified rice Rcg2 promoter; *cry3A*: *cry3A* toxin gene; TpinII: proteinase inhibitor II terminator; P35S: CaMV 35S promoter; *Bar*: phosphinothricin acetyltransferase gene; Tnos: nopaline synthase terminator; MAR: matrix attachment region; LB and RB: T-DNA left and right borders, respectively

Table 1 Sequences of primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Specific gene
Ada1	GCGTAATACGACTCACTATAGCAATTAACC	Adaptor
Ada2	GACTCACTATAGCAATTAAC	
LB1	CGGCTATTGGTAATAGGACACTGG	LB region
LB2	CAACCCTCAACTGAAACGGGCCGGA	
RB1	CTGATACCAGACGTTGCCCGCATAA	RB region
RB2	TCGTAAAAACTGCCTGGCACAG	
LBR-F	CGTCCGCAATGTGTTATTAAG	Genomic DNA sequence with the LB border
LBR-R	GGCAGTACTAGAAGTACTAGT	
RBL-F	GAATAGTCAGTCTGGAAGCA	Genomic DNA sequence with the RB border
RBL-R	CCC CGCTCATCGGCGGGGG	
MAR-F	CTGACGGCTTCCTATGCGTGC	Matrix attachment region
MAR-R	GGCAGCGTGTGGGAACACGAC	
35SBN-F	GATTAGCCTTTTCAATTTTCAAG	35s promoter, bar gene and nos terminator
35SBN-R	GTGGAGCTCGGTACCGGGCCC	

와 LB2 또는 RB2 primer를 사용하여 94°C에서 5분간 전처리 한 후 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분간을 반응주기로 전체 40회 반복 반응시킨 후 72°C에서 10분간 최종 증폭하여 진행하였다. 증폭된 PCR 반응산물은 1% agarose gel에 전기영동 하여 확인하고, 증폭된 DNA 밴드는 HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC BioScience, Taiwan)를 이용하여 정제하였으며 LB2 또는 RB2 primer를 이용하여 ABI3730XL DNA 분석기(Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA)로 염기서열 분석하였다. 분석된 염기서열 정보는 RAP-DB의 BLASTn 프로그램 서치 (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/blast/>)와 NCBI의 Blast 프로그램 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)을 이용하여 분석하였다.

도입유전자의 구조 확인

형질전환 벼 계통의 도입유전자 삽입위치 정보와 도입된 T-DNA의 염기서열을 바탕으로 primer (Table 1)를 제작하여 벼물바구미 내충성벼 BT12R4 계통의 genomic DNA를 PCR 분석을 수행하였다. LB와 RB 부위와 인접한 벼 계통 염기서열에 특이적인 primer LBR-R과 RBL-F를 제작하고, T-DNA를 구성하는 LB와 RB 염기서열에 특이적인 primer LBR-F와 RBL-R를 Long PCR Enzyme Mix (Fermentas, Germany) 제품을 이용하여 실험 매뉴얼에 따라 PCR 반응을 진행하였다. 또한 MAR (Matrix attachment region)의 염기서열에 특이적인 primer (MAR-F 그리고 MAR-R)와 35S 프로모터, Bar 유전자 그리고 NOS 터미네이터 부위를 포함하는 primer (35SBN-F 그리고 35SBN-R)를 이용하여 동일한 방법으로 PCR을 수행하였다. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였고, pGEM-T easy vector

(Promega, Madison, WI, USA)와 ligation하여 *E. coli* strain DH5α competent cell에 heat shock을 주어 형질전환 하였다. PCR 생성물이 삽입된 벡터가 포함된 균주의 선발은 X-gal, IPTG가 포함된 LB (Luria broth) 고체배지에서 white colony를 선발하고 DNA를 추출하여 확인하였다. 추출된 DNA 플라스미드는 일차적으로 M13 forward와 reverse primer를 이용하여 양 방향 염기서열을 분석하였고, 분석된 염기서열 정보를 이용하여 primer를 재 합성한 후 순차적으로 염기서열 분석에 이용하였다. 염기서열 정보는 Clustal Omega 프로그램(EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk>)과 NCBI의 Blast 프로그램을 사용하여 형질전환 벡터 BT12R의 염기서열과의 비교 및 도입 유전자의 구조를 결정하였다

