(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0048947
(43) 공개일자 2015년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0128379
(22) 출원일자 2013년10월28일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정기홍
경기 수원시 영통구 봉영로1517번길 73, 923동 1504호 (영통동, 벽적골9단지아파트)
문선옥
경기 용인시 기흥구 덕영대로2077번길 53, 204동 801호 (영덕동, 청현마을기흥데시앙아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 7 항

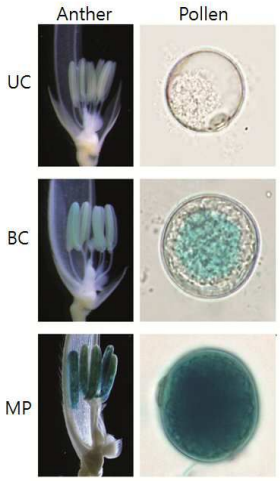
(54) 발명의 명칭 **화분 특이적 프로모터, 이를 포함하는 발현 벡터, 이에 의한 형질 전환 식물체 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 화분에 특이적으로 발현하는 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 프로모터는 화분의 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 특이적으로 조절하여 벼를 포함하는 주요 곡물의 화분 발달, 꽃가루 발달 등을 개선함으로써, 생산성이 증대된 작물을 육성하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

고현정

경기 용인시 처인구 동부로 719-12, (해곡동)

유요한

전북 익산시 동서로61길 34, 205동 1006호 (어양동, 부영2차아파트)

안진흥

경기 용인시 기흥구 탑실로 152, 210동 1703호 (공세동, 탑실마을대주피오레2단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009110

부처명 농촌진흥청 식물분자육종사업단

연구관리전문기관 경희대학교

연구사업명 차세대바이오그린 21사업

연구과제명 융합오믹스 연구기반 구축을 통한 수량성 증진 유용 유전자 대량 발굴 및 기작 규명

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2012.07.01 ~ 2014.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 화분에 특이적으로 발현되는 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 3

제2항의 벡터에 의해 형질 전환된 형질전환세포.

청구항 4

제2항에 따른 벡터 또는 제3항에 따른 형질전환세포로 형질 전환된 형질전환 식물체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 벼(Oryza sativa)인 형질전환 식물체.

청구항 6

제2항의 벡터로 식물을 형질 전환시켜 상기 외래 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 형질 전환 방법.

청구항 7

하기의 단계들을 포함하는 벼의 화분에 특이적으로 발현되는 벼 형질전환체의 제조방법:

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;

벼에 상기 벡터를 도입하는 단계; 및

상기 벡터가 도입되어 화분에 특이적으로 유전자가 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 화분에서 특이적으로 발현하는 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 벼(Oryza sativa)는 세계에서 가장 중요한 식량작물의 하나로 과거 20여년 동안 꾸준히 수량 증대에 힘써왔으나 현재 인구증가 추세로 볼 때 2020년이면 현재의 70%이상에 달하는 수량을 더 생산해야만 될 형편에 놓여있다. 그러나 벼가 재배되는 농지는 세계 각국의 공업화현상으로 갈수록 줄어들고 육종의 소재가 되는 새로운 유전자원은 고갈되어 외래 유용유전자의 도입이 요구되고 있다. 다행히 분자생물학의 발달로 외래 유용유전자의 분리 및 조작이 가능하게 되어 유용 유전자를 벼를 비롯한 많은 식물세포에 형질전환하여 새로운 유전자가 조합된 형질전환체를 얻음으로서 여러 가지 생명현상을 규명하는 유전자발현 연구는 물론 육종의 좋은 소재가 되고 있다. 이러한 형질전환을 이용한 신품종 생산은 앞으로 다가오는 21세기에는 고부가가치 산업으로 대두함은 물론이며 인류의 가장 큰 문제점으로 부각되는 식량문제를 어느 정도는 해결할 수 있으리라 생각된다.

[0003] 현재까지 알려진 형질전환 방법은 80년대에는 원형질체에 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol(PEG))과 전기

충격법(electroporation)으로 많은 형질전환체를 획득하였으며, 90년대 후반에는 유전자총 이용법이 보편화되었으며 최근에는 쌍자엽식물에서 널리 이용되어 왔던 아그로박테리움(Agrobacterium) 이용법도 많이 이용되고있다. 그밖에 화분법(pollen pathway), 미세주사(microinjection) 방법 등이 있다.

[0004] 프로모터는 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신 또는 특별한 조직에만 국한시켜 형질전환 목적을 달성할 수 있으며, 그 기능에 따라서 다음과 같이 분류할 수 있다.

[0005] 첫째로 전신발현 유도 프로모터를 들 수 있다. 식물 전신발현 유도 프로모터로는 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 쌍떡잎식물용 프로모터로 사용되고 있다. 벼 등의 외떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquithin) 유전자 프로모터들이 주로 이용되어 왔으며, 최근 벼 시토크롬 C유전자(OsOc1)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다(참조: 등록번호 10-0429335). 이들은 식물형질전환 기본 운반체 내에 선발마커로 이용되는 항생제나 제초제 저항성 유전자 및 리포터 유전자의 발현을 유도하기 위해 이미 내재되어 있으며, 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체 내 기능을 밝히고자 시도할 때 우선적으로 고려되는 프로모터들이다. 이러한 프로모터들은 조직-선택성 또는 기관-선택성이 결여되어 있기 때문에 형질전환시킨 선별마커 등이 전체 식물에서 발현됨으로써, 식물체 생장을 지연시키는 결과를 초래한다. 또한 프로모터의 특성상 도입한 유전자의 발현을 목적하는 기관에 국한되어 충분히 발현시키지 못하므로 형질전환체의 경제성이 떨어지게 된다.

[0006] 둘째로, 종자 특이적 프로모터를 들 수 있다. 대표적인 예로서 벼 주요 저장 단백질 유전자의 프로모터들로서 황금쌀(golden rice) 개발에 사용된 벼 글루테린(glutelin) 프로모터가 현재까지 외떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는 경우에 많이 사용되고 있고, 쌍떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는데 주로 사용되는 프로모터로는 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 및 애기장대의 종자에서 감마 토코페롤 메틸기 전이효소(γ-tocopherol methyl transferase:γ-TMT) 유전자 발현을 유도함으로써 비타민 E 생성을 증진시킨 연구에 사용된 당근 유래 DC-3 프로모터, 들깨 유래 올레오신(oleosin) 프로모터의 종자 특이발현 유도 특허출원(참조: 특허출원번호 10-2006-0000783) 사례가 있다. 상기 종자 특이적 프로모터들은 주로 종자 자체가 식량이나 식품 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 작물에서 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 주로 사용되고 있다.

[0007] 셋째로, 뿌리 특이 발현 프로모터이다. 애기장대 퍼옥시다제(peroxidase, prxEa)가 분리되어 뿌리 특이적 발현을 확인하였고, 최근 고구마 유래의 매즈 유전자(ibMADS)와 당 유도성 에이디피 글루코즈 파이로포스파타제(ADP-glucose pyrophosphatase, AGPase) 유전자가 분리되어 해당 프로모터가 뿌리에서 특이 발현을 유도하며 당근, 무에서 뿌리 특이적 일시적 발현을 유도함을 확인하여 특허 등록(대한민국 등록번호 제10-0604186호, 제10-0604191호)된 바 있다.

[0008] 넷째로 잎 등의 기타 조직 특이 프로모터를 들 수 있다. 잎 등의 광합성 조직에서만 강력한 유전자의 발현을 유도하는 벼와 옥수수 유래의 알비씨에스 (rbcS: ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 프로모터, 아그로박테리움 유래의 식물 뿌리 발현을 유도하는 RolD 프로모터, 감자 유래 괴경 특이 발현 유도 파타틴 (patatin) 프로모터, 토마토 유래의 과실 성숙 특이 발현 유도 피디에스 (PDS: phytoene synthase) 프로모터 등이 있다.

[0009] 한편, 소포자로부터 성숙화분으로의 발달과정은 웅성 배우자를 만드는 식물의 생식세대에 속하고 비교적 짧은 주기이나 종자식물의 존재 여부에 근간이 되는 중요한 생물학적 과정이며, 이러한 발생과정에 관여하는 유전자들은 농업적 활용도가 매우 크다. 특히, 소포자 및 화분 조직에서만 특이적으로 발현하는 프로모터를 포함하는 형질전환용 벡터를 제작함으로써 화분의 활성이 증가된 형질전환체를 육성하는데 이용될 수 있다. 이와 같은 방식으로 육성된 개체는 벼를 비롯한 주요작물에서 화분의 활성을 증가시켜 생산성을 증대시키는 등 농업적 활용도가 매우 크다.

