



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0153992
(43) 공개일자 2023년11월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) A01H 1/00 (2006.01)
A01H 1/02 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01)
A01H 5/10 (2018.01) A23D 9/00 (2006.01)
A23K 10/30 (2016.01) A23L 2/02 (2006.01)
A23L 7/196 (2016.01) C07K 14/415 (2006.01)
C12Q 1/6895 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/8242 (2013.01)
A01H 1/06 (2021.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7019393
(22) 출원일자(국제) 2021년11월30일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년06월08일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2021/051425
(87) 국제공개번호 WO 2022/115902
국제공개일자 2022년06월09일
- (30) 우선권주장
2020904452 2020년12월01일 오스트레일리아(AU)

- (71) 출원인
커먼웰쓰 사이언티픽 앤 인더스트리얼 리서치 오
거니제이션
오스트레일리아, 2601, 오스트레일리안 캐피탈 테
리토리, 액톤, 클루니즈 로스 스트리트
인스티튜트 오브 보타니, 차이나이즈 아카데미 오브
사이언스
중국 100093 베이징 난신쿤 20
- (72) 발명자
리우 춘-밍
중국, 베이징 100093, 20 난신쿤, 하이덴 디스트
릭트, 빌딩 넘버9, 아파트먼트 2-201
리 동-치
중국, 베이징 100093, 하이덴 디스트릭트, 6 바오
지야오, 빌딩 넘버1, 아파트먼트 넘버1-101
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

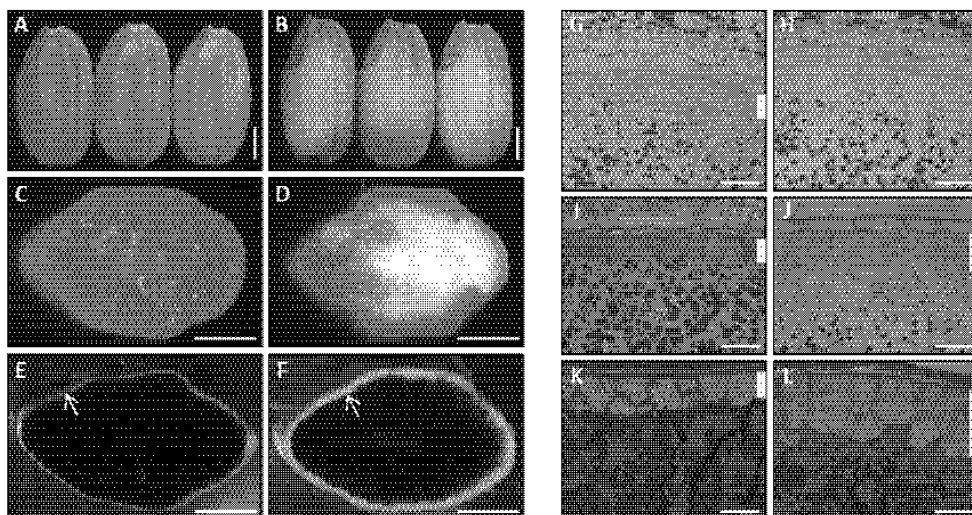
전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 농축된 호분을 갖는 시리얼 그래인

(57) 요약

본 발명은 호분, 배아, 전분성 배유 및 감소된 수준 및/또는 활성의 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴
리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 포함하는 시리얼 그래인에 관한 것이다. 본 발명
의 그래인, 또는 이로부터의 호분은 개선된 영양 성질을 갖고 따라서 특히 사람 및 동물 영양분 공급 제품에 유
용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01H 1/10 (2021.01)
A01H 1/121 (2021.01)
A01H 5/10 (2022.05)
A01H 6/46 (2022.05)
A23D 9/00 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)
A23L 2/02 (2013.01)
A23L 7/196 (2016.08)
C12Q 1/6895 (2018.05)

(72) 발명자

우 샤오-바

오스트레일리아, 오스트레일리언 캐피탈 테리토리
2615, 플로리, 127 랏클리프 크레센트

야오 수에-펑

중국, 베이징 100093, 하이옌 디스트릭트, 넘버 20
난신쿤 상산

리우 진-진

중국, 베이징 100095, 하이옌 디스트릭트, 웬추안
쿤, 바오리시샨리뉴, 빌딩 넘버12, 아파트먼트 넘
버2-303

유 로날드 춘-와이

오스트레일리아, 오스트레일리언 캐피탈 테리토리
2912, 군가린, 95 메리 길레스피 애비뉴

호윗 크리스핀 알렉산더

오스트레일리아, 오스트레일리언 캐피탈 테리토리
2617, 에바트, 62 맥길 스트리트

라킨 필립 존

오스트레일리아, 오스트레일리언 캐피탈 테리토리
2611, 웨스턴, 82 맥클런스 스트리트

명세서

청구범위

청구항 1

호분, 배아, 전분성 배유 및 상응하는 야생형 시리얼 그레이인에 비해 적어도 하나의 미토콘드리아 폴리펩타이드의 감소된 수준 및/또는 활성을 포함하는 시리얼 그레이인으로서, 여기서 이의 수준 및/또는 활성이 감소된 미토콘드리아 폴리펩타이드가 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 및 TWINKLE 폴리펩타이드 중 적어도 하나인, 시리얼 그레이인.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상응하는 야생형 시리얼 그레이인에 비해 그레이인에서 적어도 하나의 미토콘드리아 폴리펩타이드의 수준 및/또는 활성을 감소시키는 유전학적 변이를 포함하는, 그레이인.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 유전학적 변이가

(i) 미토콘드리아 폴리펩타이드의 수준 및/또는 활성을 감소시키며, 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자에서의 돌연변이, 또는

(ii) 사일런싱 RNA 분자를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오타이드로서, 여기서 상기 사일런싱 RNA 분자, 및/또는 사일런싱 RNA 분자로부터 생성된 가공된 RNA 분자가 내인성 유전자의 발현을 감소시키고, 바람직하게는 외인성 폴리뉴클레오타이드가 시리얼 식물의 발육 중인 그레이인에서 발현되는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 사일런싱 RNA 분자를 암호화하는 DNA 영역을 포함하고, 여기서 프로모터가 바람직하게 적어도 수분 시점과 수분 후 30일 사이의 시점에서 발현되는, 외인성 폴리뉴클레오타이드

를 포함하는, 그레이인.

청구항 4

청구항 2 또는 3에 있어서, 상기 유전학적 변이가

(a) 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자의 RNA 전사체의 변형된, 바람직하게는 감소된 스플라이싱을 초래하는 스플라이스 부위 돌연변이로서, 여기서 스플라이스 부위 돌연변이가 바람직하게는 스플라이스 부위에서의 단일 뉴클레오타이드 치환, 보다 바람직하게는 서열번호 4의 뉴클레오타이드 번호 2126에 상응하는 위치에 있는 아데닌 뉴클레오타이드 치환인, 스플라이스 부위 돌연변이,

(b) 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자 내의 결실 또는 삽입으로서, 바람직하게는 전구체 시리얼 식물 세포의 돌연변이유발에 의해 도입된 결실인, 결실 또는 삽입,

(c) 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자의 단백질 암호화 영역에 미성숙 해독 정지 코돈,

(d) 야생형 폴리펩타이드에 비해 감소된 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하도록 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자에서의 돌연변이로서, 바람직하게는 여기서 돌연변이가 내인성 유전자에서의 뉴클레오타이드 치환이고, 이에 의해 돌연변이를 포함하는 내인성 유전자가 서열번호 3에 비해 아미노산 치환을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는, 돌연변이, 또는

(e) 돌연변이를 갖는 유전자가 발현될 때 상응하는 야생형 유전자에 비해 감소된 수준의 폴리펩타이드를 생성하도록 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자에서의 돌연변이

를 포함하는, 그레이인.

청구항 5

청구항 2 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전학적 변이가 도입된 유전학적 변이인, 그레이인.

청구항 6

청구항 2 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 유전학적 변이에 대해 동형접합성인, 그레인.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 두꺼워진 호분을 갖는 그레인.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 수분 후 20일에 두꺼워진 호분을 갖는 그레인.

청구항 9

청구항 7 또는 8에 있어서, 상기 두꺼워진 호분이 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 세포층, 약 3개, 약 4개, 약 5개 또는 약 6개의 세포층, 또는 2-8개, 2-7개, 2-5개 또는 3-5개의 세포층, 또는 2 내지 8개, 2 내지 7개, 또는 2 내지 6개의 다수의 세포층을 포함하는, 그레인.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 하기 중 하나 이상을 추가로 특징으로 하는, 그레인:

(a) 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교하는 경우, 하기 중 하나 이상 또는 전부를 포함하고, 각각은 중량을 기반으로 하는 그레인,

i) 보다 높은 지방 함량,

ii) 보다 높은 회분 함량,

iii) 보다 높은 섬유 함량,

iv) 보다 낮은 전분 함량,

v) 보다 높은 미네랄 함량, 바람직하게 칼슘, 철, 아연, 칼륨, 마그네슘, 인 및 황의 하나 이상 또는 모두의 함량인 미네랄 함량,

vi) 보다 높은 항산화제 함량,

vii) 보다 높은 피테이트 함량,

viii) 비타민 B3, B6 및 B9의 하나 이상 또는 모두의 보다 높은 함량,

ix) 보다 높은 슈크로스 함량,

x) 보다 높은 중성 비-전분 폴리사카라이드 함량, 및

xi) 보다 높은 모노사카라이드 함량;

(b) 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교하는 경우, 보다 높은 정도의 심복백(chalkness)을 포함하는 그레인,

(c) 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교하는 경우, 보다 높은 수의 호분 세포를 포함하는 그레인,

(d) 전체 그레인 또는 크랙킹된 그레인인 그레인;

(e) 상응하는 야생형 시리얼 그레인의 발아율에 비해 약 40 내지 약 100%인 발아율을 갖는 그레인;

(f) 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교하여 발아 동안 증가된 α -아밀라제 활성을 갖는 그레인;

(g) 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교하는 경우, 불규칙한 모양의 전분 과립이 더 느슨하게 팩킹되어 있는 그레인; 및

(h) 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교하는 경우 거의 동일한 길이, 폭, 두께, 단백질 수준 및 영과 형태 중 하나 이상 또는 모두를 갖는 그레인.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 더 이상 발아할 수 없도록 처리되었고, 바람직하게는 열처리에 의해, 보다 바람직하게는 조리된, 그레인.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 발육 중인 그레인의 배유, 종피, 호분 및 배아 중 하나 이상 또는 모두에서 발견되는, 그레인.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 이의 외곽 층(들)에서 착색된, 그레인.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 벼 그레인, 밀 그레인, 보리 그레인, 옥수수 그레인, 수수 그레인 또는 귀리 그레인인, 그레인.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 벼 그레인인, 그레인.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 현미 그레인 또는 흑미 그레인인, 그레인.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 야생형 그레인이 서열번호 3 또는 15 내지 39 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 3 또는 15 내지 39 중 어느 하나 이상과 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 mtSSB 폴리펩타이드를 포함하는, 그레인.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 mtSSB 폴리펩타이드가 mtSSB-1a 폴리펩타이드인, 그레인.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 야생형 그레인이 서열번호 3 또는 15 내지 23 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 3 또는 15 내지 23 중 어느 하나 이상과 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 mtSSB-1a 폴리펩타이드를 포함하는, 그레인.

청구항 20

청구항 18 또는 19에 있어서, 상기 야생형 그레인이 서열번호 3에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 3과 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 mtSSB-1a 폴리펩타이드를 포함하는, 그레인.

청구항 21

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 절단된 mtSSB 폴리펩타이드, 바람직하게는 절단된 mtSSB-1a 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자를 포함하는, 그레인.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 절단된 mtSSB 폴리펩타이드가 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 또는 이 중 어느 하나의 절단된 버전으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진, 그레인.

청구항 23

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 감소된 mtSSB 활성이 하기 중 하나 이상 또는 모두인, 그레인:

- i) 단일 가닥 DNA에 결합하는 감소된 능력,

- ii) RECA3 폴리펩타이드에 결합하는 감소된 능력, 및
- iii) TWINKLE 폴리펩타이드에 결합하는 감소된 능력.

청구항 24

청구항 1 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 야생형 그레인이 서열번호 61, 67, 69, 71, 73, 75, 77 또는 79 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 61, 67, 69, 71, 73, 75, 77 또는 79 중 어느 하나 이상과 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 RECA3 폴리펩타이드를 포함하는, 그레인.

청구항 25

청구항 1 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 감소된 RECA3 폴리펩타이드 활성이 하기 중 하나 또는 둘 다인, 그레인:

- i) mtSSB 폴리펩타이드에 결합하는 감소된 능력, 및
- ii) 감소된 리컴비나제 활성.

청구항 26

청구항 1 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 야생형 그레인이 서열번호 64, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 또는 96 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 64, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 또는 96 중 어느 하나 이상과 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 TWINKLE 폴리펩타이드를 포함하는, 그레인.

청구항 27

청구항 1 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 감소된 TWINKLE 폴리펩타이드 활성이 하기 중 하나 또는 둘 다인, 그레인:

- i) mtSSB 폴리펩타이드에 결합하는 감소된 능력, 및
- ii) 감소된 헬리카제 활성.

청구항 28

아미노산 서열이 각각 상응하는 야생형 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 상이하고, 바람직하게는 청구항 3 내지 5 중 어느 한 항에 따른 유전학적 변이를 포함하는 시리얼 식물의 내인성 유전자에 의해 암호화된 상응하는 야생형 폴리펩타이드와 비교할 때 감소된 활성을 갖는, 돌연변이체 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, 돌연변이체 RECA3 폴리펩타이드 또는 돌연변이체 TWINKLE 폴리펩타이드.

청구항 29

청구항 28의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 바람직하게는 청구항 3 내지 5 중 어느 한 항에 따른 유전학적 변이를 포함하는 시리얼 식물의 내인성 유전자.

청구항 30

시리얼 식물의 그레인에 존재할 때 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 발현을 감소시키는 단리된 및/또는 외인성 폴리뉴클레오타이드.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 적어도 수분 시점과 수분 후 30일 사이의 시점에서 시리얼 식물의 발육 중인 그레인에서 유전자의 발현을 감소시키기 위해 사용되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 32

청구항 29 내지 31 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 핵산 작제물 및/또는 벡터로서, 상기 핵산 작제물 또는 벡터가 적어도 수분 시점과 수분 후 30일 사이의 시점에서 시리얼 식물의 발육 중인 그레인에서 발현되는, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 DNA 영역을 포함하는, 핵산 작제물 및/또는 벡터.

청구항 33

청구항 29 내지 31 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 청구항 32의 핵산 작제물 및/또는 벡터를 포함하는 세포, 조직, 기관, 식물 부분 또는 식물.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 또는 벡터가 세포, 조직, 기관, 식물 부분 또는 식물의 계놈, 바람직하게는 핵 계놈으로 통합되는, 식물 세포, 조직, 기관, 식물 부분 또는 식물.

청구항 35

상응하는 야생형 시리얼 식물 세포에 비해 적어도 하나의 미토콘드리아 폴리펩타이드의 감소된 수준 및/또는 활성을 포함하는 시리얼 식물 세포, 이로부터의 종자 또는 조직으로서, 여기서 수준 및/또는 활성이 감소된 미토콘드리아 폴리펩타이드가 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 및 TWINKLE 폴리펩타이드 중 적어도 하나인, 시리얼 식물 세포, 이로부터의 종자 또는 조직.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 배유, 종피, 호분 또는 배아 세포이거나 이를 포함하는 세포, 이로부터의 종자 또는 조직.

청구항 37

청구항 35에 있어서, 호분 세포인 세포, 이로부터의 종자 또는 조직.

청구항 38

청구항 1 내지 10 또는 12 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인을 생성하고/하거나 청구항 28의 폴리펩타이드, 청구항 29 내지 31 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 청구항 32의 핵산 작제물 및/또는 벡터 또는 청구항 33 내지 37 중 어느 한 항에 따른 세포, 종자 또는 조직을 생성하는 시리얼 식물.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 하기 중 하나 이상 또는 모두를 특징으로 하는 시리얼 식물:

- (a) 상응하는 야생형 식물과 거의 동일한 높이를 갖는 것;
- (b) 상기 식물이 자웅 생식력이 있는 것; 및
- (c) 상기 식물이 지연된 그레인 성숙화를 나타내는 것.

청구항 40

필드에서 성장하는 청구항 38 또는 39의 적어도 100개 시리얼 식물의 집단.

청구항 41

청구항 33 내지 37 중 어느 한 항에 따른 세포를 생성하는 방법으로서, 상기 방법이 청구항 2 내지 5 중 어느 한 항에 정의된 유전학적 변이, 청구항 29 내지 31 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 또는 청구항 32의 핵산 작제물 및/또는 벡터를 세포, 바람직하게는 시리얼 식물 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 42

청구항 38 또는 39의 시리얼 식물 또는 이로부터의 그레인을 생성하는 방법으로서, 상기 방법이 하기의 단계를 포함하는 방법:

- i) 청구항 2 내지 5 중 어느 한 항에 정의된 유전학적 변이, 청구항 29 내지 31 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클

레오타이드, 또는 청구항 32의 핵산 작제물 및/또는 벡터를 시리얼 식물 세포로 도입하는 단계,

ii) 단계 i)로부터 수득된 세포로부터 유전학적 변이 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 시리얼 식물을 수득하는 단계, 및

iii) 임의로 단계 ii)의 식물로부터 그레인을 수확하는 단계로서, 상기 그레인이 유전학적 변이를 포함하거나 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 또는 벡터로 유전자전이된, 단계, 및

iv) 임의로 그레인으로부터 하나 이상 세대의 자손 식물을 생성하는 단계로서, 상기 자손 식물이 유전학적 변이를 포함하거나 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 또는 벡터로 유전자전이되어, 시리얼 식물 또는 그레인을 생성하는 단계.

청구항 43

청구항 38 또는 39의 시리얼 식물, 또는 이로부터의 그레인을 생성하는 방법으로서, 상기 방법이 하기의 단계를 포함하는 방법:

i) 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자에 대한 돌연변이를 시리얼 식물 세포에 도입하여, 세포가 상응하는 야생형 시리얼 식물 세포에 비해 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드의 감소된 수준 및/또는 활성을 갖도록 하는 단계,

ii) 단계 i)의 세포로부터 시리얼 식물을 수득하는 단계로서, 상기 시리얼 식물이 내인성 유전자의 돌연변이를 포함하는 단계, 및

iii) 임의로 단계 ii)의 식물로부터 그레인을 수확하는 단계로서, 상기 그레인이 돌연변이를 포함하는 단계, 및

iv) 임의로 그레인으로부터 하나 이상의 세대의 자손 식물을 생성하는 단계로서, 상기 자손 식물이 돌연변이를 포함하여, 시리얼 식물 또는 그레인을 생성하는 단계.

청구항 44

청구항 38 또는 39의 시리얼 식물 또는 청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인을 선택하는 방법으로서, 상기 방법이 하기의 단계를 포함하는 방법:

i) 청구항 1 내지 10 또는 12 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인의 생성에 대해 또는 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자 내 돌연변이의 존재에 대해 각각이 전구체 시리얼 식물 세포, 그레인 또는 식물의 돌연변이 유발 처리로부터 수득된 시리얼 식물 또는 그레인의 집단을 스크리닝하는 단계, 및

ii) 단계 (i)의 집단으로부터 청구항 1 내지 10 또는 12 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인을 생성하거나 상기 유전자 내 돌연변이를 포함하는 시리얼 식물을 선택하여 시리얼 식물 또는 그레인을 선택하는 단계.

청구항 45

청구항 38 또는 39의 시리얼 식물을 선택하는 방법으로서, 상기 방법이 하기의 단계를 포함하는 방법:

i) 시리얼 그레인으로부터 하나 이상의 자손 식물을 생성하는 단계로서, 시리얼 그레인이 2개의 모체 시리얼 식물의 교배로부터 유래된 단계,

ii) 청구항 1 내지 10 또는 12 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인의 생성을 위해 단계 i)의 하나 이상의 자손 식물을 스크리닝하는 단계, 및

iii) 그레인을 생성하는 자손 식물을 선택하여, 시리얼 식물을 선택하는 단계.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 단계 ii)가 하기 중 하나 이상 또는 모두를 포함하는, 방법:

i) 유전학적 변이에 대해 자손 식물로부터의 DNA를 포함하는 샘플을 분석하는 단계,

ii) 자손 식물로부터 수득된 그레인의 호분의 두께를 분석하는 단계, 및

iii) 그레인 또는 이의 부분의 영양 내용물을 분석하는 단계.

청구항 47

청구항 45 또는 46에 있어서, 단계 iii)가 하기 중 하나 이상 또는 모두를 포함하는, 방법:

- i) 유전학적 변이에 대해 동형접합성인 자손 식물을 선택하는 단계,
- ii) 이의 그레인이 상응하는 야생형 시리얼 그레인에 비해 증가된 호분 두께를 갖는 자손 식물을 선택하는 단계, 및
- iii) 이의 그레인 또는 이의 부분이 상응하는 야생형 시리얼 그레인 또는 이의 부분과 비교하여 변경된 영양 내용물을 갖는 자손 식물을 선택하는 단계.

청구항 48

청구항 45 내지 47 중 어느 한 항에 있어서,

- i) 2개의 모체 시리얼 식물을 교배하는 단계로서, 바람직하게 모체 시리얼 식물 중 하나가 청구항 1 내지 10 또는 12 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인을 생성하는 단계, 또는
- ii) 단계 i)로부터의 하나 이상의 자손 식물을, 제1 모체 시리얼 식물의 주요 유전자형을 갖는 식물을 생성하지만 청구항 1 내지 10 또는 12 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인을 생성하기에 충분한 횟수 동안 청구항 1 내지 10 또는 12 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인을 생성하지 않는 제1 모체 시리얼 식물과 동일한 유전자형의 식물과 역교배하는 단계, 및
- iii) 청구항 1 내지 10 또는 12 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인을 생성하는 자손 식물을 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 49

청구항 42 내지 48 중 어느 한 항에 따른 방법을 사용하여 생성된 시리얼 식물.

청구항 50

세포, 시리얼 식물 또는 시리얼 그레인과 같은 식물 부분을 생성하기 위한 청구항 29 내지 31 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 또는 청구항 32의 핵산 작제물 및/또는 벡터의 용도.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인을 생성하기 위해 사용되는, 용도.

청구항 52

청구항 1 내지 10 또는 12 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인을 생성하는 시리얼 식물을 동정하기 위한 방법으로서, 상기 방법이 하기의 단계를 포함하는 방법:

- i) 시리얼 식물로부터 핵산 샘플을 수득하는 단계, 및
- ii) 상응하는 야생형 시리얼 식물과 비교할 때 식물에서 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드의 활성 수준을 감소시키는 유전학적 변이의 존재 또는 부재에 대해 샘플을 스크리닝하는 단계.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 상기 유전학적 변이가 하기 중 하나 또는 둘 다인, 방법:

- a) 시리얼 식물에 존재하는 경우 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 발현을 감소시키는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 의해 암호화되는 폴리뉴클레오타이드를 발현하는 핵산 작제물, 및
- b) 활성이 감소된 돌연변이체, 바람직하게는 절단된 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드,

RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 발현하는 유전자 또는 이에 의해 암호화되는 mRNA.

청구항 54

청구항 52 또는 53에 있어서, 상기 유전학적 변이의 존재가 유전학적 변이(들)이 결합된 상응하는 시리얼 식물과 비교할 때 시리얼 식물의 그레인이 두꺼워진 호분을 가짐을 나타내는, 방법.

청구항 55

청구항 1 내지 10 또는 12 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인을 생성하는 시리얼 식물을 동정하기 위한 방법으로서, 상기 방법이 하기의 단계를 포함하는 방법:

- i) 시리얼 식물로부터 그레인을 수득하는 단계, 및
- ii) 하기 중 하나 이상에 대해 그레인 또는 이의 일부를 스크리닝하는 단계:
 - a) 두꺼워진 호분,
 - b) 그레인에서 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드 및/또는 활성의 양, 및
 - c) 그레인에서 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자에 의해 암호화된 mRNA의 양.

청구항 56

청구항 52 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 청구항 28, 38 또는 39 중 어느 한 항에 따른 시리얼 식물을 동정하는, 방법.

청구항 57

시리얼 식물 부분을 생성하는 방법으로서, 상기 방법이,

- a) 필드에서 청구항 28, 38 또는 39 중 어느 한 항에 따른 시리얼 식물, 또는 이러한 적어도 100개의 시리얼 식물을 성장시키는 단계, 및
- b) 시리얼 식물 또는 시리얼 식물들로부터 시리얼 식물 부분을 수확하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 58

가공된 그레인, 또는 그레인으로부터 수득된 밀가루, 겨, 통밀, 맥아, 전분 또는 오일의 생성 방법으로서, 상기 방법이

- a) 청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인을 수득하는 단계, 및
- b) 그레인을 가공하여 가공된 그레인, 밀가루, 겨, 통밀, 맥아, 전분 또는 오일을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 59

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인, 또는 청구항 28, 38 또는 39 중 어느 한 항에 따른 시리얼 식물, 또는 유전학적 변이를 포함하는 상기 그레인 또는 시리얼 식물 부분로부터 생성된 생성물.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 유전학적 변이, 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 또는 벡터, 및 두꺼워진 호분 중 하나 이상 또는 모두를 포함하는, 생성물.

청구항 61

청구항 59 또는 60에 있어서, 상기 부분이 조리된 것, 끓인 것, 반숙한 것, 로스팅한 것, 베이킹된 것, 정미한 것, 크래킹된 것, 퍼핑한 것, 제분한 것 또는 플레이킹된 그레인, 또는 겨인, 생성물.

청구항 62

청구항 59 내지 61 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생성물이 식품 성분, 음료 성분, 식품 또는 음료 생성물인, 생성물.

청구항 63

청구항 62에 있어서,

- i) 식품 성분 또는 음료 성분이 로스팅한 그레인, 정미한 그레인, 크랙킹된 그레인, 펄핑된 그레인, 제분된 그레인, 플레이킹된 그레인, 통밀, 밀가루, 겨, 전분, 맥아 및 오일로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
- ii) 식품이 가공된 그레인, 조리된 그레인, 끓인 그레인, 죽, 누룩 또는 누룩을 넣지 않은 빵, 파스타, 국수, 동물 사료, 아침식사용 시리얼, 스낵 식품, 케이크, 페이스트리 및 밀가루 기반 소스를 함유하는 식품으로 이루어진 그룹으로부터 선택되거나,
- iii) 음료품이 차, 팩킹된 음료 또는 에탄올을 포함하는 음료인, 생성물.

청구항 64

청구항 62 또는 63의 식품 또는 음료 성분을 제조하는 방법으로서, 상기 방법이 청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인, 또는 상기 그레인로부터의 겨, 밀가루, 통밀, 맥아, 전분 또는 오일을 가공하여 식품 또는 음료 성분을 생성함을 포함하는, 방법.

청구항 65

청구항 62 또는 63의 식품 또는 음료 생성물을 제조하는 방법으로서, 상기 방법이 바람직하게 청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 따른 그레인, 또는 상기 그레인로부터의 겨, 밀가루, 통밀, 맥아, 전분 또는 오일을 조리하거나, 끓이거나, 로스팅하거나 플레이킹하거나 또 다른 식품 또는 음료 성분과 혼합함에 의해 그레인을 가공함을 포함하는, 방법.

청구항 66

동물 사료 또는 식품으로서, 또는 동물 소비용 사료 또는 사람 소비용 식품을 생성하기 위한 청구항 1 내지 27 중 어느 한 항의 그레인 또는 이의 부분, 또는 청구항 28, 38 또는 39 중 어느 한 항에 따른 시리얼 식물 또는 이의 부분의 용도.

청구항 67

청구항 28의 폴리펩타이드, 청구항 29 내지 31 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 청구항 32의 핵산 작제물 및/또는 벡터, 또는 청구항 33 내지 37 중 어느 한 항에 따른 세포 중 하나 이상, 및 하나 이상의 허용되는 담체, 바람직하게는 또 다른 식품 성분을 포함하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 호분, 배아, 전분성 배유 및 감소된 수준 및/또는 활성의 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 포함하는 시리얼 그레인에 관한 것이다. 본 발명의 그레인, 또는 이로부터의 호분은 개선된 영양 성질을 갖고 따라서 특히 사람 및 동물 영양분 공급 생성물에 유용하다.

배경 기술

[0002]

전 세계적으로 밀, 벼, 옥수수, 보타 적은 정도로 보리, 귀리, 호밀과 같은 시리얼 그레인은 그레인의 전분 함량에서 사람이 섭취하는 열량의 주요 공급원이다. 시리얼 그레인은 또한 단백질, 비타민, 미네랄 및 식이 섬유와 같은 다른 영양 성분을 공급하는데 중요하다. 그레인의 다른 부분은 이러한 영양 성분에 다르게 기여한다. 전분은 시리얼 그레인의 전분이 많은 배유에 저장되는 반면 다른 영양 성분은 배아와 겨에 더 집중되어 있다(참조: Buri 등, 2004). 그러나 겨는 음식, 특히 벼에서 사용하기 전에 제거한 다음 백미로 먹는 경우가 많다.

- [0003] 시리얼 그레인에는 모계와 부계 배우체 사이의 이중 수정 이벤트에서 발생한다. 꽃가루관의 2개 정자 세포 중 하나는 난자와 융합하여 배아로 발달하는 접합자를 생성하고, 다른 정자 세포는 거대배우체의 2배체 중앙 세포와 융합하여 1차 배유 핵을 생성하고 이로부터 유전학적으로 3배체 배유가 발달한다. 따라서, 호분을 포함하는 배유는 모계 반수체 계통의 2개 카피와 부계 반수체 계통의 1개 카피를 갖는 3배체이다. 쌍자엽 종자에서 배유는 발육 중인 배아에 의해 소비되는 반면, 벼와 같은 단자엽 식물에서는 배유가 성숙한 그레인의 대부분을 차지한다.
- [0004] 시리얼의 성숙한 배유는 뚜렷한 특징을 가진 4가지 세포 유형, 즉 전분 과립과 저장 단백질의 풍부한 함량을 특징으로 하는 전분이 많은 배유, 대부분의 전분이 많은 배유를 둘러싸는 두께가 하나의 세포 층인 표피 유사 호분, 주요 모계 맥관 구조 위의 종자 기저에 있는 전달 세포, 및 그레인 발달 초기에 배아의 내벽을 형성하지만 나중에는 배아와 전분이 많은 배유를 연결하는 배지루만 둘러쌀 수 있는 배아 주변 세포층을 갖는다(참조: Becraft 등, 2001a). 배아는 전분이 많은 배유 내의 공동 내에서 형성된다. 따라서 시리얼 호분 조직은 시리얼 그레인에서 배유의 최외곽 층을 포함하고 전분이 많은 배유와 배아의 일부를 둘러싸고 있다.
- [0005] 호분 세포는 이들의 형태, 생화학적 구성 및 유전자 발현 프로파일에 의해 전분이 많은 배유 세포와 구별된다(참조: Becraft 및 Yi, 2011). 호분 세포는 일반적으로 오일과 단백질이 풍부하고 종자 발아 동안 배유 비축을 이 동시킬 수 있는 효소를 분비한다. 각각의 호분 세포는 배유 세포벽보다 두껍고 주로 다양한 비율의 아라비노크 실란과 베타 글루칸으로 구성되고 고도의 자가형광을 나타내는 섬유질 세포벽 내에 봉입되어 있다. 호분층은 시리얼에서 때때로 안토시아닌으로 착색되는 배유의 유일한 층이다.
- [0006] 시리얼 호분은 밀과 야생형 옥수수에서 단지 하나의 세포층이고(참조: Buttrick 1963; Walbot, 1994), 벼에서는 배유의 등쪽 영역에서 대부분 1개이지만 최대 3개 세포층(참조: Hoshikawa, 1993), 및 야생형 보리에서 3개의 세포층(참조: Jones, 1969)이다. 정상적인 배유에서 호분은 매우 규칙적이고 세포 분열의 패턴은 고도로 조직화되어 있다. 야생형 성숙한 호분 세포는 과립, 작은 액포 및 단백질, 지질 및 피틴으로 구성되거나 단백질과 탄수화물로 구성된 봉입체를 포함하는 조밀한 세포질을 갖는 단면이 거의 직육면체이다. 성숙한 시리얼 그레인에서 호분은 건조된 휴면 상태이지만 살아 있는 유일한 배유 조직이다. 흡수 시, 배아는 지베렐린을 생성하여 호분에 의해 아밀라제 및 기타 하이드롤라제의 합성을 유도하며, 이는 전분이 많은 배유로 방출되어 저장 화합물을 분해하여 배아가 묘목으로 초기 성장할 수 있도록 당과 아미노산을 형성한다.
- [0007] 문헌(참조: Becraft 및 Yi(2011))은 시리얼 그레인에서 호분 발달의 규제를 검토하였다. 여러 수준의 유전학적 조절이 호분 세포의 운명, 분화 및 조직화를 제어하고 많은 유전자가 이 과정에 관여하며 그 중 일부만 동정되었다. 예를 들어, 옥수수 결함 *kernal1(dek1)* 기능 상실 돌연변이체는 호분 층을 갖지 않고 이는 야생형 Dek1 폴리펩타이드가 호분으로서 외부 세포층을 특징하기 위해 요구됨을 지적한다(참조: Becraft 등, 2002). Dek1 폴리펩타이드는 21개의 막-스패닝 도메인과 활성 칼파인 프로테아제를 포함하는 세포질 도메인을 가진 큰 통합 막 단백질이다. 옥수수의 또 다른 유전자인 CRINKLY4(CR4)는 호분 운명의 양성 조절자 역할을 하는 수용체 키나제를 암호화하고, *cr4* 돌연변이체는 호분을 감소시켰다(참조: Becraft 등, 2001b).
- [0008] 시리얼 그레인 돌연변이체에서 두꺼워진 호분의 여러 사례가 문헌에 보고되었지만 다발성 영양 효과 또는 농업 및 생산 문제로 인해 유용한 것으로 입증된 것은 없다.
- [0009] 문헌(참조: Shen 등 (2003))은 상이한 돌연변이체에서 정상적인 단일 층 대신 호분 세포의 2-3개 또는 최대 7개 층을 갖는 *과잉 호분 층I(sal1)* 유전자에서 옥수수 돌연변이체의 동정을 보고하였다. SAL1 폴리펩타이드는 부류 E 액포 분류 단백질로 동정되었다. 동형접합성 *sal1-1* 돌연변이체 그레인은 발아에 실패한 결함이 있는 배아를 갖고 전분이 많은 배유가 많이 감소하였다. *sal1-2* 대립형질에 대해 동형접합성인 덜 완전한 돌연변이체는 2개 세포층 호분을 나타냈다. 그러나 돌연변이체 식물은 야생형의 30% 높이까지만 성장하였고 감소된 뿌리 질량을 갖고 종자 세팅이 불량하였다(참조: Shen 등 2003). 이들 식물은 농경학적으로 유용하지 않았다.
- [0010] 문헌(참조: Yi 등 (2011))은 옥수수에서 두꺼워진 호분1(*thk1*) 돌연변이체의 동정을 보고하였다. 돌연변이체 커널(kernal)은 다층 호분을 보여주었다. 그러나 돌연변이체 커널에는 잘 발달된 배아가 없었고 과중했을 때 발아하지 않았다. 야생형 *Thk1* 유전자는 옥수수에서 호분 발달에 필요한 Dek1 폴리펩타이드의 다운스트림에서 작용하는 Thk1 폴리펩타이드를 암호화하였다(참조: Becraft 등, 2002).
- [0011] 옥수수 세포의 세포층(*Xc1*) 유전자 돌연변이체는 잎 형태에 대한 이의 효과에 의해 동정되었다. 이것은 이중 호분층과 다층 잎 표피를 생성하였다(참조: Kessler 등, 2002). *Xc1* 돌연변이는 옥수수에서 세포 분열과 분화 패턴을 방해하는 반우성 돌연변이로, 비정상적으로 반짝이는 모양을 가진 두껍고 좁은 잎을 생성한다.

- [0012] *disorgal1* 및 *disorgal2(dil1* 및 *dil2)* 유전자의 옥수수 돌연변이체는 불규칙한 형태와 크기의 세포가 있는 다양한 층 수를 갖는 호분을 나타냈다(Lid 등, 2004). 그러나 동형접합성 *dil1* 및 *dil2* 돌연변이체 그레인은 전분의 축적 감소로 인해 수축되었고, 성숙한 돌연변이체 그레인은 발아율이 낮았으며 생존 가능한 식물체로 발달하지 못하였다.
- [0013] 보리에서, *elo2* 돌연변이체는 비정상적인 주연부 세포 분열로 부터 비롯되는 호분 층의 유사하게 무질서한 세포와 호분층의 불규칙성을 보여주었다(참조: Lewis 등, 2009). 식물은 또한 잎 표피에서 증가된 세포층을 보여주었고, 표피에 세포가 부풀어 오르고 뒤튼졌다. 중요하게도, 동형접합성 돌연변이체 식물은 왜소화되어 야생형의 60% 미만의 그레인 중량을 생성하고 그레인 생산에 유용하지 않다.
- [0014] 벼에서 종자 저장 단백질의 발현을 조절하는 2개의 전사 인자도 호분 세포의 운명에 영향을 미친다(참조: Kawakatsu 등, 2009). DOF 아연 핑거 전사 인자 부류에 속하는 벼 프롤라민 박스 결합 인자(RPBF) 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 공동 억제 작제물에 의한 발현 감소는 크고 무질서한 세포로 이루어진 산발적인 다층 호분을 유도하였다. 또한 종자 저장 단백질 발현 및 축적이 상당히 감소하였고, 전분과 지질은 상당히 감소된 수준으로 축적되었다. 옥수수 Dek1, CR4 및 SAL1 유전자의 벼 상동체의 발현도 감소하여 RPBF 및 RISBZ1 인자가 해당 유전자와 동일한 조절 경로에서 작동함을 보여준다.
- [0015] 보다 최근에, 돌연변이체 *ROS1a* 유전자가 벼에서 두꺼워진 호분을 유도할 수 있는 것으로 결정되었다(참조: WO 2017/083920).
- [0016] 농경학적으로 유용한 식물, 특히 벼 식물로부터 두꺼워진 호분을 갖는 시리얼 그레인이 필요하다.

발명의 내용

- [0017] 본원 발명자들은 시리얼 그레인에서 호분 발달에 영향을 미치는 수많은 유전자 및 이에 의해 암호화되는 단백질을 동정하였다.
- [0018] 따라서, 하나의 양상에서 본 발명은 호분, 배아, 전분이 많은 배유 및 상응하는 야생형 시리얼 그레인에 비해 적어도 하나의 미토콘드리아 폴리펩타이드의 감소된 수준 및/또는 활성을 포함하는 시리얼 그레인을 제공하고, 여기서 수준 및/또는 활성이 감소된 미토콘드리아 폴리펩타이드는 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 및 TWINKLE 폴리펩타이드 중 적어도 하나이다.
- [0019] 바람직한 구현예에서, 그레인은 상응하는 야생형 시리얼 그레인에 비해 그레인에서 적어도 하나의 미토콘드리아 폴리펩타이드의 수준 및/또는 활성을 감소시키는 유전학적 변이를 포함한다. 본 구현예의 예에서, 그레인은 상응하는 야생형 시리얼 그레인에 비해 그레인에서 적어도 하나의 미토콘드리아 폴리펩타이드의 수준 및/또는 활성을 감소시키는 2개 이상의 유전학적 변이를 포함한다. 본 구현예의 또 다른 예에서, 그레인은 상응하는 야생형 시리얼 그레인에 비해 그레인에서 2개 또는 3개의 미토콘드리아 폴리펩타이드의 수준 및/또는 활성을 감소시키는 2개 이상의 유전학적 변이를 포함한다.
- [0020] 하나의 구현예에서, 유전학적 변이는 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자에서의 돌연변이를 포함하고, 이로써 상기 돌연변이는 미토콘드리아 폴리펩타이드의 수준 및/또는 활성을 감소시킨다.
- [0021] 하나의 구현예에서, 유전학적 변이는 사이린성 RNA 분자를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 상기 사이린성 RNA 분자, 및/또는 사이린성 RNA 분자로부터 생성된 가공된 RNA 분자는 내인성 유전자의 발현을 감소시키고, 바람직하게는 외인성 폴리뉴클레오타이드는 시리얼 식물의 발달 중인 그레인에서 발현되는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 사이린성 RNA 분자를 암호화하는 DNA 영역을 포함하고, 여기서 프로모터는 바람직하게 적어도 수분 시점과 수분 후 30일 사이의 시점에서 발현된다,
- [0022] 하나의 구현예에서, 유전학적 변이는 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자의 RNA 전사체의 변형된, 바람직하게는 감소된 스플라이싱을 초래하는 스플라이스 부위 돌연변이를 포함하고, 여기서 스플라이스 부위 돌연변이는 바람직하게는 스플라이스 부위에서의 단일 뉴클레오타이드 치환, 보다 바람직하게는 서열번호 4의 뉴클레오타이드 번호 2126에 해당하는 위치에 있는 아데닌 뉴클레오타이드 치환이다.
- [0023] 하나의 구현예에서, 유전학적 변이는 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자 내의 결실 또는 삽입, 바람직하게는 전구체 시리얼 식물 세포의 돌연변이유발에 의해 도입된 결실을 포함한다.
- [0024] 하나의 구현예에서, 유전학적 변이는 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자의 단백질 암호화 영역에 미성숙 해독 정지 코돈을 포함한다.

- [0025] 하나의 구현예에서, 유전학적 변이는 야생형 폴리펩타이드에 비해 감소된 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하도록 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자에서의 돌연변이를 포함하고, 바람직하게는 여기서 돌연변이는 내인성 유전자에서의 뉴클레오타이드 치환이고, 이에 의해 돌연변이를 포함하는 내인성 유전자는 서열번호 3에 비해 아미노산 치환을 갖는 폴리펩타이드를 암호화한다.
- [0026] 하나의 구현예에서, 유전학적 변이는 돌연변이를 갖는 유전자가 발현될 때 상응하는 야생형 유전자에 비해 감소된 수준의 폴리펩타이드를 생성하도록 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자에서의 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 유전학적 변이는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 스플라이스-부위 돌연변이를 포함하거나, 상기 유전자는 유전자의 발현을 감소시키는 이의 프로모터에 돌연변이를 포함한다.
- [0027] 하나의 구현예에서, 유전학적 변이는 도입된 유전학적 변이이다.
- [0028] 구현예에서, 그레이인은 유전학적 변이에 대해 이형접합성이다. 구현예에서, 그레이인은 유전학적 변이에 대해 동형접합성이다.
- [0029] 바람직한 구현예에서, 그레이인은 두꺼워진 호분을 갖는다. 하나의 구현예에서, 그레이인은 수분 후 20일에 두꺼워진 호분을 갖는다. 하나의 구현예에서, 두꺼워진 호분은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 세포층, 약 3개, 약 4개, 약 5개 또는 약 6개의 세포층, 또는 2-8개, 2-7개, 2-6개, 2-5개 또는 3-5개의 세포층 또는 2 내지 8개, 2 내지 7개, 또는 2 내지 6개의 다수의 세포층을 포함한다.
- [0030] 하나의 구현예에서, 그레이인은 상응하는 야생형 시리얼 그레이인과 비교하는 경우, 하기 중 하나 이상 또는 전부를 포함하고, 각각은 중량을 기반으로 한다.
- [0031] i) 보다 높은 지방 함량,
- [0032] ii) 보다 높은 회분 함량,
- [0033] iii) 보다 높은 섬유 함량,
- [0034] iv) 보다 낮은 전분 함량,
- [0035] v) 보다 높은 미네랄 함량, 바람직하게 칼슘, 철, 아연, 칼륨, 마그네슘, 인 및 황의 하나 이상 또는 모두의 함량인 미네랄 함량,
- [0036] vi) 보다 높은 항산화제 함량,
- [0037] vii) 보다 높은 피테이트 함량,
- [0038] viii)비타민 B3, B6 및 B9의 하나 이상 또는 모두의 보다 높은 함량,
- [0039] ix) 보다 높은 슈크로스 함량,
- [0040] x) 보다 높은 중성 비-전분 폴리사카라이드 함량, 및
- [0041] xi) 보다 높은 모노사카라이드 함량.
- [0042] 하나의 구현예에서, 그레이인은 상응하는 야생형 시리얼 그레이인과 비교하는 경우, 보다 높은 정도의 심복백(chalkness)을 포함한다.
- [0043] 하나의 구현예에서, 그레이인은 상응하는 야생형 시리얼 그레이인과 비교하는 경우, 보다 높은 수의 호분 세포를 포함한다.
- [0044] 하나의 구현예에서, 그레이인은 전체 그레이인 또는 크랙킹된 그레이인이다
- [0045] 하나의 구현예에서, 그레이인은 상응하는 야생형 시리얼 그레이인의 발아율에 비해 약 40 내지 약 100%인 발아율을 갖는다.
- [0046] 하나의 구현예에서, 그레이인은 상응하는 야생형 시리얼 그레이인과 비교하여 발아 동안 증가된 α -아밀라제 활성을 갖는다.
- [0047] 하나의 구현예에서, 그레이인은 상응하는 야생형 시리얼 그레이인과 비교할 때 불규칙한 모양의 전분 과립이 더 느슨하게 팩킹되어 있다.
- [0048] 하나의 구현예에서, 그레이인은 상응하는 야생형 시리얼 그레이인과 비교했을 때 거의 동일한 길이, 폭, 두께, 단백질

질 수준 및 영과 형태의 하나 이상 또는 모두를 갖는다.