결과 및 고찰

유전자 도입위치 확인

아그로박테리움을 이용한 형질전환 방법(*Agrobacterium*-mediated transformation method)으로 벼물바구미 내충성 벼 4 계통을 국립농업과학원이 육성하였다. 형질전환 벼 계통들은 세대 전개에 따라 각 단계별 세대에서 *cry3A* 유전자 부분을 이용한 PCR 분석을 이용하여 선발하였고, Southern blot, RT-PCR 그리고 Western blot 분석 등의 방법으로 도입유전자 삽입 수(copy number)와 도입유전자인 *cry3A*의 안정적 발현을 확인하였다(Lee et al. 2013).

정확한 T-DNA 도입위치를 확인하기 위해서 BT12R로 명명된 4계통(BT12R1, BT12R2, BT12R3 그리고 BT12R4)의 벼물바구미 내충성 형질전환 벼에 대한 도입유전자

인접염기서열 분석을 수행하였다. 이차 PCR을 수행한 결과 BT12R1 계통은 LB와 RB의 각각 한 개씩의 밴드, BT12R2 계통은 LB 방향 두 개의 밴드, BT12R3 계통은 RB 방향의 한 개의 밴드를 얻었으며, 마지막으로 BT12R4 계통에서

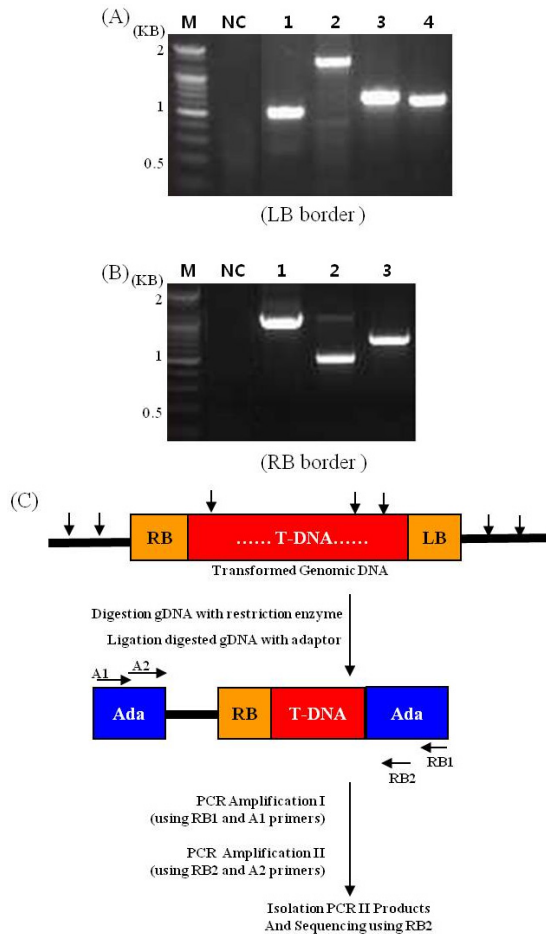


Fig. 2 2nd PCR amplification products of junction regions between T-DNA and rice genomic DNA. (A) M, 100bp DNA ladder; NC, wild-type control; lane 1-4, left border sequence of BT12R1 (*HincII*), BT12R2 (*HincII*), BT12R2 (*HaeIII*), BT12R4 (*HincII*). (B) M, 100bp DNA ladder; NC, wild-type control; lane 1-3, right border sequence of BT12R1 (*HincII*), BT12R3 (*HincII*), BT12R4 (*HaeIII*). (C) Flanking T-DNA Sequencing method consists of three main steps: (i) Digestion of the genomic DNA, (ii) Ligation of an adaptor, (iii) PCR amplification between two primers specific for the T-DNA and the adaptor, respectively