[0010] 하지만 다른 조직 특이적 프로모터와 대비하여 화분 특이적으로 작용할 수 있는 프로모터에 관한 연구가 매우 부족한 실정이다. 화분의 발달은 온도와 밀접한 관계를 맺고 있으며 특히 고온에서는 화분의 발달이 저해된다. 현대는 지구의 기후변화로 인해 작물이 고온에 노출될 위험이 크며 그로 인해 화분발달 장애로 인한 생산성 감소가 발생할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 화분에서의 유전자 발현을 조절할 수 있는 프로모터의 개발은 중요하다. 그러므로 개발자의 의도에 따라 보다 정밀하게 화분에서의 발현을 조절할 수 있는 새로운 프로모터에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록 특허 제10-1185845호

(특허문헌 0002) 대한민국 등록 특허 제10-1015972호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신이 아닌 화분에 국한하여 발현시킬 수 있는 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 식물의 조직 또는 기관 특이적인 유전자 발현을 조절할 수 있는 프로모터들을 발굴함으로써, 식물의 특정 조직 또는 기관에 국한시켜 목적 유전자를 특이적으로 발현 또는 저해할 수 있는 시스템을 확립하고자 하였다. 이 과정에서 벼의 LOC_Os11g20384의 프로모터가 식물의 다른 조직보다 화분에서 특이적으로 발현이 이루어짐을 확인하였고, 이에 따라 상기 프로모터를 확보하여 이를 포함하는 발현벡터를 제조한 후 이를 식물에 도입하여 형질전환시킨 형질전환체에서 화분 특이적으로 리포터 유전자가 발현됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0014] 보다 상세하게 본 발명자들은 공개된 벼 에피메트릭스(affymetrix) 자료 983종을 수집하였고, 이들을 17개 기관별로 재분류를 하였다. 에피메트릭스 어레이(affymetrix array)는 한 번의 실험으로 57000 종의 프로브에 의해서 대변되는 유전자 발현을 분석 가능케 하며, 대규모로 수집된 에피메트릭스 어레이(affymetrix array) 자료의 재구성을 통해서 만들어진 기관별 발현 양상은 상당히 높은 재현성을 보여 주었다. 이 자료의 발현 패턴별 분석을 통해서 다양한 기관 및 조직 특이적 유전자들이 분리되었다. 그 중에서 본 발명자들은 화분에서 중요한 형질 발현에 필요한 프로모터 발굴에 관심을 가졌다.

[0015] 상기 방법을 통해서, 672 종의 유전자가 다른 유전자들에 비하여 화분에서 높은 발현 양상을 보여 주었다.

[0016] 이러한 유전자에 의해서 조절되는 유전자 발현양상은 이들 프로모터 3' 방향에서 GUS reporter 유전자를 발현시켜 그 활성을 식물체 내에서 측정함으로써 정밀하게 분석되었다.

[0017] 염기서열 해독 정보를 참고로 하여 LOC_Os11g20384의 ATG 앞 약 2,500 bp의 프로모터를 게놈 DNA PCR를 통해 분리하고 pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다.

[0018] 이렇게 분리된 프로모터를 pGA3383 벡터에 넣어, 형질전환된 식물체를 제작하였다. 형질전환 된 식물체에서 GUS 반응을 검증함으로써, 해당 프로모터를 이용하여 식물의 화분 특이적 유전자 발현을 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

[0019] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열인 벼의 LOC_Os11g20384의 프로모터를 포함하는 화분에 특이적으로 발현되는 프로모터를 제공한다.

[0020] 프로모터는 유전자의 환경적, 시기적 및 조직적 발현을 조절하는 필수적인 요소로서, 본 발명에 따른 화분 특이적 프로모터를 사용하여 식물체 내에서 외래 유용 유전자의 발현 부위를 화분 특이적으로 유도할 수 있다.

[0021] 본 발명은 벼의 LOC_Os11g20384의 프로모터로서, 외래 유전자의 발현이 화분에 특이적으로 이루어지도록 유도하는 화분 특이적 프로모터(이하 '본 발명의 프로모터'라 함)를 제공한다.

[0022] LOC_Os11g20384는 SacI homology domain containing protein을 암호하며, 17 개의 exon으로 구성되어있다. 597 아미노산으로 구성된 본 유전자의 프로모터는 서열번호 1의 염기서열을 갖는다.

[0023] 또한 본 발명은 상기 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0024] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며, DNA를 복제하고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘 다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서 발현 벡터는 재조합 DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입 시 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제 가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 게놈 내에 통합되는 것들을 포함한다.

[0025] 상기 통상의 벡터는 본 발명의 프로모터를 도입할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하나, 바람직하게는 pCAMBIA계열, pGA계열, pGWB계열, 예컨대, pGA3383, pCAMBIA3301, pCAMBIA3300, pGA3426, pGA3780, pGWB12, pGWB14와 같은 Ti-plasmid 및 이에 파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0026] 본 발명의 발현 벡터는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편을 포함한다.

[0027] "본 발명의 프로모터"와 "기능적으로 동등한 절편"은 본 발명의 프로모터와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분을 의미한다. 이러한 핵산 절편은 서열번호 1에 기재된 염기서열과 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지며, 이러한 핵산 절편은 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다. 또한, 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 프로모터는 공개된 벼 게놈 서열 상, LOC_Os11g20384의 앞쪽에 위치하는 서열로, 서열번호 1로 표시되는 염기 서열 중 일부가 추가 또는 삭제되더라도 공개된 벼 게놈 서열 상 LOC_Os11g20384의 앞에 위치한 서열과 상동성이 유지되어 실질적으로 동등한 효과를 나타낸다면 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.

[0028] 본 발명의 발현 벡터는 3' 방향에 목적 단백질에 대한 유전자가 발현되도록 한다.

[0029] 바람직하게는 상기 발현벡터는 화분에 특이적으로 발현시키고자 하는 유용한 외래 유전자를 포함할 수 있다.

[0030] 상기 외래 유전자는 화분에서 발현을 원하는 어떠한 유전자라면 무엇이든 무방하다.

[0031] 상기 발현벡터는 통상의 벡터에 본 발명의 프로모터를 도입한 것일 수 있으며, 이처럼 본 발명의 프로모터를 도입하여 발현벡터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공지의 방법에 따라 용이하게 실시 가능하다.

[0032] 또한 본 발명은 상기 벡터에 의해 형질 전환된 형질 전환 세포를 제공한다.

[0033] 상기한 재조합 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포; 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 임의의 식물 세포가 이용가능하다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 가능하다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되지 않으나, 줄기, 잎, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다.

[0035] 또한 본 발명은 상기 벡터 또는 상기 형질전환 세포로 형질 전환된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0036] "본 발명의 형질전환 식물체"와 "기능적으로 동등한 형질전환 식물체"는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 변이체와 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 이용하여 제조된 형질 전환 식물체로써, 화분에서의 특이적 프로모터 효과가 실질적으로 동등한 특징을 가지는 형질전환 식물체이다.

[0037] 본 발명의 식물체의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키기 위한 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 예를 들어, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al.,

June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D.et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen.Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.

[0038] 본 발명에서 형질전환되는 식물체는 본 실시예에서 사용된 벼(Oryza sativa L.)를 포함한 단자엽식물 뿐만 아니라 쌍자엽 식물도 제한 없이 사용할 수 있다.

[0039] 바람직하게는, 단자엽 식물, 더욱 바람직하게는 벼(Oryza sativa L.)가 사용된다.

[0040] 이러한 변이체는 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.

[0041] 또한 본 발명은 상기 벡터로 식물을 형질 전환시켜 상기 외래 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 형질 전환 방법을 제공한다.

[0042] 바람직하게, 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 벼에 상기 발현벡터를 도입하는 단계; 및 상기 발현벡터가 도입되어 벼의 화분에 특이적으로 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 식물의 형질 전환 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0043] 본 발명의 화분 특이적 프로모터는 화분의 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 특이적으로 조절하여 벼를 포함하는 주요 곡물의 화분 발달, 꽃가루 발달 등을 개선함으로써, 생산성이 증대된 작물을 육성하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 히트맵(Heatmap)으로 벼의 화분 영역에서 우선적으로 발현을 보이는 분리된 유전자와 그 발현 양상을 나타내는 도이다.

도 2는 본 발명의 프로모터 활성 확인을 위한 T-DNA 삽입 위치를 나타내는 도이다.

도 3은 1A-13819 계통이 LOC_Os11g20384 유전자에 co-segregation된 것을 나타내는 PCR 결과이다.

도 4는 LOC_Os11g20384 유전자가 성숙한 화분에서 발현이 되고 있음을 보여주기 위한 시기별 GUS 발현 양상과 RNA의 발현 양상을 나타내는 RT-PCR 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 LOC_Os11g20384 유전자의 화분 특이적 발현을 GUS staining을 통해 확인한 도이다.

도 6은 LOC_Os11g20384 유전자의 화분 특이적 발현을 나타내는 마이크로 어레이 결과를 나타내는 도이다.

도 7은 LOC_Os11g20384 프로모터를 포함하는 GUS 식물체 제조를 위해 사용한 벡터의 다이어그램을 나타내는 도이다.

도 8은 LOC_Os11g20384 유전자의 ATG 앞 약 2.5Kb 프로모터를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 아래의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0046] **<실시예 1> 화분에 특이적으로 발현되는 벼 유전자 대량 선별**

[0047] 화분에 특이적으로 발현하는 유전자를 선별하기 위하여, 공개된 마이크로어레이 데이터베이스인 NCBI GEO(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)에서 수집된 983종의 벼 에피메트릭스 마이크로어레이(affymetrix microarray) 자료를 17개 기관별/조직별로 재구성하여 유전자 발현 분석용 데이터베이스를 구축하였다.