- [0049] 하나의 구현예에서, 그레이인은 더 이상 발아할 수 없도록 처리되었고, 바람직하게는 열처리에 의해, 보다 바람직하게는 조리되었다.
- [0050] 하나의 구현예에서, 폴리펩타이드는 발달 중인 그레이인의 배유, 종피, 호분 및 배아 중 하나 이상 또는 모두에서 발현된다.
- [0051] 하나의 구현예에서, 그레이인은 외부 층(들)에서 착색된다.
- [0052] 본 발명의 시리얼 그레이인의 예는 벼 그레이인, 밀 그레이인, 보리 그레이인, 옥수수 그레이인, 수수 그레이인 또는 귀리 그레이인을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 구현예에서, 그레이인은 벼 그레이인이다. 하나의 구현예에서, 그레이인은 갈색 벼 그레이인 또는 검정 벼 그레이인이다.
- [0053] 하나의 구현예에서, 야생형 그레이인은 서열번호 3 또는 15 내지 39 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 3 또는 15 내지 39 중 어느 하나 이상과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 mtSSB 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0054] 하나의 구현예에서, mtSSB 폴리펩타이드는 mtSSB-1a 폴리펩타이드이다. 하나의 구현예에서, 야생형 그레이인은 서열번호 3 또는 15 내지 23 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 3 또는 15 내지 23 중 어느 하나 이상과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 mtSSB-1a 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0055] 하나의 구현예에서, 야생형 그레이인은 서열번호 3에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 3과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 mtSSB 1a 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0056] 하나의 구현예에서, 야생형 그레이인은 하기 모티프 중 하나 이상 또는 모두를 포함하는 mtSSB 폴리펩타이드를 포함한다: FRGVHRAI(I/L)CGKVGQ(V/A)P(V/L)QKILRNG(R/H)T(V/I)T(V/I)FT(V/I)GTGGMFDQR (서열번호 45), P(K/M)PAQWHRI(A/S)(V/I)H(N/S)(D/E) (서열번호 46), AVQ(K/Q)L(V/T)KNS(A/S)VY(V/I)EG(D/E)IE(T/I)R(V/I)YND (서열번호 47) 및 IC(L/V/I)R(R/G)DGKI (서열번호 48).
- [0057] 하나의 구현예에서, 그레이인은 절단된 mtSSB 폴리펩타이드, 바람직하게는 절단된 mtSSB-1a 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자를 포함한다. 하나의 구현예에서, 절단된 mtSSB 폴리펩타이드는 C-말단 절단된다. 하나의 구현예에서, 절단된 mtSSB 폴리펩타이드는 200개 미만의 아미노산 길이이다. 본 발명의 시리얼 그레이인의 절단된 mtSSB 폴리펩타이드의 예는 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 또는 이 중 어느 하나의 절단된 버전으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 하나의 구현예에서, 감소된 mtSSB 활성은 하기 중 하나 이상 또는 모두이다:
- [0059] i) 단일 가닥 DNA에 결합하는 감소된 능력,
- [0060] ii) RECA3 폴리펩타이드에 결합하는 감소된 능력, 및
- [0061] iii) TWINKLE 폴리펩타이드에 결합하는 감소된 능력.
- [0062] 하나의 구현예에서, 야생형 그레이인은 서열번호 61, 67, 69, 71, 73, 75, 77 내지 79 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 61, 67, 69, 71, 73, 75, 77 내지 79 중 어느 하나 이상과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 RECA3 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0063] 하나의 구현예에서, 야생형 그레이인은 서열번호 61에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 61과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 RECA3 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0064] 하나의 구현예에서, 감소된 RECA3 폴리펩타이드 활성은 하기 중 하나 또는 둘 다이다:
- [0065] i) mtSSB 폴리펩타이드에 결합하는 감소된 능력, 및

- [0066] ii) 감소된 리컴비나제 활성.
- [0067] 하나의 구현예에서, 야생형 그레인은 서열번호 64, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 내지 96 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 64, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 내지 96 중 어느 하나 이상과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 TWINKLE 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0068] 하나의 구현예에서, 야생형 그레인은 서열번호 64에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 64과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 TWINKLE 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0069] 하나의 구현예에서, 감소된 TWINKLE 폴리펩타이드 활성은 하기 중 하나 또는 둘 다이다:
- [0070] i) mtSSB 폴리펩타이드에 결합하는 감소된 능력, 및
- [0071] ii) 감소된 헬리카제 활성.
- [0072] 또한 아미노산 서열이 각각 상응하는 야생형 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 상이한 돌연변이체 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, 돌연변이체 RECA3 폴리펩타이드 또는 돌연변이체 TWINKLE 폴리펩타이드가 제공되고, 이는 바람직하게는 본 발명의 유전학적 변이를 포함하는 시리얼 식물의 내인성 유전자에 의해 암호화된 상응하는 야생형 폴리펩타이드와 비교할 때 감소된 활성을 갖는다.
- [0073] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 돌연변이체 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드, 바람직하게는 본 발명의 유전학적 변이를 포함하는 시리얼 식물의 내인성 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0074] 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 시리얼 식물의 그레인에서 발현되는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0075] 추가 양상에서, 본 발명은 시리얼 식물의 그레인에 존재할 때 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 발현을 감소시키는 단리된 및/또는 외인성 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0076] 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 시리얼 식물의 그레인에서 발현되는 프로모터에 작동적으로 결합된다.
- [0077] 적어도 수분 시점과 수분 후 30일 사이의 시점에서 시리얼 식물의 발달 중인 그레인에서 유전자의 발현을 감소시키기 위해 사용되는 경우 상기 양상의 폴리뉴클레오타이드가 또한 제공된다.
- [0078] 당업자는 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위해 사용될 수 있는 상이한 유형의 폴리뉴클레오타이드 및 이들 폴리뉴클레오타이드가 디자인될 수 있는 방법을 잘 알고 있다. 예는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 분자 또는 이의 가공된 RNA 생성물, 마이크로 RNA, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 센스 폴리뉴클레오타이드 또는 촉매 폴리뉴클레오타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 시리얼 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 상보체와 적어도 19, 적어도 20 또는 적어도 21개 연속 뉴클레오타이드(여기서 티민(T)은 우라실(U)이다)를 포함하거나, 시리얼 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 상보체와 적어도 95% 동일한 dsRNA 분자 또는 이의 가공된 RNA 생성물이다. 예를 들어, 하나의 구현예에서 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1의 상보체와 적어도 95% 동일한 적어도 19개 연속 뉴클레오타이드(여기서 티민(T)은 우라실(U)이다)를 포함하거나, 서열번호 3으로 제공된 아미노산 서열을 포함하는 mtSSB 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 상보체와 적어도 95% 동일한 dsRNA 분자 또는 이의 가공된 RNA 생성물이다.
- [0080] 또 다른 구현예에서, dsRNA 분자는 마이크로RNA(miRNA) 전구체이고/이거나 여기서 이의 가공된 RNA 생성물은 miRNA이다.
- [0081] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 핵산 작제물 및/또는 벡터를 제공하고, 여기서 핵산 작제물 또는 벡터는 적어도 수분 시점과 수분 후 30일 사이의 시점에서 시리얼 식물의 발달 중

인 그레인에서 발현되는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 DNA 영역을 포함한다.

- [0082] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 발명의 핵산 작제물 및/또는 벡터를 포함하는 세포, 조직, 기관, 식물 부분 또는 식물을 제공한다.
- [0083] 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 또는 벡터는 세포, 조직, 기관, 식물 부분 또는 식물의 계놈, 바람직하게는 핵 계놈으로 통합된다.
- [0084] 또 다른 양상에서 본 발명은 상응하는 야생형 시리얼 식물 세포에 비해 적어도 하나의 미토콘드리아 폴리펩타이드의 감소된 수준 및/또는 활성을 포함하는 시리얼 식물 세포, 이로부터의 종자 또는 조직을 제공하고, 여기서 수준 및/또는 활성이 감소된 미토콘드리아 폴리펩타이드는 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 및 TWINKLE 폴리펩타이드 중 적어도 하나이다.
- [0085] 하나의 구현예에서, 세포, 이로부터의 종자 또는 조직은 배유, 종피, 호분 또는 배아 세포이거나 이를 포함한다.
- [0086] 하나의 구현예에서, 세포는 호분 세포이다.
- [0087] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 그레인을 생산하고/하거나 본 발명의 폴리펩타이드, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 및/또는 벡터 또는 본 발명의 세포, 종자 또는 조직 중 하나 이상 또는 모두를 포함하는 시리얼 식물을 제공한다.
- [0088] 하나의 구현예에서, 본 발명의 식물은 상응하는 야생형 식물과 거의 동일한 높이를 갖는다.
- [0089] 하나의 구현예에서, 본 발명의 식물은 암수 생식력이 있다.
- [0090] 하나의 구현예에서, 본 발명의 식물은 지연된 그레인 성숙화를 나타낸다.
- [0091] 또한, 필드(field)에서 성장하는 본 발명의 적어도 100개의 시리얼 식물 집단이 제공된다.
- [0092] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 세포를 생성하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 발명의 유전학적 변이, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 발명의 핵산 작제물 및/또는 벡터를 세포, 바람직하게는 시리얼 식물 세포로 도입하는 단계를 포함한다.
- [0093] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 시리얼 식물, 또는 이로부터의 그레인을 생성하는 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0094] i) 시리얼 식물 세포로 본 발명의 유전학적 변이, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 발명의 핵산 작제물 및/또는 벡터를 도입하는 단계,
- [0095] ii) 단계 i)로부터 수득된 세포로부터 유전학적 변이 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 시리얼 식물을 수득하는 단계, 및
- [0096] iii) 임의로 단계 ii)의 식물로부터 그레인을 수확하는 단계로서, 상기 그레인이 유전학적 변이를 포함하거나 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 또는 벡터로 유전자전이된, 단계, 및
- [0097] iv) 임의로 그레인으로부터 하나 이상 세대의 자손 식물을 생성하는 단계로서, 상기 자손 식물이 유전학적 변이를 포함하거나 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 또는 벡터로 유전자전이되어, 시리얼 식물 또는 그레인을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0098] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 시리얼 식물, 또는 이로부터의 그레인을 생성하는 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0099] i) 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드에 대한 돌연변이를 시리얼 식물 세포에 도입하여, 세포가 상응하는 야생형 시리얼 식물 세포에 비해 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드의 감소된 수준 및/또는 활성을 갖도록 하는 단계,
- [0100] ii) 단계 i)의 세포로부터 시리얼 식물을 수득하는 단계로서, 상기 시리얼 식물이 내인성 유전자의 돌연변이를 포함하는 단계, 및
- [0101] iii) 임의로 단계 ii)의 식물로부터 그레인을 수확하는 단계로서, 상기 그레인이 돌연변이를 포함하는 단계, 및

- [0102] iv) 임의로 그레인으로부터 하나 이상의 세대의 자손 식물을 생성하는 단계로서, 상기 자손 식물이 돌연변이를 포함하여, 시리얼 식물 또는 그레인을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0103] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 시리얼 식물 또는 본 발명의 그레인을 선택하는 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0104] i) 본 발명의 그레인의 생성에 대해 또는 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자 내 돌연변이의 존재에 대해 각각이 전구체 시리얼 식물 세포, 그레인 또는 식물의 돌연변이 유발 처리로부터 수득된 시리얼 식물 또는 그레인의 집단을 스크리닝하는 단계, 및
- [0105] ii) 단계 (i)의 집단으로부터 본 발명의 그레인을 생성하거나 유전자 내 돌연변이를 포함하는 시리얼 식물을 선택하여,
- [0106] 시리얼 식물 또는 그레인을 선택하는 단계를 포함한다.
- [0107] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 시리얼 식물을 선택하는 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0108] i) 시리얼 그레인으로부터 하나 이상의 자손 식물을 생성하는 단계로서, 시리얼 그레인이 2개의 모체 시리얼 식물의 교배로부터 유래된 단계,
- [0109] ii) 본 발명의 그레인의 생성을 위해 단계 i)의 하나 이상의 자손 식물을 스크리닝하는 단계, 및
- [0110] iii) 그레인을 생성하는 자손 식물을 선택하여, 시리얼 식물을 선택하는 단계를 포함한다.
- [0111] 하나의 구현예에서, 단계 ii)는 유전학적 변이에 대해 자손 식물로부터의 DNA를 포함하는 샘플을 분석하는 단계를 포함한다.
- [0112] 하나의 구현예에서, 단계 ii)는 자손 식물로부터 수득된 그레인의 호분의 두께를 분석하는 단계를 포함한다.
- [0113] 하나의 구현예에서, 단계 ii)는 그레인 또는 이의 부분의 영양 내용물을 분석하는 단계를 포함한다.
- [0114] 하나의 구현예에서, 단계 iii)은 유전학적 변이에 대해 동형접합성인 자손 식물을 선택하는 단계를 포함한다.
- [0115] 하나의 구현예에서, 단계 iii)은 이의 그레인이 상응하는 야생형 시리얼 그레인에 비해 증가된 호분 두께를 갖는 자손 식물을 선택하는 단계를 포함한다.
- [0116] 하나의 구현예에서, 단계 iii)은 이의 그레인 또는 이의 부분이 상응하는 야생형 시리얼 그레인 또는 이의 부분과 비교하여 변경된 영양 내용물을 갖는 자손 식물을 선택하는 단계를 포함한다.
- [0117] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 추가로
- [0118] i) 2개의 모체 시리얼 식물을 교배하는 단계로서, 바람직하게 모체 시리얼 식물 중 하나가 본 발명의 그레인을 생성하는 단계, 또는
- [0119] ii) 단계 i)로부터의 하나 이상의 자손 식물을 제1 모체 시리얼 식물이지만 본 발명의 것을 생성하는 주요 유전자형을 갖는 식물을 생성하기에 충분한 횟수 동안 본 발명의 그레인을 생성하지 않는 제1 모체 시리얼 식물과 동일한 유전자형의 식물과 역교배하는 단계, 및
- [0120] iii) 본 발명의 그레인을 생성하는 자손 식물을 선택하는 단계를 포함한다.
- [0121] 또한 본 발명의 방법을 사용하여 생성된 시리얼 식물이 제공된다.
- [0122] 또한 세포, 시리얼 식물 또는 시리얼 그레인과 같은 식물 부분을 생성하기 위한 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 발명의 핵산 작제물 및/또는 벡터의 용도가 제공된다.
- [0123] 하나의 구현예에서, 상기 용도는 본 발명의 그레인을 생성하는 것이다.
- [0124] 추가의 양상에서, 본 발명은 본 발명의 그레인을 생성하는 시리얼 식물을 동정하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0125] i) 시리얼 식물로부터 핵산 샘플을 수득하는 단계, 및
- [0126] ii) 상응하는 야생형 시리얼 식물에 비해 식물에서 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드의 활성 수준을 감소시키는 유전학적 변이의 존재 또는 부재에

대해 샘플을 스크리닝하는 단계를 포함한다.

- [0127] 하나의 구현예에서, 유전학적 변이는 하기 중 하나 또는 둘 다이다:
- [0128] a) 시리얼 식물에 존재하는 경우 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 발현을 감소시키는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 의해 암호화되는 폴리뉴클레오타이드를 발현하는 핵산 작제물, 및
- [0129] b) 활성이 감소된 돌연변이체, 바람직하게는 절단된 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 발현하는 유전자 또는 이에 의해 암호화되는 mRNA.
- [0130] 하나의 구현예에서, 유전학적 변이의 존재는 유전학적 변이(들)이 결합된 상응하는 시리얼 식물과 비교할 때 시리얼 식물의 그레인이 두꺼워진 호분을 가짐을 지칭한다.
- [0131] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 그레인을 생성하는 시리얼 식물을 동정하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0132] i) 시리얼 식물로부터 그레인을 수득하는 단계, 및
- [0133] ii) 하기 중 하나 이상에 대해 그레인 또는 이의 일부를 스크리닝하는 단계를 포함한다:
- [0134] a) 두꺼워진 호분,
- [0135] b) 그레인에서 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드 및/또는 활성의 양, 및
- [0136] c) 그레인에서 미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 폴리펩타이드, RECA3 폴리펩타이드 또는 TWINKLE 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자에 의해 암호화된 mRNA의 양.
- [0137] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 본 발명의 시리얼 식물을 동정한다.
- [0138] 추가의 양상에서, 본 발명은 시리얼 식물 부분을 생성하는 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0139] a) 필드에서 본 발명의 시리얼 식물, 또는 이러한 적어도 100개의 시리얼 식물을 성장시키는 단계, 및
- [0140] b) 시리얼 식물 또는 시리얼 식물들로부터 시리얼 식물 부분을 수확하는 단계를 포함한다.
- [0141] 추가의 양상에서, 본 발명은 가공된 그레인, 또는 그레인으로로부터 수득된 밀가루, 겨, 통밀, 맥아, 전분 또는 오일의 제조 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0142] a) 본 발명의 그레인을 수득하는 단계, 및
- [0143] b) 그레인을 가공하여 가공된 그레인, 밀가루, 겨, 통밀, 맥아, 전분 또는 오일을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0144] 또한 본 발명의 그레인, 또는 본 발명의 시리얼 식물, 또는 유전학적 변이를 포함하는 상기 그레인 또는 시리얼 식물의 일부로부터 생산된 생성물이 제공된다.
- [0145] 하나의 구현예에서, 생성물은 유전학적 변이, 폴리뉴클레오타이드, 핵산 작제물 또는 벡터, 및 두꺼워진 호분 중 하나 이상 또는 모두를 포함한다.
- [0146] 하나의 구현예에서, 일부는 조리된 것, 끓인 것, 반숙한 것, 로스팅한 것, 베이킹된 것, 정미한 것, 크래킹된 것, 퍼핑한 것, 제분한 것 또는 플레이킹된 그레인, 또는 겨이다.
- [0147] 하나의 구현예에서, 생성물은 식품 성분, 음료 성분, 식품 또는 음료 생성물이다.
- [0148] 하나의 구현예에서, 식품 성분 또는 음료 성분은 로스팅한 그레인, 정미한 그레인, 크래킹된 그레인, 퍼핑된 그레인, 제분된 그레인, 플레이킹된 그레인, 통밀, 밀가루, 겨, 전분, 맥아 및 오일로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0149] 하나의 구현예에서, 식료품은 가공된 그레인, 익힌 그레인, 끓인 그레인, 죽, 누룩 또는 누룩을 넣지 않은 빵, 파스타, 국수, 동물 사료, 아침식사용 시리얼, 스낵 식품, 케이크, 페이스트리 및 밀가루 기반 소스를 함유하는 식품으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0150] 하나의 구현예에서, 음료 제품은 차, 포장된 음료 또는 에탄올을 포함하는 음료이다.

- [0151] 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명의 식품 또는 음료 성분을 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 발명의 그레인, 또는 상기 그레인으로부터의 겨, 밀가루, 통밀, 맥아, 전분 또는 오일을 가공하여 식품 또는 음료 성분을 제조한다.
- [0152] 추가의 양상에서, 본 발명은 본 발명의 식품 또는 음료 성분을 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 바람직하게 그레인을 조리하거나, 끓이거나, 로스팅하거나 플레이킹하거나 본 발명의 그레인, 또는 상기 그레인으로부터의 겨, 밀가루, 통밀, 맥아, 전분 또는 오일을 또 다른 식품 또는 음료 성분과 혼합함에 의해 그레인을 가공하는 단계를 포함한다.
- [0153] 또한, 동물 사료 또는 식품으로서, 또는 동물 소비용 사료 또는 사람 소비용 식품을 제조하기 위한 본 발명의 그레인 또는 이의 부분, 또는 본 발명의 시리얼 식물 또는 이의 부분의 용도가 제공된다.
- [0154] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 본 발명의 핵산 작제물 및/또는 벡터, 또는 본 발명의 세포 중 하나 이상, 및 하나 이상의 허용되는 담체, 바람직하게는 다른 식품 성분을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0155] 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 본원에서의 임의의 구현에는 임의의 다른 구현에 준용하여 적용되는 것으로 간주되어야 한다.
- [0156] 본 발명은 단지 예시의 목적으로 의도된 본원에 기재된 특정 구현에 의해 범위가 제한되는 것은 아니다. 기능적으로 등가인 생성물, 조성물 및 방법은 본원에 기재된 바와 같이 분명히 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0157] 본 명세서 전반에 걸쳐, 달리 구체적으로 언급되지 않거나 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성, 단계의 그룹 또는 물질의 조성의 그룹에 대한 언급은 이들 단계, 물질의 조성, 단계의 그룹 또는 물질 조성의 그룹 중 하나 및 복수(즉, 하나 이상)를 포함하는 것으로 간주되어야 한다.
- [0158] 본 발명은 이후 하기의 비제한적인 실시예 및 첨부된 도면을 참조로 기재된다.

도면의 간단한 설명

- [0159] **도 1.** *tal-1* 성숙한 영과는 두꺼운 호분 표현형을 보여주었다. 야생형(ZH11, A) 및 *tal-1*(B)의 성숙한 영과; ZH11 (C) 및 *tal-1* (D) 성숙한 영과의 횡단면; Lugo1의 ZH11(E) 및 *tal-1*(F) 성숙한 영과의 염색, 화살표는 호분을 가리킴; ZH11 5 DAP(G), 10 DAP(I), 30 DAP(K) 및 *tal-1* 5 DAP(H), 10 DAP(J), 30 DAP(L) 영과 반-얇은 절편의 PAS 및 쿠마시 브릴리언트 블루(G-250) 염색. 막대 = A 및 B에서 2 mm, C, D, E 및 F에서 1 mm, G, H, I, J, K 및 L에서 20 μ m. DAP: 수분 후 경과일.
- 도 2.** 영과의 다른 위치에서 야생형 및 *tal-1*의 성숙한 그레인에서 호분 세포층의 평균 수. 상기 값은 평균 $\pm$ SD (n = 15), ** P < 0.01를 나타낸다.
- 도 3.** 시간에 따른 그레인 건조 중량 변화 분석. DAP: 수분 후 경과일. 데이터는 평균 $\pm$ SD (n = 10), **P < 0.01로서 나타낸다.
- 도 4.** ZH11 (야생형) 및 *tal-1* 성숙한 영과의 영양물 함량. 성숙한 영과에서 총 단백질(A), 조 지질(B), 식이 섬유(C), 칼슘(D), 철(E), 아연(F), 비타민 B2(G) 및 비타민 B3(H) 함량을 측정하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM, n = 3, (*, P < 0.05; **, P < 0.01)으로서 나타낸다.
- 도 5.** 흡수 후 발아된 그레인으로부터의 *tal-1* 배유 및 호분의 α -아밀라제 활성 검정. 보다 검은 막대는 *tal-1* 그레인에 대한 것이다. ZH11과 *tal* 사이의 차이는 스튜던트 t 시험에 의해 결정된 바와 같이 유의적이었다. *P < 0.05; **P < 0.01. 각각의 막대는 3개 샘플의 평균을 나타냈다.
- 도 6.** 벼의 5번 염색체에 매핑된 Indel 마커를 보여주는 TAI 맵 기반 클로닝. 각각의 선형 맵은 바로 위의 맵에서 세그먼트의 확대를 나타낸다. n은 매핑 공정의 각 단계에서 사용되는 재조합체의 수를 보여준다. Indel = 삽입 또는 결실, 번호로 나타냄. 각 수직선 아래의 숫자는 Indel 마커와 *tal-1* 돌연변이 사이의 재조합체의 수를 보여준다. Mb, 100만 염기쌍, Kb, 1천 염기쌍. 가장 낮은 선은 단백질 암호화 영역 내의 엑손(아라비아 숫자 1-6)을 나타내는 채워진 직사각형 박스와 단백질 암호화 영역 내의 인트론(로마 숫자 I-V)을 나타내는 선이 있는 TAI 유전자 개략도이다. G에서 A로 표지된 화살표는 두꺼운 호분 표현형을 담당하는 *tal-1* 대립유전자에서 G에서 A로의 점 돌연변이의 위치를 보여준다.
- 도 7.** 야생형 TAI cDNA(ZH11)의 상응하는 영역의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 11)과 비교하여 *tal I*, *tal II*

및 *tal* III으로 표지된 상이한 *tal-1* RNA로부터 생성된 cDNA 영역의 3개 뉴클레오타이드 서열(서열번호 12-14)의 정렬. 상기 영역은 돌연변이체 *tal-1* 유전자로부터의 전사체의 대안적 스플라이싱에 관여하고 있다.

도 8. 야생형 *TAI* 폴리펩타이드 서열(ZH11, 서열번호 3)과 비교하여, *tal-1* 그레인에서 생성된 3개의 상이한 RNA로부터 해독된 폴리펩타이드의 예측된 아미노산 서열(서열번호 8, 9 및 10).

도 9. 제아 메이스(*Zea mays*)(서열번호 16), 소르굼 바이컬러(*Sorghum bicolor*)(서열번호 17), 보리 호르데움 불가레(*Hordeum vulgare*)(서열번호 18), 밀 트리티쿰 아에스티쿰(*Triticum aestivum*)(서열번호 19), 브라키 포디움 디스테키톤(*Brachypodium distachyon*)(서열번호 20), 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)(서열번호 15) 및 포플러(*poplar*)(서열번호 21)에서 야생형 Os *TAI* 폴리펩타이드(서열번호 3) 및 동족체의 아미노산 서열의 정렬. 관련된 벼 서열(Os*TAI*; 서열번호 24)은 또한 정렬에 사용되었다. 9개의 서열에서 완전히 보존된 아미노산은 별표로 나타내고, 대부분 보존된 아미노산은 세미콜론으로, 유사 아미노산은 점으로 나타낸다. 단일 가닥 DNA 결합(SSB) 도메인은 단색 막대로 지적되는 반면, 미토콘드리아 통과 펩타이드(MTP)를 제거하기 위한 예상 절단 부위는 화살표로 지적한다.

도 10. 상이한 벼 조직에서 *TAI* 유전자의 상대적 발현 수준. SAM: 정단 분열 조직을 촬영, DAP: 수분 후 경과일. 모든 발현 수준은 액틴 유전자로 정규화한다. 각각의 샘플에 대한 3개의 복제물을 제조하고 평균 $\pm$ SD로 도해한다.

도 11. 비오틴 표지된 45-뉴클레오타이드 ssDNA 분자를 프로브로 사용하여 ssDNA에 결합하는 6xHis-*TAI* 단백질(레인 2). 비표지 ssDNA를 2x(레인 3), 20x(레인 4) 및 200x(레인 5)에 경쟁자 ssDNA로 첨가하면 *TAI* 단백질의 존재 하에서 이동성 전환 비오틴 표지 ssDNA의 양이 점진적으로 감소하였다.

도 12. 6xHis-*TAI* 및 이의 돌연변이체 형태인 6xHis-*tal-1* 폴리펩타이드(절단된 *TAI* 폴리펩타이드)를 사용하여 비오틴 표지된 45-뉴클레오타이드 ssDNA 분자를 프로브로 사용하여 EMSA 실험으로 ssDNA에 대한 결합을 조사하였다. 도 11과 같이 검정을 수행하기 위해 2 μ g의 제조합 *TAI* 단백질을 사용하였고, 동일한 조건 하에서 2 μ g, 4 μ g 및 8 μ g의 제조합체 6xHis-*tal-1* 폴리펩타이드 농도 구배를 사용하였다.

도 13. 다른 발달 단계에서 호분과 벼 영과의 배아에서 *TAI*의 발현. *pTAI:TAI-GUS* 유전자전이 식물로부터의 영과는 5 DAP(A 및 G), 7 DAP(B 및 H), 9 DAP(C 및 I), 11 DAP(D 및 J), 18 DAP(E 및 K) 및 24 DAP(F 및 L)에서 GUS 활성에 대해 염색하였다. C, D, I, 및 J에서 화살표는 호분 세포층을 지적한다. 막대 = A, B, C, D, E 및 F에서 0.2 cm, 막대 = G, H, I, J, K 및 L에서 0.1 cm. DAP: 수분 후 경과일.

도 14. A. 15 DAP(n = 10)에서 야생형과 비교하여 *tal-1* 발달 그레인의 호분 세포의 각 절편에서 미토콘드리아의 수. B. 11 DAP에서 야생형 및 *tal-1* 호분에서 ATP 함량. 데이터는 평균 $\pm$ SD로서 나타낸다. n = 3; **는 $P < 0.01$ 을 지적한다.

도 15. RNAi를 사용하여 벼에서 RecA3 및 TWINKLE 유전자의 하향 조절. 상단 패널은 엑손을 블랙 박스로, 인트론을 박스 사이의 선으로 사용하여 RecA3 및 TWINKLE 유전자에 대한 도식적 맵을 보여준다. RNAi 작제물에 대해 선택된 유전자 영역(엑손만)을 나타낸다. b와 c. 정량적 RT-PCR을 사용하여 각 RNAi 작제물에 대해 3개의 형질 전환된 벼 식물의 그레인에서 mRNA 수준을 측정하여 선택된 각 식물에서 감소된 발현을 보여준다.

도 16. 다른 식물 종, 주로 시리얼로부터의 mtSSB 단백질의 계통 발생 분석. 단백질 서열은 ClustalW와 정렬되었고 계통 발생은 이웃-연결(Neighbor-Joining) 방법을 사용하여 MEGA7로 생성되었다.

도 17. 일부 시리얼을 포함하는, 다른 식물 종으로부터의 TWINKLE 단백질의 계통 발생 분석. 단백질 서열은 ClustalW와 정렬되었고 계통 발생은 이웃-연결(Neighbor-Joining) 방법을 사용하여 MEGA7로 생성되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열 목록에 대한 참조

서열번호 1 - 야생형 벼 *TAI* 유전자, 유전자좌 Os05g43440의 뉴클레오타이드 서열. 뉴클레오타이드 1-1024, *TAI* 프로모터 및 5'UTR; 1025-1027, ATG 해독 개시 코돈; 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 1025-1094, 1176-1339, 1425-1633, 1771-1871, 2127-2186 및 2353-2369이다. 뉴클레오타이드 1095-1175, 인트론 1; 1340-1424, 인트론 2; 1634-1770, 인트론 3; 1872-2126, 인트론 4; 2187-2352, 인트론 5. 해독 정지는 뉴클레오타이드 2367-2369이다.

서열번호 2 - TAG 정지 코돈을 포함하는 야생형 *TAI* 유전자의 cDNA의 단백질 암호화 영역의 뉴클레오타이드 서

열.

- [0163] 서열번호 3 - 야생형 *TAI*(OsmtSSB) 폴리펩타이드의 아미노산 서열.
- [0164] 서열번호 4 - 벼 *tal-1*(돌연변이체) 유전자, 유전자좌 Os05g43440의 뉴클레오타이드 서열. *tal-1* 돌연변이는 인트론 4의 마지막 뉴클레오타이드인 뉴클레오타이드 2126(G2126A)에 있다. 뉴클레오타이드 1-1024, *TAI* 프로모터 및 5'UTR; 1025-1027, ATG 해독 개시 코돈; 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 1025-1094, 1176-1339, 1425-1633, 1771-1871, 2127-2186 및 2353-2369이다. 뉴클레오타이드 1095-1175, 인트론 1; 1340-1424, 인트론 2; 1634-1770, 인트론 3; 1872-2126, 인트론 4; 2187-2352, 인트론 5. 해독 정지는 뉴클레오타이드 2367-2369이다.
- [0165] 서열번호 5 - 해독 개시 ATG로부터 야생형 *TAI* 정지 코돈 TAG로의 *tal-1* I cDNA의 뉴클레오타이드 서열.
- [0166] 서열번호 6 - 해독 개시 ATG로부터 야생형 *TAI* 정지 코돈 TAG로의 *tal-1* II의 뉴클레오타이드 서열.
- [0167] 서열번호 7 - 해독 개시 ATG로부터 야생형 *TAI* 정지 코돈 TAG로의 *tal-1* III cDNA의 뉴클레오타이드 서열.
- [0168] 서열번호 8 - *tal-1* I 폴리펩타이드의 예측된 아미노산 서열.
- [0169] 서열번호 9 - *tal-1* II 폴리펩타이드의 예측된 아미노산 서열.
- [0170] 서열번호 10 - *tal-1* II 폴리펩타이드의 예측된 아미노산 서열.
- [0171] 서열번호 11 - 야생형 *TAI* 유전자로부터 cDNA 영역의 뉴클레오타이드 서열.
- [0172] 서열번호 12 - *tal-1* 유전자로부터 cDNA 영역의 뉴클레오타이드 서열.
- [0173] 서열번호 13 - *tal-1* 유전자로부터 cDNA 영역의 뉴클레오타이드 서열.
- [0174] 서열번호 14 - *tal-1* 유전자로부터 cDNA III의 영역의 뉴클레오타이드 서열.
- [0175] 서열번호 15 - 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)에서 *TAI* 상동성 단백질의 아미노산 서열.
- [0176] 서열번호 16 - 제아 메이스(*Zea mays*)에서 *TAI* 상동성 단백질의 아미노산 서열.
- [0177] 서열번호 17 - 소르굼 바이컬러(*Sorghum bicolor*)에서 *TAI* 상동성 단백질의 아미노산 서열.
- [0178] 서열번호 18 - 호르데움 불가레(*Hordeum vulgare*)에서 *TAI* 상동성 단백질의 아미노산 서열.
- [0179] 서열번호 19 - 트리티쿰 아에스티븀(*Triticum aestivum*)에서 TamtSSB-1a:D의 예측된 아미노산 서열.
- [0180] 서열번호 20 - 브라키포디움 디스타키온(*Brachypodium distachyon*)에서 *TAI* 상동성 단백질의 아미노산 서열.
- [0181] 서열번호 21 - 포플러 포폴러스 트리코카르파(*Populus trichocarpa*)에서 *TAI* 상동성 단백질의 아미노산 서열.
- [0182] 서열번호 22 - 트리티쿰 아에스티븀(*Triticum aestivum*)에서 TamtSSB-1a:B의 예측된 아미노산 서열.
- [0183] 서열번호 23 - 세타리아 이탈리아(*Setaria italica*)에서 SimtSSB-1a의 예측된 아미노산 서열.
- [0184] 서열번호 24 - 오리자 사티바(*Oryza sativa*)의 *TAI* 유사(OsmtSSB-1b) 단백질의 아미노산 서열.
- [0185] 서열번호 25 - 세타리아 이탈리아(*Setaria italica*)에서 SimtSSB-1b의 예측된 아미노산 서열.
- [0186] 서열번호 26 - 호르데움 불가레 아종 불가레(*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*)에서 HvmtSSB-1b의 예측된 아미노산 서열.
- [0187] 서열번호 27 - 트리티쿰 아에스티븀(*Triticum aestivum*)에서 TamtSSB- 1b:A의 예측된 아미노산 서열.
- [0188] 서열번호 28 - 트리티쿰 아에스티븀(*Triticum aestivum*)에서 TamtSSB- 1b:B의 예측된 아미노산 서열.
- [0189] 서열번호 29 - 트리티쿰 아에스티븀(*Triticum aestivum*)에서 TamtSSB- 1b:D의 예측된 아미노산 서열.
- [0190] 서열번호 30 - 오리자 사티바 자포니카 그룹(*Oryza sativa Japonica Group*)에서 OsmtSSB-2의 예측된 아미노산 서열.
- [0191] 서열번호 31 - 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)에서 AtmtSSB-2의 예측된 아미노산 서열.
- [0192] 서열번호 32 - 소르굼 바이컬러(*Sorghum bicolor*)에서 SbmtSSB-2의 예측된 아미노산 서열.

- [0193] 서열번호 33 - 제아 메이스(*Zea mays*)에서 ZmmtSSB-2의 예측된 아미노산 서열.
- [0194] 서열번호 34 - 세타리아 이탈리아(*Setaria italica*)에서 SimtSSB -2의 예측된 아미노산 서열.
- [0195] 서열번호 35 - 호르데움 불가레 아종 불가레(*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*)에서 HvmtSSB -2의 예측된 아미노산 서열.
- [0196] 서열번호 36 - 트리티쿰 아에스티쿰(*Triticum aestivum*)에서 TamtSSB -2:A의 예측된 아미노산 서열.
- [0197] 서열번호 37 - 트리티쿰 아에스티쿰(*Triticum aestivum*)에서 TamtSSB -2:B의 예측된 아미노산 서열.
- [0198] 서열번호 38 - 트리티쿰 아에스티쿰(*Triticum aestivum*)에서 TamtSSB -2:D의 예측된 아미노산 서열.
- [0199] 서열번호 39 - 포플러스 트리코카파(*Populus trichocarpa*)에서 PtmtSSB-2의 예측된 아미노산 서열.
- [0200] 서열번호 40 - 무스 무스쿨러스(*Mus musculus*)에서 MmmtSSB의 예측된 아미노산 서열.
- [0201] 서열번호 41 - 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)에서 HsmtSSB의 예측된 아미노산 서열,
- [0202] 서열번호 42 - 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)에서 DmmtSSB의 예측된 아미노산 서열.
- [0203] 서열번호 43 - 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 ScmtSSB의 예측된 아미노산 서열.
- [0204] 서열번호 44 - 에스케리치아 콜리(*Escherichia coli*)에서 EcmtSSB의 예측된 아미노산 서열,
- [0205] 서열번호 45 - 아미노산 모티프; 42aa.
- [0206] 서열번호 46 - 아미노산 모티프; 14aa.
- [0207] 서열번호 47 - 아미노산 모티프; 24aa.
- [0208] 서열번호 48 - 아미노산 모티프; 9aa.
- [0209] 서열번호 49 - *TAI* 발현 패턴을 분석하기 위해 사용된 뉴클레오타이드 서열. 뉴클레오타이드 1-3208은 *TAI* 프로 모터 및 5'UTR; 3209-3211, ATG 해독 개시 코돈을 함유하고; 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 3209-3278, 3360-3523, 3609-3817, 3955-4055, 4311-4370 및 4537-4553이다. 뉴클레오타이드 3279-3359, 인트론 1; 3524-3608, 인트론 2; 3818-3954, 인트론 3; 4056-4310, 인트론 4; 4371-4536, 인트론 5. 해독 정지 및 하기의 GUS 단백질 암호화 영역은 상기 서열에 포함되지 않는다.
- [0210] 서열번호 50 - *tal* 맵핑을 위해 분자 마커 Indel 559를 검출하기 위한 정배향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0211] 서열번호 51 - *tal* 맵핑을 위해 분자 마커 Indel 559를 검출하기 위한 역배향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0212] 서열번호 52 - *tal* 맵핑을 위해 분자 마커 Indel 548를 검출하기 위한 정배향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0213] 서열번호 53 - *tal* 맵핑을 위해 분자 마커 Indel 548를 검출하기 위한 역배향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0214] 서열번호 54 - *tal* 맵핑을 위해 분자 마커 Indel 562를 검출하기 위한 정배향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0215] 서열번호 55 - *tal* 맵핑을 위해 분자 마커 Indel 562를 검출하기 위한 역배향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0216] 서열번호 56 - *tal* 맵핑을 위해 분자 마커 Indel 583를 검출하기 위한 정배향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0217] 서열번호 57 - *tal* 맵핑을 위해 분자 마커 Indel 583를 검출하기 위한 역배향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0218] 서열번호 58 - *TAI* 및 *tal-1* 유전자의 전사체를 검출하기 위한 정배향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0219] 서열번호 59 - *TAI* 및 *tal-1* 유전자의 전사체를 검출하기 위한 역배향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열.
- [0220] 서열번호 60 - EMSA 실험에 사용된 프로브의 뉴클레오타이드 서열.
- [0221] 서열번호 61 - 벼 RECA3 DNA 복구 단백질, 오리자 사티바 자포니카 그룹(*Oryza sativa* Japonica Group)의 아미노산 서열.
- [0222] 서열번호 62 - 벼 RECA3 유전자, 오리자 사티바 자포니카(*Oryza sativa* Japonica) 그룹 재배종 니폰바레(Nipponbare) 염색체 1의 뉴클레오타이드 서열.
- [0223] 서열번호 63 - 벼 RECA3 유전자, 미토콘드리아 RECA3, 오리자 사티바 자포니카(*Oryza sativa* Japonica) 그룹

재배종 니폰바레에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열.

- [0224] 서열번호 64 - 벼 TWINKLE 엽록체/미토콘드리아 DNA 복구 단백질, 오리자 사티바 자포니카 그룹(*Oryza sativa Japonica Group*)의 아미노산 서열.
- [0225] 서열번호 65 - 벼 TWINKLE 유전자, 오리자 사티바 자포니카 그룹(*Oryza sativa Japonica Group*) 재배종 니폰바레 엽록체 6의 뉴클레오타이드 서열.
- [0226] 서열번호 66 - 오리자 사티바 자포니카(*Oryza sativa Japonica*) 그룹 재배종 니폰바레로부터의 벼 TWINKLE 유전자, 엽록체/미토콘드리아에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 153-2321이다.
- [0227] 서열번호 67 - RECA3 DNA 복구 단백질, 미토콘드리아, 브라키포디움 디스타키온(*Brachypodium distachyon*)의 아미노산 서열
- [0228] 서열번호 68 - RECA3 유전자, 미토콘드리아 RECA3, 브라키포디움 디스타키온(*Brachypodium distachyon*)에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 196-1482이다.
- [0229] 서열번호 69 - RECA3 DNA 복구 단백질, 미토콘드리아 소르굼 바이컬러(*Sorghum bicolor*)의 아미노산 서열.
- [0230] 서열번호 70 - RECA3 유전자, 미토콘드리아 RECA3, 소르굼 바이컬러(*Sorghum bicolor*)에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 230-1510이다.
- [0231] 서열번호 71 - RECA3 DNA 복구 단백질, 미토콘드리아, 제아 메이스(*Zea mays*)의 아미노산 서열.
- [0232] 서열번호 72 - RECA3 유전자, 미토콘드리아 RECA3, 제아 메이스(*Zea mays*)에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 59-1333이다.
- [0233] 서열번호 73 - 보리 RECA3 DNA 복구 단백질, 미토콘드리아, 호르데움 불가레 아종 불가레(*Hordeum vulgare* subsp. *Vulgare*)의 아미노산 서열
- [0234] 서열번호 74 - 보리 RECA3 유전자, 미토콘드리아 RECA3, 호르데움 불가레 아종 불가레(*Hordeum vulgare* subsp. *Vulgare*)에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 122-1408이다.
- [0235] 서열번호 75 - RECA3 DNA 복구 단백질, 미토콘드리아, 트리티쿰 아에스티븀(*Triticum aestivum*) 재배종의 아미노산 서열.
- [0236] 서열번호 76 - 트리티쿰 아에스티븀(*Triticum aestivum*), 재배종 차이니스 스프링으로부터의 밀 RECA3 유전자에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 112-1416이다.
- [0237] 서열번호 77 - 아에길로프스 타우시 아종 타우시(*Aegilops tauschii* subsp. *Tauschii*)로부터의 RECA3 DNA 복구 단백질, 미토콘드리아의 아미노산 서열.
- [0238] 서열번호 78 - 아에길로프스 타우시 아종 타우시(*Aegilops tauschii* subsp. *Tauschii*)로부터의 미토콘드리아 RECA3을 암호화하는 RECA3 유전자에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 129-1427이다.
- [0239] 서열번호 79 - 트리티쿰 투르기둠 아종 드럼(*Triticum turgidum* subsp. *Durum*)으로부터의 RECA3 DNA 복구 단백질, 미토콘드리아의 아미노산 서열.
- [0240] 서열번호 80 - 브라키포디움 디스타키온(*Brachypodium distachyon*) 으로부터의 TWINKLE 상동성 단백질, 엽록체/미토콘드리아의 아미노산 서열.
- [0241] 서열번호 81 - 브라키포디움 디스타키온(*Brachypodium distachyon*)으로부터의 엽록체/미토콘드리아 TWINKLE 단백질을 암호화하는 TWINKLE 유전자에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 132-2300이다.
- [0242] 서열번호 82 - 소르굼 바이컬러(*Sorghum bicolor*)로부터의 TWINKLE 상동성 단백질, 엽록체/미토콘드리아의 아미노산 서열.
- [0243] 서열번호 83 - 소르굼 바이컬러 (*Sorghum bicolor*)로부터의 엽록체/미토콘드리아 TWINKLE 단백질을 암호화하는 TWINKLE 유전자에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 154-2436이다.