는 LB와 RB 방향으로 각각 한 개씩의 밴드를 얻을 수 있었다(Fig. 2). PCR 반응으로 얻은 각각의 증폭산물에 대한 염기서열을 분석하여 도입유전자의 삽입위치를 확인하였다. BT12R1 계통은 10번 염색체의 Serine/threonine protein kinase-related domain containing protein (Os10t0342300)을 구성하는 exon 부위에 한 개의 도입유전자가 삽입되었고, BT12R2 계통은 6번 염색체의 Lipase2C GDSL domain containing protein (Os06t0531900)의 2.6 kb upstream과 9번 염색체의 Similar to PSMD2 subunit (Os09t0326800)의 exon 부위에 각각 두 개의 도입유전자가 삽입되어 있음을 확인하였다. BT12R3 계통은 RB border 방향의 염기서열만 얻어졌으며, 3번 염색체의 Similar to CEL6=CELLULASE 6 (Os03t0736300)의 0.078 kb upstream 부위의 intergenic 부위에 도입유전자가 삽입되었다. 마지막으로 BT12R4 계통은 5번 염색체의 Hypothetical conserved gene (Os05t0497500)의 2.7 kb upstream의 intergenic 부위에 삽입되어 있음을 확인하였다(Table 2). 이전 벼물바구미 생물검정 결과에서 제일 우수한 BT12R4 계통이 단일 사본으로 intergenic 부위에 삽입되어(Fig. 3) 도입유전자 구조 확인을 위한 재료로 선발하였다.

벼 게놈 내 도입유전자의 구조 분석

벼물바구미 형질전환 벼 BT12R4 계통의 도입유전자 구조를 확인하기 위해 도입 부분의 벼 인접 서열을 포함한 T-DNA의 각 부위에 대한 염기서열 분석을 실시 하였다. 도입된 T-DNA의 LB 외부의 851 bp 크기의 염기서열과 RB 외부의 염기서열 944 bp 크기의 염기서열을 분석하였

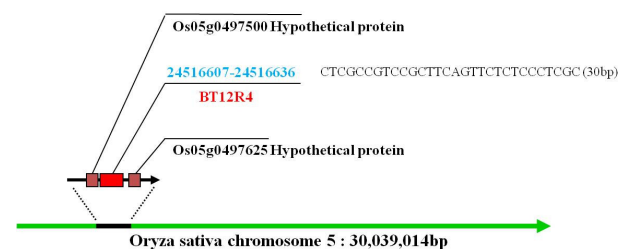


Fig. 3 Position of the T-DNA flanking sequence amplified from BT12R4 transgenic rice plant. T-DNA integrated between 24516608 ~ 24516637 bp of the rice chromosome 5 and 30 bp known genomic sequences were deleted

Table 2 Analysis of integration sites of T-DNA insertions in BT12R transgenic rice lines

Lines	Copy #	Number of Chr.	Insertion position(Gene)	Vector backbone integration	Plant generation
BT12R1	1	Chr. 10	Exon (Os10t0342300)	-	T4
BT12R2	2	Chr. 9	Exon (Os09t0326800)	-	T4
		Chr. 6	Intergenic		
BT12R3	1	Chr. 3	Intergenic	-	T4
BT12R4	1	Chr. 5	Intergenic	NO	T4

고, NCBI BLAST로 검색한 결과 온전한 단일 사본의 T-DNA가 도입 되었으며, 반면에 T-DNA의 도입위치에서의 벼 genomic DNA의 염색체 5번 24516607-24516636 위치의 30 bp 크기의 짧은 단편의 벼 DNA가 결실된 것을 확인하였다(Fig. 4). 이전 연구에서는 도입유전자를 운반하는 과정 중에 LB나 RB 인접부위의 운반체 backbone 유전자 일부 또는 전체 유전자가 함께 식물체의 핵 DNA에 도입되는 사례를 보여주고 있는데(Kim et al. 2003; Kuraya et al. 2004; Kim and Lee 2007), 이러한 GM작물의 안전성 평가를 염두에 둔 상업화 과정에서는 backbone DNA 삽입으로 인해 발생할 수 있는 위해성 여부를 확인하기 어려워 일반적으로 배제되고 있다. 본 실험에서는 형질전환과정으로 많이 발생하는 T-DNA 외부의 backbone 염기서열의 삽입(insertion) 여부를 확인한 결과 border 외부의