[0048] 이를 표 1에 나타내었다.

[0049] 표 1. 기관별/조직별로 재구성된 유전자 발현 분석용 데이터베이스

순서	기관/조직	샘플숫자
1	캘러스 /현탁 세포	42
2	잎	129
3	끝잎	121
4	화분	150
5	순(shoot)	164
6	줄기	8
7	전체 절간(Whole_internode)	9
8	생(SAM)	27
9	원추꽃차례(Panicle)	112
10	성장중인 꽃밥 (Developing_anther)	44
11	성숙된 꽃밥(Mature_anther)	20
12	씨방/암술머리	17
13	내화류 외화영(Palea_lemma)	4
14	씨앗	32
15	배(Embryo)	3
16	배낭(Embryo sac)	27
17	내배유(Endosperm)	15

[0050]

[0051] K-means clustering 분석 방법을 이용하여, 상기 표 1에 제시된 유전자 발현 분석용 데이터베이스 중 화분에서 발현이 높은 유전자 그룹을 분리하였다.

[0052] 이는 마이크로어레이 자료 분석용 소프트웨어인 MeV의 K-means clustering 분석 방법을 사용하여 수행하였으며, 기관별/조직별 발현 분석용 데이터베이스 중 화분에서 발현이 우선적인 672 종의 유전자가 분리되었다.

[0053] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0054] 도 1에 나타낸 바와 같이, 노란색에 가까울수록 강한 발현을 보이는 유전자에 해당하며 파란색에 가까울수록 발현이 낮아지게 된다. 즉, 17개의 재구성된 유전자 데이터베이스 중 화분에서 우선적 발현을 보인 672종의 유전자를 확인할 수 있었다.

[0055] **<실시예 2> 화분에 우선적인 유전자에 대한 프로모터 trap 계통의 확인**

[0056] 프로모터 탐색용 vector인 pGA2707, pGA2715, pGA2717, pGA2772의 T-DNA 오른쪽 말단에 프로모터가 없는 GUS 유전자가 이웃해 있기 때문에, T-DNA가 유전자가 발현되는 방향과 정방향으로 프로모터 후미에 삽입이 되면 GUS 발현을 통해서 프로모터 활성을 알 수 있다.

[0057] 상기 방법을 통하여, T-DNA가 삽입된 벼 계통에 대한 inverse-PCR 및 염기서열 분석을 하여 대규모로 T-DNA 삽입 위치가 벼 염색체 상에서 결정이 되었으며, 본교(경희대학교)에서 보유하고 있는 대략 벼 게놈의 1/2에 해당되는 T-DNA 색인 돌연변이 정보를 통해서 이를 분석하였다.

[0058] 그 결과, 상기 672종의 화분 특이적 유전자로부터 locus id 이름을 가지며 잠재적으로 프로모터가 trap된 계통을 탐색할 수 있었다.

[0059] **<실시예 3> 화분 우선적 발현을 보이는 계통들의 GUS 발현과 T-DNA 표지의 co-segregation 검증**

[0060] 상기 결과에 의한 672종의 화분 특이적 유전자에 대한 promoter trap 계통을 무작위로 26개 선정하여 GUS 발현 및 co-segregation 검증을 실시하였다. 선별된 26 계통을 논에 전개하고 성숙한 잎을 채취하여 액체질소에 급냉각한 후 분쇄하였다. 분쇄 된 잎에서 CTAB buffer (CTAB 10g, NaCl 40.91g, 0.5M EDTA(pH8.0) 20ml, PVP 10g과 ascobic acid 0.44g을 넣고 물로 500ml을 맞춰 조제하였다)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 또, 감수분열기부터 개화기까지의 꽃을 채취하여 화분에서의 GUS 발현을 검증하였다.

[0061] GUS 용액은 0.5M sodium phosphate buffer 200ml, 12.5mM potassium ferricyanide 100ml, 12.5mM potassium ferrocyanide 100ml, 0.5M EDTA 20ml, 10% Triton X-100 50ml, 10ml 의 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 X-gluc 1g과 Methanol 200ml을 넣고 증류수로 1L의 부피를 맞추어 제조되었다. 각 계통의 식물체를 모두 15ml의 GUS 염색액에 24시간 처리 한 후 70% 에탄올과 100% 에탄올을 순차적으로 이용하여 상온에서 탈색하였다.

[0062] 선별된 26개 promoter trap 계통의 가운데, 1A-13819 계통은 LOC_Os11g20384 유전자의 17번째 인트론에 GUS reporter 유전자가 결합된 계통으로 도 2에 삽입 위치를 나타내었다. T-DNA 삽입 위치 앞뒤에서 만들어진 F/R 프라이머(서열번호 2와 3)와 F/NGUS 프라이머(서열번호 2와 4)를 이용하여 PCR로 유전형 분석을 하였다.

[0063] PCR 반응은 95℃에서 5분 후, 95℃에서 30초, 57℃에서 30초, 72℃에서 1분30초를 37회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 5분을 진행하였다. PCR 반응 산물은 4℃에 보관하였으며 이의 일부를 전기영동으로 확인하였다. 그 결

과를 도 3에 나타내었으며 사용된 프라이머는 하기 표 2에 나타내었다.

[0064] 표 2. 1A-13819의 유전형 분석을 위한 프라이머

[0065]

Primer name	Sequencing (5'-3')
1A-13819-F(서열번호 2)	CATGGATCTTCTTCAAGGAC
1A-13819-R(서열번호 3)	CATTGCCATTTCGGTAGGAT
NGUS1(서열번호 4)	AACGCTGATCAATTCCACAG

[0066] 도 2의 T-DNA 삽입 위치는 서열번호 5의 뉴클레오티드 14,231 내지 14,379번에 해당하는 서열이다.

[0067] 화분 우선적 발현을 보이는 계통들의 GUS 발현과 T-DNA 표지의 co-segregation 검증 결과는 도 3에 나타내었다. 도 3에서 "+"는 GUS 염색이 확인됨을, "-"는 GUS 염색이 확인되지 않음을 의미한다. 또한, 도 3에서 F/R의 밴드는 LOC_Os11g20384의 gene specific primer (서열번호 2와 3)의 PCR 산물이며, F/NGUS의 밴드는 서열번호 3과 T-DNA의 RB(right border) 상의 NGUS1(서열번호 4)의 PCR 산물이다. 두 산물의 결과를 비교하면 해당 식물체의 유전형분석이 가능하다. 서열번호 2와 3의 산물만 증폭된 경우는 야생형(wt)이며 서열번호 2와 3의 산물과 서열번호 3과 4의 산물이 모두 증폭된 경우는 잡종(he)이다. 야생형에서는 T-DNA 삽입이 없으므로 GUS 발현이 나타나지 않고 잡종에서는 T-DNA상의 GUS 발현이 나타나므로 파랗게 염색되게 된다.

[0068] 즉, 도 3의 결과를 검토하여 볼 때 PCR 결과와 GUS염색 결과가 일치하는 것 확인할 수 있으며, 1A-13819 계통은 LOC_Os11g20384 유전자에 co-segregation 된 것이 확인되었다.

[0069] **<실시예 4> 화분 우선적 발현을 보이는 계통의 시기별 발현 양상 확인**

[0070] 1A-13819계통의 화분 특이적인 발현 양상을 확인하기 위해 화분의 발달 시기별(감수분열기, 4분자기, 소포자기, 출수 전과 후)로 꽃을 채취하여 GUS 염색을 실시하고 RNA의 발현을 검증하기 위해 RT-PCR을 실시하여 그 결과를 확인하였다.

[0071] GUS 염색 및 탈색은 실시예 3에서와 같이 실시하였으며 그 결과를 도 4의 (A)에 나타내었다.

[0072] 또한, 분자적 수준에서 LOC_Os11g20384 유전자의 RNA 발현을 검증하기 위해 감수분열기, 4분자기, 소포자기, 출수 전과 후의 꽃을 채취하여 액체질소에 급냉각 한 후 분쇄하였다. 분쇄한 시료에서 RNAiso(Takara)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA를 nanodrop을 이용하여 정량하고 각 시료의 RNA 1ug을 cDNA 합성을 위해 사용하였다. cDNA 합성은 역전사 효소인 M-MLV RTase(Promega)를 사용하였으며, 두 단계로 나누어 시행하였다. 1단계로 mRNA의 poly(A) tail과 15mer의 Oligo(dT) 결합을 위해 75℃에서 5분간 처리하였으며, 2단계로 cDNA 합성을 위해 M-MLV RTase와 dNTP, RNase inhibitor, reaction buffer를 넣고 42℃에서 60min 동안 처리하였다. RTase를 비활성화 시키기 위해 추가로 95℃에서 10분간 처리하였으며 합성된 cDNA는 냉장보관 하였다. 합성된 cDNA는 95℃에서 5분 후, 95℃에서 30초, 57℃에서 30초, 72℃에서 1분30초를 25회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 5분을 진행하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 산물은 4℃에 보관하였으며 이의 일부를 전기영동으로 확인하였다. LOC_Os11g20384의 상대적인 발현 비교를 위해 대조군으로 Ubi5(LOC_Os01g22490) 유전자를 사용하였으며 그 결과를 도 4의 (B)에 나타내었다.