- [0244] 서열번호 84 - 제아 메이스(*Zea mays*)로부터의 TWINKLE 상동성 단백질, 엽록체/미토콘드리아의 아미노산 서열.
- [0245] 서열번호 85 - 제아 메이스(*Zea mays*)로부터의 엽록체/미토콘드리아 TWINKLE 단백질을 암호화하는 TWINKLE 유전자에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 144-2351이다.
- [0246] 서열번호 86 - 아에길로프스 타우시 아종 타우시(*Aegilops tauschii* subsp. *Tauschii*)로부터의 TWINKLE 상동성 단백질, 엽록체/미토콘드리아의 아미노산 서열.
- [0247] 서열번호 87 - 아에길로프스 타우시 아종 타우시(*Aegilops tauschii* subsp. *Tauschii*), 전사체 변이체 X1로부터의 엽록체/미토콘드리아 TWINKLE 단백질을 암호화하는 TWINKLE 유전자에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 32-2209이다.
- [0248] 서열번호 88 - 파니쿰 할리(*Panicum hallii*), 이소형 X1로부터의 TWINKLE 상동성 단백질, 엽록체/미토콘드리아의 아미노산 서열.
- [0249] 서열번호 89 -파니쿰 할리(*Panicum hallii*), 전사체 변이체 X1로부터의 엽록체/미토콘드리아 TWINKLE 단백질을 암호화하는 TWINKLE 유전자에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 100-2343이다.
- [0250] 서열번호 90 - 세타리아 비리디스(*Setaria viridis*), 이소형 X1로부터의 TWINKLE 상동성 단백질, 엽록체/미토콘드리아의 아미노산 서열.
- [0251] 서열번호 91 -세타리아 비리디스(*Setaria viridis*), 전사체 변이체 X1로부터의 엽록체/미토콘드리아 TWINKLE 단백질을 암호화하는 TWINKLE 유전자에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 70-2346이다.
- [0252] 서열번호 92 - 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*)으로부터의 TWINKLE 상동성 단백질, 엽록체/미토콘드리아의 아미노산 서열.
- [0253] 서열번호 93 - 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*)으로부터의 엽록체/미토콘드리아 TWINKLE 단백질을 암호화하는 TWINKLE 유전자에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 103-2199이다.
- [0254] 서열번호 94 - 솔라넘 튜버로섬(*Solanum tuberosum*)으로부터의 TWINKLE 상동성 단백질, 엽록체/미토콘드리아의 아미노산 서열.
- [0255] 서열번호 95 - 솔라넘 튜버로섬(*Solanum tuberosum*)으로부터의 엽록체/미토콘드리아 TWINKLE 단백질을 암호화하는 TWINKLE 유전자에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 92-2176이다.
- [0256] 서열번호 96 - 솔라넘 리코페르시쿰(*Solanum lycopersicum*), 이소형 X1로부터의 TWINKLE 상동성 단백질, 엽록체/미토콘드리아의 아미노산 서열.
- [0257] 서열번호 97 -솔라넘 리코페르시쿰(*Solanum lycopersicum*), 전사체 변이체 X1로부터의 엽록체/미토콘드리아 TWINKLE 단백질을 암호화하는 TWINKLE 유전자에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열. 단백질 암호화 영역은 뉴클레오타이드 138-2228이다.
- [0258] 서열번호 98 - 킬링(TILLING) 검정에 사용되는 TA1-1F 프라이머.
- [0259] 서열번호 99 - 킬링(TILLING) 검정에 사용되는 TA1-1R 프라이머.

[0260] **발명의 상세한 설명**

[0261] **일반 기술 및 정의**

[0262] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 여기에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계(예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 식물 분자 생물학, 단백질 화학 및 생화학) 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 간주되어야 한다.

[0263] 달리 나타내지 않는 한, 본 발명에서 사용되는 재조합 단백질, 세포 배양 및 면역학적 기술은 당업자에게 널리 공지된 표준 절차이다. 상기 기술은 문헌(참조: 예를 들어, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley 및 Sons (1984), J. Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 및 2, IRL Press (1991), D.M. Glover 및 B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A

Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 및 1996), 및 F.M. Ausubel 등 (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present), Ed Harlow 및 David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 및 J.E. Coligan 등 (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (현재까지 모든 업데이트를 포함하는)) 전반에 걸쳐 기재되고 설명된다.

[0264] "및/또는"이라는 용어, 예를 들어, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해해야 하며, 양자 모두의 의미 또는 둘 중 하나의 의미를 위해 명확한 근거를 제공하기 위하여 취하는 것이다.

[0265] 본원에 사용된 "약"이라는 용어는 반대되는 언급이 없는 한, 지정된 값의 $\pm 10\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 5\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 2.5\%$, 보다 더 바람직하게는 $\pm 1\%$ 를 의미한다. "약"이라는 용어는 정확히 지정된 값을 포함한다.

[0266] 본 명세서 전반에 걸쳐 "포함한다(comprise)"라는 단어 또는 "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는"과 같은 변형 어구는 명시된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소 그룹, 정수 또는 단계의 포함을 의미하지만 다른 요소, 정수 또는 단계 또는 요소 그룹, 정수 또는 단계 배제가 아님을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0267] 선택된 정의

[0268] 용어 "호분" 및 "호분층"은 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 호분층은 내부 전분성 배유와 구별되는 시리얼 그레인 배유의 최외층이고, 전분성 배유와 배아의 일부를 둘러싸고 있다. 따라서 호분층을 구성하는 세포는 그레인의 전분성 성분인 배유의 최외곽 세포이다. 기술적으로 배유의 일부이며 때로는 말초 배유라고도 언급되지만 호분은 그레인을 연마할 때, 예를 들어, 벼 그레인을 제분하여 "백미"를 생산할 때 거의 과피 및 종각층과 함께 제거되기 때문에 실제적인 관점에서 거의 일부로 간주된다. 전분성 배유의 세포와 달리, 호분 세포는 그레인 성숙에서 생존 상태로 남아있다. 호분층은 미네랄, 비타민 A 및 B 그룹 비타민과 같은 비타민, 파이토케미칼 및 섬유를 포함하는 시리얼 그레인의 영양가의 중요한 일부이다.

[0269] 본 발명의 구현에는 "세포 층"의 수의 범위에 관한 것이고, 적어도 부분적으로는 본 발명의 그레인의 임의의 한 단면 지점에서, 단면 내의 임의의 단일 지점에서 또는 단면 사이에서 관찰된 세포층은 어느 정도 다양할 수 있다. 보다 구체적으로, 예를 들어 7개 세포층을 갖는 호분은 전체 내부 전분성 배유를 둘러싸는 7개 층을 갖지 않을 수 있지만 내부 전분성 배유의 적어도 일부, 바람직하게는 전분성 배유의 적어도 절반을 둘러싸는 7개 층을 갖는다.

[0270] 본 발명의 그레인의 호분과 관련하여 사용될 때 용어 "두꺼워진"은 본 발명의 그레인을 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교할 때 사용되는 상대적인 용어이다. 이와 관련하여, 본 발명의 그레인은 유전학적 변형이 결여된 야생형 그레인에 비해 두꺼워진 호분을 생성하는 유전학적 변형을 포함한다. 본 발명의 그레인의 호분은 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교할 때 증가된 세포 수 및/또는 증가된 세포 층 수, 바람직하게는 둘 모두를 갖는다. 이로써 호분은 mm로 측정시, 예를 들어, 현미경에 의한 결정시 두께가 증가한다. 일 구현예에서, 두께는 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 100% 증가하고, 500% 또는 600%만큼 많이 증가될 수 있고, 각각의 퍼센트는 상응하는 야생형 시리얼 그레인의 호분 두께에 상대적이다. 일 구현예에서, 증가는 50% 내지 100%, 또는 100% 내지 200%, 또는 200% 내지 300%, 또는 300% 내지 400% 또는 500%이다. 일 구현예에서, 각각의 퍼센트 증가는 증가 퍼센트의 범위는 적어도 시리얼의 배면(ventral side)에 걸쳐, 바람직하게는 전체 그레인에 걸쳐 평균 증가이다. 바람직한 구현예에서, 호분층의 두께는 그레인의 전체 단면에 걸쳐 결정된다. 일 구현예에서, 호분의 두께는 그레인의 적어도 배면 상의 분석에 의해 결정된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 그레인의 두꺼워진 호분은 호분이 일반적으로 규칙적으로 배향된 직사각형의 세포를 갖는 상응하는 야생형 시리얼 그레인의 호분과 비교하여 다양한 크기 및 불규칙적 배향의 세포를 포함한다. "두꺼워진 호분"의 이들의 특성의 모든 조합이 고려된다.

[0271] 폴리펩타이드

[0272] 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 일반적으로 본원에서 상호교환적으로 사용되고 펩타이드 결합으로 연결된 아미노산 중합체를 의미한다.

[0273] 본원에 사용된 바와 같이, 상응하는 야생형 시리얼 그레인에 비해 적어도 하나의 미토콘드리아 폴리펩타이드의 "감소된 수준", 또는 유사한 어구 는 단백질의 총양이 감소된 상대적 용어이다. 이것은 당업계의 표준 기술에 의해, 예를 들어 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 일부 또는 전체의 결실에 의해 달성될 수 있고, 이는 폴리펩타이드가 결여된 그레인을 초래한다. 상기 돌연변이는 널(null) 돌연변이이다. 일 구현예에서, 단백질의 수

준/양은 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교할 때 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%까지 감소되거나 완전히 결여이다.

[0274] 본원에 사용된 바와 같이, 상응하는 야생형 시리얼 그레인에서 상응하는 폴리펩타이드에 비해 적어도 하나의 미토콘드리아 폴리펩타이드의 "감소된 수준", 또는 유사하 어구 는 특정 단백질 활성의 총량이 감소된 상대적 용어이다. 일 구현예에서, 단백질의 활성은 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교할 때 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%까지 감소되거나 완전히 결여이다. 이 경우, 단백질의 총량은 상응하는 야생형 그레인과 비교할 때 본 발명의 그레인에서 거의 동일할 수 있지만, 본 발명의 그레인에서 폴리펩타이드는 상응하는 야생형 그레인에서 상응하는 폴리펩타이드와 비교할 때 본 발명의 그레인에서 폴리펩타이드가 적어도 하나의 아미노산 차이를 가져 본 발명의 그레인에서 단백질 기능이 감소되도록 한다.

[0275] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합 폴리펩타이드" 또는 "mtSSB"는 단일 가닥 DNA에 결합하고 시리얼 그레인의 미토콘드리아에서 발견될 수 있는 단백질 계열의 구성원, 및 변형되어 이들이 감소된 결합 활성을 갖거나 결합 활성을 갖지 않는 상동성 단백질을 지칭한다. 야생형 단백질은 변형된 단백질과 마찬가지로 단일 가닥 DNA에 대한 결합을 통해 DNA 복제, 재조합 및 복구에서 역할을 수행한다. 시리얼 그레인의 미토콘드리아에는 전형적으로 mtSSB-1a, mtSSB-1b 및 mtSSB-2로 지정된 mtSSB의 3가지 상이한 서브패밀리를 갖지만, 일부 시리얼은 단지 2개의 서브패밀리, 즉 mtSSB-1 및 mtSSB-2를 갖는다. 본원 발명자들은 야생형에 비해 시리얼 그레인에서 mtSSB-1a 또는 mtSSB-1 결합 활성을 감소시키면 호분 두께가 증가한다는 것을 발견하였다. mtSSB 폴리펩타이드는 야생형 시리얼 식물에서 발견되는 이러한 폴리펩타이드뿐만 아니라 인위적으로 생성되거나 천연에서 발견되는 이의 변이체를 포함하고, 단일 가닥 DNA 결합 활성 DNA 활성을 가질 수 있거나 갖지 않고, 일부 단일 가닥 DNA 결합 활성을 갖지만 상응하는 야생형 mtSSB 폴리펩타이드와 비교하여 감소된 수준이다. 본원에서 입증된 바와 같이, 야생형 mtSSB-1a 폴리펩타이드는 ssDNA뿐만 아니라 2개의 다른 미토콘드리아 폴리펩타이드, 즉 TWINKLE 및 RECA3에도 결합한다. 하나의 구현예에서, 활성이 감소된 mtSSB 변이체를 포함하는 본 발명의 mtSSB 폴리펩타이드는 TWINKLE 폴리펩타이드에 결합한다. 일 구현예에서, 활성이 감소된 mtSSB 변이체를 포함하는 본 발명의 mtSSB 폴리펩타이드는 RECA3 폴리펩타이드에 결합한다. 일 구현예에서, 본 발명의 mtSSB 폴리펩타이드는 mtSSB의 올리고머, 특히 동종이량체를 형성할 수 있다. 일 구현예에서, 야생형 그레인 mtSSB 폴리펩타이드는 서열번호 3 또는 15 내지 39 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 3 또는 15 내지 39 중 어느 하나 이상과 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 야생형 그레인 mtSSB 폴리펩타이드는 서열번호 3, 16 내지 20 또는 23 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 3, 16 내지 20 또는 23 중 어느 하나 이상과 참조 서열(들)의 전장을 따라 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0276] 본원에 기재된 야생형 mtSSB는 전형적으로 N-말단에 미토콘드리아 표적화 펩타이드(MTP)를 포함할 때 200-215개 아미노산 잔기의 길이를 갖고, MTP에 의해 절단된 후 170-190 잔기의 길이를 갖는다. 본 발명의 돌연변이체 mtSSB 폴리펩타이드는 mtSSB 유전자에 어떠한 삽입도 없는 경우 MTP와 함께 길이가 최대 215개 아미노산 잔기일 수 있지만, 보다 짧을 수 있고, 심지어 C-말단이 절단되거나 조기 해독 종결 돌연변이를 포함하는 돌연변이체 유전자에 의해 암호화된 경우 훨씬 더 짧을 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 mtSSB 폴리펩타이드는 DNA 결합 도메인의 적어도 일부가 결여되어 있고, 예를 들어 DNA 결합 도메인의 C-말단에 아미노산 GKI가 결여되어 있다 (예를 들어, 도 8 참조).

[0277] 일 구현예에서, 본 발명의 그레인은 상응하는 야생형 mtSSB 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 상이하거나 야생형 mtSSB 폴리펩타이드가 결여된 서열을 갖는 적어도 하나의 mtSSB 폴리펩타이드를 갖는다. 관련된 구현예에서, 본 발명의 그레인은 돌연변이체 폴리펩타이드가 그레인에 발현되지 않거나 불안정하고 그레인에 축적되지 않는 경우라도, 상응하는 야생형 mtSSB 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 상이한 서열을 갖는 적어도 하나의 (돌연변이체) mtSSB 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자를 갖는다.

[0278] 본원에서 사용되는 용어 "상응하는 야생형 mtSSB 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 상이한 서열을 갖는" 또는 유사한 어구는 본 발명의 mtSSB 폴리펩타이드 및/또는 본 발명의 그레인에서 아미노산 서열이 이것이 유래되고/되거나 천연적으로 존재하는 것과 가장 밀접하게 관련된 아미노산 서열과 상이한 비교 용어이다. 일 구현예에서, mtSSB 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 상응하는 야생형 아미노산 서열에 비해 하나 이상의 삽입, 결실 또는 아미노산 치환(또는 이들의 조합)을 가질 수 있다. mtSSB 폴리펩타이드는 상응하는 야생형 mtSSB 폴리펩타이드에 비해 2, 3, 4, 5 또는 6-10개의 아미노산 치환을 가질 수 있다. 바람직한 구현예에서, mtSSB 폴리펩타이드는 C-말단이 절단되어 있고, 예를 들어 야생형 mtSSB 폴리펩타이드의 C-말단 14개 아미노산, 또는 20개 아미노산 또

는 21개 이상의 아미노산이 결여되어 있다(예를 들어, 표 4 참조). 이러한 절단된 mtSSB 폴리펩타이드는 예를 들어 이것이 유래된 야생형 *mtSSB* 유전자에 비해 단백질 개방 해독 프레임에서 미성숙 해독 정지 코돈을 포함하는 *mtSSB* 유전자에 의해 암호화될 수 있거나, 야생형 RNA 전사체와 다르게 스플라이싱된 RNA 전사체를 생성하는 돌연변이체 유전자, 예를 들어 스플라이스 부위 돌연변이를 포함하는 유전자에 의해 암호화될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 활성이 감소된 mtSSB 폴리펩타이드는 상응하는 야생형 폴리펩타이드에 비해 단지 단일 삽입, 단일 결실 또는 단일 아미노산 치환을 갖는다. 이와 관련하여, "단일 삽입" 및 "단일 결실"은 다수(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)의 인접한 아미노산이 각각 삽입 또는 결실된 경우를 포함하고, "상응하는 야생형 폴리펩타이드"는 변이체가 유래된 야생형 폴리펩타이드 및/또는 변이체가 가장 밀접하게 관련된 천연 폴리펩타이드를 의미한다. 실시예 13에서 입증된 바와 같이, 이러한 돌연변이는 단백질의 암호화 영역 내, 바람직하게는 mtSSB 폴리펩타이드의 DNA 결합 도메인을 암호화하는 유전자 영역 내 어디에서나 존재할 수 있다.

[0279] 본원에서 사용되는 용어 "mtSSB 폴리펩타이드 활성" 또는 이의 변형은 야생형 mtSSB 폴리펩타이드 또는 이의 변이체의 적어도 하나의 생물학적 작용을 지칭한다. 한 예에서, 상기 용어는 단일 가닥 DNA에 대한 폴리펩타이드 또는 이의 올리고머의 결합 강도 또는 이의 결여를 지칭한다. 따라서, 일 구현예에서, 절단된 mtSSB 폴리펩타이드와 같은 본 발명의 mtSSB 폴리펩타이드는 야생형 mtSSB 폴리펩타이드, 예를 들어, 서열번호 3 또는 15 내지 39 중 어느 하나에 제공된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 것과 비교할 때 감소된 단일 가닥 DNA 결합 활성을 갖거나 갖지 않는다. 이러한 맥락에서, 비교는 공지된 mtSSB 폴리펩타이드 서열과의 아미노산 정렬에 의해 결정된 본 발명의 mtSSB 폴리펩타이드에 대한 서열에서 가장 근접한 야생형 mtSSB 폴리펩타이드, 또는 이로부터 본 발명의 mtSSB 폴리펩타이드가 돌연변이에 의해 유래된 야생형 mtSSB 폴리펩타이드와의 비교이다. 일 구현예에서, 본 발명의 mtSSB 폴리펩타이드는 DNA 결합 도메인의 적어도 일부가 결여되어 있거나(도 9 참조), 상응하는 야생형 mtSSB 폴리펩타이드(예를 들어, 서열번호 3에 제공된 것) 보다 약하게 단일 가닥 DNA에 결합하는 변이체(예를 들어 C-말단 절단된 변이체와 같은) DNA 결합 도메인을 갖는다. 일 구현예에서, 상기 용어는 본 발명의 TWINKLE 폴리펩타이드에 대한 폴리펩타이드 또는 이의 올리고머의 결합 강도 또는 이의 결여를 지칭한다. 일 구현예에서, 상기 용어는 본 발명의 RECA3 폴리펩타이드에 대한 폴리펩타이드 또는 이의 올리고머의 결합 강도 또는 이의 결여를 지칭한다.

[0280] 감소된 단일 가닥 DNA 결합 활성은 당업계의 표준 검정을 사용하여 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들어, 단일 가닥 DNA 결합은 문헌(참조: Farr 등 (2004) 및 Ciesielski 등 (2016))에 기재되거나, 바람직하게는 본원의 실시예 1 및 9에 기재된 바와 같이 전기영동 이동성 전환 검정 (또한 겔 이동성 전환 검정으로서 공지된)을 사용하여 측정될 수 있다. 이러한 검정에서, 단일 가닥 DNA 기질과 폴리펩타이드를 반응 혼합물에 첨가하고 겔 전기영동을 사용하여 이들이 단백질-DNA 복합체로 어셈블리되는지 결정한다.

[0281] 본원에 사용된 용어 "미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합 폴리펩타이드-1a", "mtSSB-1a" 또는 "TAI" 및 이들의 변이체는 야생형 단백질이 예를 들어, 서열번호 3 또는 15 내지 23 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 참조 서열(들)의 전장을 따라 서열번호 3 또는 15 내지 23 중 어느 하나 이상과 전체적으로 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 이의 변이체는 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자에서의 돌연변이(들)의 결과로서 감소된 ssDNA 결합 활성을 갖거나 ssDNA 결합 활성이 결여된 mtSSB-1a 폴리펩타이드를 포함한다. 일 구현예에서, 야생형 *OsmtSSB-1a* 폴리펩타이드는 하기의 모티프 중 하나 이상 또는 전부를 갖는다: 서열번호 3의 아미노산 73-114에 상응하는 FRGVHRAI(I/L)CGKVGQ(V/A)P(V/L)QKILRNG(R/H)T(V/I)T(V/I)FT(V/I)GTGGMFDQR (모티프 I, 서열번호 45), 서열번호 3의 아미노산 122-135에 상응하는 P(K/M)PAQWHRI(A/S)(V/I)H(N/S)(D/E) (모티프 II, 서열번호 46), 서열번호 3의 아미노산 141-164에 상응하는 AVQ(K/Q)L(V/T)KNS(A/S)VY(V/I)EG(D/E)IE(T/I)R(V/I)YND (모티프 III, 서열번호 47) 및 서열번호 3의 아미노산 176-184에 상응하는 IC(L/V/I)R(R/G)DGKI (모티프 IV, 서열번호 48). 감소된 *OsmtSSB-1a* 폴리펩타이드 활성을 갖는 폴리펩타이드의 예는 서열번호 8, 서열번호 9 또는 서열번호 10, 또는 이의 절단된 버전으로 제시된 아미노산 서열을 갖거나, 참조 서열(들)의 전장을 따라 서열번호 8, 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 제시된 하나 이상의 아미노산 서열 중 하나 이상과 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 갖는 것들을 포함한다.

[0282] 본원에 사용된 용어 "미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합 폴리펩타이드-1b", "mtSSB-1b" 및 이들의 변이체는 이의 야생형 단백질이 예를 들어, 서열번호 24 또는 29 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 참조 서열(들)의 전장을 따라 서열번호 24 내지 29 중 어느 하나 이상과 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. *mtSSB-1a* 폴리펩타이드는 *mtSSB-1b* 폴리펩타이드의 세트에 포함되지 않는다.

[0283] 본원에 사용된 용어 "미토콘드리아 단일 가닥 DNA 결합 폴리펩타이드-2" 또는 "mtSSB -2" 및 이들의 변이체는 이의 야생형 단백질이 예를 들어, 서열번호 30 내지 39 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 참조 서열

(들)의 전장을 따라 서열번호 30 내지 39 중 어느 하나 이상과 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. mtSSB-1a 폴리펩타이드는 mtSSB-2 폴리펩타이드의 세트에 포함되지 않는다.

[0284] 본원에서 사용된 용어 "TWINKLE"은 야생형 시리얼 그레인의 미토콘드리아에서 발견될 수 있고, 헬리카제 활성을 갖는 단백질 패밀리 및 이들의 돌연변이체 변이를 지칭한다. 야생형 TWINKLE 단백질은 미토콘드리아 DNA 복제에서 역할을 수행한다. 헬리카제는 뉴클레오타이드 트리포스페이트(NTP) 가수분해로부터의 에너지를 활용하여 듀플렉스 DNA의 풀림을 촉매한다. 본 발명자들은 시리얼 그레인에서, 바람직하게는 벼 그레인에서 야생형 TWINKLE 활성이 감소(제거되지는 않음)한 경우 호분 두께가 증가한다는 것을 발견하였다(실시예 15 참조). TWINKLE 폴리펩타이드는 야생형 시리얼 식물에서 발견되는 이러한 폴리펩타이드뿐만 아니라 인위적으로 생성되거나 천연에서 발견되는 이의 변이체를 포함하고, 헬리카제 활성을 가질 수 있거나 갖지 않고, 일부 헬리카제 활성을 갖지만 상응하는 야생형 TWINKLE 폴리펩타이드와 비교하여 감소된 수준이다. 이러한 맥락에서, 비교는 아미노산 정렬에 의해 결정된 본 발명의 TWINKLE 폴리펩타이드에 대한 서열에서 가장 근접한 야생형 mtSSB 폴리펩타이드, 또는 이로부터 본 발명의 mtSSB 폴리펩타이드가 돌연변이에 의해 유래된 야생형 TWINKLE 폴리펩타이드와의 비교이다. 일 구현예에서, TWINKLE 폴리펩타이드는 mtSSB 폴리펩타이드에 결합한다. 일 구현예에서, TWINKLE 폴리펩타이드는 헬리카제 활성을 갖는다. 일 구현예에서, TWINKLE 폴리펩타이드는 TWINKLE 폴리펩타이드의 다량체를 형성할 수 있다. TWINKLE는 전형적으로 5개의 보존된 헬리카제 모티프를 갖는다: (1) NTP 포스페이트를 안정화시키는 H1/워커(Walker) A 모티프; (2) NTP 결합/가수분해에 관여하는 H1a; (3) 결합된 Mg²⁺ 이온을 안정화할 뿐만 아니라 결합된 NTP를 배치하고 안정화하는 데 필요한 아르기닌 핑거 및 기본 스택 잔기를 포함하는 H2/워커 B 모티프; (4) H1a와 함께 NTP 결합/가수분해에 관여하는 H3; 및 (5) DNA 결합에 기여하는 H4. 추가로, 많은 TWINKLE 헬리카제의 C-말단 영역은 레플리좀에서 다른 인자와의 상호 작용을 위해 요구된다. 일 구현예에서, TWINKLE 폴리펩타이드는 서열번호 64, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 또는 96 중 어느 하나에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 64, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 또는 96 중 어느 하나 이상과 참조 서열(들)의 전장을 따라 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0285] 감소된 헬리카제 활성은 당업계의 표준 검정을 사용하여 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들어, 헬리카제 활성은 ADP, 무기 포스포네이트 및/또는 단일 가닥 DNA와 같은 헬리카제 반응 생성물의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 이들 검정에서 형광 표지된 단백질은 표적 분자, 예를 들어 ADP, 무기 포스포네이트 또는 단일 가닥 DNA를 검출한다(참조: Toseland 등, 2010). 하나의 예에서, 이중 가닥 DNA의 풀림을 측정하여 헬리카제 활성을 결정할 수 있다. 상기 측정은 DNA의 각 가닥에 하나씩 듀플렉스의 말단에 위치한 형광단(예를 들어, Cy3) 및 소광제(예를 들어, Dabcyl) 쌍을 사용한다. 헬리카제 유도된 DNA 풀림시, 형광단 및 소광제는 서로 분리되어 형광성의 증가를 초래한다(참조: Toseland 등, 2010). 또 다른 예에서, 짧은 5' 단일 가닥 DNA 오버행이 있는 부분적으로 이중 가닥 DNA 기질로 이루어진 헬리카제 기질이 생성된다(참조: Korhonen 등, 2003). 헬리카제 반응은 헬리카제 기질 및 폴리펩타이드를 함유하는 반응 완충액에서 수행된다. 이어서 염기쌍 기질과 단일 가닥 DNA 생성물의 일부 양을 분리하여 겔 전기영동으로 분석할 수 있다.

[0286] 본원에서 사용되는 용어 "RECA3"은 야생형 시리얼 그레인의 미토콘드리아에서 발견될 수 있고 미토콘드리아 DNA에서 부적절한 재조합 이벤트의 발생을 감소시키는 것을 도와주는 식물 재조합 관련 단백질 이의 돌연변이 변이체의 서브 패밀리를 지칭한다. 이론에 얽매이지 않고, 현재의 증거는 RECA3이 짧은 반복체 사이에서 전환 이벤트를 지시하는 동시에 긴 반복체에서 재조합 의존성 복제가 개시되도록 하는 감시 기전에 관련되어 있음을 시사한다(참조: Shedge 등, 2007). 본 발명자들은 시리얼 그레인에서, 바람직하게는 벼 그레인에서 야생형 RECA3 활성이 감소(제거되지는 않음)한 경우 호분 두께가 증가한다는 것을 발견하였다. RECA3 폴리펩타이드는 야생형 시리얼 식물에서 발견되는 이러한 폴리펩타이드뿐만 아니라 인위적으로 생성되거나 천연에서 발견되는 이의 변이체를 포함하고, 리컴비나제 활성을 갖거나 갖지 않고, 일부 리컴비나제 활성을 갖지만 상응하는 야생형 RECA3 폴리펩타이드와 비교하여 감소된 수준이다. 일 구현예에서, RECA3 폴리펩타이드는 mtSSB 폴리펩타이드에 결합한다. 일 구현예에서, RECA3 폴리펩타이드는 리컴비나제 활성을 갖는다. RECA3 폴리펩타이드는 전형적으로 ATPase에 존재하고 ATP 결합 및 가수분해 활성을 부여하는 두 개의 고도로 보존된 컨센서스 모티프인 워커 A 및 워커 B를 포함하는 RecA/RAD51 도메인을 갖고 있다. 일 구현예에서, RECA3 폴리펩타이드는 서열번호 61, 67, 69, 71, 73, 75, 77 또는 79에 제공된 아미노산 서열, 또는 서열번호 61, 67, 69, 71, 73, 75, 77 또는 79 중 어느 하나 이상과 참조 서열(들)의 전장을 따라 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0287] 감소된 리컴비나제 활성은 당업계의 표준 검정을 사용하여 용이하게 결정할 수 있다. 일예에서, 형광단 표지된 단일 가닥 DNA 기질 및 폴리펩타이드는 반응 혼합물에서 항온처리한다(참조: Silva 등, 2017). 형광성 켄칭 효과는 리컴비나제 결합시 발생한다. 형광 분석은 형광 분광측정법을 사용하여 수행할 수 있다. 또 다른 예에서,

리컴비나제 활성은 가닥 동화(또는 "D-루프") 검정을 사용하여 측정할 수 있다(참조: Jayathilaka 등, 2008). 이러한 검정에서, 폴리펩타이드는 먼저 방사성 표지된 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오타이드상에 어셈블리되도록 방치한다. 이어서 상동성 포함 슈퍼코일 표적 플라스미드가 첨가되고 2개는 "D-루프"로서 지칭되는 상동성 의존 연결 분자를 형성하도록 방치한다. D-루프 단백질은 겔 전기영동 및 인광영상으로 단리 및 분석할 수 있다.

[0288] 본원에서 사용되는 바와 같이, "실질적으로 정제된 폴리펩타이드" 또는 "정제된 폴리펩타이드"라는 용어는 지질, 핵산, 다른 펩타이드 및 천연 상태에서 회합된 다른 오염 분자로부터 적어도 부분적으로 분리된 폴리펩타이드를 의미한다. 바람직하게는, 실질적으로 정제된 폴리펩타이드는 천연적으로 결합된 다른 성분이 적어도 90% 없다. 일 구현예에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 천연적으로 존재하는 시리얼 mtSSB, TWINKLE 또는 RECA3 폴리펩타이드와 상이한 아미노산 서열을 갖고, 즉 상기 정의된 바와 같은 아미노산 서열 변이체이다.

[0289] 본 발명의 그레인, 식물 및 숙주 세포는 본 발명의 변이체 폴리펩타이드를 암호화하는 돌연변이를 포함하는 내인성 유전자 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이들 경우에, 그레인, 식물 및 세포는 돌연변이체 또는 재조합 폴리펩타이드를 생성한다. 상기 맥락에서 용어 "돌연변이체"는 이것이 가장 밀접하게 관련되거나 돌연변이에 의해 이로부터 유래하는 야생형 폴리펩타이드와 아미노산 서열에서 상이한 폴리펩타이드를 의미한다. 돌연변이체 폴리펩타이드는 이것이 가장 밀접하게 관련되고/되거나 이로부터 유래된 야생형 폴리펩타이드와 비교하여 상이한 수준 또는 상이한 세포에서 또는 상이한 시기에 발현될 수 있다. 폴리펩타이드와 관련하여 용어 "재조합체"는 세포에 의해 생성될 때 외인성 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 지칭하고, 상기 폴리뉴클레오타이드는 재조합 DNA 또는 RNA 기술, 예를 들어, 형질전환에 의해 세포 또는 전구체 세포로 도입되었다. 일 구현예에서, 재조합 폴리펩타이드는 야생형 폴리펩타이드와 아미노산 서열이 동일하지만, 재조합 폴리펩타이드는 야생형 폴리펩타이드와 비교하여 상이한 수준 또는 상이한 세포에서 또는 상이한 시기에 발현될 수 있다. 대안적 구현예에서, 재조합 폴리펩타이드는 가장 밀접하게 관련되거나 이로부터 유래된 야생형 폴리펩타이드와 아미노산 서열이 상이하다. 또한 상기 재조합 폴리펩타이드는 야생형 폴리펩타이드와 비교하여 상이한 수준 또는 상이한 세포에서 또는 상이한 시기에 발현될 수 있다. 전형적으로, 세포는 생성될 폴리펩타이드의 변경된 양을 야기하는 비-내인성 유전자를 포함한다. 일 구현예에서, "재조합 폴리펩타이드"는 식물 세포에서 외인성 (재조합) 폴리뉴클레오타이드의 발현에 의해 제조된 폴리펩타이드이다.

[0290] 폴리펩타이드의 % 동일성은 GAP(Needleman 및 Wunsch, 1970) 분석(GCG 프로그램)에 의해 결정되고, 겔 생성 페널티=5이고, 겔 연장 페널티=0.3이다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 150개 아미노산 길이이고, GAP 분석은 적어도 150개 아미노산 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 175개 아미노산 길이이고, GAP 분석은 적어도 175개 아미노산 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 200개 아미노산 길이이고, GAP 분석은 적어도 200개 아미노산 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 300개 아미노산 길이이고, GAP 분석은 적어도 300개 아미노산 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 400개 아미노산 길이이고, GAP 분석은 적어도 400개 아미노산 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 500개 아미노산 길이이고, GAP 분석은 적어도 500개 아미노산 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 600개 아미노산 길이이고, GAP 분석은 적어도 600개 아미노산 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 700개 아미노산 길이이고, GAP 분석은 적어도 700개 아미노산 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 보다 더 바람직하게, GAP 분석은 이들의 전체 길이에 걸쳐 2개의 서열을 정렬시킨다.

[0291] 정의된 폴리펩타이드와 관련하여, 상기 제공된 것보다 더 높은 % 동일성 수치가 바람직한 구현예를 포함할 것임을 이해할 것이다. 따라서, 적용 가능한 경우, 최소 % 동일성 수치에 비추어 볼 때, 폴리펩타이드는 관련 지명된 서열번호와 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 91%, 보다 바람직하게는 적어도 92%, 보다 바람직하게는 적어도 93%, 보다 바람직하게는 적어도 94%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 96%, 보다 바람직하게는 적어도 97 %, 보다 바람직하게는 적어도 98%, 보다 바람직하게는 적어도 99%, 보다 바람직하게는 적어도 99.1%, 보다 바람직하게는 적어도 99.2%, 보다 바람직하게는 적어도 99.3%, 보다 바람직하게는 적어도 99.4%, 보다 바람직하게는 적어도 99.5%, 보다 바람직하게는 적어도 99.6%, 보다 바람직하게는 적어도 99.7%, 보다 바람직하게는 적어도 99.8% 및 보다 더 바람직하게는 적어도 99.9% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것이 바람직하다.

[0292] 본원에 사용된 바와 같이, "아미노산 번호에 상응하는 위치에서"라는 어구 또는 이의 변형은 하나 이상의 특정 아미노산 서열과 관련하여 주위 아미노산과 비교한 아미노산의 상대적인 위치를 지칭한다. 일부 구현예에서, 본

발명의 폴리펩타이드는 예를 들어 서열번호 3에 대해 정렬될 때 아미노산의 상대적 위치를 변경하는 결실 또는 치환 돌연변이를 가질 수 있다. 2개의 밀접하게 관련된 단백질 사이의 상응하는 아미노산 위치를 결정하는 것은 능히 당업자의 능력 내에 있다.

[0293] mtSSB, TWINKLE 및 RECA3 폴리펩타이드의 보존된 아미노산은 본원에 기재된 것들과 같은 야생형 폴리펩타이드에 대한 아미노산 서열을 정렬함으로써 용이하게 동정될 수 있다. 예를 들어, 벼 OsmtSSB-1a (TAI) 아미노산 서열 (서열번호 3)은 다른 종 기원의 mtSSB-1a 폴리펩타이드, 또는 심지어 벼 또는 다른 종, 특히 식물 종, 예를 들어, 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)(서열번호 15), 소르굼 바이컬러(*Sorghum bicolor*)(서열번호 17), 호르데움 볼가레(*Hordeum vulgare*)(서열번호 18), 트리티쿰 아에스티쿰(*Triticum aestivum*)(서열번호 19 및 22) 브라키포디움 디스타키온(*Brachypodium distachyon*)(서열번호 20) 및 포폴러스 트리코카파(*Populus trichocarpa*)(서열번호 21) (예를 들어, 도 9를 참조한다) 기원의 mtSSB의 폴리펩타이드와 정렬될 수 있다.

[0294] 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 서열 돌연변이체는 전구체 시리얼 식물 세포의 돌연변이 유발, 예를 들어, 시리얼 종자의 돌연변이 유발에 의해, 돌연변이 유발제를 사용한 무작위 돌연변이유발에 이어서 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자에서 돌연변이체에 대한 돌연변이 유발된 집단의 스크리닝에 의해 또는 예를 들어, 유전자 편집 도구를 사용하는 것과 같은 표적화된 돌연변이 유발에 의해 제조될 수 있다. 아미노산 서열 돌연변이체는 또한 적절한 뉴클레오타이드 변화를 본 발명의 핵산에 도입함으로써 제조될 수 있다. 이러한 돌연변이체는 예를 들어 야생형 폴리펩타이드의 길이를 따라 어디에서나 발생할 수 있는 아미노산 서열 내의 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 포함한다. 최종 펩타이드 생성물이 목적하는 특징을 갖고 있다면 결실, 삽입 및 치환의 조합을 통해 최종 작제물에 도달할 수 있다. 바람직한 아미노산 서열 돌연변이체는 참조 야생형 폴리펩타이드에 비해 단지 1개, 2개, 3개, 4개 또는 10개 미만의 아미노산 변화를 갖는다. 본 발명의 돌연변이체 폴리펩타이드는 이의 아미노산 서열이 예를 들어, 서열번호 8, 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 제시된 것과 같은 상응하는 야생형의 천연적으로 존재하는 폴리펩타이드 또는 이의 절단된 버전과 비교할 때 "감소된 활성"을 갖거나, 참조 서열(들)의 전장을 따라 서열번호 8, 서열번호 9 또는 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열 중 하나 이상과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 또는 보다 바람직하게는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0295] 돌연변이(변경된) 폴리펩타이드는 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여, 예를 들어, 지시된 진화 또는 합리적 디자인 전략을 사용하여 제조할 수 있다. 돌연변이된/변경된 DNA로부터 유래된 생성물은 예를 들어 티핑에 의한 스크리닝과 같이 이들이 감소된 활성을 갖는지를 결정하기 위해 본원에 기재된 기술을 사용하여 용이하게 스크리닝할 수 있다(실시예 1 참조). 예를 들어, 상기 방법은 돌연변이된/변경된 DNA를 발현하는 유전자전이 식물체를 생성하고 i) 호분 두께에 대한 돌연변이된/변경된 DNA의 효과 및 ii) mtSSB, TWINKLE 또는 RECA3 유전자에 돌연변이된/변경되었는지의 여부를 결정하는 것을 포함할 수 있다(예를 들어, 실시예 13에 기재된 방법을 사용함). 따라서 본 발명의 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드는 이들의 생물학적 효과를 결정하기 위한 스크리닝 검정에서 사용될 수 있다.

[0296] 아미노산 서열 돌연변이체를 디자인하는데 있어서, 돌연변이 부위의 위치 및 돌연변이의 성질은 변형된 특징(들)에 의존한다. 돌연변이 부위는 예를 들어 (1) 비보존적 아미노산 선택을 사용한 치환, (2) 표적 잔기의 결실, 또는 (3) 위치된 부위에 인접한 다른 잔기의 삽입에 의해 개별적으로 또는 연속적으로 변형될 수 있다.

[0297] 아미노산 서열 결실은 일반적으로 약 1 내지 15개의 잔기, 보다 바람직하게는 약 1 내지 10개의 잔기, 및 전형적으로 약 1 내지 5개의 연속 잔기의 범위이다.

[0298] 치환 돌연변이체는 폴리펩타이드 분자에서 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거되고 그 자리에 다른 잔기가 삽입된다. 특정 활성을 유지하거나 특정 활성을 감소시키는 것이 바람직하지 않은 경우, 특히 관련 단백질 패밀리에 고도로 보존된 아미노산 위치에서 비보존적 치환을 만드는 것이 바람직하다. 보존성 치환의 예는 표 1에 나타내고, 따라서 비보존성 치환은 표 1에 나타내지 않은 것들이다.

[0299] [표 1] 보존성 치환.

본래의 잔기	보존성 치환
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

[0300]

[0301]

일 구현예에서 돌연변이체/변이체 폴리펩타이드는 천연적으로 존재하는 폴리펩타이드와 비교할 때 1개, 2개 또는 3개 또는 4개의 아미노산 변화를 갖는다. 바람직한 구현예에서, 변화는 특히 공지된 보존된 구조 도메인에서 본원에 제공된 상이한 mtSSB, TWINKLE 또는 RECA3 폴리펩타이드 사이에 고도로 보존된 하나 이상의 모티프에 있다. 당업자가 알고 있는 바와 같이, 그러한 변화는 세포 또는 시리얼 그레이에서 발현될 때 폴리펩타이드의 활성을 감소시키는 것으로 합리적으로 예측될 수 있다.

[0302]

본 발명의 폴리펩타이드의 1차 아미노산 서열은 밀접하게 관련된 효소와의 비교에 기초하여 이의 변이체/돌연변이체를 디자인하는데 사용될 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 밀접하게 관련된 단백질 사이에서 고도로 보존된 잔기의 변경은 덜 보존된 잔기의 변경보다 활성을 감소시킬 가능성이 보다 크다. 본원의 문맥에서, 공급원 범위로부터의 mtSSB, TWINKLE 또는 RECA3 단백질의 아미노산 서열의 정렬은 보다 고도로 보존된 아미노산 잔기와 덜 보존된 아미노산 잔기를 동정하는 데 사용된다.

[0303]

폴리뉴클레오타이드 및 유전자

[0304]

본 발명은 다양한 폴리뉴클레오타이드를 언급한다. 본원에서 사용되는 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산" 또는 "핵산 분자"는 DNA 또는 RNA일 수 있는 뉴클레오타이드의 중합체를 의미하고, 게놈 DNA, mRNA, cRNA, dsRNA 및 cDNA를 포함한다. 예를 들어 자동화된 합성기에서 만들어진 세포, 게놈 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA일 수 있고, 탄수화물, 지질, 단백질 또는 기타 물질과 조합되거나 형광 또는 기타 그룹으로 표지되거나 고체 지지체에 부착하여 본원에 정의된 특정 활성을 수행하거나, 당업자에게 널리 공지된 자연에서 발견되지 않는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 중합체는 단일 가닥, 필수적으로 이중 가닥 또는 부분적으로 이중 가닥일 수 있다. 본원에서 사용되는 염기쌍 형성은 G:U 염기쌍을 포함하는 뉴클레오타이드 사이의 표준 염기쌍 형성을 지칭한다. "상보적"은 2개의 폴리뉴클레오타이드가 이들의 길이의 일부를 따라 또는 하나 또는 둘 모두의 전체 길이를 따라 염기쌍 형성(하이브리드화)할 수 있음을 의미한다. "하이브리드화된 폴리뉴클레오타이드"는 폴리뉴클레오타이드가 실제로 이의 상보체와 염기쌍을 형성한다는 것을 의미한다. "폴리뉴클레오타이드"라는 용어는

본원에서 "핵산"이라는 용어와 상호교환적으로 사용된다. 본 발명의 바람직한 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화한다.

[0305] "단리된 폴리뉴클레오타이드"는 폴리뉴클레오타이드가 천연 상태에서 발견되는 경우 천연 상태에서 연합되거나 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열로부터 적어도 부분적으로 분리된 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 바람직하게는, 단리된 폴리뉴클레오타이드는 천연에서 발견되는 경우 천연적으로 연합된 다른 성분이 적어도 90% 없다. 바람직하게는 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어 천연에서 발견되지 않는 방식으로 2개의 보다 짧은 폴리뉴클레오타이드 서열(키메라 폴리뉴클레오타이드)을 공유 결합함으로써 천연적으로 존재하지 않는다.

[0306] 본 발명은 유전자 활성의 감소 및 키메라 유전자의 삭제 및 사용을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유전자"는 단백질 암호화 영역을 포함하거나 세포에서 전사되지만 해독되지 않는 임의의 대옥시리보뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라 연합된 비암호화 및 조절 영역을 포함한다. 이러한 연합된 영역은 전형적으로 어느 한 쪽에서 약 2 kb의 거리에 대해 5' 및 3' 말단 모두에서 암호화 영역 또는 전사된 영역에 인접하여 위치한다. 이와 관련하여, 유전자는 주어진 유전자와 천연적으로 연합된 프로모터, 인핸서, 종결 및/또는 폴리아데닐화 신호와 같은 제어 신호, 또는 유전자가 "키메라 유전자"로 지칭되는 이중성 제어 신호를 포함할 수 있다. 암호화 영역의 5'에 위치하고 mRNA 상에 존재하는 서열은 5' 비해독 서열로서 지칭한다. 암호화 영역의 3' 또는 다운스트림에 위치하고 mRNA 상에 존재하는 서열은 3' 비해독 서열로서 지칭한다. 용어 "유전자"는 cDNA 및 게놈 형태의 유전자 둘 다를 포함한다.