염기서열의 삽입은 보이지 않았다. 또한 벼물바구미 내충성 형질전환체에 도입되어 있는 T-DNA 내부의 MAR (Matrix attachment region)과 *Bar* 유전자 카세트의 염기서열을 분석한 결과, 923 bp 크기의 염기서열이 MAR 부위의 염기서열과 99%의 상동성을 보였으며, 856 bp 크기의 염기서열 또한 35S 프로모터/*Bar* 유전자/ *Nos* 터미네이터 카세트와 99%의 상동성을 확인하였다(Fig. 5). 위의 분석 결과를 통해 벼물바구미 내충성벼 BT12R4 계통은 도입 유전자가 단일사본으로 벼 염색체 상의 intergenic 부위에 삽입되었고, border 내부의 염기서열은 결실되어 있었으며, 벡터 backbone이 포함되지 않았음을 확인하였다. 이전 벼물바구미의 생물검정결과(Lee et al. 2013)와 본 연구 결과를 통해서 BT12R4 계통이 해충 저항성 GM벼의 실용화를 위한 재료가 될 수 있으리라 판단하였다.

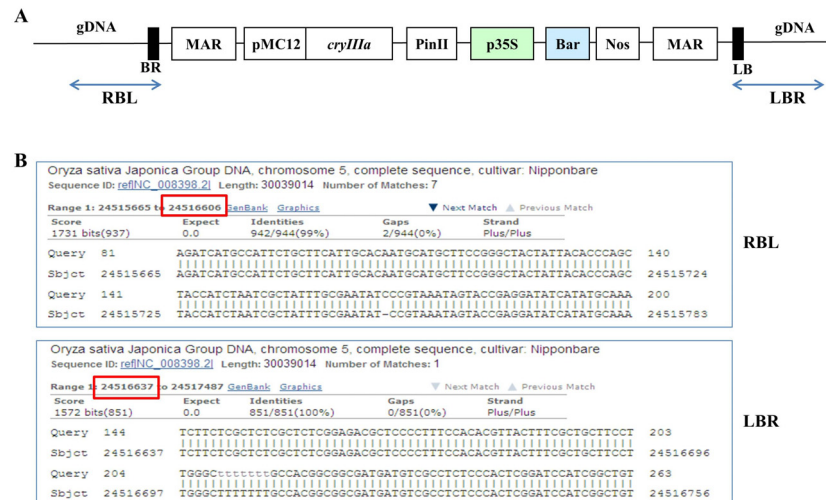


Fig. 4 Diagram of T-DNA BT12R binary vector and primer position for the indicated vector backbone insertion (A). NCBI Blast result of T-DNA flanking sequences and alignment with *Oryza sativa* genome (B)