[0073] 도 4의 (A)의 1 내지 6은 각각 1; meiosis(감수분열기), 2; tetrad(4분자기), 3; microspore(소포자기), 4; vacuolated pollen, 5; late pollen mitosis(체세포분열 후기), 6; mature pollen(성숙한 화분)의 GUS 염색결과를 나타낸다. 도 4의 (A)에 나타난 것처럼 화분이 성숙한 단계에서만 강하게 GUS의 발현이 나타났고 이는 수술이 아닌 화분에서 LOC_Os11g20384 유전자가 특이적으로 발현됨을 의미한다.

[0074] 도 4의 (B)는 화분의 발달 시기별로 LOC_Os11g20384 유전자의 발현을 살펴본 RT-PCR 결과를 나타낸다. 도 4에서 나타낸 바와 같이 원추꽃차례(panicle)의 출수 전(before heading)은 도 4의 (A)에 5에 해당하는 시기이며, 출수 후(after heading)는 도 4의 (A)에 6에 해당하는 시기로서 GUS 발현양상에서와 같이 화분이 성숙하는 시기인 출수 후에서 강하게 발현됨을 나타낸다.

[0075] 도 5는 화분의 소포자 단위에서의 GUS 발현를 나타낸 것으로 실험 결과를 통해 시간 경과에 따라 GUS 발현이 화분에서 증가함을 확인할 수 있었다. 도 5에 있어서, UC(Uninucleate micrpore)는 1핵기 소포자, BC(Bicelluar microspore)는 2핵기 소포자, MP(Mature pollen)는 성숙화분을 나타낸다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 화분이 성숙함에 따라 GUS 발현이 화분에서 증가하는 것을 확인하였다.

[0076] **<실시예 5> 마이크로 어레이 데이터 분석을 통한 유전자의 조직별 발현 분석**

[0077] 마이크로어레이 데이터베이스 분석을 통한 LOC_Os11g20384 유전자의 조직별 발현 양상을 분석하였으며 그 결과

를 도 6에 나타내었다.

[0078] 도 6에 나타낸 바와 같이, 화분 조직에서 노란색을 띄는 것을 확인할 수 있으며 이는 LOC_Os11g20384 프로모터에 의한 유전자의 조직별 발현이 화분에서 일어남을 보여준다.

[0079] 상기 도 4 내지 5의 결과를 토대로 1A-13819 계통에서 LOC_Os11g20384 유전자가 화분에서만 특이적으로 발현을 나타내는 것을 확인할 수 있으며, 이는 마이크로어레이 데이터베이스 분석을 통한 도 6의 결과와도 일치함을 보여준다.

[0080] **<실시예 6> 화분 특이적 발현을 위한 프로모터의 클로닝**

[0081] LOC_Os11g20384의 프로모터를 클로닝하기 위하여 작성된 프라이머들과 동진 벼 (Oryza sativa L. japonica cultivar-group) 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 실시하였다. 주형 DNA는 100 ng로 사용하였고, 각 프라이머는 5 pmol로 사용하였다. 이 때 프로모터 클로닝에 사용된 프라이머는 아래 표 3에 나타내었다. PCR 조건은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 68℃에서 300초를 4회 반복한 후; 95℃에서 30초, 62℃에서 30초, 68℃에서 300초를 35회 반복하고 마지막으로 68℃, 10분으로 하였다. PCR 산물은 전기영동하여 크기를 확인하고, pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다. 클로닝한 DNA를 BamHI 과 XhoI으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단된 pGA3383 벡터(promoter-GUS cloning용 벡터)와 라이게이션을 14℃에서 12시간 진행하였다. 라이게이션 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 50㎕과 혼합하여 1.5 ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 37℃ 오븐에 1분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 추가로 튜브에 넣은 다음 3시간 동안 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프렙하였다. 미니 프렙으로 얻은 DNA를 제한효소 BamHI 과 XhoI을 사용하여 효소 절단 후 전기영동에서 아가로즈 젤 분리 하고서 밴드를 확인하였다. 이렇게 해서 얻어진 클로닝 DNA를 다시 염기 서열 분석을 하여 에러가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다. 염기서열 분석은 capillary sequencing 법으로 하였으며(마크로젠 의뢰), 염기서열분석은 NGUS1, RB(right border), 그리고 프로모터 내 서열을 이용한 프라이머들을 사용하였으며 표 3에 나타내었다.

[0082] 표 3. LOC_Os11g20384의 프로모터 클로닝을 위한 프라이머

[0083]

Primer name	Sequencing (5'-3')	비고
Os11g20384-BamHI-F (서열번호 6)	GGATCCCCGTACATTGCAACTGACTC	벼의 염색체 11 (OSJNBa0066C04)
Os11g20384-XhoI-R (서열번호 7)	CTCGAGATGATAAATATGGGCCACAG	

[0084] 표 4. 염기 서열 분석을 위한 프라이머

[0085]

Primer name	Sequencing (5'-3')
NGUS1(서열번호 4)	AACGCTGATCAATTCCACAG
RB_backbone-F2(서열번호 8)	TCGCACGGAATGCCAAGCA
Os11g20384-seq_1(서열번호 9)	TTAGGATTAGGTTGGTTCAC
Os11g20384-seq_2(서열번호 10)	CTCACTGTCAAATCATGCGC

[0086] 상기 분석 결과를 서열목록 1에 나타내었으며, LOC_Os11g20384 유전자의 ATG 앞의 약 2,500 bp 서열이 화분에서 우선적으로 발현하는 프로모터 서열에 해당한다.

[0087] **<실시예 7> 형질전환 세포의 제작**

[0088] 상기 실시예 6에서 제작한 식물 발현용 벡터를 추출하였다.

[0089] 아그로박테리움 컴피턴트 셀(Agrobacterium tumefaciens LB4404) 50㎕와 2㎍의 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 액체질소에 75초 넣은 후, 37℃ 오븐에 5분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 넣은 다음 3시간 동안 28℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프렙 한 후, BamHI과 XhoI을 사용하여 효소 절단 후 사이즈를 확인 하였다.

[0090] 상기 생성된 아그로박테리움을 이용하여 벼의 형질 전환 실험에 사용하였다.

[0091] **<실시예 8> 형질전환 식물체의 제작**

[0092] N6D 고체 배지에서 동진벼 종자를 7일 정도 28℃ 생장실에서 키워서 벼의 캘러스를 생성하였다. 생성된 캘러스를 상기 실시예 7에서 얻은 식물발현용벡터로 형질 전환된 아그로박테리움을 72시간 키운 세포와 혼합하여 N6D-

Acetosyringone 을 포함한 배지에서 22℃ 암처리 생장실에 방치하였다.

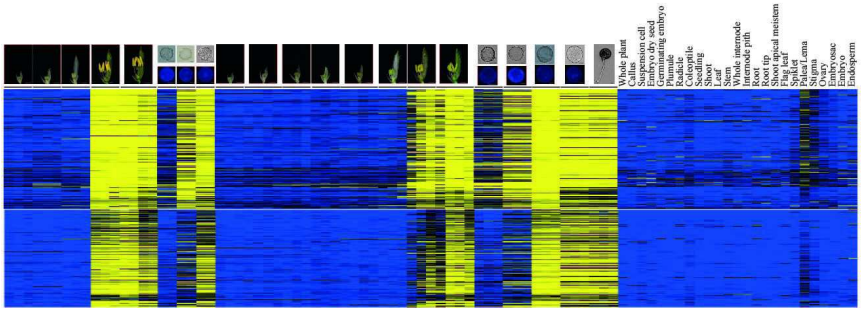
[0093] 아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 헹구어 낸 다음 N6D 고체 배지에서 hygromycin 선발을 1차(hygromycin 30 mg/L), 2차 (hygromycin 40 mg/L)에 걸쳐서 계대 배양을 통해 진행하였다. 선발은 28℃ 생장실에서 각각 2주 씩 합해서 4 주 동안 이루어졌다. 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR (hygromycin 40 mg/L) 고체 배지에 옮겨 4주 28℃ 광조건 생장실에서 재분화를 유도한 후, 식물체를 MS 고체 배지로 옮기고 7일 28℃ 광조건 생장실에서 키우고 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

[0094] **<실시예 9> 형질전환 식물체를 이용한 화분 우선적 발현 검증**

[0095] 재분화된 식물체의 기관 특이적 GUS 발현을 확인하기 위하여, 여러 시기 및 조직별로 샘플을 채취한 후, GUS 염색 처리하여 꽃에서 GUS 발현을 확인하였다.