[0307] "대립유전자"는 세포, 개별 식물 내 또는 집단 내에서 유전학적 서열(예를 들어, 유전자)의 하나의 특정 형태를 지칭하고, 상기 특정 형태는 유전자 서열 내의 적어도 하나의 서열에서 동일한 유전자의 다른 형태 및 유전자 서열 내의 종종 하나 초과와 변이체 부위와 상이하다. 상이한 대립유전자 간에 상이한 이들 변이체 부위에서의 서열은 "변이" 또는 "다형성"으로 지칭된다. 본원에 사용된 "다형성"은 식물의 상이한 종, 재배종, 계통 또는 개체의 본 발명의 유전자좌에서 대립유전자간에 뉴클레오타이드 서열 내 변이를 나타낸다. "다형성 위치"는 서열 차이가 발생하는 유전자 서열 내의 미리 선택된 뉴클레오타이드 위치이다. 일부 경우에, 유전학적 다형성은 유전자에 의해 암호화되는 폴리펩타이드 내에서 아미노산 서열 변이를 유발하고, 따라서 다형성 위치는 폴리펩타이드 서열 내의 미리 결정된 위치에서 아미노산 서열의 다형성 위치를 초래할 수 있다. 다른 경우에, 다형성 영역은 유전자의 비-폴리펩타이드 암호화 영역, 예를 들어 프로모터 영역에 있을 수 있고, 이로써 유전자의 발현 수준에 영향을 미칠 수 있다. 전형적인 다형성은 결실, 삽입 또는 치환이다. 이들은 단일 뉴클레오타이드(단일 뉴클레오타이드 다형성 또는 SNP) 또는 2개 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0308] 본원에 사용된 바와 같은 "돌연변이"는 식물 또는 이의 일부에서 표현형 변화를 생성하는 다형성이다. 이러한 맥락에서, 주요 표현형 변화는 야생형(돌연변이체가 아닌) 형태에 비해 시리얼 그레인의 호분이 두꺼워지는 것이다. 당업계에 공지된 바와 같이, 일부 다형성은 사일런트이고, 예를 들어 유전자 코드의 중복성으로 인해 암호화된 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 단백질 암호화 영역에서의 단일 뉴클레오타이드 변화이다. 이배체 식물은 전형적으로 단일 유전자의 1개 또는 2개의 다른 대립유전자를 갖지만 유전자의 2개 카피물이 동일한 경우, 즉 식물이 대립유전자에 대해 동형접합성인 경우 단지 하나를 갖는다. 배수체 식물은 일반적으로 임의의 특정 유전자의 하나 초과와 상동체를 갖는다. 예를 들어, 6배체 밀은 A, B 및 D 게놈으로 지정된 3개의 서브 게놈(종종 "게놈"이라고 지칭됨)을 갖고 있고, 따라서 이의 대부분의 유전자에 대해 A, B 및 D 게놈 각각에 하나씩 3개의 상동체를 갖고 있다.

[0309] 용어 "유전자"는 본원에 정의된 바와 같이 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 상기 유전자는 내인성의 천연적으로 존재하는 유전자일 수 있거나, 본원에 정의된 바와 같은 유전학적 변형, 바람직하게 도입된 유전학적 변형을 포함할 수 있다. 본 발명의 그레인에서 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자는 인트론을 갖거나 갖지 않을 수 있다. 한 예에서, 본 발명의 그레인은 벼에서 유래하고 *OsmtSSB-1a* 유전자의 적어도 하나의 대립유전자는 상응하는 야생형 벼 식물로부터의 *OsmtSSB-1a* 폴리펩타이드(예를 들어, 서열번호 3에 제공된 아미노산 서열을 포함함)와 비교할 때 감소된 *OsmtSSB-1a* 폴리펩타이드 활성을 갖는 *OsmtSSB-1a* 폴리펩타이드를 암호화한다. 감소된 *OsmtSSB-1a* 폴리펩타이드 활성을 갖는 이러한 *OsmtSSB-1a* 폴리펩타이드의 예는 서열번호 8, 서열번호 9 또는 서열번호 10에 제공된 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 갖는 것 중 하나 이상 또는 이의 절단된 버전을 포함하거나, 서열번호 8, 서열번호 9 또는 서열번호 10에 제시된 하나 이상의 아미노산 서열과 적어도 75%, 적어도 90%, 또는 바람직하게는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖지만 더 이상 그 길이가 아니다.

[0310] 하나의 구현예에서, 유전학적 변이는 본원에 기재된 바와 같은 야생형 미토콘드리아 폴리펩타이드를 암호화하는

내인성 유전자의 발현을 감소시킨다. 본원에 사용된 바와 같이, "내인성 유전자의 발현을 감소시킨다"라는 어구 또는 이의 변형은 본원에 정의된 기능적 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 발현을 (부분적으로) 감소시키거나 완전히 차단하는 임의의 유전학적 변이를 지칭한다. 그러한 유전학적 변이는 예를 들어 유전자의 프로모터 영역으로부터 뉴클레오타이드를 결실시키거나 치환하기 위한 유전자 편집을 사용함으로써 유전자의 전사를 감소시키는 유전자의 프로모터 영역에서의 돌연변이, 또는 mRNA를 형성하기 위한 스플라이싱의 양 또는 위치를 변경하는 인트론 스플라이싱 돌연변이를 포함한다.

[0311] 전사된 영역을 포함하는 유전자의 게놈 형태 또는 클론은 "인트론" 또는 "개재 영역" 또는 "개재 서열"이라고 하는 비암호화 서열로 중단될 수 있고, 이는 유전자의 "엑손"과 관련하여 동종 또는 이종일 수 있다. 본원에서 사용되는 "인트론"은 1차 RNA 전사체의 일부로서 전사되지만 성숙한 mRNA 분자에는 존재하지 않는 유전자의 분절이다. 인트론은 핵 또는 1차 전사체에서 제거되거나 "스플라이스 제거"되고; 따라서 전령 RNA(mRNA)에는 인트론이 없다. 본원에서 사용된 "엑손"은 RNA 분자가 해독되지 않은 경우 성숙한 mRNA 또는 성숙한 RNA 분자에 존재하는 RNA 서열에 상응하는 DNA 영역을 지칭한다. mRNA는 초기 폴리펩타이드에서 아미노산의 서열 또는 순서를 지정하기 위해 해독 중에 기능한다. 용어 "유전자"는 본원에 기재된 본 발명의 단백질의 전부 또는 일부를 암호화하는 합성 또는 융합 분자 및 상기 중 어느 하나에 대한 상보적 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 유전자는 세포에서 염색체의 유지를 위해 또는 바람직하게는 숙주 게놈으로의 통합을 위해 적절한 벡터에 도입될 수 있다.

[0312] 본원에서 사용되는 "키메라 유전자"는 자연에서 결합된 것으로 발견되지 않는 공유 결합된 서열을 포함하는 임의의 유전자를 지칭한다. 전형적으로, 키메라 유전자는 자연에서 함께 발견되지 않는 조절 및 전사된 또는 단백질 암호화 서열을 포함한다. 따라서, 키메라 유전자는 상이한 공급원으로부터 유래된 조절 서열 및 암호화 서열, 또는 동일한 공급원으로부터 유래되었지만 천연에서 발견되는 것과는 상이한 방식으로 배열된 조절 서열 및 암호화 서열을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 유전자의 단백질 암호화 영역은 유전자에 대해 이종인 프로모터 또는 폴리아데닐화/터미네이터 영역에 작동 가능하게 연결되어 키메라 유전자를 형성한다. 대안적인 구현예에서, 시리얼 식물의 그레인에 존재하는 경우 그레인에서 폴리펩타이드의 생산 및/또는 활성을 하향 조절하는 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 유전자는 폴리뉴클레오타이드에 이종인 프로모터 또는 폴리아데닐화/터미네이터 영역에 작동 가능하게 연결되어 키메라 유전자를 형성한다.

[0313] 용어 "내인성"은 연구 중인 식물과 동일한 발육 단계에서 변형되지 않은 시리얼 식물에 정상적으로 존재하거나 생성되는 물질을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. "내인성 유전자"는 유기체의 게놈에서 천연 위치에 있는 고유 유전자를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "재조합 핵산 분자", "재조합 폴리뉴클레오타이드" 또는 이들의 변형은 유전자 편집 기술에 의해, 예를 들어, TALEN 또는 CRISPR 기술에 의해 돌연변이된 변형된 내인성 유전자인 핵산 분자를 포함하여 재조합 DNA 기술에 의해 작제되거나 변형된 핵산 분자를 지칭한다. "외래 폴리뉴클레오타이드" 또는 "외인성 폴리뉴클레오타이드" 또는 "이종 폴리뉴클레오타이드" 등의 용어는 유전자 편집 기술에 의한 것을 포함하는 실험적 조작에 의해 세포의 게놈으로 도입되는 임의의 핵산을 지칭한다.

[0314] 외래 또는 외인성 유전자는 비고유 유기체에 삽입된 유전자, 고유 숙주 내의 새로운 위치에 도입된 고유 유전자, 키메라 유전자 또는 유전자 편집 기술에 의해 변형된 내인성 유전자일 수 있다. "전이유전자"는 형질전환 절차에 의해 게놈에 도입된 유전자이다. "유전학적으로 변형된"이라는 용어는 보다 광범위하고, 형질전환 또는 형질도입에 의해 세포에 유전자를 도입하는 것뿐만 아니라 세포에서 유전자를 돌연변이시키는 것, 예를 들어 유전자 편집 기술에 의해 내인성 유전자에 삽입, 결실 또는 치환을 도입하는 것, 및 이러한 작용이 수행된 세포 또는 유기체 또는 전구체 세포 또는 유기체에서 유전자의 조절을 변경 또는 조절하는 것을 포함한다.

[0315] 추가로, 폴리뉴클레오타이드(핵산)의 맥락에서 용어 "외인성"은 폴리뉴클레오타이드를 천연적으로 포함하지 않는 세포에 존재할 때의 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 세포는 암호화된 폴리펩타이드의 생성량을 변경시키는 비-내인성 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 내인성 폴리펩타이드의 발현을 증가시키는 외인성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포, 또는 이의 고유 상태에서 폴리펩타이드를 생성하지 않는 세포일 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드의 증가된 생성은 본원에서 "과발현"이라고도 지칭된다. 본 발명의 외인성 폴리뉴클레오타이드는 이것이 존재하는 유전자전이(재조합) 세포 또는 무세포 발현 시스템의 다른 성분으로부터 분리되지 않은 폴리뉴클레오타이드, 및 이러한 세포 또는 무세포 시스템에서 생성된 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 이후 적어도 일부 다른 성분으로부터 정제된다. 외인성 폴리뉴클레오타이드(핵산)는 자연에 존재하는 뉴클레오타이드의 연속 스트레치일 수 있거나, 단일 폴리뉴클레오타이드를 형성하기 위해 연결된 상이한 공급원(천연적으로 존재하고/하거나 합성)로부터의 뉴클레오타이드의 2개 이상의 연속 스트레치를 포함할 수 있다. 전형적으로 이러한 키메라 폴리뉴클레오타이드는 적어도 관심 대상의 세포에서 개방 해독 프레임의 전사를 구동시키기에 적합한 프로모터에

작동 가능하게 연결된 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 개방 해독 프레임을 포함한다.

[0316] 폴리뉴클레오타이드의 % 동일성은 GAP(Needleman 및 Wunsch, 1970) 분석(GCG 프로그램)에 의해 결정되고, 겔 생성 페널티=5이고, 겔 연장 페널티=0.3이다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 450개 뉴클레오타이드 길이이고, GAP 분석은 적어도 450개 뉴클레오타이드 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 525개 뉴클레오타이드 길이이고, GAP 분석은 적어도 525개 뉴클레오타이드 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 600개 뉴클레오타이드 길이이고, GAP 분석은 적어도 600개 뉴클레오타이드 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 900개 뉴클레오타이드 길이이고, GAP 분석은 적어도 900개 뉴클레오타이드 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 1,200개 뉴클레오타이드 길이이고, GAP 분석은 적어도 1,200개 뉴클레오타이드 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 1,500개 뉴클레오타이드 길이이고, GAP 분석은 적어도 1,500개 뉴클레오타이드 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 1,800개 뉴클레오타이드 길이이고, GAP 분석은 적어도 1,800개 뉴클레오타이드 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 일 구현예에서, 질의 서열은 적어도 2,100개 뉴클레오타이드 길이이고, GAP 분석은 적어도 2,100개 뉴클레오타이드 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 보다 더 바람직하게, GAP 분석은 이들의 전체 길이에 걸쳐 2개의 서열을 정렬시킨다.

[0317] 정의된 폴리뉴클레오타이드와 관련하여, 상기 제공된 것보다 더 높은 % 동일성 수치가 바람직한 구현예를 포함할 것임을 이해할 것이다. 따라서, 적용 가능한 경우, 최소 % 동일성 수치에 비추어 볼 때, 폴리뉴클레오타이드는 관련 지명된 서열번호와 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 91%, 보다 바람직하게는 적어도 92%, 보다 바람직하게는 적어도 93%, 보다 바람직하게는 적어도 94%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 96%, 보다 바람직하게는 적어도 97 %, 보다 바람직하게는 적어도 98%, 보다 바람직하게는 적어도 99%, 보다 바람직하게는 적어도 99.1%, 보다 바람직하게는 적어도 99.2%, 보다 바람직하게는 적어도 99.3%, 보다 바람직하게는 적어도 99.4%, 보다 바람직하게는 적어도 99.5%, 보다 바람직하게는 적어도 99.6%, 보다 바람직하게는 적어도 99.7%, 보다 바람직하게는 적어도 99.8% 및 보다 더 바람직하게는 적어도 99.9% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것이 바람직하다. % 동일성은 참조 서열의 전체 길이를 따라 계산되는 것이 바람직하다. 일 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 5' 말단, 3' 말단 또는 말단 둘 다에서 참조 뉴클레오타이드를 넘어 연장한다.

[0318] 본 발명은 또한 예를 들어 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 스크리닝하는 방법에서 올리고뉴클레오타이드의 용도에 관한 것이다. 본원에 사용된 "올리고뉴클레오타이드"는 최대 50개의 뉴클레오타이드 길이인 폴리뉴클레오타이드이다. 이러한 올리고뉴클레오타이드의 최소 크기는 올리고뉴클레오타이드와 본 발명의 핵산 분자 상의 상보적 서열 간의 안정한 하이브리드 형성에 필요한 크기이다. 이들은 RNA, DNA 또는 이들의 조합 또는 유도체일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 10 내지 30개의 뉴클레오타이드, 일반적으로 15-25개의 뉴클레오타이드 길이의 비교적 짧은 단일 가닥 분자이다. 증폭 반응에서 프로브 또는 프라이머로 사용되는 경우, 이러한 올리고뉴클레오타이드의 최소 크기는 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산 분자 상의 상보적 서열 사이의 안정한 하이브리드 형성에 필요한 크기이다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 길이가 적어도 15개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 적어도 18개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 적어도 19개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 적어도 20개의 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 적어도 25개의 뉴클레오타이드이다. 프로브로서 사용되는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 방사성동위원소, 효소, 비오틴, 형광 분자 또는 화학발광 분자와 같은 표지와 접합된다.

[0319] 본 발명은 예를 들어, 핵산 분자를 동정하기 위한 프로브, 또는 핵산 분자를 생성하기 위한 프라이머, 또는 유전자 편집을 위한 가이드 서열로 사용될 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 프로브 및/또는 프라이머는 다른 종으로부터 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 동족체를 클로닝하는 데 사용될 수 있다. 추가로, 당해 분야에 공지된 하이브리드화 기술을 사용하여 이러한 동족체에 대한 게놈 또는 cDNA 라이브러리를 스크리닝할 수도 있다.

[0320] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 1, 2, 4 내지 7, 11 내지 14, 49 내지 60, 62, 63, 65, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95 또는 97로서 제공된 하나 이상의 서열에 엄중 조건하에 하이브리드화하는 것들을 포함한다. 본원에서 사용되는 엄중 조건은 (1) 세척을 위해 낮

은 이온 강도 및 고온, 예를 들어 50℃에서 0.015M NaCl/0.0015M 나트륨 시트레이트/0.1% NaDodSO₄를 사용하거나; (2) 42℃에서 하이브리드화 동안 포름아미드와 같은 변성제, 예를 들어 0.1% 소 혈청 알부민, 0.1% 피콜(Ficoll), 0.1% 폴리비닐피롤리돈, 750 mM NaCl, 75 mM 나트륨 시트레이트와 함께 pH 6.5에서 50mM 인산나트륨 완충액과 함께 50%(vol/vol) 포름아미드를 사용하거나; (3) 50% 포름아미드, 5 x SSC(0.75 M NaCl, 0.075 M 나트륨 시트레이트), 50 mM 인산나트륨(pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5 x 덴하르트(Denhardt)의 용액, 초음파 처리된 연어 정자 DNA(50 g/ml), 0.2 x SSC 및 0.1% SDS에서 42℃에서 0.1% SDS 및 10% 텍스트란 설페이트를 사용하는 것들이다.

[0321] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 천연적으로 존재하는 분자와 비교할 때 뉴클레오타이드 잔기의 결실, 삽입 또는 치환인 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. 돌연변이체는 천연적으로 존재(즉, 천연 공급원에서 단리됨)하거나 합성(예: 핵산에 부위 지시된 돌연변이 유발을 수행하여)일 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 변이체는 본원에 정의된 참조 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 분자, 바람직하게는 내인성 유전자에 밀접한 시리얼 계통의 다양한 크기의 분자를 포함하고/하거나 이에 하이브리드화할 수 있다. 예를 들어, 변이체는 추가 뉴클레오타이드(예를 들어, 1, 2, 3, 4개 이상) 또는 표적 영역에 여전히 하이브리드화하는 한 더 적은 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 추가로, 올리고뉴클레오타이드가 표적 영역에 하이브리드화하는 능력에 영향을 미치지 않고 몇 개의 뉴클레오타이드가 치환될 수 있다. 추가로, 본원에서 정의된 특정 올리고뉴클레오타이드가 하이브리드화하는 식물 계통의 영역에 밀접한, 예를 들어 50개 뉴클레오타이드 내에서 하이브리드화되는 변이체를 용이하게 디자인할 수 있다. 특히, 이것은 동일한 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열을 암호화하지만 유전자 코드의 중복에 의해 뉴클레오타이드 서열이 다른 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 용어 "폴리뉴클레오타이드 변이체" 및 "변이체"는 또한 천연적으로 존재하는 대립유전자 변이체를 포함한다.

[0322] 유전학적 변이

[0323] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유전학적 변이"는 그레인의 하나 이상의 세포, 바람직하게는 발육 중인 배유, 발육 중인 그레인의 종피, 호분 및 배아 중 적어도 하나 이상 또는 모두에서 세포, 보다 바람직하게는 본 발명의 발육 중인 그레인 또는 식물 또는 이의 일부의 종피, 호분 및 배아의 하나 이상 또는 모두에서의 세포를 지칭하고, 이들은 사람에게 의해 도입될 수 있거나 시리얼 식물에서 천연적으로 존재할 수 있는 유전학적 변형을 갖는다. 그레인은 동일하거나 상이한 유전자에 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 유전학적 변이를 포함할 수 있다. 하나의 예에서, mtSSB 유전자는 시리얼 그레인에서 mtSSB 폴리펩타이드 수준 및/또는 활성을 감소시키는 2개의 유전학적 변이를 포함한다. 또 다른 예에서, 시리얼 그레인은 시리얼 그레인에서 mtSSB 폴리펩타이드 수준 및/또는 활성을 감소시키는 *mtSSB* 유전자의 유전학적 변이, 및/또는 시리얼 그레인에서 TWINKLE 폴리펩타이드 수준 및/또는 활성을 감소시키는 *TWINKLE* 유전자에서 유전학적 변이, 및/또는 시리얼 그레인에서 RECA3 폴리펩타이드 수준 및/또는 활성을 감소시키는 *RECA3* 유전자 내 유전학적 변이를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 그레인 또는 식물 또는 이의 일부에서 모든 세포는 도입된 유전학적 변이(들)을 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 세포, 그레인 또는 식물은 하나 이상의 유전학적 변이에 대해 동형접합성이다. 대안적 구현예에서, 본 발명의 세포, 그레인 또는 식물은 하나 이상의 유전학적 변이에 대해 이형접합성이거나, 하나의 유전학적 변이에 대해 이형접합성이고 또 다른 유전학적 변이에 대해 동형접합성이다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 이에 제한되지 않지만 유전자의 단백질 암호화 영역에 있을 수 있거나 프로모터와 같은 발현 요소에 있을 수 있는, 폴리펩타이드를 암호화하는 내인성 유전자 내 돌연변이, 내인성 유전자의 활성을 감소시키는 유전자 편집에 의해 도입되거나 감소된 폴리펩타이드 활성을 갖는 그레인을 생성하는 식물에 대한 선택과 함께 돌연변이를 도입하는 킬링을 사용함에 의해 도입되는 돌연변이로 이루어질 수 있는 많은 상이한 유형의 유전학적 변형이 있다. 대안적으로, 유전학적 변형은 예를 들어 dsRNA 분자 또는 마이크로RNA와 같은 유전자의 발현을 감소시키는 외인성 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 도입된 핵산 작제물, 또는 아미노산 서열이 상응하는 야생형 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 상이한 폴리펩타이드를 암호화하고, 상응하는 야생형 폴리펩타이드와 비교할 때 감소된 폴리펩타이드 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 핵산 작제물을 포함한다.

[0324] 돌연변이 유발

[0325] 본 발명의 식물은 돌연변이 유발 후 생성되고 동정될 수 있다. 이는 일부 시장에서 바람직한 비유전자전이된 식물을 제공할 수 있다.

[0326] 돌연변이체는 천연적으로 존재(즉, 천연 공급원에서 단리됨)하거나 합성(예를 들어, 핵산에 돌연변이 유발을 수행하여)일 수 있다. 일반적으로, 전구체 시리얼 식물 세포, 조직, 종자 또는 식물은 뉴클레오타이드 치환,

결실, 추가 및/또는 코돈 변형과 같은 단일 또는 다중 돌연변이를 생성하기 위한 돌연변이 유발에 적용될 수 있다. 본 출원의 맥락에서, "유도된 돌연변이"는 화학적, 방사선 또는 생물학적 기반 돌연변이 유발, 예를 들어 트랜스포존 또는 T-DNA 삽입의 결과일 수 있는 인위적으로 유도된 유전학적 변이이다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 유전자를 완전히 불활성화시키는 넌센스 돌연변이, 프레임시프트 돌연변이, 삽입 돌연변이 또는 스플라이스 부위 변이체와 같은 널 돌연변이이다. 뉴클레오타이드 삽입 유도체는 5' 및 3' 말단 융합뿐만 아니라 단일 또는 다중 뉴클레오타이드의 서열내 삽입을 포함한다. 삽입 뉴클레오타이드 서열 변이체는 하나 이상의 뉴클레오타이드가 뉴클레오타이드 서열에 도입된 변이체이며, 이는 수득한 생성물의 적합한 스크리닝과 함께 무작위 삽입에 의해 수득될 수 있다. 결실 변이체는 서열로부터 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것을 특징으로 한다. 바람직하게는, 돌연변이체 유전자는 야생형 유전자에 비해 뉴클레오타이드 서열의 단일 삽입 또는 결실을 갖는다. 치환 뉴클레오타이드 변이체는 서열에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드가 제거되고 그 자리에 다른 뉴클레오타이드가 삽입된 변이체이다. 야생형 유전자에 비해 돌연변이체 유전자에서 치환에 의해 영향을 받는 뉴클레오타이드의 바람직한 수는 최대 10개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 최대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2개 또는 단지 하나의 뉴클레오타이드이다. 상기 치환은 치환이 코돈에 의해 정의된 아미노산을 변화시키지 않는다는 점에서 "사일런트"일 수 있다. 대안적으로, 보존성 치환은 하나의 아미노산을 또 다른 유사한 작용 아미노산으로 변경하도록 디자인된다. 전형적인 보존성 치환은 표 1에 따라 제조된 것들이다.

- [0327] 본원에서 사용되는 용어 "돌연변이"는 유전자의 활성에 영향을 미치지 않는 사일런트 뉴클레오타이드 치환을 포함하지 않고, 따라서 유전자 활성에 영향을 미치는 유전자 서열의 변경만을 포함한다. 용어 "다형성"은 이러한 사일런트 뉴클레오타이드 치환을 포함하는 뉴클레오타이드 서열의 임의의 변화를 지칭한다.
- [0328] 일부 구현예에서, 시리얼 그레이는 *mtSSB* 유전자, *TWINKLE* 유전자 또는 *RECA3* 유전자의 적어도 일부의 비보존성 치환 결실 또는 이러한 유전자의 프레임시프트 또는 스플라이스 부위 변이를 포함한다.
- [0329] 일부 구현예에서, 하나 이상의 돌연변이체는 서열번호 45 내지 48에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것과 같은 보존된 모티프를 암호화하는 *mtSSB* 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 보존된 영역 내에 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 돌연변이는 *OsmtSSB-1a*의 DNA 결합 도메인을 암호화하는 *OsmtSSB-1a*의 영역 내에 있다.
- [0330] 돌연변이 유발은 예를 들어 EMS 또는 아지드화나트륨(Zwar 및 Chandler, 1995)과 같은 화학적 또는 방사선 수단에 의해 달성될 수 있다. 화학적 돌연변이 유발은 결실보다는 뉴클레오타이드 치환을 선호하는 경향이 있다. 중이온 빔(HIB) 조사는 새로운 식물 재배종을 생산하기 위한 돌연변이 육종을 위한 효과적인 기술로 알려져 있고, 예를 들어, 문현(Hayashi 등 (2004) 및 Kazama 등 (2008))을 참조한다. 이온빔 조사는 DNA 손상의 양과 DNA 결실의 크기를 결정하는 생물학적 효과에 대한 선량(gy)과 LET(선형 에너지 전달, keV/um)의 2개 물리적 요소를 갖고, 이들은 목적하는 돌연변이 유발의 목적하는 정도에 따라 조정될 수 있다. HIB는 일체의 돌연변이체를 생성하고, 이들 중 많은 것은 *mtSSB* 유전자에서의 돌연변이에 대해 스크리닝될 수 있는 결실을 포함한다. 동정된 유용한 돌연변이체는 돌연변이 유발된 계통에서 연결되지 않은 돌연변이의 효과를 제거하고 이에 따라 효과를 감소시키기 위해 반복적 모체로서 돌연변이되지 않은 식물과 역교배될 수 있다.
- [0331] 부위 특이적 돌연변이체를 생성하는 데 유용한 생물학적 제제는 내인성 복구 기전을 자극하는 DNA 내 이중 가닥 절단을 포함하는 효소를 포함한다. 이들은 엔도뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제, 트랜스포사아제 및 부위 특이적 리컴비나제를 포함한다. 아연 핑거 뉴클레아제 기술은 문현(Le Provost 등 (2009), Durai 등 (2005) 및 Liu 등 (2010))에서 검토된다.
- [0332] 돌연변이체의 단리는 돌연변이 유발된 식물 또는 종자를 스크리닝함에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 시리얼 식물의 돌연변이 유발된 집단은 두꺼운 호분 또는 RT-PCR에 의해 유전자 중 하나의 감소된 발현에 대해 스크리닝될 수 있거나, 유전자 중 하나의 돌연변이에 대해 직접적으로 또는 PCR 또는 헤테로듀플렉스 기반 검정에 의해, 또는 ELISA 또는 웨스턴 블롯 분석에 의한 단백질의 감소에 의해 스크리닝될 수 있다. 대안적으로, 돌연변이는 EMS(Slade 및 Knauf, 2005)와 같은 제제로 돌연변이 유발된 집단에서 티링과 같은 기술을 사용하거나 돌연변이 유발된 풀의 심층 서열분석에 의해 동정될 수 있다. 그런 다음 이러한 돌연변이는 목적하는 유전학적 배경의 식물과 돌연변이체를 교배하고 적합한 수의 역교배를 수행하여 본래의 목적하지 않는 모체 배경을 제거함으로써 바람직한 유전학적 배경으로 도입될 수 있다.
- [0333] 돌연변이는 돌연변이 유발에 의해 직접적으로 식물에 도입되거나, 또는 이중 하나가 도입된 돌연변이를 포함하는 2개의 모체 식물의 교배에 의해 간접적으로 도입될 수 있다. 변형된 식물은 유전자전이 또는 비유전자전이일 수 있다. 돌연변이 유발을 사용하여 감소된 *mtSSB-1a* 수준 또는 활성을 갖거나 필수적으로 *mtSSB-1a*가 없는 비유전자전이 식물이 생성될 수 있다. 본 발명은 또한 식물로부터 생성된 그레이나 또는 기타 식물 부분 및 배양된

조직 또는 세포와 같은 목적하는 특징을 갖는 식물을 생산하는 데 사용될 수 있는 식물의 임의의 변식 물질로 확장된다. 본 발명은 명백하게 상기 식물에 의해 생성된 상기 식물 또는 그레인을 생성하거나 동정하는 방법으로 확장된다.

[0334] **틸링**

[0335] 본 발명의 식물은 예를 들어 본원의 실시예 13에 기재된 바와 같이 틸링(표적화 유도된 국소 병변 IN 게놈)으로 공지된 공정을 사용하여 생성될 수 있다. 제1 단계에서, 새로운 단일 염기쌍 변화와 같은 도입된 돌연변이는 종자(또는 꽃가루)를 화학적 돌연변이원으로 처리한 다음 돌연변이가 안정적으로 유전되는 세대로 식물을 발전시킴으로써 식물 집단에서 유도된다. 이것은 전형적으로 M2 세대이다. DNA는 개별 식물 또는 식물의 작은 풀에서 추출되고, 종자는 시간이 지남에 따라 반복적으로 접근할 수 있는 재공급원을 생성하기 위해 모든 집단 구성원으로부터 저장된다.

[0336] 틸링 검정의 경우, PCR 프라이머는 단일 관심 대상의 유전자 표적, 예를 들어 mtSSB-1a, TWINKLE 또는 RECA3을 암호화하는 유전자를 특이적으로 증폭하도록 디자인된다. 표적이 유전자 패밀리의 구성원이거나 6배체 또는 4배체 밀과 같은 배수체 게놈의 일부인 경우 특이성이 특히 중요하다. 이어서, 염료 표지된 프라이머를 사용하여 여러 개체의 풀링된 DNA로부터 PCR 생성물을 증폭시킬 수 있다. 이들 PCR 생성물은 변성 및 재어닐링되어 미스매칭된 염기쌍의 형성을 가능하게 한다. 미스매칭 또는 헤테로듀플렉스는 천연적으로 존재하는 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)(즉, 집단으로부터의 여러 식물이 동일한 다형성을 가질 가능성이 있음)과 유도된 SNP(즉, 회귀한 개체 식물만이 돌연변이를 나타낼 가능성이 있음)를 모두 나타낸다. 헤테로듀플렉스 형성 후, 미스매칭된 DNA를 인지하고 절단하는 *Ce*II와 같은 엔도뉴클레아제의 사용은 틸링 집단 내에서 새로운 SNP를 발견하기 위한 핵심이다.

[0337] 상기 접근법을 사용하면 수천개의 식물을 스크리닝하여 게놈의 임의의 유전자 또는 특정 영역에서 단일 염기 변화뿐만 아니라 작은 삽입 또는 결실(1-30 bp)로 임의의 개체를 동정할 수 있다. 검정 중인 게놈 단편의 크기는 0.3~1.6kb 범위일 수 있다. 8-배 풀링 후, 1.4 kb 단편(노이즈로 인해 SNP 검출이 문제가 되는 단편의 말단은 제외) 및 검정당 96개 레인에서 상기 조합을 통해 단일 검정당 최대 100만 염기쌍의 게놈 DNA가 스크리닝되어 틸링이 고속 처리량 기술이 되게 한다.

[0338] 틸링은 추가로 문헌(Slade 및 Knauf (2005), 및 Henikoff 등 (2004))에 기재되어 있다.

[0339] 돌연변이의 효율적인 검출을 가능하게 하는 것 뿐만 아니라, 고속 처리량 틸링 기술은 천연 다형성의 검출을 위해 이상적이다. 따라서 공지된 서열에 대한 헤테로듀플렉싱에 의해 알려지지 않은 상동성 DNA를 조사하면 다형성 부위의 수와 위치가 밝혀진다. 적어도 일부 반복 수 다형성을 포함하여 뉴클레오타이드 변화와 작은 삽입 및 결실 둘 다 동정된다. 이를 Ecotilling이라고 하였다(참조: Comai 등, 2004).

[0340] 각각의 SNP는 수개의 뉴클레오타이드 내 이의 대략적 위치에 의해 기록된다. 따라서 각 1배체형은 이동성에 따라 보관할 수 있다. 서열 데이터는 미스매치-절단 검정에 사용되는 동일한 증폭된 DNA의 분취량을 사용하여 상대적으로 적은 증분 노력으로 수득될 수 있다. 단일 반응에 대한 좌측 또는 우측 서열분석 프라이머는 다형성에 대한 이의 근접성에 따라 선택된다. 서열분석기 소프트웨어는 다중 정렬을 수행하고 각각의 경우에 겔 밴드를 확인하는 염기 변화를 발견한다.

[0341] 에코틸링(Ecotilling)은 현재 대부분의 SNP 발견에 사용되는 방법인 전체 서열분석보다 더 저렴하게 수행할 수 있다. 돌연변이 유발된 식물로부터의 풀 보다는 차라리 정렬된 에코타입 DNA를 함유하는 플레이트가 스크리닝될 수 있다. 검출은 거의 염기쌍 분리능을 가진 겔에서 수행되고, 배경 패턴은 레인 전체에서 균일하기 때문에 동일한 크기의 밴드를 매칭시킬 수 있으므로 단일 단계에서 SNP를 발견하고 유전자형을 분석할 수 있다. 이러한 방식으로 SNP의 궁극적인 서열분석은 간단하고 효율적이며 스크리닝에 사용된 동일한 PCR 생성물의 분취액을 DNA 서열분석에 적용할 수 있다는 사실에 의해 더욱 그렇다.

[0342] **부위-특이적 뉴클레아제를 사용한 게놈 편집**

[0343] 게놈 편집을 사용하여 본원에 정의된 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자를 변형시킬 수 있다. 게놈 편집은 비특이적 DNA 절단 모듈에 융합된 서열 특이적 DNA 결합 도메인으로 구성된 조작된 뉴클레아제를 사용한다. 이들 키메라 뉴클레아제는 세포의 내인성 세포 DNA 복구 기전을 자극하여 유도된 절단을 복구하는 표적화된 DNA 이중가닥 절단을 유도함으로써 효율적이고 정확한 유전학적 변형을 가능하게 한다. 상기 기전은 예를 들어, 오류 성향의 비-상동성 말단 연결 (NHEJ) 및 상동성 지시된 복구 (HDR)를 포함한다.

- [0344] 확장된 상동성 아암이 있는 공여자 플라스미드의 존재하에, HDR은 기존 유전자를 보정하거나 대체하기 위해 단일 또는 다중 전이유전자의 도입으로 이어질 수 있다. 공여자 플라스미드의 부재하에, NHEJ 매개 복구는 유전자 파괴를 유발하는 표적의 작은 삽입 또는 결실 돌연변이를 생성한다.
- [0345] 본 발명의 방법에 유용한 가공된 뉴클레아제는 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사(TAL) 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 및 CRISPR-Cas9 또는 Cas12 유형 부위-특이적 뉴클레아제를 포함한다.
- [0346] 전형적으로 뉴클레아제 암호화된 유전자는 플라스미드 DNA, 바이러스 벡터 또는 시험관 내에서 전사된 mRNA에 의해 세포로 전달된다. 형광 대용 리포터 벡터의 사용은 또한 ZFN-, TALEN- 또는 CRISPR-변형 세포의 농축을 가능하게 한다.
- [0347] 복잡한 계놈은 종종 의도된 DNA 표적과 동일하거나 고도로 상동성인 서열의 다수의 카피물을 포함하여 잠재적으로 표적의 활성 및 세포 독성을 유도한다. 이를 해결하기 위해 구조(참조: Miller 등, 2007; Szczeppek 등, 2007) 및 선택 기반(참조: Doyon 등, 2011; Guo 등, 2010) 접근법을 사용하여 최적화된 절단 특이성 및 감소된 독성을 갖는 개선된 ZFN 및 TALEN 이중이량체를 생성할 수 있다.
- [0348] 본 발명의 바람직한 구현예에 따라 ZFN에 의한 유전자 재조합 또는 돌연변이를 표적화하기 위해서는 숙주 DNA에서 2개의 9 bp 아연 핑거 DNA 인지 서열이 동정되어야 한다. 이들 인지 부위는 서로에 대해 역배향이고 약 6bp의 DNA로 분리된다. 이어서 ZFN은 표적 유전자좌에서 DNA에 특이적으로 결합하는 아연 핑거 조합을 디자인하고 생성한 다음 아연 핑거를 DNA 절단 도메인에 연결하여 생성된다.
- [0349] 전사 활성화인자 유사(TAL) 이펙터 뉴클레아제(TALEN)는 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인과 엔도뉴클레아제 도메인을 포함한다.
- [0350] TAL 이펙터는 병원체에 의해 식물 세포로 주사되는 식물 병원성 세균의 단백질이고, 상기 식물 세포에서 이들은 핵으로 이동하여 특정 식물 유전자를 가동시키는 전사 인자로 기능한다. TAL 이펙터의 1차 아미노산 서열은 이것이 결합하는 뉴클레오타이드 서열을 지시한다. 따라서, 표적 부위는 TAL 이펙터에 대해 예측될 수 있고, TAL 이펙터는 특정 뉴클레오타이드 서열에 결합할 목적으로 가공되고 생성될 수 있다.
- [0351] TAL 이펙터-암호화 핵산 서열에 융합된 것은 뉴클레아제 또는 뉴클레아제의 일부, 전형적으로 FokI와 같은 유형 II 제한 엔도뉴클레아제로부터의 비특이적 절단 도메인을 암호화하는 서열이다(참조: Kim 등, 1996). 다른 유용한 엔도뉴클레아제는 예를 들어, *HhaI*, *HindIII*, *Nod*, *BbvCI*, *EcoRI*, *BglI*, 및 *AlwI*를 포함할 수 있다. 일부 엔도뉴클레아제(예를 들어, *FokI*)가 이량체로만 기능한다는 사실은 TAL 이펙터의 표적 특이성을 증진시키기 위해 활용될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에는 각 FokI 단량체가 상이한 DNA 표적 서열을 인지하는 TAL 이펙터 서열에 융합될 수 있고, 2개의 인지 부위가 근접한 경우에만 비활성 단량체가 함께 모여 기능성 효소를 생성한다. 뉴클레아제를 활성화하기 위해 DNA 결합을 요구함으로써 고도로 부위 특이적인 제한 효소를 생성할 수 있다.
- [0352] 서열 특이적 TALEN은 세포에 존재하는 미리 선택된 표적 뉴클레오타이드 서열 내의 특정 서열을 인지할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 표적 뉴클레오타이드 서열은 뉴클레아제 인지 부위에 대해 스캐닝될 수 있고, 특정 뉴클레아제는 표적 서열에 기초하여 선택될 수 있다. 다른 경우에 TALEN은 특정 세포 서열을 표적화하기 위해 디자인될 수 있다.
- [0353] *CRISPR을 사용한 계놈 편집(유전자 편집)*
- [0354] 엔도뉴클레아제는 서열 특이적 방식으로, 즉 정의된 뉴클레오타이드 서열을 표적화하여 계놈 DNA에서 단일 가닥 또는 이중 가닥 절단을 생성하는 데 사용될 수 있다. 진핵 세포의 계놈 DNA 절단은 비상동성 말단 연결(NHEJ) 또는 상동성 지시된 복구(HDR) 경로를 사용하여 복구된다. NHEJ는 불완전한 복구를 유도하여 돌연변이, 종종 짧은 결실, 예를 들어, 1 내지 30개 염기쌍을 생성한다. 대조적으로, HDR은 외인성 공급된 복구 DNA 주형을 사용함에 의해 정확한 유전자 삽입을 가능하게 할 수 있다. CRISPR 관련(Cas) 단백질은 상당한 관심을 받았지만 전사 활성화인자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 및 아연 핑거 뉴클레아제가 여전히 유용하지만 CRISPR-Cas 시스템은 계놈 변형을 위한 더 간단하고 다양하며 저렴한 도구를 제공한다(참조: Doudna 및 Charpentier, 2014).
- [0355] CRISPR-Cas 시스템은 다양한 뉴클레아제 또는 뉴클레아제의 조합을 사용하여 2개의 주요 그룹으로 분류된다. 부류 1 CRISPR-Cas 시스템(유형 I, III 및 IV)에서, 이펙터 모듈은 다중 단백질 복합체로 이루어진 반면 부류 2 시스템(유형 II, V 및 VI)은 단지 하나의 이펙터 단백질을 사용한다(참조: Makarova 등, 2015). Cas는 플랭킹 CRISPR 유전자좌 근처에 커플링되거나 이에 인접하거나 이의 근처에 위치한 유전자를 포함한다. 문헌(참조:

Haft 등 (2005))은 Cas 단백질 패밀리의 검토를 제공한다.

- [0356] 뉴클레아제는 CRISPR-Cas 시스템의 2개의 유전자로 단순화를 유도하는 tracrRNA; 엔도뉴클레아제 및 sgRNA를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있는 합성 소형 가이드 RNA (sgRNA 또는 gRNA)에 의해 가이드된다(참조: Jinek 등 2012). sgRNA는 전형적으로 U3 또는 U6 소형 핵 RNA 프로모터와 같은 PolIII 프로모터의 조절 제어하에 있다. sgRNA는 일반적으로 표적 뉴클레오타이드 서열에 존재하는 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)를 인지하기 위한 복합체를 위해 함께 CRISPR RNA(crRNA) 스페이서 및 반복 서열, 및 Cas 이펙터 단백질을 포함한다. sgRNA는 서열 상동성에 의해 표적화하기 위한 특정 유전자 및 유전자의 일부를 인지한다. 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)는 게놈에서 잠재적인 CRISPR-Cas 표적의 수를 제한하는 표적 부위에 인접해 있지만 뉴클레아제의 확장이 사용 가능한 PAM의 수를 증가시키기도 한다. Cas 뉴클레아제는 crRNA 스페이스 및 상보적 표적 뉴클레오타이드 서열 간의 염기쌍 형성에 의해 활성화된다. CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no>), CRISPR 디자인 <https://omictools.com/crispr-design-tool>, E-CRISP <http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>, 및 지니어스 (Geneious) 또는 벤클링(Benchling) <https://benchling.com/crispr>.
- [0357] 하나의 예에서, 약 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드의 가이드 RNA(gRNA) 표적 서열 바로 다음에 3-뉴클레오타이드 PAM(프로토스페이서 인접 모티프) 서열이 cDNA 서열로부터 본원에 정의된 폴리펩타이드, 바람직하게는 mtSSB-1 또는 mtSSB-1a 폴리펩타이드, TWINKLE 폴리펩타이드 또는 RECA3 폴리펩타이드 중 하나 이상을 암호화하는 유전자까지 동정된다.
- [0358] CRISPR-Cas 시스템은 유전자 편집을 위한 식물 유전자 변형에 가장 자주 채택되고, 종종 RNA 가이드된 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) Cas9와 같은 Cas9 이펙터 단백질 또는 다수의 식물 종의 최적화된 서열 변이체를 사용한다(참조: Luo 등, 2016). 문헌(참조: Luo 등 (2016))은 유전자가 다양한 식물 종에서 성공적으로 표적화되어 내인성 유전자 개방 판독 프레임 및/또는 프로모터에서 기능 돌연변이체 표현형의 결실 및 손실을 야기하는 수많은 연구를 요약한다. 변이체 PAM 서열이 요구되는 경우에 사용하기 위해 xCas9와 같은 변형된 Cas9가 가용하다(참조: Hu 등, 2018). 식물 세포 상의 세포벽으로 인해 CRISPR-Cas 기계를 세포로 전달하고 성공적인 유전자전이 재생은 전형적으로 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 감염(Luo 등, 2016) 또는 플라스미드 DNA 입자 충격 또는 생물학적 전달을 사용하였다. 시리얼 형질전환을 위해 적합한 벡터는 pCXUNCas9(참조: Sun 등, 2016) 또는 제조사 (Addgene)로부터 가용한 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H(참조: Ma 등, 2015, Accession number KR029109.1)를 포함한다.
- [0359] 대안적 CRISPR-Cas 시스템은 다양하고, 뉴클레아제 RuvC 도메인을 포함하지만 Cas12a, Cas12b, Cas12f, Cpf1, C2c1, C2c3 및 가공된 유도체를 포함하는 Cas12 효소를 포함하는 HNH 도메인을 포함하지 않는 이펙터 효소를 포함한다. 식물에서 프레보텔라(*Prevotella*)와 프란시셀라(*Francisella*)의 *Cpf1*은 Cas9 대안으로 성공적으로 사용되었다. *Cpf1*은 PAM-원위 위치에서 엇갈린 방식으로 이중 가닥 절단을 생성하고 더 작은 엔도뉴클레아제가 특정 종에 이점을 제공할 수 있다(참조: Begemann 등, 2017). 다른 CRISPR-Cas 시스템은 Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c를 포함하는 RNA 가이드된 RNase를 포함한다. 대안적 CRISPR-Cas 시스템은 내인성 식물 유전자에서 돌연변이를 생성하는 맥락에서 디자인되고 적용되는 복합 뉴클레아제 및 이펙터 시스템, 예를 들어, CRISPR TiD 시스템(참조: Osakabe 등, 2020); 또는 복합 뉴클레아제 및 복구 효소, 예를 들어 문헌(Anzalone 등, (2019))에 기재된 1차 편집 시스템은 DNA 절단 후 발생하는 세포 복구 및 서열 삽입을 엄격하게 제어할 수 있다.
- [0360] 서열 삽입 또는 통합
- [0361] CRISPR-Cas 시스템은 서열의 게놈으로의 삽입을 위해 상동성 복구를 지시하기 위한 핵산 서열의 제공과 조합될 수 있다. 식물 전이유전자의 표적화된 게놈 통합은 동일한 유전자좌에서 전이유전자의 순차적 첨가를 가능하게 한다. 상기 "시스 유전자 스택킹"은 후속적 육종 노력을 크게 단순화시키고 모든 전이유전자는 단일 유전자좌로서 유전된다. 표적 부위의 CRISPR/Cas9 절단과 커플링될 때 전이유전자는 플랭킹 서열 상동성에 의해 촉진되는 상동성 지시된 복구에 의해 이러한 유전자좌에 통합될 수 있다. 이러한 접근법은 연결 드래그 없이 새로운 대립 유전자를 신속하게 도입하거나 자연적으로 존재하지 않는 대립유전자 변이체를 도입하는 데 사용할 수 있다.
- [0362] 닉카제
- [0363] CRISPR-Cas II 시스템은 2개의 효소 절단 도메인, 즉 RuvC 도메인과 HNH 도메인이 있는 Cas9 뉴클레아제를 사용한다. 돌연변이는 이중 가닥 절단을 단일 가닥 절단으로 변경하여 닉카제 또는 뉴클레아제 불활성화된 Cas9라고 하는 기술 변형을 초래하는 것으로 나타났다. RuvC 서브도메인은 비상보적인 DNA 가닥을 절단하고 HNH 서브도메

인은 gRNA에 상보적인 DNA 가닥을 절단한다. 니카제 또는 뉴클레아제 불활성화된 Cas9는 gRNA에 의해 지시된 DNA 결합 능력을 보유한다. 서브도메인에서 돌연변이는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 에스. 피오게네스 (*S. pyogenes*) Cas9 뉴클레아제는 D10A 돌연변이 또는 H840A 돌연변이를 갖는다.