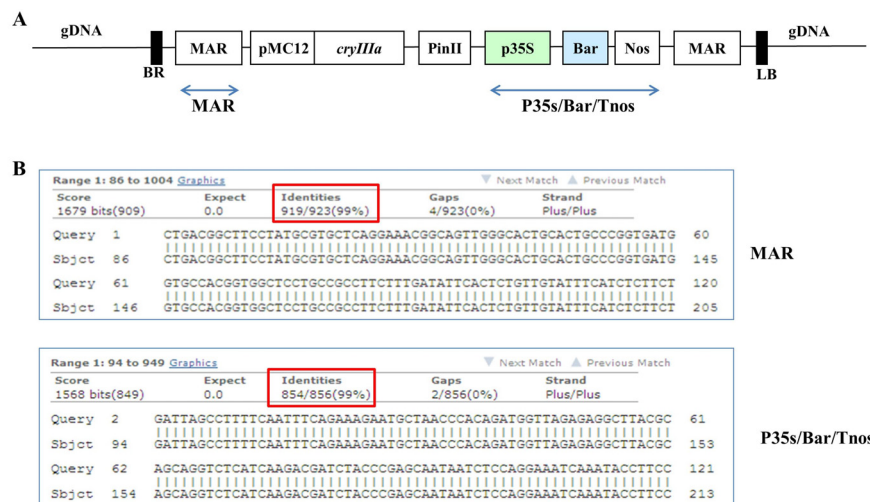


Fig. 5 Diagram of T-DNA BT12R binary vector and primer position for the indicated T-DNA inserted in transgenic rice (A). Nucleotide sequence comparison between the BT12R binary vector and T-DNA inserted in transgenic rice (B)

적 요

Bacillus thuringiensis 균주로부터 분리한 *cry3A* 유전자는 딱정벌레목 해충에 살충성을 가지고 있어서 효율적으로 딱정벌레목 해충을 방제 할 수 있다고 알려져 있다. 국립 농업과학원에서는 *cry3A* 유전자 형질전환벼를 육성하였고, GMO 포장 생물검정 연구를 통해 벼물바구미에 대한 내충성을 확인하였다. 본 연구에서는 벼물바구미 내충성 벼 4 계통에 대한 도입유전자 특성을 분자생물학적 방법으로 검정하여 유전자의 도입 사본 수와 도입유전자의 염기서열 등의 분석결과를 제시하였다. BT12R1 계통은 염색체 10번의 exon 부위에 도입유전자가 단일 사본으로 삽입되었으며, BT12R2 계통은 두 개의 사본으로 삽입되었고, BT12R3 계통은 LB 인근의 염기서열만 확인되었다. BT12R4 계통의 경우 단일 사본의 도입유전자가 염색체 5번의 24,516,607~24,516,636 위치에 30개의 염색체 염기서열이 결실된 상태로 삽입되었다. 이 도입위치는 벼의 내재 유전자가 발현하지 않는 intergenic 부위로 판명되었으며, 도입유전자 이외의 벡터 염기서열이 삽입되지 않음을 확인하였다. 이러한 벼물바구미 내충성벼 BT12R4 계통에 대한 분자생물학적 분석 결과는 차후 GM 작물 실용화의 환경 위해성 및 안전성 평가에 대한 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술연구개발사업(과제번호: PJ00863404)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Bugert P, Decker S, Klüter H (2001) Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders. *BioTechniques* 30:496-504
- Espino L, Way MO, Pearson R, Nunez M (2009) Effect of planting date on *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae) density-yield relationship on rice in southeastern Texas. *J Econ Entomol* 102:1536-1545
- De Buck S, De Wilde C, Van Montagu M, Depicker A (2000) T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium* mediated transformation. *Mol Breed* 6:459-468
- González RG, Sánchez DS, Guerra ZZ, Campos JM, Quesada AL, Valdivia RM, Arencibia AD, Bravo KQ, Caligari PDS (2008) Efficient regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. *Asia Pac J Mo. Biol Biotechnol* 16 16:25-33
- Hibbard BE, Clark TL, Ellersieck MR, Meihls LN, El Khishen AA, Kaster V, Steiner HY, Kurtz R (2010) Mortality of western corn rootworm larvae on MIR604 transgenic maize roots: field survivorship has no significant impact on survivorship of F1 progeny on MIR604. *J Econ Entomol* 103:2187-2196
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6:271-282
- Hoefte H, Whiteley HR (1989) Insecticidal Crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53:242-255
- Japan Plant Protection Association (1986) Control of the Rice Water Weevil in Japan (in Japanese)
- Jouzani GS, Goldenkova IV, Piruzian ES (2008) Expression of hybrid cry3aM-licBM2 genes in transgenic potatoes (*Solanum tuberosum*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 92:321-325
- Kim JH, Lee S (2007) Analysis of junction between T-DNA and plant genome in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J of plant biology* 50:455-460
- Kim SR, Lee J, Jun SH, Park S, Kang HG, Kwon S, Ahn GH (2003) Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol Biol* 52:761-773
- Krieg, Aloisius, Huger, Alois S (1989) Protein toxin from *Bacillus thuringiensis* which is toxic to *coleopteran*. Patent US 488 9918
- Kononov ME, Bassuner B, Gelvin SB (1997) Integration of T-DNA vector 'backbone' sequence into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J* 11:945-957
- Kuraya Y, Ohta S, Fukuda M, Hiei Y, Murai N, Hamada K, Ueki J, Imaseki H, Komari T (2004) Suppression of transfer of non-T-DNA 'vector backbone' sequences by multiple left border repeats in vectors for transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Breed* 14: 309-320
- Lange WH, Grigarick AA (1959) Rice water weevil, beetle pest in rice growing areas of southern states discovered in California. *Calif. Agric* 13(8):10-11.
- Lee JH, Shin KS, Suh SC, Rhim SL, Lee TH, Lim MH, Woo HJ, Qin Y, Cho HS (2013) CryIIIa toxin gene expression in transgenic rice confers resistance to rice water weevil. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 115:243-252.
- Rhim SL, Cho HW, Kim BD, Schnetter W, Geider K (1995) Development of insect resistance in tomato plants expressing the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Molecular Breeding* 1:229-236.
- Rhim SL, Kim IG, Jin TE, Lee JH, Kuo CI, Suh SC, Huang LC (2004) Transformation of Citrus with Coleopteran Specific δ -endotoxin Gene from *Bacillus thuringiensis* ssp. *Tenebrionis*. *J Plant Biotechnol* 6:21-24
- Saito T, Hirai K, Way MO (2005) The rice water weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus* Kusche (Coleoptera: Curculionidae). *Appl Entomol Zool* 40:31-39
- Stahl R, Horvath H, van Fleet J, Voetz M, von Wettstein D, Wolf