도면

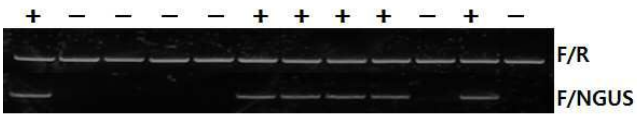
도면1



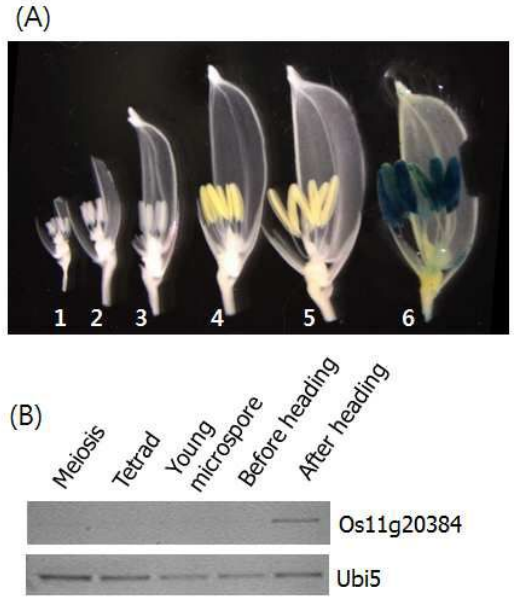
도면2



도면3



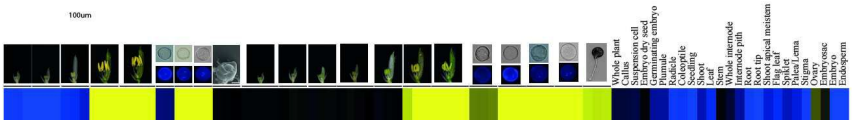
도면4


(A)
1
2
3
4
5
6
(B)
Meiosis
Tetrad
Young microspore
Before heading
After heading
Os11g20384
Ubi5

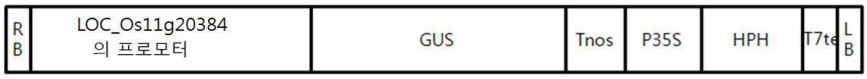
도면5


Anther
Pollen
UC
BC
MP

도면6


100um
Whole plant
Callus
Suspension cell
Germinating embryo
Plumule
Radicle
Coleoptile
Seedling
Shoot
Leaf
Stem
Whole internode
Internode pith
Root
Root tip
Shoot apical meristem
Flag leaf
Spikelet
Palea/Lemma
Stigma
Ovary
Embryo sac
Embryo
Endosperm

도면7



도면8



서 열 목 록

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

<120> Pollen specific promoter, Expression vector comprising the same, transformed plants thereby and method for preparation thereof

<130> P13-093-KHU

<160> 10

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2666

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220><221> promoter

<222> (1)..(2666)

<223> Loc_Os11g20384 promoter

<400> 1

ccgtacattg caactgactc atgataaaaa taaatacttt ttatggtttc aaattttagt 60

attcactata aaaatccccg tgcattgcaa tggatgagag ttattttaat cttattattg 120

ttatactgtt taattaatgt gaaattcact atttaaattt gcttagatat atatattttt 180

agaaagtcat aagctgcaat taggagtccg atcatctcaa gctagcatgc gagtttttt 240

aaagagattt cttatacgac tccttctatg tttccaaaaa cgaacaaact taaaaactaa 300

ctcaaatacg aaaatgtatt tccaaaagta aacgaagtta aaaaccgact catacacgga 360

tgacgtacta aagtaccggc aaaaaaattt atttttttat attatagaga ttttatagtg 420

gtattaattg atttcttata ataatccatg taagtggatt tagagcattc ttgcaccggg 480

aatattcgat ttgactatga ggagctcaat taaccttggt ggctttacac tcctcccaca 540

cacccattac tacttttttct ttttttttgct tcacccaatg caacgcatgg gcattttgct 600

tgtgtgtgtg tgtataatgc agattcgcac tcgggttcat atgtacctac aatctacact 660

gttgatgtgt tccaagattc ctgctgcaaa atgtagctaa ccttaacgaa atgaatgctt 720

actataggga gaaaagataa ttaggattag gttggttcac tatatgtata acatgtatgt 780

tgcatttttt accaaataaa tttttcaata ataatcatat ataacattta tatatctagt 840

gcattgtatt tttctaaccc ttattttgtt tataacatga tatttagtca aaatgagaaa 900

acaatatatc tactatatca ccaaattgtc atcttgcaaa aatgatattt ccaaaatgat 960

atatatccta ccatcaaaaa ctacataaac aagataattt atataaacaa ggtaaactac 1020

ataaacaagt tttgcataag aaatacaaaa attatataaa caaggtattt tacacttgta 1080

aaaaatatag tataacatgt atgttacatt ttgttagcac ctaatatact agccttgtgg 1140

gtacatgtga acttgcgtgc aaaaaatcca actcttatat atatatatat gataaaagta 1200

acttagtata taattaaagt gatttacaag cataaatatt tttttcatca taatataatc 1260

atgtaagatc ttgatgtaca gatataattg caacgaaacg atgtaatcgg gtcgtagatc 1320

agataagtaa tttaagagaa aaaattattt gaaatttaga tgggtaatga ggatgcaagt 1380

ggcaggtgct actactttta gtaagaaggg taacaagttg attacacact gcactatttt 1440

tggtaaaaag catggtcgct ggttagcaca accgagtgca tgcgctccct gtagtcgcat 1500

ccataagaaa aataatcaaa aaaaaaaagg aaaagtacta gaacgtgagg attttatcag 1560

ccaggcctcc gacattgttg ctacccacca aaaatggcca ccatcgcccc gcttctagtg 1620

tggcccttcc ctctcccgcg ttcatctcac taccgctagt tccatcccct tctccacttc 1680

tccgaggcga ttccccttct ccaatccatt cattccaccc tcttccgatc cccaaccgcc 1740

gctggtccgt atccattcca ctctcctccg acccctaccg ctgccggagt gctaggtgcg 1800

tcaggatcta atccctcttt gtgtgcttcg tttcctacgg caattttgaa ttgtttatac 1860

aaaattttgg ggcgcatgat ttgacagtga gaccgtgatg gatcgatctt gaggcgctga 1920

acgtactgct tgccaaaatt tctcggtttt gcgtcgtggt gcgggtgtgt gaggagcgtt 1980

ttgcatttta attttagggt atgaatattg acttgtcagt gcataattat atgaaatcat 2040

ggaatagcat tttgtagaaa aaaagaaaat gtgagtccta ggcactgttg gcatgattga 2100

tagaaaactg tgtacatttt ttatgatgca aggtcaggat catgtgatga gtattaaaat 2160

caggttatgg attttctttt cacattatat tatctgtgca ttcttatgta atagctttct 2220

tgtttatttg acatttatag ttatccggtt tgatttccct atctatctat tgtgataaaa 2280

aggatacatg gcagggtacc ttccctggcc cttttcgtca tacttgtttg gcttcttgtc 2340

tcatatgctc tttttgtctt gctatatgcg atatgatatg atcatcggac catggctatc 2400

taacagttct agatgctgaa ggatgttggt tccatggccc acaaatccca attagttttt 2460

taaggatgtt agtttaatgt gcatgtgttt gtattctatg attacaatag gcttatcctt 2520

actaggaaaa tcctgacact tgtactgtta ttggttattt taagagcacg ataacattat 2580

tcaggtattc atctgttact attgttccag tatattatgg gcatcacatg tcttgactgg 2640

ttatatctgt ggcccatatt tatcat 2666

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1A-13819-Foward primer

<400> 2

catggatctt cttcaaggac 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1A-13819-Reverse primer