[0364] *게놈 염기 편집 또는 변형*

[0365] 염기 편집기는 사이토신 데아미나제를 Cas9 도메인과 융합시킴에 의해 생성되었다(WO 2018/086623). 데아미나제를 융합함으로써, 염기 편집기는 DNA에서 시티딘의 탈아미노화에 의해 표적화된 시티딘(C)을 우라실(U)로 치환하기 위해 gRNA에 의해 지시된 서열 표적화를 사용한다. 이어서 세포의 미스매치 복구 기전은 U를 T로 대체한다. 적합한 시티딘 데아미나제는 APOBEC1 데아미나제, 활성화 유도 시티딘 데아미나제(AID), APOBEC3G 및 CDA1을 포함한다. 추가로, Cas9-데아미나제 융합체는 단일 가닥 절단을 생성하기 위해 니카제 활성을 갖는 돌연변이된 Cas9를 포함할 수 있다. 니카제 단백질은 상동성 지시된 복구를 촉진시키는데 잠재적으로 보다 효율적인 것으로 시사되었다(참조: Luo 등, 2016).

[0366] *무백터 게놈 편집 또는 게놈 변형*

[0367] 보다 최근에는 Cas9/sgRNA 리보핵단백질을 사용하는 무백터 접근법을 사용하는 방법은 오프 표적 이벤트의 성공적인 감소와 함께 기재되었다. 상기 방법은 원형질체와 같은 세포로 형질전환된 Cas9 리보핵단백질(RNP)의 시험관내 발현을 필요로 한다. 이는 숙주 게놈에 통합되는 Cas9 암호화 서열에 의존하지 않으므로 Cas9 유전자가 무작위로 부위에 통합될 때 발생할 수 있는 바람직하지 않은 비특이적 절단을 감소시킨다. 시험관내 안정한 Cas9 및 sgRNA 안정한 리보핵단백질을 형성하기 위해서는 짧은 플랭킹 서열만 필요하다. 문헌(참조: Woo 등 (2015))은 사전 어셈블리된 Cas9/sgRNA 단백질/RNA 복합체를 생산하여 아라비도프시스(*Arabidopsis*), 벼, 양상추 및 담배의 원형질체에 도입하였고, 재생 식물에서 최대 45%의 표적화된 돌연변이 유발 빈도를 관찰하였다. RNP의 시험관내 도입은 쌍자엽 식물(참조: Woo 등, 2015), 외떡잎 식물 옥수수(참조: Svitashv 등, 2016) 및 밀(참조: Liang 등, 2017)을 포함한 여러 종에서 입증되었다. CRISPR-Cas 9 시험관내 전사체 또는 리보핵단백질을 사용한 식물의 게놈 편집은 문헌(Liang 등 (2018) 및 Liang 등 (2019))에 기재된다.

[0368] *유전자 삽입을 위한 방법*

[0369] 식물 배아는 DNA 복구 주형과 함께 통합 부위를 표적화하는 Cas9 유전자 및 sgRNA 유전자로 포격(bombarded)될 수 있다. DNA 복구 주형은 합성된 DNA 단편, 127쌍체 이상의 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, 각각은 삽입될 관심 대상 유전자를 암호화한다. 예를 들어, 포격된 세포는 조직 배양 배지 상에서 성장시킨다. CTAB DNA 추출법을 이용하여 재생된 식물의 캘러스 또는 잎조직에서 DNA를 추출하고 PCR로 분석하여 유전자 통합을 확인한다. T1 자손 식물은 삽입된 관심 대상의 유전자를 포함하는 것으로 확인된 식물로부터 선택될 수 있다.

[0370] 상기 방법은 공여자 DNA 및 엔도뉴클레아제로 지칭되는 관심 대상의 DNA 서열을 식물 세포에 도입하는 것을 포함한다. 엔도뉴클레아제는 공여자 DNA의 상동성의 제1 및 제2 영역이 이들의 상응하는 게놈 상동성 영역과의 상동성 재조합을 진행하도록 표적 부위에 절단을 생성한다. 절단된 게놈 DNA는 DNA 서열의 수용자로서 작용한다. 공여자와 게놈 간의 수득한 DNA 교환은 식물 게놈에서 표적 부위에서 가닥 절단으로 공여자 DNA의 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드의 통합을 초래하여 본래의 표적 부위를 변경하고 변경된 게놈 서열을 생성한다.

[0371] 공여자 DNA는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 도입될 수 있다. 예를 들어, 표적 부위를 갖는 식물이 제공된다. 공여자 DNA는 아그로박테리움-매개 형질전환 또는 생물학적 입자 포격을 포함하는 공지된 형질전환 방법에 의해 식물에 제공될 수 있다. RNA 가이드 Cas 또는 Cpf1 엔도뉴클레아제는 표적 부위를 절단하고 공여자 DNA는 식물 게놈에 삽입된다.

[0372] 상동성 재조합은 식물의 체세포에서 낮은 빈도로 발생하지만 선택된 엔도뉴클레아제 표적 부위에서 이중가닥 절단(DSB)의 도입에 의해 상기 방법이 증가/자극되는 것으로 보인다.

[0373] *RNA 간섭*

[0374] RNA 간섭(RNAi)은 유전자의 발현을 특이적으로 감소시키는 데 특히 유용하고, 이는 유전자가 단백질을 암호화하는 경우 특정 단백질의 생산 감소를 초래한다. 이론에 의해 제한하고 싶지는 않지만 문헌(참조: Waterhouse 등 (1998))은 dsRNA(듀플렉스 RNA)가 단백질 생성을 감소시키는 데 사용될 수 있는 기전에 대한 모델을 제공하였다. 상기 기술은 관심 대상 유전자 또는 이의 일부의 mRNA와 필수적으로 동일한 서열을 포함하는 dsRNA 분자의 존재에 의존한다. 간편하게, dsRNA는 재조합 벡터 또는 숙주 세포에서 단일 프로모터로부터 생성될 수 있고, 여기서 센스 및 안티센스 서열은 센스 및 안티센스 서열이 하이브리드화하여 루프 구조를 형성하는 관련

없는 서열과 함께 dsRNA 분자를 형성하도록 하는 관련 없는 서열에 의해 플랭킹된다. 적합한 dsRNA 분자의 디자인 및 생성은 능히 당업자의 능력 내에 있고, 특히 문헌(참조: Waterhouse 등 (1998), Smith 등 (2000), WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029, WO 01/34815, WO19/051563 및 WO20/024019)을 고려한다.

[0375] 하나의 예에서, 본원에 정의된 폴리펩타이드, 바람직하게는 mtSSB-1 또는 mtSSB-1a 폴리펩타이드, TWINKLE 폴리펩타이드 또는 RECA3 폴리펩타이드 중 하나 이상을 암호화하는 유전자에 대해 상동성을 갖는 적어도 부분적으로 이중 가닥 RNA 생성물(들)의 합성을 지시하는 DNA가 도입된다. 따라서 DNA는 RNA로 전사될 때 하이브리드화하여 이중 가닥 RNA 영역을 형성할 수 있는 센스 및 안티센스 서열 둘 다를 포함한다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 센스 및 안티센스 서열은 RNA로 전사될 때 스플라이싱 제거되는 인트론을 포함하는 스페이서 영역에 의해 분리된다. 상기 정렬은 유전자 사일런싱의 효율성을 높이는 것으로 나타났다(참조: Smith 등, 2000). 이중 가닥 영역은 하나 또는 2개의 DNA 영역으로부터 전사된 1개 또는 2개의 RNA 분자를 포함할 수 있다. 이중 가닥 분자의 존재는 이중 가닥 RNA와 표적 유전자로부터의 상동성 RNA 전사체를 둘 다 파괴하는 내인성 시스템으로부터의 반응을 유발하여 표적 유전자의 활성을 효율적으로 감소시키거나 제거하는 것으로 사료된다.

[0376] 하이브리드화하는 센스 및 안티센스 서열의 길이는 각각 적어도 19개의 연속 뉴클레오타이드, 바람직하게는 적어도 30개, 적어도 32개, 적어도 40개 또는 적어도 50개의 연속 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 적어도 100개 또는 적어도 200개의 연속 뉴클레오타이드여야 한다. 일반적으로 표적 유전자 mRNA의 영역에 상응하는 100~1000개의 뉴클레오타이드 서열을 사용한다. 전체 유전자 전사체에 상응하는 전장 서열이 사용될 수 있다. 표적화된 전사체에 대한 센스 서열의 동일성 정도(및 따라서 또한 표적 전사체의 상보체에 대한 안티센스 서열의 동일성)는 적어도 85%, 적어도 90% 또는 95~100%여야 하며, 바람직하게는 표적 서열과 동일하다. RNA 분자는 물론 분자를 안정화시키는 기능을 할 수 있는 비관련 서열을 포함할 수 있다. RNA 분자는 RNA 폴리머라제 II 또는 RNA 폴리머라제 III 프로모터의 제어 하에 발현될 수 있다. 후자의 예는 tRNA 또는 snRNA 프로모터를 포함한다.

[0377] 바람직한 작은 간섭 RNA("siRNA") 분자는 표적 mRNA의 약 19-25개의 연속 뉴클레오타이드와 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 바람직하게는, siRNA 서열은 디뉴클레오타이드 AA로 시작하고, 약 30-70%(바람직하게는, 30-60%, 보다 바람직하게는 40-60%, 보다 바람직하게는 약 45%-55%)의 GC-함량을 포함하고, 예를 들어, 표준 BLAST 검색에 의해 결정된 바와 같이 그것이 도입될 유기체의 게놈에서 표적 이외의 임의의 뉴클레오타이드 서열에 대해 높은 퍼센트의 동일성을 갖지 않는다.

[0378] 구현예에서, dsRNA는 WO2019/051563에 기재된 바와 같은 "1edRNA" 구조를 포함하고/하거나 WO2020/024019에 기재된 바와 같은 G:U 염기쌍을 포함한다.

[0379] 본 발명에 유용한 DsRNA는 통상적인 절차를 사용하여 용이하게 제조될 수 있다.

[0380] *마이크로RNA*

[0381] 마이크로RNA(약어 miRNA)는 길이가 일반적으로 19-25개 뉴클레오타이드(통상적으로 식물에서는 약 20-24개 뉴클레오타이드)인 비암호화 RNA 분자로, 불완전한 스템-루프 구조를 형성하는 보다 큰 전구체로부터 유래한다. miRNA는 전형적으로 발현이 감소되어야 하는 표적 mRNA의 영역에 대해 완전히 상보적이지만 완전히 상보적일 필요는 없다.

[0382] miRNA는 표적 전령 RNA 전사체(mRNA)의 상보적 서열에 결합하여 일반적으로 해독 억제 또는 표적 분해 및 유전자 사일런싱을 초래한다. 인공 miRNA(amiRNA)는 당업계에 널리 공지된 바와 같이 임의의 관심 대상의 유전자의 발현을 감소시키기 위한 천연 miRNA를 기초로 디자인될 수 있다.

[0383] 식물 세포에서, miRNA 전구체 분자는 핵에서 크게 가공되는 것으로 사료된다. pri-miRNA(하나 이상의 국소 이중가닥 또는 "헤어핀" 영역과 일반적인 5' "캡" 및 mRNA의 폴리아데닐화 꼬리 포함)은 스템 루프 또는 폴드-백 구조를 포함하고 "pre-miRNA"로 호칭되는 더 짧은 miRNA 전구체 분자로 가공된다. 식물에서 pre-miRNA는 별개의 DICER 유사(DCL) 효소에 의해 절단되어 miRNA:miRNA* 듀플렉스를 생성한다. 핵 밖으로 수송되기 전에, 이들 듀플렉스는 메틸화된다.

[0384] 세포질에서, miRNA:miRNA 듀플렉스로부터의 miRNA 가닥은 표적 인지를 위해 활성 RNA 유도된 사일런싱 복합체(RISC)로 선택적으로 혼입된다. RISC-복합체는 서열 특이적 유전자 억제를 발휘하는 아그노트(Argonaute) 단백질의 특정 서브세트를 포함한다(참조: 예를 들어, Millar 및 Waterhouse, 2005; Pasquinelli 등, 2005; Almeida 및 Allshire, 2005).

- [0385] 본 발명에 유용한 마이크로RNA는 통상적인 절차를 사용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, *OsmtSSB-1a* amiRNA(인공 마이크로RNA) 작제물은 문헌(참조: Fahim 등 (2012))에 기재된 일반 방법을 기반으로 할 수 있다. WMD3 소프트웨어(www.wmd3.weigelworld.org/)를 사용하여 *OsmtSSB-1a* 유전자에서 적합한 amiRNA 표적을 동정할 수 있다. amiRNA 표적은 4개의 기준에 따라 선택된다: 1) 5'-말단에 AT가 풍부하고 3'-말단에 GC가 풍부한 서열을 사용함으로써 상대적인 5' 불안정성; 2) 위치 1의 U 및 절단 부위의 A(위치 10과 11 사이); 3) 위치 1 내지 9 및 13 내지 21에서 각각 최대 1개 및 4개의 미스매치; 및 4) amiRNA가 표적 RNA에 하이브리드화될 때 -30kcal mol^{-1} 미만의 예측된 자유 에너지(ΔG)를 가짐(참조: Ossowski 등, 2008). 유전자 특이적 발현 감소를 위해 후보 amiRNA 서열은 *OsOsmtSSB-1a*의 모든 동족체 정렬 시 가장 낮은 상동성을 나타내는 영역에서 선택되어 *OsmtSSB-1a* 동족체의 발현의 오프-표적 감소 가능성을 감소시킨다. 벼 miR395의 전구체(참조: Guddeti 등, 2005; Jones-Rhoades 및 Bartel, 2004; Kawashima 등, 2009)는 amiRNA 서열 삽입을 위한 amiRNA 백본으로 선택될 수 있다. 예를 들어, 작제물을 디자인하고 제조하기 위해 miR395에서 5개의 내인성 miRNA 표적은 mtSSB, TWINKLE 또는 RECA3 녹다운에 대한 5개의 amiRNA 표적으로 대체된다.
- [0386] 동시억제
- [0387] 유전자는 관련 내인성 유전자 및/또는 게놈에 이미 존재하는 전이유전자의 발현을 억제할 수 있고, 이러한 표현형은 상동성 의존적 유전자 사일런싱으로 호칭된다. 대부분의 상동성 의존적 유전자 사일런싱 사례는 2개 부류-전이유전자의 전사 수준에서 기능하는 것들과 전사 후 작동하는 것들로 나뉜다.
- [0388] 전사후 상동성 의존적 유전자 사일런싱(Post-transcriptional homology-dependent gene silencing)(즉, 동시억제)은 유전자전이 식물에서 전이유전자 및 관련 내인성 또는 바이러스 유전자의 발현 손실을 기재한다. 동시억제는 항상 그런 것은 아니지만 전이유전자 전사체가 풍부할 때 종종 발생하고 일반적으로 mRNA 가공, 국소화 및/또는 분해 수준에서 유발되는 것으로 사료된다. 수개의 모델은 어떻게 동시 억제가 작동하는지를 설명하기 위해 존재한다(참조: Taylor, 1997).
- [0389] 동시억제는 발현을 위한 프로모터에 대해 센스 배향으로 유전자의 여분의 카피물 또는 이의 단편을 식물에 도입하는 것을 포함한다. 센스 단편의 크기, 표적 유전자 영역에 대한 이의 상응성 및 표적 유전자에 대한 서열 동일성의 정도는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 일부 경우에는 유전자 서열의 추가 카피물이 표적 식물 유전자의 발현을 방해한다. 동시 억제 접근법을 수행하는 방법에 대해 WO 97/20936 및 EP 0465572를 참조한다.
- [0390] 안티센스 폴리뉴클레오타이드
- [0391] 용어 "안티센스 폴리뉴클레오타이드"는 내인성 폴리펩타이드를 암호화하는 특정 mRNA 분자의 적어도 일부에 상보적이고 mRNA 해독과 같은 전사후 사건을 방해할 수 있는 DNA 또는 RNA 분자를 의미하는 것으로 받아들여질 것이다. 안티센스 방법의 용도는 당업계에 널리 공지되어 있다(참조: 예를 들어, G. Hartmann 및 S. Endres, *Manual of Antisense Methodology*, Kluwer (1999)). 식물에서 안티센스 기술의 사용은 문헌(참조: Bourque (1995) 및 Senior (1998))에 의해 검토되었다. 문헌(Bourque (1995))은 유전자 불활성화의 방법으로서 식물 시스템에서 안티센스 서열이 어떻게 활용되는지의 대다수의 예를 열거한다. 부르크(Bourque)는 또한 임의의 효소 활성의 100% 억제 달성, 부분적 억제가 시스템에서 측정 가능한 변화를 보다 크게 유도함으로써 필요하지 않을 수 있음을 기재한다. 문헌(참조: Senior (1998))은 안티센스 방법이 지금 유전자 발현을 조작하기 위해 매우 잘 확립된 기술임을 기재한다.
- [0392] 하나의 구현예에서, 안티센스 폴리뉴클레오타이드는 생리학적 조건 하에서 하이브리드화하고, 즉, 안티센스 폴리뉴클레오타이드(완전히 또는 부분적으로 단일 가닥임)는 세포에서 정상적인 조건 하에서 내인성 mtSSB, TWINKLE 또는 RECA3 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA와 적어도 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드를 형성할 수 있다.
- [0393] 안티센스 분자는 구조 유전자에 상응하는 서열 또는 유전자 발현 또는 스플라이싱 이벤트를 제어하는 서열에 대한 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 안티센스 서열은 내인성 유전자의 표적화된 암호화 영역, 또는 5'-비해독 영역(UTR) 또는 3'-UTR 또는 이들의 조합에 상응할 수 있다. 이는 전사 동안 또는 전사 후에 스플라이싱 제거될 수 있고, 바람직하게는 표적 유전자의 엑손 서열에만 스플라이싱될 수 있는 인트론 서열에 부분적으로 상보적일 수 있다. 일반적으로 UTR의 보다 큰 다양성을 고려할 때, 이들 영역의 표적화는 보다 큰 유전자 억제 특이성을 제공한다.
- [0394] 안티센스 서열의 길이는 적어도 19개의 연속 뉴클레오타이드, 바람직하게는 적어도 30개 또는 적어도 50개의 뉴클레오타이드, 및 보다 바람직하게는 적어도 100, 200, 500 또는 1000개의 뉴클레오타이드여야 한다. 전체 유전

자 전사체에 상보적인 전장 서열이 사용될 수 있다. 길이는 가장 바람직하게 100-2000개 뉴클레오타이드이다. 표적화된 전사체에 대한 안티센스 서열의 동일성 정도는 적어도 90% 및 보다 바람직하게는 95-100%, 전형적으로 100% 동일해야만 한다. 안티센스 RNA 분자는 물론 분자를 안정화시키는 기능을 할 수 있는 관련 없는 서열을 포함할 수 있다.

[0395] 핵산 작제물

[0396] 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하거나 본 발명에 유용한 핵산 작제물, 및 이들을 함유하는 벡터 및 숙주 세포, 이들의 생성 및 사용 방법, 및 이들의 용도를 포함한다.

[0397] 본 발명은 작동 가능하게 결합되거나 연결되는 요소를 지칭한다. "작동가능하게 결합된" 또는 "작동가능하게 연결된" 등은 기능성 관계에서 폴리뉴클레오타이드 요소의 연결을 지칭한다. 전형적으로, 작동 가능하게 결합된 핵산 서열은 연속적으로 연결되며, 필요한 경우 2개의 단백질 암호화 영역을 연결하기 위해 연속적이거나 판독 프레임 내에 있다. 암호화 서열은 RNA 폴리머라제가 2개의 암호화 서열을 단일 RNA로 전사할 때 또 다른 암호화 서열에 "작동가능하게 결합"되고, 이는 해독되면 암호화 서열 둘 다로부터 유래된 아미노산을 갖는 단일 폴리펩타이드로 해독된다. 암호화 서열은 발현된 서열이 궁극적으로 가공되어 목적하는 단백질을 생성하는 한 서로 연속할 필요가 없다.

[0398] 본원에 사용된 용어 "시스-작용 서열", "시스-작용 요소" 또는 "시스-조절 영역" 또는 "조절 영역" 또는 유사한 용어는 발현가능한 유전학적 서열에 비해 적절하게 위치되고 결합될 때 적어도 부분적으로 유전학적 서열의 발현을 조절할 수 있는 뉴클레오타이드의 임의의 서열을 의미하는 것으로 간주될 것이다. 당업자는 시스-조절 영역이 전사 또는 전사 후 수준에서 유전자 서열의 발현 수준 및/또는 세포 유형 특이성 및/또는 발육 특이성을 활성화, 사일런싱, 증진, 억제 또는 달리 변경할 수 있음을 알 것이다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 시스-작용 서열은 발현가능한 유전학적 서열의 발현을 증진시키거나 자극하는 활성화인자 서열이다.

[0399] 프로모터 또는 인핸서 요소를 전사 가능한 폴리뉴클레오타이드에 "작동 가능하게 결합하는 것"은 전사 가능한 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드 또는 다른 전사체)를 프로모터의 조절 제어 하에 두는 것을 의미하고, 이는 이후 해당 폴리뉴클레오타이드의 전사를 제어한다. 이종성 프로모터/구조적 유전자 조합의 작제에서, 일반적으로 프로모터와 이것이 이의 천연 세팅에서 제어하고, 단백질 암호화 영역, 즉 프로모터가 유래된 유전자 사이의 거리와 대략적으로 동일한 전사 가능한 폴리뉴클레오타이드의 전사 개시 부위로부터의 거리에 프로모터 또는 이의 변이체를 위치시키는 것이 바람직하다. 당업계에 공지된 바와 같이, 상기 거리에서 일부 변화는 기능의 상실 없이 수용될 수 있다. 유사하게, 이의 조절 하에 위치할 전사가능한 폴리뉴클레오타이드에 대한 조절 서열 요소(예를 들어, 오퍼레이터, 인핸서 등)의 바람직한 위치화는 천연 세팅에서 요소, 즉 이것이 유래되는 유전자의 위치 지정에 의해 정의된다.

[0400] 본원에서 사용된 "프로모터" 또는 "프로모터 서열"은 유전자의 영역, 일반적으로 RNA 암호화 영역의 업스트림(5')을 지칭하고, 이는 관심 대상의 세포에서 전사의 개시 및 수준을 제어한다. "프로모터"는 TATA 박스 및 CCAAT 박스 서열과 같은 고전적인 게놈 유전자의 전사 조절 서열뿐만 아니라 발육 및/또는 환경적 자극에 반응하거나 조직 특이적 또는 세포 유형 특이적 방식으로 유전자 발현을 변경하는 추가 조절 요소(즉, 업스트림 활성화 서열, 인핸서 및 사일런서)를 포함한다. 프로모터는 반드시 그렇지는 않지만 일반적으로(예를 들어, 일부 PolIII 프로모터) 구조 유전자의 업스트림에 위치하여 구조 유전자의 발현을 조절한다. 추가로, 프로모터를 포함하는 조절 요소는 일반적으로 유전자의 전사 개시 부위의 2 kb 내에 위치한다. 프로모터는 세포에서의 발현을 추가로 증진시키고/시키거나 이것이 작동 가능하게 결합된 구조 유전자의 발현 시기 또는 유도성을 변경하기 위해 개시 부위에 더 먼 곳에 위치한 추가적인 특정 조절 요소를 포함할 수 있다.

[0401] "항시성 프로모터"는 식물과 같은 유기체의 많은 또는 모든 조직에서 작동가능하게 연결된 전사 서열의 발현을 지시하는 프로모터를 지칭한다. 본원에서 사용되는 항시성이라는 용어는 유전자가 모든 세포 유형에서 동일한 수준으로 발현된다는 것을 반드시 나타내는 것은 아니지만, 수준의 약간의 변화가 종종 검출될 수 있지만 유전자가 광범위한 세포 유형에서 발현된다는 것을 지적한다. 본원에 사용된 "선택적 발현"은 예를 들어 식물의 특정 기관, 예를 들어 배유, 배아, 잎, 열매, 괴경 또는 뿌리에서의 거의 배타적인 발현을 지칭한다. 바람직한 구현예에서, 프로모터는 벼 식물과 같은 시리얼 식물의 그레인에서 선택적으로 또는 우선적으로 발현된다. 따라서 선택적 발현은 항시성 발현과 대조될 수 있고, 이는 식물이 경험한 대부분의 또는 모든 조건 하에서 식물의 많은 또는 모든 조직에서의 발현을 지칭한다.

[0402] 선택적 발현은 또한 특정 식물 조직, 기관 또는 발육 단계에서 유전자 발현 생성물의 구획화를 초래할 수 있다.

색소체, 시토졸, 액포 또는 아포플라스트 공간과 같은 특정 아세포 위치에서의 구획화는 적절한 신호의 유전자 생성물, 예를 들어, 필요한 세포 구획으로의 수송을 위한 신호 펩타이드의 구조에 포함시키거나 반자율 소기관(색소체 및 미토콘드리아)의 경우 적절한 조절 서열을 갖는 전이유전자를 소기관 계층으로 통합함에 의해 성취될 수 있다.

[0403] "조직-특이적 프로모터" 또는 "기관-특이적 프로모터"는 많은 다른 조직 또는 기관, 바람직하게는 예를 들어 식물에서 모든 다른 조직 또는 기관은 아니지만 대부분의 많은 다른 조직 또는 기관에 비해 하나의 조직 또는 기관에서 우선적으로 발현되는 프로모터이다. 전형적으로, 프로모터는 다른 조직 또는 기관에서 보다 특정 조직 또는 기관에서 10배 더 높은 수준으로 발현된다.

[0404] 본 발명에 적합한 종자 특이적 프로모터는 당업계에 널리 공지된 시리얼에서 종자 특이적 발현을 유도하는 프로모터를 포함한다. 적합한 주목할만한 프로모터는 보리 LPT2 또는 LPT1 유전자 프로모터(WO 95/15389 및 WO 95/23230) 또는 WO 99/16890에 기재된 프로모터(보리 호르테인 유전자로부터의 프로모터)이다. 다른 프로모터는 문헌(참조: Broun 등 (1998), Potenza 등 (2004), US 20070192902 및 US 20030159173)에 기재된 것들을 포함한다. 일 구현예에서, 종자 특이적 프로모터는 배유, 바람직하게는 발육 호분과 같은 종자의 한정된 부분에서 우선적으로 발현된다. 추가 구현예에서, 종자 특이적 프로모터는 발현되지 않거나, 종자 발아 후 낮은 수준으로만 발현된다.

[0405] 일 구현예에서, 프로모터는 적어도 개화 시점과 개화 후 30일 사이의 시점에서 활성이거나, 이 기간 동안 전체적으로 활성이다. 이러한 프로모터의 예는 *OsmtSSB-1a* 유전자 프로모터, TWINKLE 프로모터, RECA3 프로모터 또는 TA2 프로모터(WO 2017/083920)이다.

[0406] 본 발명에 의해 고려되는 프로모터는 형질전환될 숙주 식물에 고유할 수 있거나 대안적 공급원으로부터 유래될 수 있고, 여기서 영역은 숙주 식물에서 기능성이다. 단자엽 식물에서 기능적인 수많은 프로모터는 당업계에 잘 공지되어 있다. 프로모터 활성을 평가하기 위한 비제한적인 방법은 문헌(참조: Medberry 등 (1992 및 1993), Sambrook 등 (1989, supra) 및 US 5,164,316)에 기재된다.

[0407] 대안적으로 또는 추가로, 프로모터는 그레인 식물의 적절한 발육 단계에서 도입된 폴리뉴클레오타이드의 발현을 유도할 수 있는 유도성 프로모터 또는 발육적으로 조절되는 프로모터일 수 있다. 사용될 수 있는 다른 시스-작용 서열은 전사 및/또는 해독 인핸서를 포함한다. 인핸서 영역은 당업자에게 널리 공지되어 있고, ATG 해독 개시 코돈 및 인접 서열을 포함할 수 있다. 포함되는 경우, 개시 코돈은 전체 서열이 해독되는 경우 해독을 보장하기 위해 외래 또는 외인성 폴리뉴클레오타이드와 관련된 암호화 서열의 판독 프레임과 위상이 동일해야 한다. 해독 개시 영역은 전사 개시 영역의 공급원으로부터 또는 외래 또는 외인성 폴리뉴클레오타이드로부터 제공될 수 있다. 서열은 또한 전사를 구동하기 위해 선택된 프로모터의 공급원으로부터 유래될 수 있고, mRNA의 해독을 증가시키기 위해 특이적으로 변형될 수 있다.

[0408] 본 발명의 핵산 작제물은 전사 종결 서열을 포함할 수 있는 약 50 내지 1,000개의 뉴클레오타이드 염기쌍의 3' 비해독 서열을 포함할 수 있다. 3' 비해독 서열은 폴리아데닐화 신호 및 mRNA 가공에 영향을 미칠 수 있는 임의의 다른 조절 신호를 포함하거나 포함하지 않을 수 있는 전사 종결 신호를 함유할 수 있다. 폴리아데닐화 신호는 mRNA 전구체의 3' 말단에 폴리아데닐산 트랙을 추가하는 기능을 한다. 폴리아데닐화 신호는 변이가 드물지 않지만 표준 형태 5' AATAAA-3'에 대한 상동성의 존재에 의해 일반적으로 인지된다. 적합한 3' 비해독 서열의 예는 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토펜 신타제(*ocs*) 유전자 또는 노팔린 신타제(*nos*) 유전자로부터의 폴리아데닐화 신호를 함유하는 3'-전사된 비해독 영역이다(참조: Bevan 등, 1983). 적합한 3' 비해독 서열은 또한 리볼로스-1,5-비스포스페이트 카복실라제(ssRUBISCO) 유전자와 같은 식물 유전자로부터 유래될 수 있지만, 당업자에게 공지된 다른 3' 요소도 사용될 수 있다.

[0409] 전사 개시 부위와 암호화 서열의 개시 사이에 삽입된 DNA 서열, 즉, 해독되지 않은 5' 리더 서열(5'UTR)이 전사될 뿐만 아니라 해독될 경우 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있으므로, 특정 리더 서열을 사용할 수도 있다. 적합한 리더 서열은 외래 또는 내인성 DNA 서열의 최적 발현을 지시하기 위해 선택된 서열을 포함하는 것들을 포함한다. 예를 들어, 이러한 리더 서열은 예를 들어, 문헌(참조: Joshi(1987))에 기재된 바와 같이 mRNA 안정성을 증가시키거나 유지할 수 있고 해독의 부적절한 개시를 방지할 수 있는 바람직한 컨센서스 서열을 포함한다.

[0410] 벡터

[0411] 본 발명은 유전학적 작제물의 조작 또는 전달을 위한 벡터의 사용을 포함한다. "키메라 벡터"는 핵산 분자, 바람직하게는 예를 들어 핵산 서열이 삽입되거나 클로닝될 수 있는 플라스미드 또는 식물 바이러스로부터 유래된

DNA 분자를 의미한다. 벡터는 바람직하게는 이중 가닥 DNA이고 하나 이상의 고유한 제한 부위를 포함하고 표적 세포 또는 조직 또는 이의 전구체 세포 또는 조직을 포함하는 정의된 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있거나 클로닝된 서열이 재생될 수 있도록 한정된 숙주의 계놈으로 통합할 수 있다. 따라서, 벡터는 자율적으로 복제하는 벡터, 즉, 이의 복제가 염색체 복제와는 무관한 염색체의 실체로서 존재하는 벡터, 예를 들어, 선형 또는 폐환 플라스미드, 염색체의 요소, 미니염색체, 또는 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 자가 복제를 보장하기 위한 임의의 수단을 포함할 수 있다. 대안적으로, 벡터는 세포에 도입될 때 수용자 세포의 계놈에 통합되고 이것이 통합된 염색체(들)와 함께 복제되는 것일 수 있다. 벡터 시스템은 단일 벡터 또는 플라스미드, 2개 이상의 벡터 또는 플라스미드를 포함할 수 있고, 이들은 함께 숙주 세포의 계놈에 도입될 전체 DNA 또는 트랜스포존을 포함한다. 벡터의 선택은 전형적으로 벡터가 도입될 세포와 벡터의 호환성에 따라 달라질 것이다. 벡터는 또한 항생제 내성 유전자, 제초제 내성 유전자 또는 적합한 형질전환체의 선택에 사용될 수 있는 다른 유전자와 같은 선택 마커를 포함할 수 있다. 이러한 유전자의 예는 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0412] 본 발명의 핵산 작제물은 플라스미드와 같은 벡터에 도입될 수 있다. 플라스미드 벡터는 전형적으로 원핵 및 진핵 세포에서 발현 카세트의 용이한 선택, 증폭 및 형질전환을 제공하는 추가적인 핵산 서열, 예를 들어 pUC-유래 벡터, pSK-유래 벡터, pGEM-유래 벡터, pSP-유래 벡터, pBS-유래 벡터 또는 하나 이상의 T-DNA 영역을 포함하는 이분 벡터를 포함한다. 추가적인 핵산 서열은 벡터의 자율적 복제를 제공하는 복제 오리진, 바람직하게는 항생제 또는 제초제 내성을 암호화하는 선택가능한 마커 유전자, 핵산 작제물에 암호화된 핵산 서열 또는 유전자를 삽입하기 위한 다중 부위를 제공하는 고유 다중 클로닝 부위, 및 원핵 및 진핵(특히 식물) 세포의 형질전환을 증진시키는 서열을 포함한다.

[0413] "마커 유전자"는 마커 유전자를 발현하는 세포에 명백한 표현형을 부여하여 이러한 형질전환된 세포가 마커를 갖지 않는 세포와 구별되도록 하는 유전자를 의미한다. 선택가능한 마커 유전자는 선택성 제제(예를 들어, 제초제, 항생제, 방사선, 열 또는 형질전환되지 않은 세포에 손상을 주는 기타 치료)에 대한 내성을 기반으로 "선택"할 수 있는 특성을 부여한다. 스크리닝 가능한 마커 유전자(또는 리포터 유전자)는 관찰 또는 시험, 즉 "스크리닝"(예를 들어, β -글루쿠로니다제, 루시페라제, GFP 또는 형질전환되지 않은 세포에는 존재하지 않는 기타 효소 활성)을 통해 동정할 수 있는 특성을 부여한다. 마커 유전자와 관심 대상의 뉴클레오타이드 서열은 연결될 필요가 없다.

[0414] 형질전환체의 동정을 용이하게 하기 위해, 핵산 작제물은 바람직하게는 외래 또는 외인성 폴리뉴클레오타이드로서 또는 그에 더하여 선택가능하거나 스크리닝가능한 마커 유전자를 포함한다. 마커의 실제 선택은 선택한 식물 세포와 조합하여 기능적(즉, 선택적)인 한 중요하지 않다. 예를 들어 US 4,399,216에 기재된 바와 같이 연결되지 않은 유전자의 동시-형질전환이 또한 식물 형질전환에서 효율적인 과정이기 때문에, 마커 유전자 및 외래 또는 외인성의 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 연결될 필요가 없다.

[0415] 세균 선택가능한 마커의 예는 암피실린, 에리트로마이신, 클로람페니콜 또는 테트라사이클린 내성, 바람직하게는 가나마이신 내성과 같은 항생제 내성을 부여하는 마커이다. 식물 형질전환체의 선별을 위한 예시적인 선택가능한 마커는 하이그로마이신 B 내성을 암호화하는 *hyg* 유전자; 가나마이신, 파로모마이신, G418에 대한 내성을 부여하는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(*nptII*) 유전자; 예를 들어, EP 256223에 기재된 바와 같은 글루타티온 유래 제초제에 대한 내성을 부여하는 래트 간으로부터의 글루타티온-S-트랜스퍼라제 유전자; 과발현시, 예를 들어 WO 87/05327에 기재된 바와 같은 포스포노트리신과 같은 글루타민 신테타제 억제제에 대한 내성을 부여하는 글루타민 신테타제 유전자, 예를 들어 EP 275957에 기재된 방다 같이 선택성 제제 포스포노트리신에 대한 내성을 부여하는 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스로부터의 아세틸 트랜스퍼라제 유전자, 예를 들어, 문헌(Hinchee 등 (1988))에 기재된 바와 같이 N-포스포노메틸글라이신에 대한 내성을 부여하는 5'-에놀피루빌시킴이트-3-포스페이트 신타제 (EPSPS)를 암호화하는 유전자, 예를 들어 WO91/02071에 기재된 바와 같은 비알라포스에 대한 내성을 부여하는 *bar* 유전자; 브로목시닐에 대한 내성을 부여하는 클렙시엘라 오자에나에(*Klebsiella ozaenae*)의 *bxn*과 같은 니트릴라제 유전자(참조: Stalker 등, 1988); 메토크세이트에 대한 내성을 부여하는 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자(참조: Thillet 등, 1988); 이미다졸리논, 설포닐우레아 또는 기타 ALS-억제 화합물질에 대한 내성을 부여하는 돌연변이체 아세토크테이트 신타제 유전자(ALS)(EP 154,204); 5-메틸 트립토판에 대한 내성을 부여하는 돌연변이된 안트라닐레이트 신타제 유전자; 또는 제초제에 대한 내성을 부여하는 달라폰 데할로게나제 유전자를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0416] 바람직한 스크리닝가능한 마커는 다양한 발색 기질이 알려져 있는 β -글루쿠로니다제(GUS) 효소를 암호화하는 *uidA* 유전자, 칼슘 민감성 생발광 검출에 사용될 수 있는, 발색 기질이 알려져 있는 효소를 암호화하는 β -갈락토시다제 유전자, 아에쿠오린(aequorin) 유전자(참조: Prasher 등, 1985); 녹색 형광 단백질 유전자(참조:

Niedz 등, 1995) 또는 이의 유도체; 생발광 검출을 가능하게 하는 루시페라제(luc) 유전자(Ow 등, 1986), 및 당 업계에 공지된 다른 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 "리포터 분자"는 이의 화학적 성질에 의해 단백질 생성물을 참조하여 프로모터 활성의 결정을 용이하게 하는 분석적으로 동정가능한 신호를 제공하는 분자를 의미한다.

[0417] 바람직하게는, 핵산 작제물은 예를 들어 본 발명의 식물 또는 세포의 게놈에 안정적으로 혼입된다. 따라서, 핵산은 분자가 게놈에 혼입되도록 하는 적절한 요소를 포함하거나, 작제물은 식물 세포의 염색체에 혼입될 수 있는 적절한 벡터에 위치한다.

[0418] 본 발명의 하나의 구현에는 핵산 분자를 숙주 세포로 전달할 수 있는 임의의 벡터에 삽입된 본 발명의 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는 재조합 벡터를 포함한다. 이러한 벡터는 천연적으로 본 발명의 핵산 분자에 인접하여 발견되지 않고 바람직하게는 핵산 분자(들)가 유래된 종 이외의 종으로부터 유래된 핵산 서열인 이중성 핵산 서열을 포함한다. 벡터는 RNA 또는 DNA, 원핵생물 또는 진핵생물일 수 있고 전형적으로 바이러스 또는 플라스미드이다.

[0419] 식물 세포의 안정한 형질감염 또는 유전자전이 식물의 확립을 위해 적합한 다수의 벡터는 문헌(참조: 예를 들어, Pouwels 등, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987; Weissbach 및 Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; 및 Gelvin 등, Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990)에 기재되었다. 전형적으로, 식물 발현 벡터는 예를 들어 5' 및 3' 조절 서열 및 우성 선택가능한 마커의 전사 제어 하에 하나 이상의 클로닝된 식물 유전자를 포함한다. 이러한 식물 발현 벡터는 또한 프로모터 조절 영역(예를 들어, 유도성 또는 항시성, 환경적 또는 발육적 조절, 또는 세포 또는 조직 특이적 발현을 제어하는 조절 영역), 전사 개시 시작 부위, 리보솜 결합 부위, RNA 처리 신호, 전사 종결 부위 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다.

[0420] mtSSB, TWINKLE 또는 RECA3 폴리펩타이드의 수준은 시리얼 식물에서 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 감소시켜 호분 두께를 증가시킴으로써 조절될 수 있다. 유전자의 발현 수준은 세포당 카피 수를 변경함으로써, 예를 들어 암호화 서열 및 이에 작동 가능하게 결합되고 세포에서 기능적인 전사 제어 요소를 포함하는 합성 유전학적 작제물을 도입함으로써 조절될 수 있다. 다수의 형질전환체를 선택하고 전이유전자 통합 부위 부근의 내인성 서열의 영향으로부터 발생하는 전이유전자 발현의 선호되는 수준 및/또는 특이성을 갖는 형질전환체에 대해 스크리닝할 수 있다. 전이유전자 발현의 선호되는 수준 및 패턴은 호분 두께를 증가시키는 것이다. 대안적으로, 돌연변이 유발된 종자 집단 또는 육종 프로그램으로부터의 식물 집단은 증가된 호분 두께를 갖는 개별 라인에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0421] 재조합체 세포

[0422] 본 발명의 다른 구현에는 돌연변이된 내인성 유전자, 예를 들어 유전자 편집에 의해 변형된 유전자를 포함하는 재조합 세포, 또는 본 발명의 하나 이상의 재조합 분자로 형질전환된 숙주 세포, 또는 이의 자손 세포를 포함한다. 유전자 편집을 포함하는 다양한 유형의 돌연변이유발이 상기에 기재되어 있고 재조합 세포를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 핵산 분자의 세포로의 형질전환은 핵산 분자가 세포에 삽입될 수 있는 임의의 방법에 의해 성취될 수 있다. 형질전환 기술은 형질감염, 전기천공법, 미세주사, 지질감염, 흡착 및 원형질체 용해를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 재조합 세포는 단세포로 남을 수 있거나 조직, 기관 또는 다세포 유기체, 예를 들어 유전자전이 식물로 성장할 수 있다. 본 발명의 형질전환된 핵산 분자는 염색체외에 남을 수 있거나 발현 능력이 유지되는 방식으로 형질전환된 세포의 염색체 내의 하나 이상의 부위로 통합될 수 있다. 바람직한 숙주 세포는 식물 세포, 보다 바람직하게는 시리얼 그레인 세포이다.

[0423] 유전학적 변형을 갖는 식물

[0424] 여기에서 명사로 사용되는 "식물"이라는 용어는 전체 식물을 의미하고 식물계(Plantae Kingdom)의 모든 구성원을 지칭하지만, 형용사로 사용되는 용어는 식물, 예를 들어, 식물 기관(예를 들어, 잎, 줄기, 뿌리, 꽃), 단일 세포(예를 들어, 꽃가루), 종자, 식물 세포 등에 존재하거나, 이로부터 유래하거나 이와 관련된 임의의 물질을 지칭한다. 뿌리와 싹이 출현하는 묘목과 발아 종자도 "식물"의 의미에 포함된다. 본원에서 사용되는 용어 "식물 부분"은 식물로부터 수득되고 식물의 게놈 DNA를 포함하는 하나 이상의 식물 조직 또는 기관을 지칭한다. 식물 부분은 식물 구조(예를 들어, 잎, 줄기), 뿌리, 꽃 기관/구조, 종자(배아, 자엽 및 종피 포함), 식물 조직(예를 들어, 혈관 조직, 지상 조직 등), 세포 및 이의 자손을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "식물 세포"는 식물로부터 또는 식물에서 수득된 세포를 지칭하며, 원형질체 또는 식물로부터 유래된 다른 세포, 생식세포-생산 세

포 및 전체 식물로 재생되는 세포를 지칭한다. 식물 세포는 배양 중인 세포, 즉 시험관 내 세포일 수 있다. "식물 조직"은 식물의 분화된 조직 또는 식물로부터 수득된("외식편") 또는 미성숙 또는 성숙한 배아, 종자, 뿌리, 싹, 과일, 덩이줄기, 꽃가루 및 캘러스와 같은 배양 중인 식물 세포의 다양한 형태의 집합체로부터 유래된 미분화 조직을 의미한다. 종자 내 또는 종자로부터의 예시적인 식물 조직은 자엽, 배아 및 배축, 또는 배반, 배유 또는 호분이다. 따라서 본 발명은 식물 및 식물 부분 및 이들을 포함하는 생성물을 포함한다.

[0425] 용어 "그레인" 및 "종자"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. "그레인"은 문맥에 따라 식물의 성숙한 그레인, 식물의 종자 발달, 수확된 그레인 또는 예를 들어 대부분의 그레인이 온전한 상태로 유지되는 분쇄 또는 연마와 같은 가공 후 또는 흡수 또는 발아 후 그레인을 지칭할 수 있다. 성숙한 그레인은 일반적으로 약 18-20% 미만, 전형적으로 약 8-12 중량%의 수분 함량을 갖는다. 일 구현예에서, 본 발명의 발육 중인 그레인은 수분 후 적어도 약 10일(DAP)이다. 일 구현예에서, 본 발명의 발육 종자는 수분 시점과 수분 후 30일 사이의 종자이고, 이는 식물에 포함될 수 있거나 절제될 수 있다.