- N (2002) T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2146-2151
- Shang H, Stout MJ, Zhang Z, Cheng J (2004) Rice water weevil (*Coleoptera: Curculionidae*) population dynamics in Louisiana. *J Entomol* 39:623-42
- Stout MJ, Riggio MR, Zou L, Roberts R (2002) Flooding influences ovipositional and feeding behavior of the rice water weevil (*Coleoptera: Curculionidae*). *J Econ Entomol* 95:715-21
- Stout MJ, Frey MJ (2007) Evaluation of thiamethoxam as a seed treatment against the rice water weevil. *Ann Res Rpt Rice Res Stn LSU Agric Ctr* 99:299-300
- Stout MJ, Hummel NA, Frey MJ, Rice WC (2011) The Impact of Planting Date on Management of the Rice Water Weevil in Louisiana Rice. *J Econ Entomol* 5:1-9
- Tohidfar M, Zare N, Jouzani GS, Eftekhari SM (2013) Agrobacterium-mediated transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) using a synthetic cry3a gene to enhance resistance against alfalfa weevil. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 113:227-235
- Uhm KB, Lee YI, Kim YH, Choi KM, You KS (1989) Studies on the future dispersion of the rice water weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus*, in Korea. *Research Report RDA* 31:23-28
- Webb JL (1914) Notes on the rice water weevil (*Lissorhoptrus simplex* Say). *J Econ Entomol* 7:432-438
- Zhai BP, Cheng JA, Huang EY, Shang HW, Zheng XH, Wu J, Fang YJ, Xia WQ, Lu XJ (1997) Population dynamics of rice water weevil in double rice cropping area of Zhejiang Province, China. *Sci Agric Sin* 30(6):23-29
- Zou L, Stout MJ, Dunand RT (2004) The effects of feeding by the rice water weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel, on the growth and yield components of rice, *Oryza sativa*. *Agric For Entomol* 6:47-53
- Zhou Z, Pang J, Guo W, Zhong N, Tian Y, Xia G, Wu J (2012) Evaluation of the resistance of transgenic potato plants expressing various levels of Cry3A against the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) in the laboratory and field. *Pest Manag Sci* 68(12):1595-604