<400> 3

cattgccatt tcggtaggat 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NGUS1

<400> 4

aacgctgatc aattccacag 20

<210> 5

<211> 15647

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 5

actaccgcta gttccatccc cttctccact tctccgaggc gattcccctt ctccaatcca 60

ttcattccac cctcttccga tccccaaccg ccgctggtcc gtatccattc cactctcctc 120

cgacccctac cgctgccgga gtgctaggtg cgtcaggatc taatccctct ttgtgtgctt 180

cgtttcctac ggcaattttg aattgtttat acaaaatttt ggggcgcatg atttgacagt 240

gagaccgtga tggatcgatc ttgaggcgct gaacgtactg cttgccaaaa tttctcggtt 300

ttgcgtcgtg gtgcgggtgt gtgaggagcg ttttgcattt taattttagg gtatgaatat 360

tgacttgtca gtgcataatt atatgaaatc atggaatagc attttgtaga aaaaaagaaa 420

atgtgagtcc taggcactgt tggcatgatt gatagaaaac tgtgtacatt ttttatgatg 480

caaggtcagg atcatgtgat gagtattaaa atcaggttat ggattttctt ttcacattat 540

attatctgtg cattcttatg taatagcttt cttgtttatt tgacatttat agttatccgg 600

tttgatttcc ctatctatct attgtgataa aaaggataca tggcagggta ccttccctgg 660

ccctttтcgt catacttgtt tggcttcttg tctcatatgc tctttttgtc ttgctatatg 720

cgatatgata tgatcatcgg accatggcta tctaacagtt ctagatgctg aaggatgttg 780

gttccatggc ccacaaatcc caattagttt tttaaggatg ttagtttaat gtgcatgtgt 840

ttgtattcta tgattacaat aggcttatcc ttactaggaa aatcctgaca cttgtactgt 900

tattggttat tttaagagca cgataacatt attcaggtat tcatctgtta ctattgttcc 960

agtatattat gggcatcaca tgtcttgact ggttatatct gtggcccata tttatcattc 1020

tgatgattta acatttactc atgtattcct ctatcagggc atcacacgat gagtgttgca 1080

actgaagcat gcccttcacc aaagctacac acaagactaa ggctgtggga gtttgcagac 1140

cgttacgtat ttgaaccagt tgacggtctt gctgatttgt tcctgtcagt tgatcggaca 1200

aatggatcaa tgagtctagt ggaagagttg ccacctcgtg gtccctctac aaatcctaaa 1260

gttagaatag tttttggtgt gattggagtg ctcaaacttg cagttcggtc gtactttctt 1320

gtgatcactg gccgtgattg tgttggatcc tacttggggc atgcaatttt caaattgacg 1380

ggactaaaag ttctgccatg caataactcg ttaaatactt cttctgctga gcaggtttgg 1440

aagtgattat ttgggcctta tttacaattt ctttccatcc atattccatt agtcattcca 1500

taaagctctt gcagaagaaa atggaatcag aattttcgga acttctggat gcagcagaga 1560

ggactatagg cctgtacttc tcctatgatg tcaacttaac actaacgtgg gtacctcaat 1620

gaatattatg cctttttttt tcttgcaaac atttgcctga agtgtataga gggggttcca 1680

tctttctttt ttttttgtta tcttcctctt ctttcgtttt aagttggtta agcatttatc 1740

tctgcccctt atatgttgta gttcacagag gctgcatgat ctaggagatc agtttaagtc 1800

acttccactt tggagacagg tttgttgcct agctccttac ataattccgt ggtttgcttg 1860

tgcatgaaat tcctgatctt ttttatcctt tcttatataa tctgcaagct tctatagctt 1920

gtcctcaaca tcttcacatg atttataccg ctttccttat tatggaacct aattgtatat 1980

ttggttatta cttattagat cagtggatta cacttgtgat gtagaaagat ggaattgaag 2040

ttaaaatttt ctaaatgcaa tgtgtttcat ttggccgata tttgtttttt agataatgga 2100

agctttatta agactcagtt aaatacacca agatgataca ttccaactga gtccaccccc 2160

ggcctctgca tagaatgcac acaaccaaaa aactggacct aagaacactt ccccatcaca 2220

aaacatagaa actagtggct atcaatccgt agactagatc gccacccatg ctcctgggta 2280

aaaaactcct gtgccaccta atccaaacgt tgcgatacca ccgcaatagt atcccgaagt 2340

ccctgtttgt ggaggatggc ccaggagcgt agccaccggg tgactaaagt agtaacctgc 2400

aaaggagaag acaccacctt gttatcaaaa attacctcgt ttctgcttag ccatatggac 2460

caacaaagag atgctgcacc catcaaaagc agatttctca tgtctttagg aacacaagta 2520

agccaacgcc caaacaagtg agtaatattt tgaggaggtt gtatgttcga agccatatga 2580

acaacagacc ataccaagcg agaaacacga cattgaaaaa acaaatgttg aatggtctct 2640

tccttgtgac aaaagccatg ttgaatggcc gatatttgta gttgcagcta aaaatttttg 2700

atgctcaatt tgtggttaat atttttтcat gagaagtcac gtgtgacaaa attgtaacga 2760

tgtgattttc catttaagaa actcaattta taataccaca cactcctagt tagcatattc 2820

cttcctgaga aaatagctat catacaaatc caagcgaaat gaaccaaatg catgaaagct 2880

atatcggaac atgtcacaca atagattctt acttaatttg taaattatag tttctagttt 2940

taaatagact gtcaaatgga agattctcag ttcaatgaac aggtccaaga agcaagcaga 3000

agtccatagc gtacctagaa taaaatattc atgtgcttca gtttaaaaat attttctaga 3060

tgtacaatat agtatgtttg cttttatttc cttgtcctga tttcttaaga aggatgtggt 3120

gggagaaatt agcaaaagct gatgttacat tttgattttt ccgtgatgac atttgcaccg 3180

tattttagaa tattgctaac actgtgccca ttggtaatga ttctactagc atcctgcaaa 3240

atcttcaagc ttatcctttg gattctttta aggttcattg acctttttt tcttgaatat 3300

gcaagagaaa tacgtatcat ttcattaaga caggaaaaaa aaacgaggag ggaagaaaaa 3360

ccctccctca ccctacaaac aaacaggacc tgaggttaca tatgaaaagg aacaaaaaca 3420

accttaccca aacggggtta gcgacctact agggaaatat gtgagcttag aagctccggc 3480

catacaccat aggtcatact catttgccac cgtttggatg acagacatta cattaggatt 3540

gacgccgtta aacaaacagt cgttcctatg cttccagatt tcccaagcca ccaaaatgat 3600

aactgtattg agccctttтt ttttggagtt ttgatcaatg cctcttacac tgccttaggc 3660

caccaacagc ataagcaagt agaattttga cttggagaaa tggaaatcag ccccaacctt 3720

tggagaatta gtgaccacac ttgttgggaa aagacacaag taactaggat gtgattaatg 3780

gattcctcag cctggtcaga aagcatacaa gtagcaggat gtggcagtcc acgcttggca 3840

aggcgattag ccgtccagca atggttatta attggaagac atagaaaaac ttgcaccaca 3900

agggcgccta gctctcccaa agtcttctgc atagtgagaa tctgattgtg ccaacaaagg 3960

actcatatgc tggtttgcac gtgtacgatt ccgactttgt gaacttccaa cgttaccatc 4020

ctgcaagacc gcattggcca ctcagtacca aacttgcaag tattctataa tgacctggac 4080

agtgaaatgt tcattgactt attttacgct ttcttattaa atgttataac tctgtgaggg 4140

acagtgagaa aggtggtgca aaaaaaggaa agaacacaca gatggagccc atgtcatgat 4200

taagacatct tgtttttcat aaagacaatc ggaaatagaa atgaacgcta gctacgacat 4260

acaaatgaaa gacaaacatg tcatagcatg gttagcaatc acagtgaata tcttttaaaa 4320

ctttgtttga tggtattcac tgaaaaaact gttccgtaaa caaaatgaaa aattgagttg 4380

taacaacata tgcaaataat ttttcaatcc accgcttatt tttattacct ttttacaatt 4440

aagtcattga ccacactttt agtaatacta aggactgttt tggtttgata ccaagacccc 4500

ttccaatatt ttggccactt gaatagtagt tgtgatgcat ttgggttgga gccatatttt 4560

tggcaatgcc catgtccaaa ttggcagcag tcgaaagctg tcttaaccta caaagaattg 4620

gctcataatt ggcatcaaac caaaccaaat caatacaatc ctatggaccc taccaaataa 4680

ttggtagtac tgaaacttgc ctaggtttca gcactaccaa aacagtgtag ggtagtaatc 4740

caaaacaact ttaatcaact aatagagttt gatggtagtg gtaaaagtga taggagcatg 4800

atttttttc tactactttg aagacacagt tgcctcctcc accctatgca tgtagtgcga 4860

gaaaatccca taaacccctc aacaccttat ttgccactat atacttccca tttcttgaac 4920

gtcatttgag tgcaaatttt atttctcttg tgccattttc atacataacc agttaagtga 4980

gtgcaaaagc aggagcataa taaggaattg aaggaacgct cagtggcata ggaggaattt 5040

tctgcagaaa atgaaatggt ttaataaact acatgagtac actttggaca tgttaataag 5100

tcttttgatg ctttactggt tacttttgca ccagattaat taattatacc ttttgcaggc 5160

agaaccaaga tttctttgga acggttactt gttggagcct ctaattgaga acaaagtaag 5220

attagtgttg ttattaactg tggatcgtgt gaccaatatt tacaattaat tttgatttcc 5280