[0426] 본원에 사용된 "유전자전이 식물"은 동일한 종, 품종 또는 재배종의 야생형 식물에서 발견되지 않는 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오타이드(들)를 포함하는 본원에 정의된 바와 같은 하나 이상의 유전학적 변이를 갖는 식물을 지칭한다. 즉, 유전자전이 식물(형질전환된 식물)은 형질전환 이전에 포함하지 않았던 유전학적 물질(전이유전자)을 포함한다. 전이유전자는 식물 세포, 또는 다른 식물 세포, 또는 비-식물 공급원, 또는 합성 서열로부터 수득되거나 유래된 유전학적 서열을 포함할 수 있다. 전형적으로, 전이유전자는 예를 들어 형질전환과 같은 사람 조작에 의해 식물에 도입되었지만 당업자가 인지하는 바와 같이 임의의 방법이 사용될 수 있다. 전이유전자는 바람직하게는 식물의 핵 게놈으로 안정적으로 통합된다. 전이유전자는 동일한 종에서 천연적으로 존재하지만 재배열된 순서로 또는 예를 들어 안티센스 서열과 같은 요소의 상이한 배열로 존재하는 서열을 포함할 수 있다. 상기 서열을 포함하는 식물은 본원에서 "유전자전이 식물"에 포함된다.

[0427] "비-유전자전이 식물"은 재조합 DNA 기술에 의한 유전학적 물질의 도입에 의해 유전학적으로 변형되지 않은 식물이다.

[0428] 본원에서 사용되는 "야생형"은 본 발명에 따라 변형되지 않은 세포, 폴리펩타이드, 유전자, 조직, 그레인 또는 식물을 지칭한다. 야생형 세포, 조직 또는 식물은 내인성 유전자의 발현 수준, 본 발명의 폴리펩타이드 또는 다른 폴리펩타이드의 양, 외인성 핵산 또는 형질 변형의 정도 및 성질을 본원에 기재된 바와 같이 변형된 세포, 조직, 그레인 또는 식물, 특히 호분 두께의 표현형을 비교하기 위한 대조군으로서 사용될 수 있다.

[0429] 본원에서 사용되는 용어 "상응하는 야생형" 그레인 식물 또는 그레인, 또는 유사한 어구는 본 발명의 시리얼 식물 또는 그레인의 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 97%, 보다 바람직하게는 적어도 99%, 보다 더 바람직하게는 99.5%의 유전자형을 포함하지만, 각각 식물 또는 그레인 및/또는 두꺼워진 호분에서 폴리펩타이드의 활성을 감소시키는 유전학적 변이(들)(예를 들어, 도입된 돌연변이(들))를 포함하지 않는 시리얼 식물 또는 그레인을 지칭한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 시리얼 그레인 또는 식물은 하나 이상의 유전학적 변이(도입된 돌연변이와 같은) 이외에 상대적 동질의 그레인 또는 식물이다. 바람직하게는, 상응하는 야생형 식물 또는 그레인은 본 발명의 식물/그레인의 전구체와 동일한 재배종 또는 품종, 또는 하나 이상의 유전학적 변형이 결여되고/되거나 흔히 "분리개체"로 지칭되는 두꺼워진 호분을 갖지 않는 자매 식물 계통이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 벼 식물 또는 그레인은 야생형 벼 재배종 Zhonghua 11(ZH11)의 유전자형과 50% 미만 동일한 유전자형을 갖는다. ZH11은 1986년 이후 상업적으로 가용하였다.

[0430] 본 발명의 맥락에서 정의된 유전자전이 식물은 본 발명에 따라 유전학적으로 변형된 시리얼 식물의 자손을 포함하고, 여기서 자손은 유전학적 변이(들), 예를 들어 관심 대상의 돌연변이(들) 또는 전이유전자를 포함한다. 이러한 자손은 1차 유전자전이 식물의 자가 수정 또는 이러한 식물을 다른 시리얼 식물과 교배하여 수득될 수 있다. 이것은 일반적으로 목적하는 식물 또는 이의 그레인에서 본원에 정의된 적어도 하나의 단백질의 생성을 조절하는 것일 것이다. 유전자전이 식물 부분은 예를 들어 배양된 조직, 캘러스 및 원형질체, 바람직하게는 그레인과 같은 전이유전자를 포함하는 상기 식물의 모든 부분 및 세포를 포함한다.

[0431] 본원에서 사용되는 "시리얼"은 그레인의 식용 성분을 위해 재배되는 일반적으로 목초라고 하는 벼과(Poaceae)의 임의의 식물을 지칭한다. 따라서 시리얼은 단자엽 개화 식물의 한 과이다. 본 발명의 시리얼 식물/그레인의 예는 벼, 밀, 보리, 호밀, 옥수수, 수수, 귀리 및 라이미를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0432] 본원에서 사용되는 용어 "벼"는 그레인의 식용 성분을 위해 재배되는 오리자(Oryza) 속의 식물의 계통(strain), 변종 또는 재배종을 포함하는 식물 또는 이의 일부를 지칭한다. 벼 식물은 오리자 사티바(Oryza

sativa) 종인 것이 바람직하다.

- [0433] 본원에 사용된 바와 같이, "현미"는 겨 층 및 배아(삭)를 포함하지만 보통 수확 동안 제거된 겉질이 아닌 벼의 전체 그레인을 의미한다. 즉, 현미는 호분과 배아를 제거하기 위해 정미되지 않았다. "갈색"은 겨 층에 갈색 또는 황갈색 안료가 있음을 지칭한다. 현미는 통그레인(wholegrain)으로 간주된다. 본원에서 사용된 "백미"(제분된 벼)는 겨 및 삭이 제거된 벼 그레인, 즉 필수적으로 전체 벼 그레인의 남아있는 전분성 배유를 의미한다. 이들 부류의 벼 그레인 둘 다는 짧은 그레인, 중간 그레인 또는 긴 그레인 형태로 올 수 있다. 현미는 백미에 비해 단백질, 미네랄, 비타민 함량이 보다 높고 단백질 함량 중 라이신 함량이 보다 높다.
- [0434] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "밀"은 이의 전구체 뿐만 아니라 다른 종과 교배함에 의해 생성된 이의 자손을 포함하여 그레인의 식용 성분을 위해 재배되는 트리티쿰(*Triticum*) 속의 계통, 변종 또는 재배종을 포함하는 임의의 식물 또는 이의 부분을 지칭한다. 밀은 42개의 염색체로 구성된 AABB의 계놈 구성을 갖는 "6배체 밀"과 28개의 염색체로 구성된 AABB의 계놈 구성을 갖는 "4배체 밀"을 포함한다. 6배체 밀은 티. 아에스티쿰(*T. aestivum*), 티. 스펠타(*T. spelta*), 티. 마카(*T. macha*), 티. 콤팩툼(*T. compactum*), 티. 스파에로코쿰(*T. sphaerococcum*), 티. 바빌로비(*T. vavilovii*) 및 이들의 중간 교배를 포함한다. 6배체 밀의 바람직한 종은 티. 아에스티쿰 아종 아에스티쿰(또한 "빵밀(breadwheat)"로 호칭됨)이다. 4배체 밀은 티. 두룸(*T. durum*)(또한 본원에서 두룸 밀 또는 트리티쿰 투르기둠 아종 두룸(*Triticum turgidum* ssp. *durum*)으로 언급됨), 티. 디코코이데스(*T. dicoccoides*), 티. 디코쿰(*T. dicoccum*), 티. 폴로니쿰(*T. polonicum*), 및 이의 상호 교배종을 포함한다. 추가로, 용어 "밀"은 6배체 또는 4배체 트리티쿰 종(*Triticum* sp.)의 잠재적 전구체, 예를 들어, A 계놈에 대해 티. 우아르투(*T. uartu*), 티. 모노코쿰(*T. monococcum*) 또는 티. 보에오티쿰(*T. boeoticum*), B 계놈에 대해 아에길로프스 스펠토이데스(*Aegilops speltoides*), 및 D 계놈에 대해 티. 타우시(*T. tauschii*)(또한, 아에길로프스(*Aegilops squarrosa*) 또는 아에길로프스 타우시(*Aegilops tauschii*))를 포함한다. 특히 바람직한 전구체는 A 계놈에 대한 것들이고, 보다 더 바람직하게 A 계놈 전구체는 티. 모노코쿰(*T. monococcum*)이다. 본 발명에서 사용하기 위한 밀 재배종은 상기 열거된 임의의 종에 속할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 또한 트리티칼레(*Triticale*)를 포함하지만 이에 국한되지 않는 비-트리티쿰(*Triticum*) 종(예를 들어, 호밀[세칼레 세레알레(*Secale seriale*)]과의 유성 교배에서 모체로서 트리티쿰 종(*Triticum* sp.)을 사용하는 통상적인 기술에 의해 생산되는 식물이 포함된다.
- [0435] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "보리"는 이의 전구체 뿐만 아니라 다른 종과 교배함에 의해 생성된 이의 자손을 포함하여 그레인의 식용 성분을 위해 재배되는 호르테움(*Hordeum*) 속의 계통, 변종 또는 재배종을 포함하는 임의의 식물 또는 이의 부분을 지칭한다. 식물은 호르테움 불가레(*Hordeum vulgare*) 종인 것이 바람직하다.
- [0436] 본원에서 사용되는 "착색된"은 비정형 색상을 포함하는 그레인을 지칭한다. 이의 예는 흑미, 적미, 붉은 밀, 자주색 벼, 자주색 보리 및 자주색 옥수수를 포함한다. 흑미와 적미는 각각 호분층에 색소, 특히 안토시아닌과 안토시아닌을 함유하고 있다. 착색된 벼는 비-착색된 벼 보다 높은 리보플라빈 함량을 갖지만 티아민 함량은 유사하다. "흑미"는 안토시아닌의 농도로 인해 검정 또는 거의 검정 착색된 겨 층을 갖고 조리시 진한 자주색으로 변할 수 있다. "자도(urple rice)" (또한 "금단의 벼"로서 공지된)는 흑미의 짧은 그레인 변이체이고 본원에 정의된 바와 같이 흑미에 포함된다. 조리되지 않은 상태에서는 자주색이고 조리될때는 진한 자주색이다. "적미"는 시아닌-3-글루코시드(크리산테닌) 및 페오니-3-글루코시드(옥시코씨시-아닌)를 포함하여, 겨에게 적색/적갈색을 부여하는 다양한 안토시아닌을 함유한다.
- [0437] 이들 유형의 각각의 시리얼 그레인은 예를 들어, 조리(비등)함에 의해 또는 건조 가열(구운)에 의해 발아를 방지하기 위해 처리될 수 있다. 예를 들어, 현미와 착색된 벼는 목적하는 질감에 따라 전형적으로 10-40분 동안 조리되는 반면 백미는 일반적으로 12-18분 동안 조리된다. 조리 또는 가열은 트립신 억제제, 오리자시스타틴 및 해마글루티닌(렉틴)과 같은 그레인에 항영양 인자 수준을 이러한 단백질의 변성에 의해 감소시키지만 피테이트 함량은 감소시키지 않는다. 시리얼 그레인은 또한 요리하기 전에 물에 담가두거나 당업계에 알려진 바와 같이 더 오랜 시간 동안 천천히 조리할 수 있다. 시리얼 그레인은 또한 갈라지거나, 반숙되거나, 열 안정화될 수 있다. 이러한 형태의 각각의 시리얼 그레인은 발아할 수 없고 생존 가능한 식물을 생성하는 데 사용할 수 없는 가공된 그레인 부류에 포함된다. 겨는 예를 들어, 100℃에서 약 6분 동안 이를 안정화시키기 위해 처리된 증기일 수 있다.
- [0438] 일 구현예에서, 본 발명의 그레인은 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교하는 경우 지연된 그레인 성숙화를 갖는다. 본 발명의 식물은 야생형 식물에 비해 감소된 종자 세팅 속도(%)를 가질 수 있고, 이는 성장의 성숙한

그레인 단계에서 종자에 의해 채워진 식물의 꽃 부분의 퍼센트 계산을 수반한다.

- [0439] 일 구현예에서, 본 발명의 그레인은 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교하는 경우 감소된 발아 능력을 갖는다. 예를 들어, 그레인은 성장 챔버에서 습도 조절 없이 12시간 명/12시간 암주기 하에 28℃에서 배양될 때 상응하는 야생형 시리얼 그레인의 발아 능력의 약 50%를 갖는다. 본원에서 사용되는 용어 "발아"는 소근이 종피를 통해 가시적으로 출현할 때로 정의된다.
- [0440] 일 구현예에서, 본 발명의 식물은 야생형 모체 품종에 비해 정상 식물 높이, 생식력 (암수(male and female)), 종자 길이, 종자 너비 및 종자 두께 중 하나 이상 또는 모두를 갖고, 예를 들어, 서열번호 3에 제공된 아미노산의 서열을 갖는 OsmtSSB-1a 폴리펩타이드를 포함하는 동종원성 식물이다. 일 구현예에서, 본 발명의 그레인은 하기 중 하나 이상 또는 모두를 갖는 시리얼 식물을 생성할 수 있다: 야생형 모체 품종에 비해 정상 식물 높이, 생식력(암수), 종자 길이, 종자 너비 및 종자 두께. 본원에서 사용되는 용어 "정상"은 본 발명의 식물과 동일한 조건 하에서 성장한 야생형 모체 품종에서 동일한 형질을 측정함으로써 결정될 수 있다. 일 구현예에서, 정상적으로 본 발명의 식물은 야생형 모체 품종과 비교할 때 한정된 특성의 +/- 20%, 보다 바람직하게는 +/- 10%, 보다 바람직하게는 +/- 5%, 보다 더 바람직하게는 +/- 2.5%의 수준/수 등을 갖는다.
- [0441] 본 발명의 맥락에서 정의된 바와 같은 유전자전이 식물은 재조합 기술을 사용하여 유전학적으로 변형되어 목적하는 식물 또는 식물 기관에서 본 발명의 적어도 하나의 폴리펩타이드의 생성이 유발된 식물(상기 식물의 부분 및 세포) 및 이들의 자손을 포함한다. 유전자전이 식물은 일반적으로 문헌(참조: A. Slater 등, Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003), 및 P. Christou 및 H. Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley 및 Sons (2004))에 기재된 것들과 같이 당업계에 공지된 기술을 사용하여 생성될 수 있다.
- [0442] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 식물은 각각의 및 모든 유전학적 변이, 도입된 유전자 또는 핵산 작제물(전이 유전자) 또는 돌연변이(들)에 대해 동형접합성이어서 이들의 자손이 목적하는 표현형에 대해 분리되지 않는다. 유전자전이 식물은 또한 예를 들어 하이브리드 종자로부터 성장된 F1 자손에서와 같이 도입된 유전학적 변이, 유전자 또는 핵산 작제물에 대해 이형접합성일 수 있다. 이러한 식물은 당업계에 잘 알려진 하이브리드 활력과 같은 이점을 제공할 수 있다.
- [0443] 하나의 구현예에서, 본 발명의 식물을 선택하는 방법은 적어도 하나의 "다른 유전학적 마커"에 대해 식물로부터의 DNA 샘플을 분석하는 것을 추가로 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "다른 유전학적 마커"는 식물의 원하는 특성에 연결된 임의의 분자일 수 있다. 이러한 마커는 당업자에게 널리 공지되어 있고, 질환 내성, 수확량, 식물 형태, 그레인 품질, 휴면 특성, 그레인 색상, 종자의 지베렐린산 함량, 식물 높이, 가루 색상과 같은 특성을 결정하는 유전자에 연결된 분자 마커를 포함한다. 이러한 유전자의 예는 반왜성 성장 습성을 결정함에 따라서 내도복성(lodging resistance)을 결정하는 *Rht* 유전자이다.
- [0444] 유전자의 세포로의 직접적인 전달을 위한 4개의 일반 방법이 기재되었다: (1) 화학적 방법(참조: Graham 등, 1973); (2) 미세주사와 같은 물리적 방법(참조: Capecchi, 1980); 전기천공 (참조: 예를 들어, WO 87/06614, US 5,472,869, 5,384,253, WO 92/09696 및 WO 93/21335); 및 유전자 총 (참조: 예를 들어, US 4,945,050 및 US 5,141,131); (3) 바이러스 벡터(참조: Clapp, 1993; Lu 등, 1993; Eglitis 등, 1988); 및 (4) 수용체 매개 기전(참조: Curriel 등, 1992; Wagner 등, 1992).
- [0445] 사용될 수 있는 가속화 방법은 예를 들어 미세발사체 폭격(microprojectile bombardment) 등을 포함한다. 형질 전환 핵산 분자를 식물 세포로 전달하는 방법의 한 예는 미세발사체 폭격(microprojectile bombardment)이다. 상기 방법은 문헌(참조: Yang 등, Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994))에 의해 검토되었다. 핵산으로 코팅되어 추진력에 의해 세포로 전달될 수 있는 비생물학적 입자(미세발사체). 예시적인 입자는 텅스텐, 금, 백금 등으로 구성된 것들을 포함한다. 미세발사체 폭격의 특정 장점은 단자엽을 생식적으로 형질전환시키는 효과적인 수단일 뿐만 아니라 원형질체의 단리 또는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 감염의 감수성이 요구되지 않는다는 것이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 입자 전달 시스템은 제조사(Bio-Rad Laboratories)로부터 가용한 헬륨 가속화 PDS-1000/He 총이다. 포격을 위해, 미성숙 배아 또는 미성숙 배아로부터 유래된 배반 또는 캘러스와 같은 유래 표적 세포를 고체 배양 배지에 배열할 수 있다.
- [0446] 또 다른 대안적 구현예에서, 색소체는 안정적으로 형질전환될 수 있다. 고등 식물에서 색소체 형질전환을 위해 기재된 방법은 선택가능한 마커를 포함하는 DNA의 입자 총 전달 및 상동 재조합을 통한 색소체 게놈으로의 DNA

의 표적화를 포함한다(참조: US 5, 451,513, US 5,545,818, US 5,877,402, US 5,932479, 및 WO 99/05265).

- [0447] 아그로박테리움 매개 전달은 DNA가 전체 식물 조직에 도입될 수 있기 때문에 유전자를 식물 세포에 도입하는 데 널리 적용 가능한 시스템으로 원형질체에서 온전한 식물을 재생해야 할 필요성을 우회한다. DNA를 식물 세포에 도입하기 위한 아그로박테리움-매개 식물 통합 벡터의 사용은 당업계에 널리 알려져 있다(참조: 예를 들어, US 5,177,010, US 5,104,310, US 5,004,863, US 5,159,135). 추가로, T-DNA의 통합은 재배열이 거의 발생하지 않는 비교적 정밀한 과정이다. 전달될 DNA 영역은 경계 서열에 의해 정의되고, 개입 DNA는 일반적으로 식물 게놈에 삽입된다.
- [0448] 아그로박테리움 형질전환 방법을 사용하여 형성된 유전자전이 식물은 전형적으로 하나의 염색체상에 단일 유전학적 유전자좌를 포함한다. 상기 유전자전이 식물은 부가된 유전자에 동형접합성인 것으로서 지칭될 수 있다. 부가된 구조 유전자에 대해 동형접합성인 유전자전이 식물; 즉, 2개의 부가된 유전자, 염색체 쌍의 각 염색체 상의 동일한 유전자좌에 하나의 유전자를 포함하는 유전자전이 식물이 보다 바람직하다. 동형접합성 유전자전이 식물은 단일 부가된 유전자를 포함하는 독립적인 분리형 유전자전이 식물을 유성 교배(자가생식(selfing))하고 생성된 일부 종자를 발아시키고 관심 대상의 유전자에 대해 생성된 식물을 분석함으로써 수득될 수 있다.
- [0449] 다른 세포 형질전환 방법도 사용될 수 있고, 꽃가루로의 DNA 직접 전달에 의해, 식물의 생식 기관으로의 DNA 직접 주입에 의해, 미성숙 배아 세포로의 DNA 직접 주입에 이어서 건조된 배아의 재수화에 의한 식물로의 DNA 도입을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0450] 단일 식물 원형질체 형질전환체 또는 다양한 형질전환된 외식편으로부터의 식물의 재생, 발육 및 재배는 당업계에 잘 알려져 있다(참조: Weissbach 등, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, (1988)). 이러한 재생 및 성장 과정은 전형적으로 형질전환된 세포의 선택 단계, 뿌리내린 묘목 단계를 통한 일반적인 배아 발육 단계를 통해 개별화된 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 유전자전이 배아 및 종자는 유사하게 재생한다. 생성된 유전자전이 뿌리가 있는 새싹을 그 후 토양과 같은 적절한 식물 성장 배지에 심는다.
- [0451] 외래의 외인성 유전자를 함유하는 식물의 발육 또는 재생은 당업계에 잘 알려져 있다. 바람직하게는, 재생된 식물은 자가수분되어 동형접합 유전자전이 식물을 제공한다. 그렇지 않으면 재생된 식물에서 얻은 꽃가루는 농경학적으로 중요한 계열의 종자 성장 식물과 교배된다. 반대로, 이러한 중요한 계열의 식물에서 나온 꽃가루는 재생된 식물을 수분하는 데 사용된다. 목적하는 외인성 핵산을 함유하는 본 발명의 유전자전이 식물은 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용하여 재배된다.
- [0452] 유전자전이 세포 및 식물에서 전이유전자의 존재를 확인하기 위해, 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 증폭 또는 서던 블롯 분석을 수행할 수 있다. 전이유전자의 발현 생성물은 생성물의 특성에 따라 다양한 방법으로 검출할 수 있고 웨스턴 블롯 및 효소 검정을 포함한다. 단백질 발현을 정량화하고 다른 식물 조직에서 복제를 검출하는 특히 유용한 방법 중 하나는 GUS와 같은 리포터 유전자를 사용하는 것이다. 유전자전이 식물이 수득되면, 목적하는 표현형을 갖는 식물 조직 또는 부분을 생성하기 위해 성장시킬 수 있다. 식물 조직 또는 식물 부분을 수확하고/하거나 종자를 수집할 수 있다. 종자는 목적하는 특징을 갖는 조직 또는 부분을 갖는 추가 식물을 성장시키기 위한 공급원으로서 작용할 수 있다.
- [0453] 마커 지원 선택
- [0454] 마커 지원 선택은 고전적 육종 프로그램에서 회귀성 모체와 역교배할 때 필요한 이형접합 식물을 선택하는 잘 알려진 방법이다. 각 역교배 세대의 식물 집단은 역교배 집단에서 일반적으로 1:1 비율로 존재하는 관심 대상의 유전자에 대해 이형접합성일 것이고, 분자 마커는 유전자의 2개 대립유전자를 구별하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 어린 새싹에서 DNA를 추출하고 이입된 바람직한 형질에 대한 특정 마커로 시험함으로써 에너지와 자원이 적은 수의 식물에 집중되는 동안 추가 역교배를 위한 식물의 조기 선택이 수행된다. 역교배 프로그램의 속도를 더욱 높이기 위해 미성숙 종자의 배아(개화 후 25일)를 잘라내고 완전한 종자 성숙을 허용하는 대신 무균 조건에서 영양 배지에서 성장시킬 수 있다. 3개의 잎 계에서의 DNA 추출 및 mtSSB, TWINKLE 또는 RECA3 활성을 변경하고 식물에 증가된 호분 두께를 부여하는 적어도 하나의 유전학적 변이 분석과 함께 사용되는 "배아 구조"라고 하는 상기 공정은 목적하는 형질을 갖는 식물의 신속한 선택을 가능하게 하고 이는 회귀성 모체에 대한 후속 추가 역교배를 위해 온실 또는 야외에서 성숙할 때까지 양육될 수 있다.
- [0455] 당업계에 공지된 임의의 분자 생물학적 기술이 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 이러한 방법에는 핵산 증폭, 핵산 서열분석, 적합하게 표지된 프로브를 사용한 핵산 하이브리드화, 단일 가닥 형태 분석(SSCA), 변성 농도구배 겔 전기영동(DGGE), 헤테로듀플렉스 분석(HET), 화학적 절단 분석(CCM), 촉매 핵산 절단 또는 이들의 조합의

사용을 포함하지만 이에 제한되지 않는다(참조: 예를 들어, Lemieux, 2000; Langridge 등, 2001). 본 발명은 또한 각각 mtSSB, TWINKLE 또는 RECA3 활성을 변경하고 식물에 증가된 호분 두께를 부여하는 (예를 들어) mtSSB, TWINKLE 또는 RECA3 유전자의 대립유전자에 연결된 다형성을 검출하기 위한 분자 마커 기술의 사용을 포함한다. 상기 방법은 제한 단편 길이 다형성(RFLP), RAPD, 증폭 단편 길이 다형성(AFLP) 및 미소부수체(단순 서열 반복, SSR) 다형성의 검출 또는 분석을 포함한다. 밀접하게 연계된 마커는 문헌(참조: Langridge 등 (2001))에 의해 검토된 바와 같이 별킹 분리개체 분석과 같은 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 용이하게 획득될 수 있다.

[0456] 하나의 구현예에서, 마커 지원 선택을 위한 연계된 유전자좌는 본 발명의 폴리캡타이드를 암호화하는 유전자로부터 적어도 1 cM, 또는 0.5 cM, 또는 0.1 cM, 또는 0.01 cM 내에 있다.

[0457] "폴리머라제 연쇄 반응"(PCR)은 "업스트림" 및 "다운스트림" 프라이머 및 DNA 폴리머라제 및 전형적으로 열적으로 안정한 폴리머라제 효소와 같은 중합 촉매로 이루어진 "프라이머 쌍" 또는 "프라이머 세트"를 사용하여 표적 폴리뉴클레오타이드의 복제 카피물이 구성되는 반응이다. PCR을 위한 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌("PCR" (M.J. McPherson 및 S.G. Moller (editors), BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, (2000))에 교시되어 있다. PCR은 mtSSB, TWINKLE 또는 RECA3 유전자 또는 대립유전자를 발현하는 식물 세포로부터 단리된 역전사 mRNA로부터 획득된 cDNA에서 수행할 수 있고, 이는 식물에서 호분 두께를 증가시켰다. 그러나, 이것은 일반적으로 PCR이 식물로부터 단리된 게놈 DNA에 대해 수행되는 경우 보다 용이해진다.

[0458] 프라이머는 표적 서열에 대해 서열 특이적 방식으로 하이브리드화할 수 있고 PCR 동안 연장될 수 있는 올리고뉴클레오타이드 서열이다. 앰플리콘 또는 PCR 생성물 또는 PCR 단편 또는 증폭 생성물은 표적 서열의 프라이머 및 새로 합성된 카피물을 포함하는 연장 생성물이다. 멀티플렉스 PCR 시스템은 하나 초과인 앰플리콘을 동시에 생산하는 여러 프라이머 세트를 포함한다. 프라이머는 표적 서열과 완벽하게 매칭될 수 있거나 이들은 특정 표적 서열에서 제한 효소 또는 촉매 핵산 인지/절단 부위를 도입할 수 있는 내부 미스매칭된 염기를 포함할 수 있다. 프라이머는 또한 추가 서열을 포함할 수 있고/있거나 앰플리콘의 포획 또는 검출을 용이하게 하기 위해 변형되거나 표지된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. DNA의 열 변성, 상보적 서열로의 프라이머의 어닐링 및 폴리머라제에 의한 어닐링된 프라이머의 연장의 반복된 사이클은 표적 서열의 기하급수적 증폭을 초래한다. 표적 또는 표적 서열 또는 주형이라는 용어는 증폭되는 핵산 서열을 지칭한다.

[0459] 뉴클레오타이드 서열의 직접 서열분석 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌(참조: Ausubel 등, (상기) 및 Sambrook 등, (상기))에서 찾을 수 있다. 서열분석은 임의의 적합한 방법, 예를 들어 디테옥시 서열분석, 화학적 서열분석 또는 이의 변형에 의해 수행될 수 있다. 직접적인 서열분석은 특정 서열의 염기쌍에서 변이를 결정하는 이점을 갖는다.

[0460] 그레인 가공

[0461] 농축된 호분으로 인해, 본 발명의 시리얼 그레인, 및 이로부터의 밀가루 및 겨는 개선된 영양 함량을 갖는다. 단리된 호분 조직은 낮은 수준의 전분과 과피를 포함해야 하고, 사람 영양을 위한 그레인의 생리학적으로 이로운 물질의 주요 부분을 나타낸다. 예를 들어, 본 발명의 그레인 및/또는 이로부터 생성된 밀가루는 상응하는 야생형 시리얼 그레인 및/또는 이로부터 생성된 밀가루와 비교할 때 각각 중량 기준으로 다음 중 하나 이상 또는 모두를 포함한다.

[0462] i) 야생형보다 적어도 약 10%, 적어도 약 20% 또는 적어도 약 30%, 또는 약 30%, 최대 약 50% 더 높은 지방 함량,

[0463] ii) 야생형보다 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15% 또는 적어도 약 20%, 또는 약 20%, 최대 약 25% 더 높은 회분 함량,

[0464] iii) 야생형보다 적어도 약 70%, 적어도 약 80% 또는 적어도 약 94%, 또는 약 94%, 최대 약 150% 더 높은 섬유 함량,

[0465] iv) 상응하는 야생형 시리얼 그레인의 전분 함량에 비해 약 1중량% 내지 약 10중량% 감소된 것과 같은 더 낮은 전분 함량,

[0466] v) 야생형보다 약 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20% 또는 적어도 약 25% 이상 내지 최대 약 40%와 같이 더 높은 미네랄 함량, 바람직하게 미네랄 함량은 하나 이상의 또는 모든 아연 함량(예를 들어, 야생형보다 적어도 약 10% 또는 적어도 약 15% 이상 내지 최대 약 30% 더 높음), 철(예를 들어, 야생형 보다 적어도 약 2.5% 또는

적어도 약 5% 이상 내지 최대 약 10% 더 높음), 칼륨(예를 들어, 야생형보다 적어도 약 20% 또는 적어도 약 25% 이상 내지 최대 약 40% 더 높음), 마그네슘(예를 들어, 야생형보다 적어도 약 18% 또는 적어도 약 23% 이상 내지 최대 약 40% 더 높음), 인(예를 들어, 야생형 보다 적어도 약 17% 또는 적어도 약 22% 이상 내지 최대 약 40% 더 높음,) 및 황(예를 들어, 야생형보다 적어도 약 5% 또는 적어도 약 10% 이상 내지 최대 약 20% 더 높음),

- [0467] vi) 야생형 보다 적어도 약 20%, 적어도 약 25% 또는 적어도 약 30% 더 높은 총 페놀 화합물, 및/또는 적어도 약 35% 또는 적어도 약 46%, 더 많은 항산화제 용량 내지 최대 약 60% 더 높은 항산화제 함량,
- [0468] vii) 야생형보다 적어도 약 10% 또는 적어도 약 15% 이상 내지 최대 약 25% 더 높은 피테이트 함량,
- [0469] viii) 하나 이상 또는 모든 비타민 B3(예를 들어, 적어도 5% 또는 적어도 9%), B6(예를 들어, 야생형 보다 적어도 100% 또는 적어도 120% 내지 최대 약 200% 더 높음) 및 B9(예를 들어, 야생형보다 적어도 50% 또는 적어도 61% 내지 최대 약 100% 더 높음),
- [0470] ix) 야생형보다 적어도 약 60% 또는 적어도 약 76% 내지 최대 약 100% 더 높은 슈크로스 함량,
- [0471] x) 야생형보다 적어도 약 38% 또는 적어도 약 48% 이상 내지 최대 약 80% 더 높은 중성 비-전분 폴리사카라이드 함량,
- [0472] xi) 야생형보다 적어도 약 42% 또는 적어도 약 59% 이상 내지 최대 약 100% 더 높은 모노사카라이드 함량(예를 들어, 아라비노스, 자일로스, 갈락토스, 글루코스 함량), 및
- [0473] xii) 유사한 질소 수준.
- [0474] 그레인의 이들 각 영양 성분은 실시예 1 및 4에 요약된 것과 같은 통상적인 기술을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0475] 일 구현예에서, 그레인은 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교하여 총 전분 함량에서 증가된 비율의 아밀로스를 포함한다. 상기 그레인을 제조하는 방법은 예를 들어, W02002/037955, W02003/094600, W02005/040381, W02005/001098, W02011/011833 및 W02012/103594에 기재되어 있다.
- [0476] 일 구현예에서, 본 발명의 그레인은 상응하는 야생형 시리얼 그레인과 비교하여 이의 총 지방산 함량에서 증가된 비율의 올레산 및/또는 감소된 비율의 팔미트산을 포함한다. 상기 그레인을 생성하는 방법은 예를 들어, W02008/006171 및 W02013/159149에 기재되어 있다.
- [0477] 추가의 구현예에서, 본 발명의 그레인 또는 식물은 추가로 ROS1a 폴리펩타이드를 암호화하는 *ROS1a* 유전자 및 상응하는 야생형 식물과 비교하는 경우 식물에서 적어도 하나의 *ROS1a* 유전자의 활성을 각각 감소시키는 하나 이상의 유전학적 변이체를 추가로 포함한다. 상기 그레인 및 식물은 W02017/083920에 기재되어 있다. 바람직하게, 상기 그레인 또는 식물은 각각 벼 그레인 또는 벼 식물이다.
- [0478] 본 발명의 그레인/종자 또는 본 발명의 다른 식물 부분은 가공되어 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여 식품 성분, 식품 또는 비식품 생성물을 생산할 수 있다.
- [0479] 본원에서 사용되는 용어 "다른 식품 또는 음료 성분"은 식품 또는 음료의 일부로 제공될 때 동물이 소비하기에 적합한 임의의 물질, 바람직하게는 사람이 소비하기에 적합한 임의의 물질을 지칭한다. 이의 예는 다른 식물 종기원의 그레인, 슈가 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않지만 물은 제외된다.
- [0480] 하나의 구현예에서, 생성물은 예를 들어 초미세-제분된 그레인 가루 또는 약 100%의 그레인으로 만들어진 가루와 같은 전체 그레인 가루이다. 전체 그레인 가루는 정제 가루 성분(정제 가루 또는 정제 가루)과 조립분(초미세 분쇄된 조립분)을 포함한다.
- [0481] 정제된 가루는 예를 들어 세정된 그레인을 분쇄하고 볼팅(bolting)함에 의해 제조된 가루일 수 있다. 정제 가루의 입자 크기는 98% 이상이 "212 마이크로미터(U.S. Wire 70)"로 지정된 직조 와이어 천의 구멍보다 크기 않은 구멍을 가진 천을 통과하는 가루로 기재된다. 조립분은 겨 및 배아 중 적어도 하나를 포함한다. 예를 들어, 배아는 그레인 알갱이 내에서 발견되는 배아 식물이다. 배아는 지질, 섬유, 비타민, 단백질, 미네랄 및 플라보노이드와 같은 식물성 영양물을 포함한다. 겨는 여러 세포층을 포함하고 상당한 양의 지질, 섬유, 비타민, 단백질, 미네랄 및 플라보노이드와 같은 식물성 영양물을 갖는다. 또한, 조립분은 지질, 섬유, 비타민, 단백질, 미네랄 및 플라보노이드와 같은 식물성 영양물도 포함하는 호분층을 포함할 수 있다. 호분층은 기술적으로 배아의 일부로 간주되지만 겨와 동일한 특징을 많이 나타내므로 전형적으로 제분 과정에서 겨 및 배아와 함께 제거

된다. 호분층은 단백질, 비타민 및 펙토산과 같은 식물성 영양물을 포함한다.

[0482] 또한, 조립분은 정제된 가루 성분과 블렌딩될 수 있다. 조립분은 정제된 가루 성분과 혼합되어 전체 그레인 가루를 형성할 수 있고, 따라서 정제된 가루에 비해 증가된 영양가, 섬유 함량 및 항산화 능력을 갖는 전체 그레인 가루를 제공한다. 예를 들어, 조립분 또는 전체 그레인 가루는 구운 식품, 스낵 제품 및 식료품에서 정제된 또는 전체 그레인 가루를 대체하기 위해 다양한 양으로 사용될 수 있다. 본 발명의 전체 그레인 가루(즉, 초미세로 분쇄된 전체 그레인 가루)는 또한 수제로 구운 제품에 사용하기 위해 소비자에게 직접 판매될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 전체 그레인 가루의 과립화 프로파일은 전체 그레인 가루의 98 중량% 입자가 212 마이크로미터 미만이 되도록 한다.

[0483] 추가 구현예에서, 전체 그레인 가루 및/또는 조립분의 겨 및 배아 내에서 발견되는 효소는 전체 그레인 가루 및/또는 조립분을 안정화시키기 위해 불활성화된다. 안정화는 증기, 열, 방사선 또는 기타 처리를 사용하여 겨와 배아 층에서 발견되는 효소를 불활성화하는 과정이다. 안정화된 가루는 요리 특성을 유지하고 유통 기한이 보다 길다.

[0484] 추가적인 구현예에서, 전체 그레인 가루, 조립분, 또는 정제 가루는 식품의 성분(성분요소)일 수 있고 식품을 생산하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 식품은 베이글, 비스킷, 빵, 번(bun), 크루아상, 만두, 잉글리시 머핀, 머핀, 피자 빵, 쿵 브레드, 냉장/냉동 반죽 제품, 도우, 베이킹 콩, 부리또, 칠리, 타코, 타말레, 토르티야, 냄비 파이, 즉석 시리얼, 즉석 식사, 만두속, 전자레인지를 용 식사, 브라우니, 케이크, 치즈케이크, 커피 케이크, 쿠키, 디저트, 패스트리, 스위트 롤, 캔디 바, 파이 크러스트, 파이 필링, 이유식, 베이킹 믹스, 배터, 브레딩(breading), 그레이비 믹스, 육류 증량제, 육류 대용품, 시즈닝 믹스, 수프 믹스, 그레이비, 루(roux), 샐러드 드레싱, 수프, 사워 크림, 국수, 파스타, 라면, 차우멘 국수, 로메인 국수, 아이스크림 포함, 아이스크림 바, 아이스크림 콘, 아이스크림 샌드위치, 크래커, 크루통, 도넛, 에그롤, 압출 스낵, 과일 및 그레인 바, 전자레인지를 용 스낵 제품, 영양 바, 팬케이크, 파르메이킹 베이커리 제품, 프레첼, 푸딩, 그레놀라 기반 제품, 스낵 칩, 스낵 식품, 스낵 믹스, 와플, 피자 크러스트, 동물성 사료 또는 애완동물 사료일 수 있다. 바람직한 식품은 조리된 벼, 죽, 쌀국수 및 가공된 벼 그레인을 포함하는 바이고, 바람직한 음료는 쌀차이다. 본원의 실시예 19를 참조한다.

[0485] 대안적인 구현예에서, 전체 그레인 가루, 정제된 가루 또는 조립분은 영양 보충제의 성분일 수 있다. 예를 들어, 영양 보충제는 전형적으로 비타민, 미네랄, 허브, 아미노산, 효소, 항산화제, 허브, 향신료, 프로바이오틱스, 추출물, 프레바이오틱스 및 섬유를 포함하는 하나 이상의 추가 성분을 포함하는 식단에 추가되는 제품일 수 있다. 본 발명의 전체 그레인 가루, 정제 가루 또는 조립분은 비타민, 미네랄, 아미노산, 효소 및 섬유를 포함한다. 예를 들어, 조립분은 건강한 식단에 필수적인 B-비타민, 셀레늄, 크롬, 망간, 마그네슘 및 항산화제와 같은 기타 필수 영양물뿐만 아니라 농축된 양의 식이 섬유를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 조립분 22g은 개체의 일일 권장 섬유 소비량의 33%를 전달한다. 영양 보충제는 개체의 전반적인 건강에 도움이 되는 임의의 알려진 영양 성분을 포함할 수 있고, 그 예로는 비타민, 미네랄, 기타 섬유 성분, 지방산, 항산화제, 아미노산, 펩타이드, 단백질, 루테인, 리보스, 오메가-3 지방산 및/또는 기타 영양 성분을 포함할 수 있다. 보충제는 인스턴트 음료 믹스, 바로 마실 수 있는 음료, 영양 바, 웨이퍼, 쿠키, 크래커, 젤 샷, 캡슐, 츄, 씹을 수 있는 정제 및 알약과 같은 형태로 전달될 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 일 구현예는 향이 첨가된 셰이크 또는 맥아 유형 음료의 형태로 섬유 보충제를 전달하고, 상기 구현예는 어린이를 위한 섬유 보충제로서 특히 매력적일 수 있다.

[0486] 추가 구현예에서, 제분 공정은 멀티-그레인 가루 또는 멀티 그레인 조립분을 만드는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 한가지 유형의 그레인으로부터의 겨 및 배아는 같아서 다른 유형의 시리얼의 같은 배유 또는 전체 그레인 시리얼 가루와 블렌딩할 수 있다. 대안적으로, 한가지 유형의 그레인으로부터의 겨 및 배아는 같아서 다른 유형의 그레인의 같은 배유 또는 전체 그레인 가루와 블렌딩할 수 있다. 본 발명은 하나 이상의 그레인의 겨, 배아, 배유 및 전체 그레인 가루 중 하나 이상의 임의의 조합을 혼합하는 것을 포함하는 것으로 사료된다. 상기 멀티-그레인 접근법은 맞춤형 가루를 만들고 여러 유형의 시리얼 그레인의 품질과 영양 내용물을 활용하여 하나의 가루를 만드는 데 사용할 수 있다.

[0487] 본 발명의 전체 그레인 가루, 조립분 및/또는 그레인 제품은 당업계에 공지된 임의의 제분 공정에 의해 제조될 수 있는 것으로 사료된다. 예시적인 구현예는 그레인의 배유, 겨 및 배아를 별도의 스트림으로 분리하지 않고 단일 스트림으로 그레인을 분쇄하는 것을 포함한다. 깨끗하고 템퍼링된 그레인은 해머밀, 롤러 밀, 핀 밀, 임팩트 밀, 디스크 밀, 공기 마멸 밀, 겹 밀 등과 같은 첫 번째 통로 분쇄기로 이송된다. 분쇄 후 그레인은 배출되

어 체에 전달된다. 또한, 본 발명의 전체 그레인 가루, 조립분 및/또는 그레인 제품은 발효, 인스턴트화, 압출, 캡슐화, 토스트, 로스팅 등과 같은 수많은 다른 공정에 의해 변형되거나 향상될 수 있는 것으로 고려된다.

[0488] 실시예

[0489] 실시예 1. 일반 재료 및 방법

[0490] 수단 레드(Sudan Red) 용액으로 염색함에 의한 호분 관찰

[0491] 수단 레드 IV 1g을 폴리에틸렌 글리콜 용액(평균 분자량 400, Sigma, Cat. No. 202398) 50 ml에 첨가하여 염색 용액을 제조하고, 90℃에서 1시간 동안 항온처리하고, 동일한 용량의 90%의 글리세롤과 혼합하였다. 각 그레인의 과피(포(palea) 및 램마(lemma))를 제거한 후 성숙한 벼 그레인을 증류수에서 5시간 동안 항온처리한 다음 면도날을 사용하여 가로 또는 세로로 절개하였다. 절편을 실온에서 24 내지 72시간 동안 수단 레드 용액 중에서 염색하였다. 그런 다음 절편을 실온에서 20분 동안 루골(Lugol) 염색 용액(Sigma, 32922)으로 역염색하고 해부 현미경(Sreenivasulu, 2010)으로 관찰하였다.

[0492] 에반스 블루를 사용한 호분의 염색

[0493] 에반스 블루(Sigma, E2129) 0.1 g을 증류수 100 mL에 용해하여 에반스 블루 염색 용액을 제조하였다. 각 그레인의 과피를 제거한 후 성숙한 벼 그레인을 면도날을 사용하여 가로로 절개하였다. 절편을 실온에서 30분 동안 증류수에서 항온처리하고, 염색제를 첨가하고 실온에서 2분 동안 방치하였다. 이어서 염색 용액을 버리고 절편을 증류수로 2회 세척하고 해부 현미경으로 관찰하였다.

[0494] 벼 배유의 광학현미경 관찰

[0495] 벼 그레인을 포르말린-아세트산-알코올(FAA) 용액(60% 에탄올, 33% H₂O, 5% 빙초산 및 2% 포름알데히드; v/v/v/v)에 고정시키고, 1시간 동안 탈기하고, 70%, 80%, 95% 및 100% 에탄올을 포함하는 일련의 알코올 용액에서 탈수시키고, LR 백색 수지(Electron Microscopy Sciences, 14380)를 침투시키고 60℃에서 24시간 동안 중합한다. 마이크로톰 절편은 Leica UC7 마이크로톰을 사용하여 수행하였다. 절편은 실온에서 2분 동안 0.1% 톨루티딘 블루 용액(Sigma, T3260)으로 염색한 후 증류수로 2회 세척하고 광학현미경으로 조사하였다. 대안적으로 절편을 실온에서 2분 동안 0.01% Calcofluor White 용액(Sigma, 18909)으로 염색시키고 UV 여기(여기 365 nm 및 방출 ~ 440 nm)를 사용하여 광학 현미경으로 조사하였다.

[0496] 과요오드산-슈프(Periodic acid-Schiff(PAS)) 시약 및 쿠마시 블루(Coomassie Blue)를 사용한 염색

[0497] 슬라이드 상의 고정된 절편을 예열된 0.4% 과요오드산(Sigma, 375810) 중 57℃에서 30분 동안 항온처리한 다음 증류수로 3회 세정하였다. 슈프 시약(Sigma, 3952016)을 적용하고 슬라이드를 실온에서 15분 동안 항온처리하고 이어서 증류수로 3회 세정하였다. 그런 다음 절편을 실온에서 2분 동안 1% 쿠마시 블루(R-250, Thermo Scientific, 20278)에서 항온처리하고 증류수로 3회 세정하였다. 절편의 탈수는 30%, 50%, 60%, 75%, 85%, 95% 및 100% 에탄올을 갖는 일련의 알코올 용액을 각각 2분 동안 사용하여 달성한 후 각 슬라이드를 50% 크실렌 및 100% 크실렌 용액(Sigma, 534056)에서 각 2분 동안 세정한다. 커버슬립은 이어서 Eukitt® 신속 강화 탑재 배지(Fluka, 03989)에 탑재하고 절편은 광학현미경하에 관찰하였다.