cttttgtccc tcaacagctg caccaatact tactaccagt cattcaagga agtatccttc 5340

acctcatcgt aacatctcaa cttattacct gagatgttag atgacttatg atagtttata 5400

tttaggttac ctttctgtta aggtcatatg tcaatttgaa cttctgcaac ttaactaaat 5460

atcaggtttt cagagtatcc atgcagaagt tgggtcagag aaggtaaatg tgaccctgat 5520

tgcacgtcgg tgtacacgta ggataggtaa gagttacgaa ccatcaaaag cttattcgcc 5580

attttctttt cattaaatgt taccgtagtt agaacctaag gtaaatttgt attcatttgc 5640

tattttacta tttttggaaa ctgaatgtca atgatcgttt aggaatttac gagctgttct 5700

ttgttgaagg tacccggatg tggaggcgag gagctgatcc agagggttat gctgcaaatt 5760

ttgttgaatc agagcagata atgcaatcga aagaatttac agcatcatat gtgcaagtaa 5820

gtttcttcac tcaattgaat gacacatagg ggagctagtg tccccgtttg aggaattgac 5880

atgatgcaat gtcccatttc tttttttgaa aaaataatga tttgcataca cataaagtta 5940

tgttaacctt catattttgt ttccaattta tctttggaat caacaatcga aaaggaaaaa 6000

agagtcaatc atgcacagct catgtacgct aaaagatttc ttgtcttcct atttgtatct 6060

tgatactagc ggtgaatatg acactaaaag tttgcaggtt ttcccaactt ttttctagca 6120

cctttcatat ttattttggc ttacagttta tttttatatt ctgtgataac tttgttacat 6180

tgatgtgtat tgcaggttcg aggttctatg cctttttttgt gggaacaaat tgttgatttg 6240

acatataaac ctagttttga tgttgtcaga gtagaggagg cggtgagtgc tctcatcata 6300

cgatttttttt tccttttttat cgttgttgct ctactaattt ctcgttgttg ctccactaat 6360

ttctacccct tcagttcatg tacatattat gaagatctaa cttaagtatt tgcaatgtag 6420

ccattgctta tacttttctt gtcataaatt ttcttggatt tgatttctgc agcctcgtgt 6480

acttgaacgg cattttcatg atttacaaaa gaaatatgga gctgtcgtgg ctgttgatct 6540

tgtcaataca gtaagtattg aattcttgga cccaaaccag tctcttcatt ctgtttgtca 6600

tgtataacag tcatgttggg attccctacc attggtgtgc aagttgactg gcctcaaggc 6660

agcttgtcag actttacaca gtcttcagaa gtctaattgt tggcatattt agataaaact 6720

ggtcttaatt atgcatatct ctggataagt cattttgttg tttcattaga tgttagtggt 6780

tttagataac ttcatctatg aaagtcctgc cgcatgattg aagaaagaaa taccagtttc 6840

acctatccct tgccatctgg aaccacatca tagatcctta gccattccac agggtccagg 6900

gcctcatctt gatacttcac acagttgcaa catcaaaccc acccccctac aaatcatcta 6960

ggctgtgtca tatggttgtc ttgattgcag gaccagaatg agagttcttc atttttttcc 7020

tcgaaaaagc aagagaaatg tgtttcattt cattaagggg aagaaaaata aagaacaaaa 7080

atacaaagta ggagaaccag agtactctca ccgaaaaaac acacccacac accccagcca 7140

atactggcaa gcgctagctg cctaggtttg ctgctccatt aagaaacttt tggagggcaa 7200

atgcccctgc taaacaccaa aggttaccct cattctctac cacctgcaag accgccgcaa 7260

ttctaggatt ggcgccattg aaaacacagt catttgtagc ttggctccac tacctcaaaa 7320

aacaaatagt tgaaggttga ggcactgcat cagatatccc ttgcttcaag aatagtgccg 7380

tccacacttg gcaagaaaag acacaagaaa tcaaaatgtg tttgacggat tcttcacttt 7440

aatcacaaag gggacatgcc gcggggtact gcaatccgcg cttagcaagt tggttggctg 7500

tctaacatct attattgacg gccaaccaga tgaagaactt acagcgaaga ggagcccaac 7560

tcttccaaat gtgattccaa ggagcaaact tgatcgatcc caggaaataa gcttcatagg 7620

tagatttgca agaatacatc ccatcagccg ttagcttcca aacatgttga tcttgtacac 7680

cttgtagcag aaccacctct tataccaaaa cccaaatggt catgtactcg taaagaacct 7740

gaatagatag ctccccatgt atgtcagcca ccgatctgtt gttctccaaa gcctgcgccg 7800

cagtacgttg cttccttgcc tcttagagat caaggcaaag agattagggg ccagttttgc 7860

tattgttttc ccttgcagct acctatcgct ccaaaatttg gtattttctt cattcgcaat 7920

tatagttttg acagccacat tgaaaagaga atggacgttc tgaggcacat gaaaagataa 7980

actagcccaa ggtctagcaa aatcagtttt ttgaagccat aaccacctca tgcataatgc 8040

tcatcccatc ttttctaggt taaggatacc aaggcctcca taggacaaag gccgacacac 8100

acgatccaaa gagatcaaac aattttctcc attagtgttt tctcttccct tccataagaa 8160

gccgcgatgc cttttatcta tagccttgac cacccactta gagatccaac gccatcattg 8220

cataaaagcc gagaggacca ccattactgt tataagccag cacgccctat tcattaaaga 8280

ggctttccaa catggtaaat tatctgccac tttgtccaca aggggcaaca attctgtctt 8340

ggttggttta catattctaa gaggaagtcc gagataagag caagggaagc tcatcacttt 8400

acaagacaac tcattagaaa tcacttccag atcatcttcc aagcagtgaa taggaatgca 8460

agagctcttc atcatattgg ttcttagtcc agaaatctga ccaaaaactc caaaatctgc 8520

ttgataagag ataggtcccc acttgtagga cacaagaaca tgaccacatc agccgcatac 8580

agagaaaccc ggtgtgttgt ttgcgtgaca gcaagaggct ccaggagata tccatgatcc 8640

gcagactgcc acaactgagt tcagtatgtc cataaccaag ataaaaaaaa gaaaaagaaa 8700

aaagagttct tcactttgac gaatagtgtc ccatgttcat tccataaatt gcatttttat 8760

ctccgatttt gtatattctg ttccttgaaa tagaattaac tagttcattt cagcttatat 8820

tacataacga taattgtttg ctctagaatt agttaaatgt ttaggagttt tgcctcttct 8880

tatttttaac atgctagtaa tatgcggtgg tggtactagt ttgttctact cctgtgtgat 8940

atttttcacc tatcatatac cttgttaata tattcagcat ggtggcgaag gtcgcctgta 9000

tgaaagatat gcaaaatcaa ttgagcctat cttgagtgaa gatataaggt aagttttgct 9060

ccactctaga gttattctat tgtggtttac tgtttataat tgcattaaac ctaattattg 9120

cagatttgtg cattttgact tccatcaaat ctgtggtcat attcactttg aacgcctttc 9180

tcaactgtat gatcaaattg aggattatct taagaagcat aggtatgttg ctagaagata 9240

caaagtacta catgttttat catttataat ttttgtataa tacctcttca catgacattg 9300

gtacattgac agtctctaaa gcacatgttt gatcatcgcc ttctcaaatt atatatttat 9360

caaaataatt agaaatataa ttgcatgaaa atgaaatata ttaataacat tttacatatc 9420

aaatcttaat atctttgcat ttattataag attgtggggt tgattttaca cattcaaaaa 9480

atgccatttg atttggtaga gtatatgtta gcatgagttt tcttctacag aatttttctc 9540

tgtttaacat ttctgcaagt gtgagtatct gcattttcta tttgaaaaat cagtgcattt 9600

catgtagaga ataatgtagc tgatttacta ttcagttcct tcttttgcca aactactata 9660

gcatatatgc agtaatgtgc tttcgtttaa taacccttgt ttcgtttaat atttctttca 9720

ttataactta taattattgg tagtagggac tagcatacat gcattgaaaa gcgtacacat 9780

attttgctat atgcttccta gttttggccc tgttcctgtc aaagggaaag caaatttatc 9840

gtacattagt caaactattt tgcttctttt tctatgttct tatgttgcca tctctacatg 9900

gcgagaaaaa aaaaacattt cacatctacc tttcccacac aacaagaaaa caaatggcaa 9960

aatggtagct gcatctgaca cttttggtca catatgttat ataaaacctc ctagctgaaa 10020

tttggtgagg aatttggatt aaaacccaag gaatgtccca aaagaatccc tttcatccaa 10080

actcatatta tttctttgtt ctcatagtct ttttaattgt atggcatagg tacttccttt 10140

taaatagtaa aggtgagaaa atggaagagc agaccggaac cgttagaaca aattgtgtcg 10200

attgtctgga tcgtactaat gtaactcagg tacatacttc caaggacagc tttttcatga 10260

tattttgaaa tgtaattcta gatactaaca aaataattgc tgatgtggta actatcgctt 10320

taatttttt ttgaaagaat gggatgtact ttagtacagt attgtaatct aagtgcagtt 10380

ttcaaaagat acagaacatc acataatcgc tcctaggttc ttctagatag tgtttagttt 10440

ggacgaggcc ctcaccctga atttggttgg taggacgaag tggaatgagc cgggacgagt 10500

tcatccaaca tgatagaata ttcgaccaag atgcaaaacg gtgttgtacc agaaattttg 10560

ctagatgagc tcttcccacc tcgcacgtga tagcttttgc tatgtctggt cgctgcgtgg 10620

atatcagccg gtgagagaaa agcgatggtg catgcatgac tctggtctat gaggagacgt 10680

tgaagctagt gaagaggatg ccgcacgctg cgccagatgg ggagaggccg tagtgccctg 10740