[0498] DNA 추출 및 PCR 조건

[0499] 식물 잎 샘플로부터의 DNA 추출을 위해 2개의 방법이 사용되었다: 문헌(Kim 등 (2016))으로부터 변형된, 덜 순수한 DNA 샘플을 제공하기 위한 신속한 DNA 추출 방법과 보다 순수한 DNA를 위한 보다 광범위한 DNA 추출 방법. 제1 방법에서, 직경이 2 mm인 4개의 유리 비드(Sigma, 273627), 1 내지 2 mg의 벼 잎 조직 및 150 ml의 추출 완충액(10 mM Tris, pH 9.5, 0.5 mM EDTA, 100 mM KCl)을 96-웰 PCR 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고 혼합물을 Mini-Beadbeater-96 믹서(Glen Mills, 1001)를 사용하여 1분 동안 균질화하였다. 3000 rpm에서 5분 동안 플레이트를 원심분리한 후 추출된 DNA를 포함하는 상층액의 분취액을 PCR 반응에 사용하였다.

[0500] 두 번째 방법에서는 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 2 mm 직경의 유리 비드 2개 각각과 함께 잎 샘플 0.2 g을 액체 질소에서 10분 동안 냉각하였다. 이어서 샘플은 Mini-Beadbeater-96에서 1분 동안 균질화하고, 이어서 600 µl의 DNA 추출 완충액 (2% SDS, 0.4 M NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)을 각각의 튜브에 첨가하고 혼합물을 1시간 동안 65℃에서 항온처리하였다. 혼합물을 냉각시킨 후, 450 µl의 6 M NaCl은 각각의 튜브에 첨가하였다. 튜브는 볼텍싱하고 20분동안 12000 rpm에서 원심분리하였다. 각 상층액을 새 튜브로 옮기고 DNA를 -20

℃에서 1시간 동안 동일 용적의 2-프로판올을 사용하여 침전시켰다. DNA는 4℃에서 20분 동안 2400 rpm에서 원심분리하여 회수하고 펠렛을 75% 에탄올로 2회 세척하였다. 펠렛은 실온에서 공기 건조시키고, 각각을 10 ng/μl RNase를 포함하는 600 ml 증류수(Thermo Scientific, EN0201)에 재현탁시키고 PCR 반응에 사용하였다.

[0501] PCR 반응은 Taq 폴리머라제(Thermo Scientific, K0171), 5' 및 3' 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 1 ml의 DNA 샘플을 포함하는 5 ml of 2xPCR 완충액을 총 10 ml의 용적으로 사용하였다. 증폭은 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초의 35 사이클을 사용하여 수행하였다. 증폭 생성물은 3% 아가로스 겔을 사용하는 겔 전기영동으로 분석하였다. 대조군 PCR 반응은 모체 야생형 Japonica 벼 품종인 동형접합성 Zhonghua11(ZH11) 식물 또는 그레인, 야생형 인디카 벼 품종으로서 동형접합성 NJ6 식물 및 ZH11과 NJ6의 DNA 혼합물로부터의 DNA 제제를 사용하였다.

[0502] *tal* 대립유전자의 유전학적 매핑을 위해 유전학적 마커에 대한 PCR 증폭은 다음 프라이머 쌍(5'에서 3' 서열)을 사용하였다: Indel 559(염색체 5 상의 위치 25,149, 249), 정배향 프라이머 TTATCAGCTTCTCGGTTCATCCAA (서열번호 50), 역배향 프라이머 AAACAGGGTTAGCAATTCGTTTT (서열번호 51); Indel 548 (염색체 5 상의 위치 25,265,533, 정배향 프라이머 TCTGTCCATATATACAACCG (서열번호 52), 역배향 프라이머 ATTTGTGTTTCAATCCTATATA (서열번호 53); Indel 562 (염색체 5 상의 위치 25,237,218), 정배향 프라이머 GGTCTTCAAACTCCACA (서열번호 54), 역배향 프라이머 CCAACTTGCCTTAGCATCA (서열번호 55); Indel 583 (염색체 5 상의 위치 25,265,326), 정배향 프라이머 ACTACTCCATTTCTGTATTCACT (서열번호 56), 역배향 프라이머 GAGCGTCATGGTTCACCTCTT (서열번호 57).

[0503] 틸링 검정

[0504] 틸링 검정에 사용된 프라이머는 하기의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다: *TAI-IF*: CATTGATAATGACCAGCTAGGTGCT (서열번호 98) 및 *TAI-IR*: GAGTTGAAACATGCCTGTACTCCTG (서열번호 99). ExTaq을 사용한 PCR 증폭은 다음 반응 조건으로 수행하였다: 앰플리콘 길이 1kb당, 95℃에서 2분간; 94℃에서 20초, 68℃에서 30초(사이클당 1℃ 감소), 72℃에서 60초의 8사이클에 이어서 앰플리콘 길이 1 kb당 94℃에서 20초, 60℃에서 30초 및 72℃에서 60초의 35 사이클 및 5분 동안 72℃에서 최종 연장. 야생형 및 시험 샘플로부터 PCR 생성물을 혼합하고 완전한 변성-느린 어닐링 프로그램에 적용하여 다음 조건 하에서 헤테로듀플렉스를 형성하였다: 변성을 위해 99℃에서 10분 동안, 이어서 70℃에서 시작하여 각각 20초에서 사이클당 0.3℃씩 감소하는 70 사이클의 감소 및 이어서 15℃에서 유지하여 변성된 PCR 생성물을 재어닐링하여 헤테로듀플렉스를 형성하였다. 어닐링된 PCR 생성물의 *Ce/I* 분해는 *Ce/I* 완충액(10mM HEPES, pH 7.5, 10 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 0.002% Triton X-100 및 0.2 μg/mL 소 혈청 알부민(BSA)), 4 μL의 PCR 생성물 및 PCR 생성물이 Ex Taq에 의해 중합된 경우 1 유닛 *Ce/I*(10 유닛/μL) 또는 PCR 생성물이 KOD에 의해 중합된 경우 20 유닛 *Ce/I*을 포함하는 15μL 반응 혼합물에서, 45℃에서 15분 동안 수행하고 이어서 2 μL의 0.5 M EDTA(pH 8.0)를 첨가하여 반응을 중단시킨다. 대안적으로 분해는 MBN 완충액(20 mM Bis-Tris, pH 6.5, 10 mM MgSO₄, 0.2 mM ZnSO₄, 0.002% Triton X-100 및 0.2 μg/mL BSA)에서 60℃에서 30분 동안 4 μL의 PCR 생성물 및 2 유닛의 녹두 뉴클레아제(MBN, 10 유닛/μL, Cat. No. M0250S; New England Biolabs, USA)를 포함하는 15-μL 반응 혼합물에서 수행하고, 이어서 2 μL의 0.2% SDS를 첨가하여 반응을 중단시킨다.

[0505] 전체 *Ce/I* 분해 PCR 생성물을 2% 아가로스 겔에서 전기영동하여 돌연변이를 검출하였다.

[0506] 고-분리능 DNA 용융 곡선(HRM) 분석

[0507] 어린 잎 조직(2 mm × 2 mm)을 96-웰 플레이트의 웰에서 유리 비드(직경 2 mm)를 사용하여 10 mM Tris(pH 9.5), 0.5mM EDTA, 100 mM KCl을 포함하는 150 μL 용해 완충액으로 균질화하고, DNA 추출을 위해 상기된 받아 같이 균질화하였다. PCR 반응은 10 μL의 용적에서 수행하였다: 5 μL의 2× 마스터 믹스(Roche, Cat No: 04909631001), 10 μM의 정배향 프라이머, 10 μM에서 역배향 프라이머, 1.0 μL의 25 mM MgCl₂, 1.5 μL DNA 주형. 혼합물을 95℃에서 10분 동안 순환시킨 다음 95℃에서 10초 동안 45사이클, 53℃에서 15초 및 72℃에서 15초 동안 어닐링하였다. 이어서 변성 프로그램: 95℃ 60초, 40℃ 60초, 65℃ 1초, 97℃ 1초; 램프 4.4℃/초, 지속 시간 60초, 목표 온도 95℃.

[0508] *TAI*의 단일 가닥 DNA 결합 기능 연구

[0509] 하기된 바와 같이, *TAI* 유전자 생성물은 미토콘드리아 표적 단일 가닥 DNA 결합(mtSSB) 단백질로서 동정되었다. 단일 가닥 DNA(ssDNA) 결합에서 *TAI* 폴리펩타이드의 기능을 연구하기 위해, 6xHis 태그와 융합된 정제된 제조함

TAI 단백질을 전기영동 이동 전환 검정(Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA))에 의해 분석하여 ssDNA에 대한 친화성을 결정하였다.

[0510] 이. 콜라이에서 His-태그된 *TAI* 단백질의 발현

[0511] 성숙한 *TAI* 단백질에 대한 621 bp의 단백질 암호화 영역(서열번호 2)을 PCR로 증폭하고, pET-30a 벡터(Novagen Cat. No. 69909-3)에 클로닝하고 pET-30a의 프로모터에 상대적인 유전자 삽입체의 목적하는 배향을 확인하였다. 이러한 작제물은 pET-30a-*TAI*로 지정하였다. 이것은 니켈 컬럼에 결합할 수 있도록 발현된 *TAI* 폴리펩타이드의 N-말단에서 해독적으로 융합된, pET-30a 벡터로부터 유래된 6xHis 태그를 포함하였다. 재조합 *TAI*을 트란세타(DE3) 화학적 성분 이. 콜라이 세포(Transgen Cat. No.CD801)에서 발현시키고 LB 배지에서 밤새 성장시켰다. 세포를 1x SDS 부하 완충액(12 mM Tris pH 6.8, 5% 글리세롤, 0.4% SDS, 1% β-머캅토에탄올, 0.02% 브로모페놀 블루)에서 5분 동안 100℃에서 가열하여 용해시켰다. 가용성 단백질을 SDS-PAGE 겔(Bio-Rad)에서 전기영동으로 분획하고 PVDF 막(Bio-Rad)으로 옮겼다. 재조합 단백질은 이어서 6xHis 태그(Marine Biological Laboratory)에 대해 지시된 모노클로날 항체를 사용하는 Western 분석으로 가시화하였다.

[0512] 분석학적 방법

[0513] 그레인, 식품 성분 및 식품 샘플의 프록시메이트 및 기타 주요 성분은 예를 들어 하기에 기재된 것과 같은 표준 방법을 사용하여 결정하였다.

[0514] 그레인 수분 함량은 공식 분석 화학자 협회(AOAC) 방법 925.10에 따라 측정하였다. 간략하게, 약 2g의 그레인 샘플을 약 1시간 동안 130℃의 오븐에서 일정한 중량으로 건조시켰다.

[0515] 또한 회분 함량은 AOAC 방법 923.03에 따라 측정하였다. 수분 측정에 사용된 샘플은 머플로(muffle furnace)에서 520℃로 15시간 동안 회분처리하였다.

[0516] 그레인, 식품 성분 및 식품 샘플의 단백질 함량

[0517] 단백질 함량은 AOAC 방법 992.23에 따라 측정하였다. 간략하게, 총 질소는 자동화된 질소 분석기를 사용하여 Dumas 연소법으로 분석하였다(Elementar Rapid N cube, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). 그레인 또는 식품 샘플의 단백질 함량(g/100 g)은 질소 함량에 6.25를 곱하여 추정하였다.

[0518] 슈가, 전분 및 기타 폴리사카라이드

[0519] 총 전분 함량은 AOAC 방법 996.11에 따라 측정하였고, 이는 문헌(참조: McCleary 등 (1997))의 효소적 방법을 사용한다.

[0520] 슈가의 양은 AOAC 방법 982.14에 따라 측정하였다. 간략하게, 단순 슈가는 수성 에탄올(80% 에탄올)로 추출한 다음, 아세트니트릴:물(75:25 v/v)을 이동상으로서 사용하고 증발 광산란 검출기를 사용하여 폴리아민 결합 중합체 겔 컬럼을 사용한 HPLC로 정량화하였다.

[0521] 총 중성 비-전분 폴리사카라이드(NNSP)는 문헌(참조: Theander 등 (1995))의 가스 크로마토그래피 절차로 측정하였고 이는 1M 황산으로 2시간 동안 가수분해한 후 원심분리함을 포함하는 약간의 변형을 갖는다.

[0522] 프럭탄(프럭토-올리고사카라이드)는 AOAC 방법 999.03에 의한 구체화된 방법에 의해 분석하였다. 간략하게, 프럭토-올리고사카라이드를 물로 추출한 후 슈크라제/말타제/인버타제 혼합물로 분해시켰다. 생성된 유리된 슈가는 수소화붕소나트륨으로 환원되고 프럭타노스와 함께 프럭토스/글루코스로 분해하였다. 방출된 프럭토스/글루코스는 p-하이드록시벤조산 하이드라진(PAHBAH)을 사용하여 측정하였다.

[0523] 섬유 함량

[0524] 총 식이 섬유(TDF)는 AOAC 방법 985.29에 따라 측정하였고 가용성 및 불용성 섬유(SIF)는 AOAC 방법 991.43에 따라 측정하였다. 간략하게, TDF는 AOAC 방법 985.29에 구체화된 바와 같이 문헌(참조: Prosky 등 (1985))의 중량 측정 기술에 의해 측정하였고, SIF는 AOAC 991.43에 기재된 바와 같은 중량 측정 기술로 결정하였다.

[0525] 총 지질

[0526] 밀가루 5 g 샘플을 1% Clarase 40000(Southern Biological, MC23.31)과 함께 45℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 다중 추출에 의해 샘플로부터 지질을 클로로포름/메탄올로 추출하였다. 원심분리하여 상을 분리한 후 클로로포름/메탄올 분획을 제거하고 101℃에서 30분간 건조하여 지질을 회수하였다. 나머지 잔류물의 매스는 샘플

중에 총 지질을 나타냈다(AOAC 방법 983.23).

[0527] *지질의 지방산 프로필*

[0528] AOAC 방법 983.23에 따라 제분 밀가루로부터 지질을 클로로포름으로 추출하였다. 내부 표준으로서 헵타-데칸산 분취량을 첨가한 후 지질을 함유하는 클로로포름 분획의 일부를 질소 기류 하에서 증발시켰다. 잔류물은 무수 메탄올 중에서 1% 아황산에 현탁시키고 혼합물은 50℃에서 16 h 동안 가열하였다. 혼합물은 물로 희석하고 헥산으로 2회 추출하였다. 배합된 헥산 용액을 플로리실의 작은 컬럼에 부하하고 컬럼을 헥산 및 지방산 메틸 에스테르로 세척한 다음 헥산 중 10% 에테르로 용출시켰다. 용출액을 증발 건조시키고 잔류물을 GC 상으로 주입하기 위해 이소-옥탄에 용해시켰다. 지방산 메틸 에스테르는 표준 지방산의 혼합물에 대해 정량화하였다. GC 조건: 컬럼 SGE BPX70 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm; 주입 0.5 μL; 주입기 250℃; 15:1 분할; 유동 1.723 ml/min 정류 (constant flow); 오븐 0.5 min 동안 150℃, 10℃/분에서 180℃까지, 1.5℃/min에서 220℃까지, 30℃/min에서 260℃까지, 총 전개-시간 33 min; 280℃에서 검출기 FID.

[0529] *항산화제 활성(ORAC-H)*

[0530] 친수성 항산화제 활성(ORAC-H)은 문헌(참조: Wolbang 등 (2010))에 기재된 변형과 함께 후양(Huang) 방법 (2002a 및 2002b)에 따라 측정하였다. 다음과 같이 친수성 항산화제에 이어 친수성 항산화제에 대해 샘플을 추출하였다. 100 mg의 샘플은 3중으로 2 mL의 마이크로튜브에 칭량하였다. 이어서 1 mL 헥산:디클로로메탄(50:50)을 첨가하고 2분 동안 격렬하게 혼합하고 10℃에서 2분 동안 13,000 rpm으로 원심분리하였다. 상등액을 유리 바이알로 옮기고 펠렛을 추가 2mL의 헥산:디클로로메탄 혼합물로 재추출하였다. 이어서 혼합 및 원심분리 단계를 반복하고 상등액을 동일한 유리 바이알로 옮겼다. 펠렛으로부터의 잔류 용매를 부드러운 질소 흐름 하에서 증발시켰다. 이어서 1mL의 아세톤:물:아세트산 혼합물(70:29.5:0.5)을 첨가하고 샘플을 2분 동안 격렬하게 혼합하였다. 이어서 혼합물을 이전과 같이 원심분리하고 상등액을 ORAC-H 플레이트 분석에 사용하였다. 샘플은 요구되는 바와 같이 포스페이트 완충액으로 희석하였다. 곡선 이하 면적(AUC)을 계산하고 Trolox 표준에 대한 AUC 값과 비교하였다. ORAC 값은 샘플의 μM Trolox 등가물/g으로 보고한다.

[0531] *페놀류*

[0532] 최소의 변형과 함께 문헌(참조: Li 등 (2008))에 의해 기재된 방법에 따라 추출 후 총 페놀류 함량 및 유리, 공액 및 결합 상태의 페놀류 함량을 결정하였다. 간략하게, 유리 바이알(8 mL 용량)에서 10분 동안 초음파 처리에 의해 2mL 80% 메탄올로 추출한 후 100 mg 샘플에서 자유 페놀류를 측정하였다. 상등액을 두 번째 유리 바이알로 옮기고 잔류물 추출을 반복하였다. 합한 상등액을 질소 하에서 증발 건조시켰다. 2% 아세트산 2 mL를 첨가하여 pH를 약 2로 조정한 후 에틸아세테이트 3mL를 첨가하여 2분 동안 진탕하면서 페놀류를 추출하였다. 바이알을 10℃에서 5분 동안 2000 x g로 원심분리하였다. 상등액은 투명한 유리 바이알로 옮기고 추출을 2회 이상 반복하였다. 배합된 상등액을 37℃에서 질소 하에 증발시켰다. 잔류물을 2 mL의 80% 메탄올 중에 용해시키고 냉장 저장하였다.

[0533] 접합된 페놀류에 대한 샘플은 초기 80% 메탄올 추출에 대한 자유 페놀류 검정에 대한 것과 같이 처리하였다. 상기 시점에서, 2.5 mL의 2M 수산화나트륨 및 자기 막대를 유리 바이알에 있는 증발된 상등액에 첨가하고 이어서 질소로 채우고 단단하게 캡핑하였다. 바이알은 혼합하고 교반하면서 1시간 동안 110℃에서 가열하였다. 샘플은 2분 동안 진탕함에 의해 3mL 에틸 아세테이트로 추출하기 전에 빙상에서 냉각시켰다. 바이알을 10℃에서 5분 동안 2000 x g로 원심분리하였다. 상등액을 버리고 12M HCl을 사용하여 pH를 약 2로 조정하였다. 자유 페놀류에 대해 기재된 바와 같이 에틸 아세테이트의 3 x 3 mL 분취량을 사용하여 페놀류를 추출하였다. 상등액을 배합하고 37℃에서 질소 하에 증발 건조시키고 잔류물을 2mL 80% 메탄올 중에 취하고 냉장 저장하였다.

[0534] 결합된 페놀류는 자유 페놀류의 메탄올 추출 후 잔류물로부터 측정하였다. 2.5mL의 2M 수산화나트륨과 자기 막대를 잔류물에 첨가한 후 바이알을 질소로 채우고 단단히 캡핑하였다. 바이알은 혼합하고 교반하면서 1시간 동안 110℃에서 가열하였다. 샘플은 2분 동안 진탕함에 의해 3 mL 에틸 아세테이트로 추출하기 전에 빙상에서 냉각시켰다. 바이알을 10℃에서 5분 동안 2000 x g로 원심분리하였다. 상등액을 버리고 12M HCl을 사용하여 pH를 약 2로 조정하였다. 자유 페놀류에 대해 기재된 바와 같이 에틸 아세테이트의 3 x 3 mL 분취량을 사용하여 페놀류를 추출하였다. 상등액을 배합하고 37℃에서 질소 하에 증발 건조시키고 잔류물을 2mL 80% 메탄올 중에 취하고 냉장 저장하였다.

[0535] 가수분해 전에 샘플을 습윤화시키기 위해 80% 메탄올 200 μL를 첨가하여 100 mg의 샘플을 사용하여 총 페놀류를 측정하였다. 2.5 mL의 2 M 수산화나트륨과 자기 막대를첨가한 후 바이알을 질소로 채우고 단단히

캡핑하였다. 바이알은 혼합하고 교반하면서 1시간 동안 110℃에서 가열하였다. 샘플은 2분 동안 진탕함에 의해 3 mL 에틸 아세테이트로 추출하기 전에 빙상에서 냉각시켰다. 바이알을 10℃에서 5분 동안 2000 x g로 원심분리하였다. 상등액을 버리고 12M HCl을 사용하여 pH를 약 2로 조정하였다. 자유 페놀류에 대해 기재된 바와 같이 에틸 아세테이트의 3 x 3 mL 분취량을 사용하여 페놀류를 추출하였다. 상등액을 배합하고 37℃에서 질소 하에 증발 건조시키고 잔류물을 4mL 80% 메탄올 중에 취하고 냉장 저장하였다.

[0536] 처리/추출된 샘플의 페놀류 양은 페놀류 결정을 위한 Folin Ciocalteu의 검정을 사용하여 측정하였다. 0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 및 25 µg/mL의 갈산 표준물을 사용하여 표준 곡선을 작성하였다. 1mL의 표준물을 4mL 유리 튜브에 첨가하였다. 시험 샘플의 경우, 완전히 혼합된 샘플의 100 µL 분취량을 4mL 유리 튜브의 900 µL 물에 첨가하였다. 100 mL의 Folin Ciocalteu 시약을 이어서 각각의 튜브에 첨가하고 이를 즉시 볼텍싱하였다. 2분 후 1M 중탄산나트륨 용액 700 µL를 첨가한 다음 볼텍싱하여 혼합하였다. 각 용액을 암실에서 실온에서 1시간 동안 항온처리한 다음 765 nm에서 흡광도를 판독하였다. 결과는 µg 갈산 당가물/g 샘플로 표현하였다.

[0537] 피테이트

[0538] 밀가루 샘플의 피테이트 함량 측정은 AOAC 공식적 분석 방법(Official Methods of Analysis)(1990)에 기재된 바와 같이 할랜드 및 보베레아스(Harland 및 Oberleas)의 방법을 기반으로 하였다. 간략하게, 밀가루 샘플 0.5g 칭량하고 실온에서 1시간 동안 회전 휠(30rpm)을 사용하여 2.4% HCl로 추출하였다. 그 다음 혼합물을 2000 x g에서 10분 동안 원심분리하고 상등액을 추출하고 milli-Q 물로 20배 희석하였다. 음이온 교환 컬럼(500 mg Agilent Technologies)을 진공 매니폴드에 놓고 제조업체의 지침에 따라 사용하도록 컨디셔닝하였다. 이어서 희석된 상등액을 컬럼에 부하하고 0.05M HCl로 세척하여 비-피테이트 종을 제거하였다. 이어서 피테이트는 2 M HCl로 용출하였다. 수거된 용출물은 가열 블록을 사용하여 분해하였다. 샘플을 냉각시키고 milli-Q 물로 용적을 최대 10 mL로 만들었다. 인 수준은 몰리브데이트, 설펡산 착색법을 사용하는 분광측정기에 의해 측정하고 640 nm에서 흡광도를 판독하였다. 피테이트는 하기의 식을 사용하여 계산하였다:

[0539] 피테이트 (mg/g) = $P \text{ conc} \cdot V1 \cdot V2 / (1000 \cdot \text{샘플 중량} \cdot 0.282)$

[0540] 여기서 P conc는 분광측정기에 의한 측정시 인의 농도(µg/mL)이고, V1은 최종 용액의 용적이고, V2는 추출된 피테이트 용액의 용적이며, 0.282는 인에서 피테이트로의 전환 계수이다.

[0541] 총 미네랄 함량 추정

[0542] 샘플의 총 미네랄 함량은 AOAC 방법 923.03 및 930.22를 사용하여 회분 검정에 의해 측정하였다. 약 2g의 밀가루를 540℃에서 15시간 동안 가열한 다음 회분 잔류물의 매쓰를 칭량하였다. 0.5g의 통밀 가루 샘플을 140℃에서 8시간 동안 8M 질산으로 튜브 블록 분해를 사용하여 분해하였다. 아연, 철, 칼륨, 마그네슘, 인 및 황 함량은 Zarcinas(1983a 및 1983b)에 따라 유도적으로 커플링된 플라즈마 원자 방출 분광측정(ICP-AES)을 사용하여 분석하였다.

[0543] 미네랄은 조사기관(CSIRO, Urrbrae, Adelaide South Australia, at Waite Analytical Service (University of Adelaide, Waite, South Australia) 및 Dairy Technical Services (DTS, North Melbourne, Victoria.))에서 분석하였다. 원소는 CSIRO에서 질산 용액으로 분해한 후 유도적으로 커플링된 플라즈마-광학 방출 분광측정(ICP-OES)에 의해, 또는 묶은 질산 및 과산화수소로 분해한 후 DTS에서 또는 질산/과염소산 용액으로 분해한 후 ICP-AES로 결정하였다.

[0544] 비타민

[0545] 비타민 B3(니아신), B6(피리독신) 및 총 엽산 분석은 DTS와 국가 측정 연구소(NMI)에서 수행하였다. 니아신은 문헌(Lahey, 등 (1999))에 따른 AOAC 방법 13th Ed (1980) 43.045에 의해 측정하였다. 피리독신은 문헌(참조: Mann 등 (2001))에 따라 측정하였다. 상기 방법은 인산화되고 자유 비타민 B6 형태의 피리독신(피리독솔)으로의 프레-컬럼 변환을 통합하였다. 탈인산화를 위해 산 포스파타제 가수분해를 사용하고 이어서 Fe2+의 존재 하에 글리옥살산으로 탈아민화에 의해 피리독사민을 피리독살로 전환시켰다. 이어서 피리독살을 수소화붕소나트륨에 의해 피리독신으로 환원시켰다.

[0546] 엽산은 제조업체의 지침을 사용하여 VitaFast 엽산 키트에 따라 또는 AOAC 방법 2004.05.에 따라 측정하였다.

[0547] **실시예 2. 두꺼운 호분 (ta) 돌연변이체의 단리 및 특징 분석**

[0548] 돌연변이 유발된 벼 집단의 확립 및 배양

- [0549] 야생형 벼 재배종 Zhonghua11(ZH11)의 약 8000개 그레인(M0 그레인으로 지정됨)은 표준 조건을 사용하여 60mM 에틸 메탄 설포네이트(EMS)로 처리하여 돌연변이를 유발하였다. 돌연변이 유발된 그레인을 발에 파종하고 수득한 식물을 재배하여 M1 그레인을 생성하였다. M1 그레인을 수확하고 이어서 발에 파종하여 M1 식물을 생성하였다. 1327개의 개별 M1 식물로부터 8925개의 원추를 수확하였다. 이들 식물들로부터 36,420개의 M2 그레인을 스크리닝하고, 각 원추로부터 적어도 4개의 그레인을 포함한다.
- [0550] 절반 그레인의 염색에 의한 돌연변이체 스크리닝
- [0551] M2 벼 그레인의 파괴(포 및 램마)를 제거하였다. 36,420개의 그레인 각각을 가로로 이등분하였다. 배아를 포함하는 반쪽은 후속 발아를 위해 96-웰 플레이트에 보관하고, 배아가 없는 각 반쪽 그레인은 에반스 블루로 염색하고 해부 현미경으로 관찰하여 야생형에 비해 호분이 두꺼워진 돌연변이체 그레인을 검출하였다. 염색은 에반스 블루가 전분성 배유의 세포와 같은 생존 불가능한 세포에만 침투하여 염색할 수 있는 반면 생존 가능한 호분층에서는 색상 변화가 관찰되지 않는다는 원리를 기반으로 하였다. 초기 에반스 블루 염색 및 조직학적 분석으로부터 호분 두께의 현저한 증가를 나타내는 개별 그레인과 종자의 배쪽 호분에서 현저한 두꺼워짐을 나타내는 그레인이 관찰되었다. 다른 그레인은 호분 두께가 증가했지만 그 정도는 적었다. 각 종자의 배쪽 측면의 염색되지 않은 영역은 특히 호분층의 두께를 위해 조사하였다. 그레인의 등쪽 측면 상에서 호분층의 두께가 증가된 변이체가 또한 관찰되었다. 추가 분석을 위해 전체 단면에 걸쳐 호분 층의 두께가 크게 증가한 변이체만 선택하였다.
- [0552] 야생형 반쪽 그레인과 비교할 때, 에반스 블루가 염색되지 않은 영역이 더 두꺼운 반쪽 그레인을 선택하였다. 조사된 36,420개의 그레인 중에서 호분 두께가 다른 219개의 호분(0.60%)을 동정하여 선택하였다. 이들은 140개의 개별 M1 식물로부터 162개의 원추 식물로부터 수득되었으므로 대부분이 독립적인 돌연변이체를 나타냈다. 특히 하나의 돌연변이체 그레인을 동정하였고 하기에 기재된 바와 같이 추가로 특징 분석하였고, 두꺼운 호분 1(*tal-1*)으로서 지정된 유전자에 돌연변이가 있다. 상응하는 야생형 유전자는 *TAI*로 지정하였고; 그 지정을 본원에 사용한다. 돌연변이체 대립유전자는 *TAI* 유전자에서 처음 동정된 돌연변이로서 *tal-1*로 지정하였다.
- [0553] 추정되는 돌연변이체 계통을 유지하기 위해 각각의 상응하는 배아 반쪽 그레인을 1% Bacto 한천(Bacto, 21403 0)으로 고형화한 반쪽-강도 MS 염 배지(Murashige 및 Skoog, 1962)를 포함하는 배지상에서 발아시키고 25℃에서 조도 1500 ~ 2000 Lux, 16시간 광/8시간 암 사이클로 배양하였다. 묘목은 2 내지 3엽 단계에서 토양으로 옮겨졌고 수득한 식물은 성숙기로 성장하였다. 상응하는 배아 반쪽 그레인의 발아 및 재배 시, 115개의 종자(생존율 52.5%)가 성장하여 성숙하고 생식력 있는 식물을 생성하였다.
- [0554] 야생형 모체 품종에 비해 정상적인 식물 높이, 생식력(암수 생식력), 그레인 크기 및 1,000개 그레인 중량을 갖는 것들과 같이 일반적인 농경학적 특성에 결함이 거의 없거나 전혀 없고 안정한 두꺼워진 호분 특성의 유전을 보여주는 후보물 돌연변이체 식물을 동정하고 선택하여 추가로 분석하였다. 이들 중에서 *tal-1* 돌연변이체 대립유전자를 갖는 호분의 적어도 일부에 3 내지 5개의 세포층을 보이는 M3 세대의 그레인을 선택하고 상세하게 분석하였다. 야생형 ZH11 그레인은 예상대로 대부분의 그레인 주위에 1-2개의 세포층의 호분을 나타냈다.
- [0555] *tal-1* 돌연변이체 그레인의 조직학적 분석
- [0556] 야생형 ZH11 및 동형접합성 *tal-1* 돌연변이체 식물로부터 발육하는 그레인을 연구하고 수분(DAP) 후 1일에서 30 일까지의 형태학적 변화를 비교하였다. 벼 그레인의 숙성 단계는 우유 그레인 단계, 반숙 그레인 단계, 및 성숙한 그레인 단계의 3단계를 갖는 것으로 일컬어질 수 있다. 반숙 그레인 단계에서, 야생형 원추의 그레인은 녹색에서 황색으로 색이 변하기 시작했고, 이어서 줄기와 영과를 연결하는 수포 조직이 점진적으로 파괴되었다. *tal-1* 원추에서 그레인은 색상 변화가 지연되었다. 벼 그레인의 횡단면에 대한 현미경 검사에서도 *tal-1* 돌연변이체 그레인에서 백악질(불투명도) 정도가 증가한 것으로 나타났다. 이어서 스캐닝 전자 현미경(SEM)을 사용하여 전분성 배유의 중간 부분에 있는 전분 과립 구성의 구조를 연구하였다. 야생형 그레인에서, 전분 과립은 촘촘하게 패키징되어 매끄러운 표면과 규칙적인 형태를 보인 반면, *tal-1* 그레인에서는 불규칙한 형태의 전분 과립이 느슨하게 패키징된 것이 관찰되었다. 요약하면, *tal-1* 돌연변이를 갖는 식물 및 그레인에서 적어도 3개의 변화가 관찰되었다: 그레인 성숙화의 지연, 그레인의 백악질 정도의 증가 및 전분 과립 구조의 증가.
- [0557] 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 21, 24, 27 및 30 DAP에서 발달하는 돌연변이체 및 야생형 그레인을 에반스 블루로 염색하고 호분층을 광학 현미경으로 조사하였다. 10 DAP까지 야생형과 *tal-1* 돌연변이체 그레인 사이의 발달 호분층의 두께에서 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 10 DAP 후, *tal-1* 돌연변이체의 호분층은 야생형 그레인보다 두꺼웠고, 그 차이는 약 20 DAP에서 최대에 도달하였다. 도 1은 3개의 발달 시점에서 야생형 (ZH11) 및

tal-1 돌연변이체에서 호분의 발달을 입증하기 위한 전분성 배유를 강조하는 루골(Lugol) 시약을 사용한 종자 절편의 염색(도 1, 패널 E 및 F) 및 종자의 반박형(semi-thin) 절편의 PAS 및 쿠마시 브릴리언트 블루(G-250) 염색을 보여준다.

[0558] 야생형 및 *tal-1* 돌연변이체 그레인(30 DAP)을 절편(1 μ m), 염색 및 광학 현미경으로 조직학적 차이에 대해 추가로 조사하였다. 핵산을 청색으로 염색하고 폴리스카라이드를 보라색으로 염색하는 0.1% 톨루이딘 블루로 염색한 후, 크고 규칙적으로 배향된 직사각형 세포의 단일 층이 야생형 호분에서 관찰되었다. 대조적으로, *tal-1* 돌연변이체 그레인의 절편은 3 내지 5개 세포 층의 호분층을 갖고, 세포는 또한 다양한 크기 및 불규칙한 배향을 갖는다. 이들 관찰은 *tal-1* 그레인의 두꺼워진 호분이 주로 개별 호분 세포의 확대보다는 차라리 세포층 수의 증가에 의해 유발되었음을 지적하였다.

[0559] 형광 세포벽 염색제인 0.01% 칼코플루오르 화이트(Calcofluor White)로 추가 염색한 결과 호분층에서 야생형과 *tal-1* 돌연변이체 그레인 사이에 세포벽 두께에 차이가 없음을 보여주었다. 호분 세포의 세포벽은 야생형과 *tal-1* 그레인 둘 다에 대해 전분성 배유의 세포벽보다 두껍다.

[0560] 성숙한 야생형 및 *tal-1* 그레인을 가로로 절단하고 실시예 1에 기재된 바와 같이 PAS로 염색하였다. 세포층의 수로 계산된 그레인의 등쪽, 위쪽 측면, 측면, 아래쪽 측면 및 배면 위치의 호분의 두께를 계수하고, 각 유전자형의 15개의 그레인에 대해 통계적으로 분석하였다. 결과는 도 2에 나타낸다. 야생형과 돌연변이체 그레인 둘 다에 대해 성숙한 그레인의 5개의 다른 위치에서 세포층의 수가 균일하지 않은 것으로 관찰되었지만, 모든 위치에서 돌연변이체 그레인에 대한 세포층의 수는 야생형 그레인에 대한 것 보다 유의적으로 컸다($P < 0.01$).

[0561] 3, 6, 9, 12, 18, 26, 34 및 42 DAP에서 그레인 건조 중량을 측정하고 야생형 그레인과 비교하여 식물 성장 및 발달 동안 그레인 충전을 조사하였다. 결과 (도 3)는 *tal-1* 그레인에 대해 감소된 그레인 충전을 보여주었다.

[0562] *tal* 돌연변이체 식물 및 그레인의 농경학적 특징의 분석

[0563] 필드에서 3세대 동안 야생형(ZH11) 식물과 역교배하여 BC3F3 세대를 생성하고 이로써 돌연변이유발 처리로부터 발생할 수 있는 추가의 연계되지 않은 돌연변이를 제거한 후, *tal-1* 돌연변이체 식물을 일부 농경학적 특성에 대해 분석하였다. *tal-1* 돌연변이체 식물과 그레인은 야생형 식물 및 그레인과 비교하여 식물의 높이, 길이, 너비, 두께에 따른 그레인의 크기, 영과의 형태에서 유의한 차이가 없었다(표 2). 대조적으로, 야생형 식물은 98.90%의 종자 설정 비율을 보인 반면, 동형접합체 *tal-1* 돌연변이체 식물은 89.32%의 종자 설정 비율 감소를 보여주었다. 종자 설정 비율은 성숙한 그레인 단계에 의해 종자로 채워지는 식물의 작은 꽃의 퍼센트로 계산되었다. 또한, *tal-1* 돌연변이체 그레인은 성장실에서 습도 조절 없이 12시간 명/12시간 암 주기로 28°C에서 배양했을 때 야생형 그레인 97.3%에 비해 49.8%의 발아력 감소를 보여주었다. 발아는 유근이 종자 코트를 통해 눈에 띄게 나올 때로 정의되었다.

[0564] [표 2] 농경학적 특성에 대한 야생형(ZH11)과 *tal-1* 돌연변이체 식물의 비교(평균 $\pm$ SE).

특성	ZH11	<i>tal-1</i>
식물 높이 (cm)	103.7 (± 3.24)	101.5 (± 5.62)
종자 설정 비율 (%)	98.9 (± 3.41)	89.32 (± 5.15)
1000 종자 중량 (g)	22.73 (± 0.17)	19.99 (± 0.33)
종자 길이 (mm)	7.46 (± 0.26)	7.38 (± 0.25)
종자 폭 (mm)	3.27 (± 0.12)	3.37 (± 0.13)
종자 두께 (mm)	2.35 (± 0.10)	2.24 (± 0.11)

[0565]

[0566] **실시예 3. *tal-1* 돌연변이의 유전학적 분석**

[0567] *tal* 돌연변이의 유전학적 조절, 특히 돌연변이가 우성인지 열성인지, 그리고 그것이 자웅 모체 중 하나 또는 둘 다로부터 유전되었는지 여부를 결정하기 위해 교배하였다. 두꺼운 호분 표현형이 모계로 결정되었는지 여부를 결정하기 위해 2개의 유전학적 실험을 수행하였다. 첫째, 야생형 ZH11 식물의 모계 동형 접합성 *tal-1* 식물과 꽃가루 사이에 시험 교배를 수행하였다. F2 자손 그레인을 수득하였다. F2 그레인 중 24.1%(n=1093)는 F2 집단

에서 열성, 핵 암호화된 돌연변이의 멘델 유전에 대해 예측된 3:1(야생형:돌연변이체) 비율과 일치하는 두꺼운 호분 표현형을 보여주었다. F1 종자(n=218)의 98.7%가 야생형 호분 표현형을 가지고 있는 반면, 나머지 1.3%의 종자는 스코어링하기 어려웠지만 F2 세대에서 야생형 호분 표현형을 갖는 것으로 관찰되었다. 둘째, 야생형 식물에 사용된 *tal-1* 식물로부터의 꽃가루를 자성 모체로 하여 역교배를 수행하였다. 역교배에서 99.7%의 F1 종자(n=325)는 야생형 호분 표현형을 나타냈다. 이들 데이터는 *tal-1*의 두꺼운 호분 표현형이 돌연변이체 대립유전자가 야생형 대립유전자에 열성인 단일 핵 유전자에 의해 제어됨을 나타냈다.

[0568] 실시예 4. *tal-1* 돌연변이체 그레이인의 영양성분 분석

[0569] 돌연변이체 그레이인의 조성, 특히 영양학적으로 중요한 성분을 측정하기 위해 ZH11과 동형접합성 *tal-1* 식물을 동일한 시간에 동일한 조건하에서 성장시켰다. 본원에서 통밀 또는 현미 가루로도 지칭되는 전체 그레이인 가루의 샘플을 식물로부터 수확한 그레이인으로부터 제조하고 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 조성 분석을 위해 사용하였다. 밀가루의 대략적인 분석 결과는 중복 측정의 수단을 보여주는 표 3에 나타낸다.

[0570] 대략적인 분석은 *tal-1* 돌연변이체 밀가루 내 총 지방 함량이 약 30% 증가함을 나타냈다. 총 질소 분석은 *tal-1* 돌연변이체와 야생형 그레이인 사이의 단백질 수준에 유의적인 변화가 없음을 보여주었다. 제습된 밀가루 샘플의 연소 후 남겨진 물질의 양을 측정한 회분 검정은 야생형에 비해 *tal-1* 그레이인이 20% 증가하였음을 입증하였다. 총 섬유 수준은 *tal-1* 그레이인에서 약 94%까지 증가하였다. 전분 함량은 야생형에 비해 *tal-1* 그레이인에서 5% 감소하였다. 이들 데이터는 *tal-1* 돌연변이체에서 호분층의 두께 증가가 종자의 크기를 변화시키지 않고 호분이 풍부한 지질, 미네랄 및 총 식이 섬유와 같은 영양물의 수준을 증가시켰음을 입증하였다. 이들 변화와 다른 변화를 보다 자세히 이해하기 위해 다음과 같이 보다 광범위한 분석을 수행하였다.

[0571] [표 3] 벼 그레이인의 조성 분석 (g/그레이인 100 g)

샘플	과산화	과산화	전분	지방	과산화	산소	섬유	가용성 섬유	전분
ZH 11	9.54	1.79	15.3	3.30	66.0	1.02	1.6	0.7	2.9
<i>tal-1</i>	9.19	2.14	15.8	4.28	62.7	1.84	3.1	0.6	3.7

[0572] 추가 조성 분석은 도 4에 기록되어 단백질, 식이 섬유, 칼슘, 철, 아연, 비타민 B2 및 비타민 B3에서 현미 가루의 통계적으로 유의적인 증가를 확인한다.

[0574] 미네랄

[0575] 미네랄 함량을 측정하기 위해 유도적으로 커플링된 플라즈마(ICP)와 원자 방출 분광측정(AES) 기술을 조합한 ICP-AES를 사용하였다(실시예 1). 이것은 미네랄 함량을 측정하기 위한 표준 방법으로, 단일 분석에서 많은 수의 원소에 대한 민감하고 높은 처리량 정량을 제공한다. 분석으로부터 수득된 데이터는 *tal-1* 돌연변이체 그레이인의 아연 수준이 13.9mg/kg에서 15.68mg/kg으로 약 15% 증가함을 보여주었다. 필드에서 재배한 *tal-1* 전체 그레이인 가루의 동일한 샘플에서 철은 12.43mg/kg에서 13.03mg/kg으로 5% 증가하였다.

[0576] 칼륨, 마그네슘, 인 및 황의 증가도 각각 약 26%, 23%, 22% 및 10% 증가한 것으로 관찰되었다. 이들 결과는 대부분 미네랄을 측정된 *tal-1* 그레이인의 회분 함량 증가와 일치하였다.

[0577] 항산화제

[0578] 항산화제는 동물 조직에서 산화의 음성 효과를 상쇄할 수 있는 생분자로 염증, 심혈관 질환, 암 및 노화 관련 장애와 같은 산화 스트레스 관련 질환으로부터보호한다(참조: Huang, 2005).

[0579] *tal-1* 돌연변이체 및 야생형 벼 그레이인으로부터 수득된 통밀 가루의 항산화능은 실시예 1에 기재된 바와 같이 산소 라디칼 흡광도 능력(ORAC) 검정으로 측정하였다. ORAC 검정에서 항산화 능력은 AAPH(2,2'-아조비스(2-아미디노-프로판)디하이드로클로라이드)에 의해 생성된 합성 자유 라디칼에 대한 내인성 라디칼 소거 생분자와 산화 가능한 분자 형광 프로브 플루오레세인 간의 경쟁 동역학으로 나타낸다. 능력은 Trolox 표준(Prior, 2005)에 의해 생성된 AUC와 그레이인에 대한 분자 프로브 플루오레세인의 형광 분해 동역학을 나타내는 동역학 곡선 이하 면

적(AUC)을 비교하여 계산되었다. 항산화 능력을 정량화하는 또 다른 접근법은 폴린-시오칼토(Folin-Ciocalteu) 시약 (FCR)을 사용하는 것이었고; 이것은 식품 샘플에서 총 페놀류 화합물의 환원 능력을 측정함에 의한 항산화 능력을 나타냈다. FCR 검정은 비교적 간단하고 편리하며 재현 가능하였다. 그러나 더 많은 시간이 소요되는 ORAC 검정은 보다 생물학적으로 관련된 활성을 측정하였다. 항산화제는 광범위한 폴리페놀, 환원제 및 친핵체를 포함하기 때문에 FCR 및 ORAC 둘 다에 의한 측정은 전체 항산화 능력에 보다 양호한 적용범위를 제공하고 보다 포괄적으로 나타낼 수 있다. 문헌(참조: Prior (2005))에 의해 보고된 바와 같이, FCR 검정 및 ORAC 측정 결과는 일반적으로 일치한다.