tcctagagtt ggacaaggag gccgacgtca ttgcgtgtgc cagaggtgga ggcagctaga 10800

acaatggagc agtctgggga ggcgaaatca tccaactgcc ttaaaggtga tatgatagac 10860

ttctgaccgc gtgggggaag ggcgcaaggc atcattcatc caaccaacac agaaaataga 10920

gaggaggcga tcctagaaga agcactctgc catggatgag atttttcgat gtggctgcct 10980

tgaatgagat tgatgtgttt gccatgtaga gaagtagagg aaaaatgcgg ggagaatgga 11040

aagttgaaaa tagaacataa ttctcacctc ctaaagagaa ggttttctta accaatcctg 11100

ttccaattta atttcttcaa tcaaacaatg ggattgatgg ggttatatgc attggctcat 11160

ggaggtcata aaacttggtt atgtacctag gggtggttct agacattagt tatgcactgc 11220

catggtgtca aaccttcacg gggtgaattt aatactaggc ccaataatag tggctcttgt 11280

agcccggact gtggttttgg tgcgattagt cccacatata gagtttaggt aggtacaaac 11340

tgagggattt ctgaccatag tatcttcgtt taacacttct acacaacgtg aggagtttag 11400

tcgatatgga ctttggttgg tagtagagca taaaccttcg ttacacaaga atgtgcgagc 11460

agatcaccac attctagatt gatcttgtca ttggacattc aaaaaataaa tgatatgttg 11520

tttcatcctt gtcattggat aacttcagtt tggatccatt tgagagaagg gttgttggca 11580

gtactaggtc acccacattc cttgtaaatg tatagccatg caccatgtcc agacaatagg 11640

ttaaatagtc cacattgaag tctaaacata gagtaactag acatgcataa tataaacata 11700

aagtgtgaat agacgaggta ccaacagata acaaatagta aactagaaag aaataataag 11760

atcacatcag aattttaccg gattgaaggg ataggagttt tattccatcg gggagaaaaa 11820

atcatcgaag tggtacaaat ttggagtgtt agcattccgg cctatagtat ttttctggtc 11880

tctgagattt ctttccttgt caactatctt ttcctagctg tttccaccct ctcgagaaga 11940

ggggcgagtg aagtgagagt ggagcccccc atttatatta gaagtgcctt gggcatatgg 12000

gtttcatctc caccaggcat ggaggaatga agtggcatga ggcatttctc ccacactgca 12060

tggagcatac aaggaggtgg agtagcagct aaggcatctt gtggggctag ccaacttatg 12120

tcggtgtggg atcgactggg ctacggagtg gaccggctgg gctgtaagct tgggctggcc 12180

aggctgcatg cttggtttgg gaccggccgg actgcatccc ttggttggct aggctggttg 12240

ggccgttgca tacgttgcct ggcattgttc ttgcattttt tttgaacttc ctgattttgc 12300

ttgaatatgt tgatgcactt attaccggct taccgccaaa aacttgttga cacaccaaaa 12360

ctcgtggata cattaaggtt agtgccaaaa taaatacagc atttatcaat acctcattta 12420

ttcataagta tttaaggagt acaaaatatc acttttagca ttttacgggc gtcaacaatg 12480

ctccatgtgg aactaatctc accaaaccac accatgggtt acatcactag caagtagcaa 12540

ctactgggct agaatattac attcaaagta tttgtagttg tgtggggatc cttatgtctt 12600

tctcgagcaa ttactttgtt tctttggcct tctccatttt tttaatgtgt atgtaactac 12660

aatagtctcc ttaatacaca aaacagagca tgatcgggag aaaaatattg gaaagccaac 12720

tgcaaaaaat cagtgttctt ggtgacaaca atacaatcag cgattatccg gcatttgatg 12780

cagattacaa agtttgtaag tgttgcatat gatattcact aaacatgttt gttagtatgt 12840

ccccacatt tgtctcacaa tgttgctggt cctaaacaat tgctgacttc tttttcagtg 12900

tgggccaacc atggcgatgc aataagcact cagtactctg gaactcctgc cttgaaggga 12960

gactttgtgc ggtaatttgt gttttcaagt ttttgtgaat tctcttattt agccccttt 13020

cctttgcaca atttggacct actaatttca gaaaaagaag taatgatttg attgcaacca 13080

taagcacgtt taagctgagt tgctaatgtt tccttatgaa gcaaaggttt tgtaacttgt 13140

aagatccttt aacacctagc ctgctaaaca ttttctctag tttcatgttg tgaatctcct 13200

caatagttaa acctttataa tggcaacttt taaactgatt tatttcttgc tcgctgtgaa 13260

aagttatctt ctcgtcacca tcagaaaaat tacttgttgg attatgttta gttgcttact 13320

tcccagtatc aggactgagc tgacacctaa gatgttgaca cagttctaat gcatgagagt 13380

gcagtattat aattaaatta ctgacaaact acatgatcac ataaggtgca aaataatact 13440

atcgttctgc caatggcatt gccacatgtt ttcacttttt cctctattaa tccgctgtct 13500

atgatctatt tcttcttttg gttgttggat ctttagaaac aaataatgat taattagtta 13560

tttgttgttc ttaacctaac tatatcttat ttatttatta ggtacggaaa gcgaactaca 13620

cagggaattt taaatgatct gtggaatgca atggctagat attacctgaa caactttgca 13680

gatggtacta aacaggtatg ttgcttactt ggtctcacca ttgatgggct ggagtgagtt 13740

ggattttgct attttaggtt tgctatttta tccaagacat catggacgag tgaagaaaag 13800

atcccttacg ttggtaatga tggatcaagg catagtgata actcattatt tgtttattgt 13860

cttgtatagg atgccatgga tcttcttcaa ggacatcaca tatcctcagt tagtcgggat 13920

atgccaactc caaccaaagg acttatagag aatcacgcgg ttggttattt tctttctatt 13980

acttgagatt tttttttaca gatgaataat ccttaagttg cataccgtga attgcattta 14040

ttgttcttac tcttggttct gaattctcat gcttaaaagg attgcaattt acaatgaatt 14100

tctatgcata attttgatgt ttccatctac ttactaggat aagttgacag cggtgatgct 14160

atgatccata ccaaggtttt gaataccagt ctttctggaa aaccactata tccatttttt 14220

ttaattcaca aaccatttac cagccgtaac cgaccatgaa ccagtttttg atggaaaatt 14280

ttgtattaaa acttatggca tggataatgc gtgctttttt ttaatgactt agtatttatc 14340

acacttaatg ctgcaaaaaa tatacagctc ataatgttct gaccggaaat accagtaact 14400

ggtttggagc tcctggccgg taaccagcag tgtaattacc tgcgaagatt tccacccctg 14460

atgtattccc tcaatttagt tctttcgtgt tgatagagtt acatgggcat ttgaatgtcg 14520

ttatgcatat cttagtggag atatttgttg aatagtccca cattggttgt ggaaggacct 14580

aagatataag tgggggagcc cctcacctca atggctagct tttggggtgg gaaaggccct 14640

ttacggtctt acaattggta tcagagcctg gctaggttaa catctctggc ccgatggaca 14700

cagtatgtga aggtttgatg gaccgtgggt gcctgcgggg cccgtatacc taatggaccg 14760

tgggcctgtt ctgtggggtc tatacacggt gaaaggctga gggacttaag atataagtgg 14820

gggagcccct cacctcaatg gctagctttt ggggtgggaa aggcccttta cgatcctaca 14880

atatttttcc atatttaaat taggatattt tagtggagaa cttacttgag ttttcatttg 14940

cagtccttcc gccttgcttt tgctctgctt ttggctgccg tgatattctt gataatgtca 15000

ctgagaagag gtactatttc atcctaccga aatggcaatg atttaagtta atttatgcag 15060

attagaggca ctcaactgtt gtaaacttga cgagttgttt gcagccaaca tattactatg 15120

tggaaacaaa tacataacca agtcactagg ccaaattcac tccaacaagt ttaatttgat 15180

ccttcttcat gctttgtcat actaacttga ttcatttcct tgcagcacgt aatgatgttt 15240

tccatttggt gctgtcacta ctatggtctg gtttttgctt tggcatcacg cgttatgtca 15300

aagctaacgg acggaagttc acgaaccgtc ctcgctttca cctatcgcgc cattgatgcg 15360

aacaaaaggg attatataca cactcatggt cgactcacct ttctgggcat gcatgtgtgc 15420

tctcagtttt gtatcaagtt taactttccc tctttgtaag attttgcaca tgttctgacc 15480

atcacggctt tatattttct tgttgaatgg gaacatcagg aattgatttg ttctattgca 15540

tttatttatt tatttattta tttatataaa cgttttgcag aaaatgttgc aaagatgtat 15600

atgatgatca aaattgcaaa tggtttaggg tttcatatat tttgggc 15647

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os11g20384-BamHI-Foward primer

<400> 6

ggatccccgt acattgcaac tgactc 26

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os11g20384-BamHI-Reverse primer

<400> 7

ctcgagatga taaatatggg ccacag 26

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RB_backbone-F2

<400> 8

tcgcacggaa tgccaagca 19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os11g20384-seq_1

<400> 9

ttaggattag gttggttcac 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os11g20384-seq_2

<400> 10

ctcactgtca aatcatgcgc 20