[0580] FCR 및 ORAC 검정 둘 다는 야생형인 ZH11 전체 그레인 가루에 비해 *tal-1* 돌연변이체 전체 그레인 가루로부터의 밀가루의 증가된 항산화 능력을 보여주었다. ORAC는 *tal-1* 돌연변이체 그레인에서 항산화 능력이 약 46% 증가하고 총 페놀류가 30% 증가함을 입증하였다.

[0581] 피테이트

[0582] 적절한 인이 있는 조건에서 성장시키는 경우 벼 그레인에 있는 총 인 함량의 약 70%는 파이테이트 또는 피트산 (미오-이노시톨-1,2,3,4,5,6-핵사키스포스페이트)의 형태로 있다. 식이성 피테이트는 또한 강력한 항산화제로서 건강에 유익한 역할을 할 수 있다(참조: Schlemmer, 2009). 전체 피테이트 분석은 야생형 ZH11 그레인과 비교하여 *tal-1* 그레인에서 약 15%까지 피테이트 함량이 증가하여 약 10.8 mg/g에서 약 12.4 mg/g으로 증가함을 보여주었다.

[0583] B 비타민

[0584] *tal-1* 밀가루에서 비타민 B3(니아신), B6(피리독신) 및 B9(엽산)의 수준은 야생형 밀가루에서 보다 각각 약 9%, 120% 및 61% 더 높았다. 호분은 배유보다 비타민 B3, B6 및 B9가 더 풍부한 것으로 알려져 있고(참조: Calhoun, 1960), *tal-1* 돌연변이체 그레인의 호분 두께 증가는 이러한 비타민과 아마도 다른 비타민에 대해 더 강력한 싱크를 생성할 가능성이 있었다.

[0585] 탄수화물

[0586] *tal-1* 그레인의 전분 함량은 중량 기준으로 6% 감소하였다. 대조적으로, 슈크로스 수준은 돌연변이체 그레인에서 76% 증가하였다. 중성 비전분 폴리사카라이드(NNSP)는 48% 증가하였고, NNSP의 모노사카라이드 성분(아라비노스, 크실로스, 갈락토스, 글루코스)은 모두 야생형에 비해 42%에서 59%로 증가하였다.

[0587] 결론

[0588] 영양 분석 결과, 필드에서 성장시킨 *tal-1* 그레인으로부터 생성된 전체 그레인 가루가 지질 및 섬유와 같은 매크로-영양물, 적어도 철, 아연, 칼륨, 마그네슘, 인 및 황 수준을 포함하는 미네랄과 같은 마이크로-영양물, B3, B6 및 B9와 같은 B 비타민, 항산화제 및 페놀류 화합물 및 피테이트와 같은 호분 연합된 생분자를 포함하는 대부분의 호분이 풍부한 영양물에서 야생형 밀가루에 비해 상당히 증가하였음을 보여주었다. 자유 슈크로스도 상당히 증가하였다. 이들 영양물 및 미량 영양물의 증가와 일치하여, *tal-1* 돌연변이체의 전분 함량은 중량 기준으로 상대적 퍼센트로 약간 감소하였다.

[0589] 실시예 5. *tal-1* 돌연변이체 그레인의 α -아밀라제 활성 검정

[0590] 시리얼 종자 발아 동안 흡수 후 호분층에서 생성된 α -아밀라제는 배유 전분을 대사 가능한 슈가로 가수분해하여 뿌리와 새싹의 성장을 위한 에너지를 제공하는 데 중요한 역할을 한다(참조: Akazawa 및 Hara-Mishimura, 1985; Beck 및 Ziegler, 1989). *tal* 돌연변이체 그레인은 호분 세포층을 증가시켰기 때문에 발아된 벼 그레인의 α -아밀라제 활성을 수일에 걸쳐 검정하였다. 아밀라제 활성 검정 키트(참조: Sigma, MAK009)를 사용하여 검정을 수행하고 상세한 방법은 하기와 같다.

[0591] 샘플 제조

[0592] 100 mg의 발아된 벼 그레인을 각각 해부하여 묘목을 제거하였다. 나머지 배유 및 호분 조직을 0.5 mL의 아밀라제 검정 완충액에서 균질화하고 혼합물을 13,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 불용성 물질을 제거하였다. 96 웰 플레이트의 웰당 1 - 50 μ L의 샘플을 첨가하고 각 샘플의 용적을 아밀라제 검정 완충액으로 50 μ L로 만들었다. 양성 대조군의 경우 5 μ L의 아밀라제 양성 대조군 용액을 사용하고 아밀라제 검정 완충액을 사용하여 50 μ L로 조정하였다. 웰당 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ L의 2 mm 니트로페놀 표준물로 구성된 표준물을 50 μ L 용적이 되게 하고 0, 4, 8, 12, 16 및 20 nmol/웰 표준물을 생성하였다.

- [0593] 검정 반응
- [0594] 1. 50 mL의 아밀라제 검정 완충액과 50 mL의 아밀라제 기질 믹스를 혼합하여 마스터 반응 믹스를 제조하였다.
- [0595] 2. 마스터 반응 믹스 100 μ L를 각 샘플, 표준물 및 양성 대조군 웰에 첨가하고 각 샘플을 파이펫팅하여 혼합하였다.
- [0596] 3. 2-3분 후(T 초기) 흡광도는 (A405)초기라고 하는 405nm에서 측정하였다.
- [0597] 4. 플레이트를 25℃에서 항온처리하고 5분마다 흡광도(A405)를 측정하였다. 플레이트는 항온처리 동안 광으로부터 보호하였다.
- [0598] 5. 가장 활성이 높은 샘플의 값이 가장 높은 표준 값(20 nmole/웰)보다 클 때까지 측정을 수행하였다. 이때 가장 활성이 높은 샘플은 표준 곡선의 선형 범위의 끝 근처에 있었다.
- [0599] 6. 효소 활성을 계산하기 위해 사용된 최종 흡광도 측정[(A405)최종]은 가장 활성이 높은 샘플이 표준 곡선의 선형 범위의 끝에 근접하기 직전 시점의 값이었다. 두 번째 판독 시간은 T최종으로 지정되었다.
- [0600] 표준 및 샘플의 (A405) 최종 측정값에서 0 니트로페놀 표준물질에 대해 수득된 최종의 측정값(A405)을 공제하여 백그라운드에 대해 보정하였다. T초기 내지 T최종의 흡광도의 변화를 계산하였다: $\Delta A405 = (A405)_{\text{최종}} - (A405)_{\text{초기}}$
- [0601] 각각의 샘플의 $\Delta A405$ 는 표준 곡선과 비교하여 T초기 내지 T최종 사이에 아밀라제에 의해 생성된 니트로페놀(B)의 양을 측정하였다. 샘플의 아밀라제 활성은 하기의 수학적식에 의해 결정하였다:
- [0602] 아밀라제 활성 = $B \times \text{샘플 희석 인자}$
- [0603] (반응 시간) $\times V$
- [0604] $B = T_{\text{초기}}$ 와 $T_{\text{최종}}$ 사이에 생성된 니트로페놀의 양(nmole)
- [0605] 반응 시간 = $T_{\text{최종}} - T_{\text{초기}}$ (분)
- [0606] $V =$ 웰에 첨가된 샘플 용적(mL)
- [0607] 각각의 샘플에 대한 아밀라제 활성은 nmole/min/mL (밀리유닛)으로서 나타났다. 아밀라제 1유닛은 25℃에서 분당 1.0 μ mole의 p-니트로페놀을 생성하기 위해 에틸렌-pNP-G7을 절단하는 아밀라제의 양이다.
- [0608] 검정 결과(도 5)는 발아된 *tal-1* 그레인인 ZH11에 비해 3일 이후부터 α -아밀라제 활성이 보다 높았고, 증가 정도는 시간이 지남에 따라 증가하였고, 흡수 개시 후 7일에 가장 컸다(DAG).
- [0609] 실시예 6. 유전학적 맵핑 및 서열 분석에 의한 *TAL* 유전자 및 *tal-1* 돌연변이의 동정
- [0610] 유전자 맵핑을 위한 SSR 및 Indel 마커의 동정 및 용도
- [0611] 유전자 맵핑을 위해 Japonica 품종 ZH11의 유전학적 백그라운드에서 *tal-1* 돌연변이를 포함하는 식물과 Indica 품종 NJ6의 식물 사이의 유전학적 교배로부터 식물의 F2 집단을 생성하였다. ZH11과 NJ6 사이에 다형성이 있고 이어서 유전자 맵핑에 사용할 수 있는 유전학적 마커를 동정하기 위해, 동형접합성 ZH11 식물, 동형접합성 NJ6 식물 및 DNA의 1:1 혼합물로부터의 DNA 샘플에 대해 하나의 세트의 PCR 실험을 수행하였다. 겔 전기영동에 의한 PCR 생성물의 분석은 다형성 마커를 동정하기 위해 ZH11, NJ6 및 혼합물로부터의 생성물의 비교를 허용하였다. 프라이머 쌍은 별도의 ZH11 및 NJ6 DNA를 사용한 증폭이 별개의 다른 증폭 생성물을 나타내고 혼합된 DNA가 2개 산물의 조합을 나타내는 경우에만 유전자 맵핑을 위해 선택되었다. 이로써 54개의 삽입-결실 다형성 (INDEL) 및 70개의 짧은 서열 반복체 (SSR) 다형성을 포함하는 총 124개의 프라이머 쌍이 선택되었다. 이러한 유전학적 마커는 벼 게놈을 따라 약 3-4Mbp 간격으로 분포되었고 유전자 맵핑에 대한 좋은 적용 범위를 제공하였다.
- [0612] *tal-1* 대립유전자의 유전학적 맵핑을 위해 F2 집단으로부터의 132개 식물을 124개의 다형성 마커로 스코어링하였다. 호분 표현형에 대한 맵핑 집단에서 개별 F2 식물의 동형접합성 또는 이형 접합성은 각 F2 식물에서 수득된 F3 자손 그레인의 표현형 분석에 의해 신중하게 평가되었다. DNA는 실시예 1에 기재된 바와 같이 추출하였다. PCR 증폭은 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행하였고 생성물은 3% 아가로스를 통한 겔 전기영동에 의해 분리된다. 결과로부터 *tal* 유전자좌는 대략 400kb의 물리적 거리에 상응하는 벼의 게놈 서열로부터 5번 염색체의

마커 Indel 537과 Indel 541 사이에 위치한다는 결론을 내렸다(도 6).

[0613] 또 다른 8000 F2 식물은 상기 쌍의 마커를 사용하여 스크리닝하였다. 1076개의 개체를 동정하고 선택하였고, 이는 Indel 537과 Indel 541 마커 사이에 재조합을 나타냈다. 이들 재조합 식물이 표현형화되었을 때, *tal* 유전자는 Indel 562와 Indel 583 마커 사이에 있는 28kb 영역에 매핑되었다(도 6).

[0614] *tal-1* 돌연변이체 식물에서 상기 영역의 뉴클레오타이드 서열을 획득하고 이를 야생형 서열과 비교하여 *tal-1* 대립유전자에 상응하는 돌연변이를 동정하기 위해 게놈 영역을 플랭킹하는 프라이머를 디자인하고 DNA 서열분석을 수행하였다. 게놈 DNA 서열의 비교는 벼 게놈 서열(EnsemblPlants)에 Os05g0509700으로 주석이 달린 유전자의 서열분석된 영역에서 단일 염기 다형성(SNP)을 확인시켜 주었다. 상기 유전자는 위치 염색체 5에 있다: 미토콘드리아 ssDNA 결합 단백질로서 주석이 달린 역배향 가닥을 갖는 25,254,990-25,259,747. 동일한 유전자는 UniPARC 게놈 서열에서 Japonica 유전자 Os05g0509700에 연결된 단백질에 대해 LOC_Os05g43440으로 주석이 달렸다. 단일 뉴클레오타이드 G(야생형)에서 A로의 다형성은 Japonica 품종의 EnsemblPlants 벼 게놈 서열을 참조하여 뉴클레오타이드 위치 Chr5:25257622에서 확인되었다. 서열번호 4를 참조로 이러한 뉴클레오타이드 치환 G2126A는 염색체 5에서 Os05g0509700 유전자의 엑손 4와 엑손 5 사이에 있는 인트론 IV의 마지막 뉴클레오타이드였다(도 6, 가장 낮은 줄). 인트론 넘버링은 Os05g0509700의 단백질 암호화 영역 주석에서 취해졌고 유전자의 5'-UTR에 긴 인트론을 포함하지 않는다. 돌연변이가 스플라이스 부위 내에서 인트론의 마지막 뉴클레오타이드와 관련되어 있기 때문에, 본원 발명자들은 돌연변이가 *TAL* 유전자의 스플라이싱 파괴를 수반하는 것으로 의심하였다. 하기 기재된 후속 실험에서 상기 다형성이 *tal-1* 돌연변이임을 확인하였다.

[0615] 상기 실험은 또한 *tal-1* 돌연변이가 예를 들어 Indica 품종과 같은 다른 유전학적 배경에 도입될 수 있고, 여전히 두꺼운 호분 표현형을 부여할 수 있음을 보여주었다.

[0616] 실시예 7. *tal-1* 돌연변이의 특성

[0617] *tal-1* 유전자의 발현 및 스플라이싱을 분석하기 위해, 실시예 1에 기재된 바와 같이 *tal-1* 식물로부터의 잎 및 발육 중인 그레인에서 RNA를 추출하였다. RNA를 조합하고, 역전사하고, 개별 cDNA의 뉴클레오타이드 서열을 획득하였다. *tal-1* cDNA I, II 및 III으로 지정된 *tal-1* cDNA로부터 3개의 상이한 cDNA 서열을 획득하였고, 각각은 ZHI1로부터의 야생형 cDNA 서열과 상이한 서열을 갖는다. 야생형 cDNA(서열번호 2)와 *tal-1* cDNA 뉴클레오타이드 서열의 비교는 뉴클레오타이드 위치 2126에서 인트론 IV의 G에서 A로의 다형성(G2126A)이 1 그레인에서 3개의 상이한 성숙 mRNA와 연관되어 있음을 보여주었다. 이것과 아래에 설명된 추가 분석으로부터, 발명자들은 이들 변이체가 *tal* 전사체의 대안적 스플라이싱 때문에 발생했다고 결론지었다.

[0618] 3개의 *tal-1* 전사체를 돌연변이 부위 및 이에 따른 대안적 스플라이싱 영역에 걸쳐 있는 올리고뉴클레오타이드 프라이머(서열 번호 58 및 서열 번호 59)를 사용한 RT-PCR로 추가로 분석하였다. 이어서 PCR 생성물을 회수하여 Blunt 벡터에 클로닝한 다음 개별 클론의 뉴클레오타이드서열분석을 수행하였다. 도 7은 야생형 cDNA 서열과 정렬된 돌연변이 부위에 걸친 cDNA 영역의 정렬된 서열을 보여준다. cDNA I, II 및 III은 엑손 4의 끝, 즉 인트론 IV의 시작 부분까지 야생형 cDNA와 동일한 염기 서열을 가졌으나 cDNA I에서 인트론 IV의 마지막 31개 뉴클레오타이드의 삽입 또는 엑손 5 서열의 결실(cDNA II) 또는 엑손 5의 시작 부분에서 단일 뉴클레오타이드의 결실(cDNA III)로 다양화된 것으로 관찰되었다. *tal-1* cDNA I(서열번호 12)는 엑손 5 바로 앞에 31bp 삽입을 갖고 있기 때문에, 상기 cDNA는 아미노산 위치 182에서 해독 프레임전환으로 부터 비롯되어 야생형 *TAL* 단백질의 아미노산 서열(서열번호 3)에 비해 위치 193에서 미성숙한 해독 정지 코돈을 유도하는 폴리펩타이드(서열번호 8)를 암호화하였다. *tal-1* cDNA II(서열번호 13)는 전체 엑손 5의 결실을 갖고 있기 때문에, 상기 cDNA는 아미노산 위치 182에서 해독 프레임전환으로 부터 비롯되어 위치 186에서 미성숙한 해독 정지 코돈을 유도하는 폴리펩타이드(서열번호 9)를 암호화하였다. *tal-1* cDNA III(서열번호 14)는 엑손 5에서 첫 번째 G 뉴클레오타이드의 결실을 갖고 있기 때문에, 상기 cDNA는 위치 182에서 해독 프레임전환으로 인해 비롯되어 야생형 *TAL* 단백질에 비해 185번 아미노산에서 미성숙한 해독 정지를 유도하는 폴리펩타이드(서열번호 10)를 암호화하였다. 예측된 전장 아미노산 서열은 도 8에서 야생형 *TAL* 서열과 비교하였다.

[0619] *tal-1* I, II 및 III cDNA의 상대적 풍부성은 각각 전체 전사체의 67%, 29% 및 4%였다. cDNA 분석에 의해 *tal-1* 돌연변이체 식물의 잎과 발육 중인 그레인에서 야생형 전사체가 검출되지 않았고; 본 발명자들은 야생형 스플라이싱이 폐지된 돌연변이체 식물에서 야생형 mRNA의 부재로부터 결론을 내렸다. 아래에 기재된 다음 실험의 데이터에 의해 *tal-1* 유전자의 인트론 IV의 다형성이 원인이 되는 변화, 즉 해당 식물과 그레인의 *tal-1* 돌연변이라는 것이 확인된 이들 데이터로부터 결론을 내렸다. 또한 돌연변이는 야생형 *TAL* 유전자에 비해 *tal-1* 유전자의 RNA 전사체의 스플라이싱 패턴의 변화를 초래하여 *tal-1* 대립유전자에 대한 *tal* 돌연변이체 표현형을 야기한다

고 결론지었다.

[0620] 벼 게놈의 염색체 5에서 위치 Os05g0509700에서의 유전자는 미토콘드리아 표적화된 단일 가닥 DNA 결합 단백질 을 암호화하는 아라비도프시스 탈리아나 mtSSB-1 유전자 (AtmtSSB-1)의 동족체인 벼 mtSSB-1a 유전자(OsmtSSB-1a)로서 주석이 달렸다(참조: Edmondson 등, 2005).

[0621] 야생형 벼 mtSSB-1a(TA1) 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 프로모터 및 1024 뉴클레오타이드의 5'-UTR(해독되지 않은 영역), 5개의 인트론과 411개의 뉴클레오타이드 3'-UTR을 포함하는 뉴클레오타이드 1025-2369의 단백질 암호화 영역을 포함하는 서열번호 1로서 제공된다. 5개 인트론의 뉴클레오타이드 위치는 서열번호 1에 대한 범례에서 제공된다. 야생형 *TA1*(OsmtSSB-1a) 유전자에 상응하는 cDNA의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2로서 제공되고, 206개 아미노산의 암호화된 야생형 *TA1* 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 3으로서 제공된다.

[0622] 야생형 벼 TA1 폴리펩타이드의 구조적 특성에 대한 기재.

[0623] 벼 *TA1* 유전자가 OsmtSSB-1a와 동일한 것을 확인한 후, OsTA1(OsmtSSB-1a) 폴리펩타이드 아미노산 서열을 조사하였다. 서열번호 3의 아미노산 73-184에 상응하는 하나의 전형적인 단일 가닥 DNA 결합 도메인이 동정되었다(도 9). 아미노산 서열을 속씨식물, 즉 제아 메이스(*Zea mays*)(서열번호 16), 소르굼 바이컬러(*Sorghum bicolor*)(서열번호 17), 호르데움 불가레(*Hordeum vulgare*)(서열번호 18), 트리티쿰 아에스티쿰(*Triticum aestivum*)(서열번호 19) 및 시리얼과 관련된 모델 단자엽 식물인 브라키포디움 디스타키온(*Brachypodium distachyon*)(서열번호 20), 모델 쌍자엽 식물인 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)(서열번호 15), 및 모델 트리(tree)인 포플러(서열번호 21)을 광범위하게 대표하는 7개 기타 식물 종의 게놈에 의해 암호화된 가장 상동성인 서열과 비교하였다. 잘 어셈블리되고 주석이 달린 게놈 서열은 이들 중에 대해 가용하였다. mtSSB 아미노산 서열이 정렬되었을 때(도 9), SSB 도메인이 N-말단 및 C-말단 플렉싱 서열 보다 OsTA1의 SSB 도메인의 112개 아미노산에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 보다 고도로 보존된 것이 명백하였다. 서열번호 3의 전체 길이에 대한 전체 아미노산 서열 동일성은 단자엽 TA1 서열에 대한 적어도 79%를 포함하는 적어도 60%이었다. 도 9에 나타난 9개의 *TA1* 폴리펩타이드에 대한 SSB 도메인은 서열번호 3의 아미노산 73-114에 상응하는 보존된 아미노산 모티프 FRGVHRAI(I/L)CGKVGQ(V/A)P(V/L)QKILRNG(R/H)T(V/I)T(V/I)FT(V/I)GTGGMFDQR (모티프 I, 서열번호 45), 서열번호 3의 아미노산 122-135에 상응하는 P(K/M)PAQWHRI(A/S)(V/I)H(N/S)(D/E) (모티프 II, 서열번호 46), 서열번호 3의 아미노산 141-164에 상응하는 AVQ(K/Q)L(V/T)KNS(A/S)VY(V/I)EG(D/E)IE(T/I)R(V/I)YND (모티프 III, 서열번호 47) 및 서열번호 3의 아미노산 176-184에 상응하는 IC(L/V/I)R(R/G)DGKI (모티프 IV, 서열번호 48)을 포함하였다. 이들 4개의 모티프는 포플러 서열을 제외한 각 모티프 사이의 간격과 마찬가지로 정렬된 *TA1* 서열 9개 모두에서 완전히 보존되었다(도 9). 4개의 모티프와 이들의 간격은 식물에서 *TA1* 폴리펩타이드의 완전한 기능을 위해 필요할 가능성이 높다고 결론지었다.

[0624] 식물 설정을 사용하여 Mitofates 소프트웨어로 OsmtSSB-1a 아미노산 서열(서열번호 3)을 분석했을 때, 서열번호 3의 아미노산 28과 29 사이에서 미토콘드리아 프로테아제 절단 부위가 예측되었고(도 9), 178개 아미노산의 성숙한 폴리펩타이드를 생성하기 위해 벼 세포에서 미토콘드리아로 진입시 제거될 폴리펩타이드의 N-말단 말단에 28개 아미노산의 미토콘드리아 전이 펩타이드의 존재를 예측한다. 이것은 AtmtSSB-1의 아라비도프시스 서열에 대한 예측과 비교하여 하나의 아미노산 잔기 내에서 정렬된 부위를 예측하였다(참조: Edmondson 등, 2005).

[0625] 야생형 *OsTA1*(OsmtSSB-1a) 폴리펩타이드의 DNA 결합 도메인의 마지막 3개 아미노산(GKI)이 DNA 결합 도메인 후 *TA1* 폴리펩타이드의 C- 말단 영역 뿐만 아니라, *tal-1* cDNA I, II 및 III의 예측된 해독 생성물에서 누락된 것으로 나타났다(도 6).

[0626] 실시예 8. 벼에서 TA1 유전자의 발현

[0627] 발육 중인 그레이의 일부, 특히 배아, 전분이 많은 배유 및 호분을 포함하는 상이한 벼 조직에서 *TA1* 유전자의 발현을 분석하기 위한 실험을 수행하였다. 제1 실험에서 *TA1* mRNA는 문헌(참조: Brewer 등 (2006))에 기재된 바와 같이 동일계 하이브리드화에 의해 벼 조직 절편에서 검출하였다. 간략하게, 다양한 벼 조직을 진공 침윤 후 4℃에서 8시간 동안 FAA 고정액에 고정시키고, 단계별 에탄올 계열에 이어 크실렌 계열을 사용하여 탈수시키고, 실시예 1에 기재된 바와 같이 파라플라스틱 플러스(Paraplast Plus)(Sigma-Aldrich)에 포매하였다. 8μm 두께의 마이크로톰 절편을 프로브-온 플러스(Probe-On Plus) 현미경 슬라이드(Fisher)에 탑재하였다.

[0628] 하이브리드화 신호로부터, TA1 유전자가 종피, 호분 조직에서 및 발육 중인 그레이의 배아에서 발현되지만 관다발에서는 발현되지 않는 것으로 결론지었다. TA1은 발육 중인 꽃차례에서도 발현되었지만 잎과 줄기에서는 발현

되지 않았다.

[0629] 실시간 역전사 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR)을 사용하여 다양한 식물 조직에서 상대적인 발현 수준을 검정하였다. 발현 수준은 동일한 조직에서 항상성으로 발현되는 유전자인 액틴 유전자의 발현에 대해 정규화하였다. 놀랍게도, 그 결과는 꽃가루에서 가장 높은 상대적 발현을 나타냈고, 배아, 싹 정단 분열 조직 및 호분 조직이 그 뒤를 이었다(도 10). 활성 성장 조직에서 *TAI*의 특정 발현이 세포 분열에 관여할 수 있다고 사료되었다. 예측된 SSB 단백질로서 *TAI* 단백질은 단일 가닥 DNA를 보호하고 이러한 활성 성장 조직에서 DNA 복제, 재조합, 전사 및 DNA 복구 동안 다른 관련 단백질을 동원하는 기능을 하는 것으로 간주되었다.

[0630] **실시예 9. *TAI* 단백질의 ssDNA 결합 활성**

[0631] *TAI* 융합 단백질의 정제

[0632] *TAI* 폴리펩타이드의 DNA 결합 활성을 시험관내 시험하기 위해, 실시예 1에 기재된 바와 같이 이. 콜라이네 발현 벡터로부터 N-말단에 6xHis 태그를 갖는 재조합 *TAI* 융합 단백질(6xHis-*TAI*)을 생성하였다. 6xHis 태그는 니켈 컬럼에 결합함에 의해 융합 단백질의 신속하고 단순한 정제가 가능하도록 혼입되었다. 융합 단백질을 발현하는 이. 콜라이 세포를 액체 질소에서 동결하고, 빙상에서 해동하고 30분 동안 초음파 처리(10초 간격으로 5초 펄스)하여 파괴하였다. 6xHis-*TAI* 단백질은 인산칼륨 완충액에서 40% 황산암모늄 염 침전으로 농축시켰다. 침전된 단백질을 재현탁하고 인산나트륨 완충액(50 mM NaPO₄, 500 mM NaCl, pH 7.8)에 대해 밤새 투석하였다. 이어서 단백질을 니켈 컬럼(Bio-Rad)에 부하하고 비결합 단백질을 제거하기 위해 10mM 이미다졸을 포함하는 인산나트륨 완충액으로 광범위하게 세척하였다. 정제된 6xHis-*TAI* 단백질은 인산나트륨 완충액에서 이미다졸의 10-500mM 선형 구배를 사용하여 컬럼으로부터 분리되었다. 분광측정기로 각 분획의 단백질 농도를 결정하고 샘플을 SDS-PAGE로 분리한 다음 쿠마시 블루로 염색하였다. 정제된 6xHis-*TAI* 단백질은 저장 완충액 (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 M NaCl, 50% (v/v) 글리세롤)으로 옮기고 -80℃에서 저장하였다.

[0633] 전기영동 이동성 전환 검정(Electrophoretic mobility shift assay) (EMSA)

[0634] ssDNA에 대한 정제된 6xHis-*TAI* 단백질의 친화성은 문헌(참조: Reddy 등 (2001))에 의한 일반 용어에 기재된 바와 같이 EMSA(Thermo Cat. No. 20148X)를 사용하여 결정하였다. 45개 뉴클레오타이드 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드(서열번호 60)는 제조업체의 지침에 따라 비오틴화된 CTP(Thermo Cat. No. 89818)로 3' 말단에 표지시켰다. 재조합 6xHis-*TAI* 단백질(2 µg)을 750 attomole의 비오틴 표지된 올리고뉴클레오타이드에 첨가하고 혼합물을 실온에서 10분 동안 항온처리하였다. 6xHis-*TAI* 단백질이 부재인 대조군 샘플을 도 11의 레인 1에 적용하였다. 60-bp 이중 가닥 DNA(dsDNA; Thermo EMSA 키트로부터의 제어 단편)의 존재하에 별도의 반응을 수행하여 이동성 전환이 ssDNA에 특이적인지를 결정하였다. 결합 반응 생성물을 0.5xTBE(Bio-Rad)에서 5% 천연 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동으로 분리하고 나일론 막(Bio-Rad)으로 옮겼다. DNA 밴드는 스트렙타비딘-접합된 서양고추냉이 퍼옥시다제(Thermo)를 사용하여 가시화하였다. 도 11에 나타난 바와 같이, 6xHis-*TAI* 단백질은 ssDNA에 결합하고 결합은 표지되지 않은 ssDNA와의 경쟁에 의해 감소하였다. dsDNA는 단일 가닥 DNA(ssDNA)에 대한 *TAI* 단백질의 결합에 대해 경쟁하지 않았고, 이는 단백질이 단일 가닥 DNA 결합(SSB) 단백질로 지정된 것과 일치하는 ssDNA에 대해 특이적임을 보여준다.

[0635] 돌연변이체 *tal-1 I* 폴리펩타이드가 ssDNA에 결합하는 능력을 유지하는지의 여부를 조사하기 위해 N-말단에 6xHis 태그가 있는 *tal-1* cDNA I에 의해 암호화된 예측된 폴리펩타이드를 암호화하고 이. 콜라이에서 발현된 유사한 유전학적 작제물을 제조하였다. cDNA I 서열은 상응하는 mRNA가 돌연변이체 *tal-1* 유전자로부터의 우세한 스플라이싱된 전사체이기 때문에 선택되었고, 이는 *tal-1* 유전자로부터의 전체 전사의 약 70%를 나타낸다. 돌연변이체 6xHis-*tal-1* 융합 폴리펩타이드는 야생형 6xHis-*TAI* 단백질과 동일한 방법으로 정제하였다. ssDNA에 대한 야생형 및 돌연변이체 폴리펩타이드의 결합을 비교하기 위해 상응하는 야생형 단백질에 대해 상기 기재된 바와 같이 EMSA 실험에서 정제된 6xHis-*tal-1 I* 융합 폴리펩타이드를 사용하였다. 결합 실험은 돌연변이체(절단된) 폴리펩타이드가 ssDNA에 결합하지만, 야생형 *TAI* 단백질과 비교하여 약 3-4배 감소된 효율을 가짐을 보여주었다(도 12). *TAI*과 절단된 형태(6xHis-*tal-1 I*) 둘 다는 ssDNA 프로브에 결합할 수 있었지만, 6xHis-*TAI*의 결합 활성은 절단형(6xHis-*tal-1 I*)보다 높았고, 2 µg 6xHis-*TAI*은 8 µg 절단된 6xHis-*tal-1 I* 폴리펩타이드와 유사한 강도의 전환된 프로브를 가졌다. 본 발명자들은 상기 데이터로부터 적어도 *tal-1 I* 폴리펩타이드가 약간의 SSB 활성을 유지하고 *tal-1* 대립유전자가 널 대립유전자가 아니라는 결론을 내렸다. *tal-1* 유전자는 야생형 *TAI* 유전자에 비해 활성이 적어도 67% 감소한 것으로 여겨진다.

[0636] **실시예 10. *tal-1* 돌연변이체의 상보성 분석**

- [0637] TA1 유전자의 돌연변이가 *tal-1* 돌연변이체에서 나타나는 두꺼워진 호분 및 관련 표현형에 관여한다는 결론을 강화하기 위해, 2개의 상보성 실험을 수행하였다. 제1 실험에서 고유 TA1 프로모터를 포함하는 TA1 유전자의 야생형 카피를 아그로박테리움 매개 형질전환에 의해 *tal-1* 돌연변이체 식물에 도입하였다. 도입된 DNA 서열은 일련의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 ZH11 게놈 DNA로부터 증폭시킨 다음, 이분 벡터 pPLV15에 어셈블리하였다. 상기 벡터는 또한 선택가능한 마커 유전자로서 하이그로마이신 내성 유전자를 포함하였다. 형질전환용 플라스미드 및 대조군 플라스미드(공 벡터)를 각각 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 EHA105에 도입하고 문헌(참조: Nishimura 등 (2006))에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 *tal-1* 벼 수용자 세포를 형질전환시키기 위해 사용하였다. 총 53개의 T0 유전자전이 식물은 야생형 TA1 유전자로의 형질전환으로부터 재생하였다. 이들 식물은 토양에 전달하고 성장 챔버에서 성숙화될때까지 성장시켰다. PCR을 사용하여 하이그로마이신 내성 유전자의 존재 여부를 시험한 결과, 하이그로마이신 유전자를 보유한 34개의 형질전환주를 확인하고 선택하였다. 이들은 성숙해질까지 성장시키고 그레인 (T1 종자)은 각각의 식물로부터 수거하였다. 이들 각각의 식물은 PCR 검정에 의해 입증된 바와 같이 야생형 TA1 유전자를 함유하는 벡터로부터의 T-DNA를 함유하였다.
- [0638] 이들 식물로부터 수확한 그레인을 에반 블루로 염색하여 호분 표현형에 대해 조사하였다. 8개의 독립적인 형질전환된 식물이 시험되었고 그들 모두는 야생형과 같은 정상적인 호분을 가진 그레인을 생성하였고, 이는 도입된 유전자의 양성 발현과 따라서 *tal-1* 돌연변이의 상보성을 지적한다. 이것은 결정적으로 TA1 유전자의 돌연변이가 돌연변이체 표현형을 유발한다는 것을 입증하였다.
- [0639] 제2 상보성 실험에서 TA1 프로모터로부터의 발현을 관찰할 수 있도록 제2 유전학적 작제물을 제조하여 형질전환에 사용하였다. 상기 작제물은 야생형 벼 게놈으로부터 단리된 TA1 단백질 암호화 서열 다음에 해독적으로 융합된 GUS 리포터 서열을 포함하였다. 유전학적 작제물은 TA1 유전자의 프로모터를 함유하는 것으로 간주된 3208-bp 업스트림 서열, 모든 인트론을 포함하는 전체 TA1 단백질 암호화 영역, GUS 리포터 코딩 영역이 TA1 서열의 C-말단 및 마지막으로 *nos 3'* 폴리아데닐화/전사 종결 영역에 해독적으로 융합된 GUS 리포터 암호화 영역을 순서대로 포함하는 4,550개 뉴클레오타이드 DNA 단편(서열 번호 49로 제공되는 뉴클레오타이드 서열)을 포함하였다. 상기 GUS 해독 융합은 TA1-GUS 융합 단백질이 발현되는지 여부와 형질전환된 식물의 어느 조직에서 발현되는지 시험하기 위해 디자인되었다.
- [0640] 상기 제2 작제물은 이전과 같이 아그로박테리움 매개 형질전환에 의해 *tal-1* 식물에 도입하였다. 발육 종자를 포함하는 형질전환된 식물의 다양한 조직은 GUS 활성에 대해 염색하였다. 유전자전이 식물의 호분 및 배아에서 TA1-GUS 융합 유전자의 발현 패턴을 도 13에 나타낸다. GUS 활성은 특히 DAP 5-11일에 유전자전이 식물의 호분 및 발육 중인 벼 그레인의 배아에서 관찰되었다. GUS의 강한 발현은 18 및 24 DAP의 배아에서 여전히 관찰되었고, 이들 시점에서 호분에서 약한 발현이 관찰되었다. 매우 낮은 수준의 발현만이 배아에서 나타났다.
- [0641] 고유 TA1 프로모터의 제어 하에 TA1-GUS 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 유전학적 작제물은 또한 *tal-1* 돌연변이를 보완하여 정상적인 야생형 호분 표현형을 가진 식물을 수득한다. 이것은 *tal-1* 식물에서 동정된 돌연변이가 두꺼운 호분 표현형에 관여함을 추가로 확인하였다. 또한 TA1 폴리펩타이드에 대한 GUS 융합 C-말단은 TA1 기능을 손상시키지 않는다는 결론을 내렸다.
- [0642] **실시예 11. TA1 단백질의 세포내 국소화**
- [0643] 야생형 벼 TA1 폴리펩타이드(서열번호 3)의 단백질 암호화 영역과 CaMV 35S 프로모터의 제어하에 벡터 내 녹색형광 단백질 (GFP)의 단백질 암호화 영역 및 식물 세포에서 일과성 발현을 위해 디자인된 *nos 3'* 폴리아데닐화 영역/전사 종결인자에 융합된 유전학적 작제물을 제조하였다. 상기 작제물은 이어서 담배 잎에 도입하여 이의 GFP 형광성을 통해 융합 단백질의 세포내 국소화를 결정하였다. 도입된 융합 유전자를 발현하도록 방치한 수일 후, GFP 신호의 국소화는 미토콘드리아 특이적 염색, Mito 추적자로부터의 것과 비교하였다. 공초점-형광성 현미경에 의해, 잎 상피 세포에서 작제물로부터 발현된 TA1-GFP 융합 단백질이 Mito 추적자 염색으로 동시에 국소화되는 것으로 관찰되었다. TA1 단백질은 OsmtSSB-1a로서의 대체 명칭과 일치하는 미토콘드리아 국소화를 제공하는 N-말단 미토콘드리아 수송 펩타이드(MTP)를 갖는다고 결론지었다. 이들 데이터 및 결론은 MTP 서열의 존재에 관한 실시예 7에 기재된 분석과 일치하였다.
- [0644] **실시예 12. *tal* 벼 호분에서 미토콘드리아 기능과 에너지 항상성**
- [0645] 야생형 TA1 단백질의 미토콘드리아 국소화 및 발육 중인 그레인에서 세포의 미토콘드리아에서 SSB 단백질로서의 명백한 기능을 고려하여, 본원 발명자들은 발육 중인 *tal-1* 그레인의 호분에서 미토콘드리아를 조사하였다. 투

과 전자 현미경으로 15 DAP에서 호분 세포를 조사한 결과 돌연변이체 그레인의 미토콘드리아가 비정상적인 모양과 형태를 가짐을 보여주었다. 미토콘드리아는 야생형 호분의 보다 길어진 모양에 비해 모양이 보다 환형이고 뚜렷하고 잘 발육된 크리스타를 가진 동일한 내부 구조를 갖지 않았다.

[0646] 미토콘드리아의 수는 *tal-1*과 야생형 그레인의 15 DAP 영과의 호분 세포의 각 절편에서 계수하였다. 11 DAP에서 야생형 및 *tal-1* 호분에서 ATP 함량을 또한 측정하였다. 그 결과(도 14)는 야생형과 비교하여 *tal* 호분 세포의 미토콘드리아 수가 증가했지만 ATP 함량은 유의적으로 감소함을 보여주었다.

[0647] 추가로, *tal-1* 그레인의 전사체를 야생형과 비교했을 때 해당과정, 산화적 인산화 및 시트레이트 사이클에 관여하는 수많은 유전자가 *tal-1* 그레인에서 상향 조절되는 것으로 관찰되었다.

[0648] 본원 발명자들은 이들 데이터로부터 *TAI* 유전자의 돌연변이가 미토콘드리아의 수 증가와 관련된 결합된 미토콘드리아 기능을 유도하고, 발육 중인 그레인의 세포가 돌연변이체 *tal* 유전자 및 관련된 감소된 mtSSB 단백질의 기능을 보상하려고 하기 때문에 미토콘드리아 기능과 관련된 유전자를 상향조절한다는 결과를 내렸다.

[0649] **실시예 13 *TAI* 유전자에서 추가의 돌연변이체 대립유전자에 대한 스크리닝**

[0650] *TAI* 유전자의 가능한 녹아웃(널) 돌연변이를 포함하는 추가 돌연변이를 제공하기 위해 다음과 같이 CRISPR-Cas9 유전자 편집 방법을 사용하였다. 4개의 별도의 CRISPR 작제물은 야오광 리우 박사(참조: School of Life Science, South China Agricultural University, China)에 의해 제공된 벡터 pYLCRISPR/Cas9-MH를 변형시킴에 의해 제조하였다. 첫번째로, 4개의 20개 뉴클레오타이드 영역 각각에 바로 이어서 3-뉴클레오타이드 PAM(프로토스페이서 인접 모티프) 서열은 잠재적 가이드 RNA (gRNA) 표적 서열로서 *TAI* cDNA 뉴클레오타이드 서열로부터 동정되었다. Casg1, Casg2, Casg3 및 Casg4로 지정된 gRNA 표적은 각각 제2 (g1 및 g2), 제3 (g3) 및 제4 (g4) 엑손에서 돌연변이를 제조할 목적으로 선택하였다. 이어서 gRNA 표적이 gRNA 백본에 통합되고 벡터로부터의 U3 프로모터에 의해 구동되는 gRNA 표적 구조물을 합성하였다. 합성된 DNA는 제한 효소 BsaI를 사용하여 절개하고 pYLCRISPR/Cas9-MH 벡터에 삽입하였다. 이어서 합성 유전자 작제물을 단리하고 아그로박테리움 균주 EHA105로 형질전환시켰다. 벡의 형질전환은 문헌(참조: Transformation of rice was performed by the method by Nishimura 등 (2006))에 의한 방법에 의해 수행하였다. 유전자전이 벡 식물은 형질전환된 칼리(calli)로부터 재생하였다. 돌연변이체 식물의 종자는 호분 층 세포 수를 분석하기 위해 성숙한 영과를 박편 절개함에 의해 이들의 호분 표현형에 대해 조사하였다.

[0651] 표 4는 CRISPR/Cas9 방법을 사용하여 생성된 적어도 13개 독립적 계열을 포함하는 28개 계열에서 *TAI* 돌연변이를 열거한다. 이들 모든 계열은 단백질 암호화 영역 내에 프레임전환 돌연변이를 갖고 있어서 조기 해독 종료를 유발하는 정지 코돈을 초래하고 따라서 널 돌연변이를 가질 것이다. 중요하게도, 모든 돌연변이체 계열의 종자는 두꺼운 호분 표현형을 보여주었다. 일부 돌연변이체 계열의 그레인은 추가로 하나 이상의 백악질 배유, 감소된 종자 세트 및 감소된 1000개 그레인 중량을 포함하여 야생형에 비해 다른 표현형 변화를 가졌다. *TAI* 유전자(서열번호 1, 서열번호 3 및 상동성 *TAI* 유전자를 암호화함)의 널 대립유전자가 두꺼운 호분 및 연관된 표현형을 부여한다고 결론지었다. 벡와 시리얼을 포함한 다른 식물에서 유전자 편집 기술의 현재 효율성으로 CRISPR 또는 TALENs를 사용하는 것과 같은 유전자 편집은 두꺼운 호분 표현형을 수득하기 위해 바람직한 방법이다.

[0652] [표 4] CRISPR/Cas9 방법을 사용하여 생성된 *TAI* 녹아웃 돌연변이체

표적	계열	<i>TAI</i> 에서 돌연변이	추정 <i>tal</i> 단백질	표현형
g1	3, 30	T 삽입	112 aa 에서 정지	두꺼운 호분
	13, 16, 23, 24, 26	T 결실	80 aa 에서 정지	두꺼운 호분
	4, 5	44 bp 결실	93 aa 에서 정지	두꺼운 호분
	21	C 삽입	112 aa 에서 정지	두꺼운 호분
	27	G 삽입	112 aa 에서 정지	두꺼운 호분
g2	1, 2, 5	A 삽입	112 aa 에서 정지	두꺼운 호분
	10, 12, 16, 17, 26, 27	T 삽입	112 aa 에서 정지	두꺼운 호분
	15	C 삽입	112 aa 에서 정지	두꺼운 호분
g3	31	T/A 삽입	134 aa 에서 정지	두꺼운 호분
	43	T 결실	130 aa 에서 정지	두꺼운 호분
g4	3, 5, 11	C/T 삽입	183 aa 에서 정지	두꺼운 호분
	8	A 삽입	183 aa 에서 정지	두꺼운 호분
	16	CG 결실	182 aa 에서 정지	두꺼운 호분

[0653]

[0654] **실시예 14. *TAI* 단백질은 RECA3 및 TWINKLE 폴리펩타이드와 연합한다**

[0655] SSB 단백질은 DNA 복제, 밀접하게 관련되거나 동일한 염색체 간의 상동 재조합 및 DNA 복구에 중요한 역할을 한다. 세균에서 RecA 단백질은 상동성 가닥 교환을 촉매하고 SSB 단백질은 능히 DNA 가닥 분리를 안정화시켜 반응을 증진시킨다. 미토콘드리아 SSB 단백질은 식물 세포에서 다중 미토콘드리아 게놈의 복제 및 재조합에서 유사한 역할을 하는 것으로 간주된다(참조: Edmondson 등, 2005). 미토콘드리아 DNA 복제는 식물 소기관 DNA 폴리머라제 또는 POP(Moriyama 및 Sato, 2014)로 알려진 DNA 폴리머라제, RNA 프라이머를 합성하는 역할을 하는 프리마제, 지라제라고도 하는 DNA 토포이소머라제, mtSSB 및 TWINKLE이라고도 알려진 이중 가닥 DNA를 푸는 헬리카제를 요구한다. 미토콘드리아에 국소화된 식물에서 TWINKLE 효소는 프리마제 및 헬리카제 활성 둘 다를 갖고 이들은 이. 콜라이 DNA 폴리머라제 I에 의해 고분자량 DNA로 연장되는 적어도 15개 길이의 뉴클레오타이드의 RNA 프라이머를 합성할 수 있다(참조: Diray-Arce 등, 2013).

[0656] 속씨식물의 여러 미토콘드리아 염색체는 특히 반복되는 서열을 포함하여 종종 재배열 및 재결합하여 다수의 서열 복제, 역위, 결실 및 삽입을 생성한다(참조: Gualberto 및 Newton, 2017). 여러 핵 유전자는 미토콘드리아 DNA 재조합 및 게놈 안정성을 조절하는 것으로 공지되어 있다. 일반적으로 이들 유전자는 DNA 복제, 재조합 또는 복제의 충실도에 영향을 미치는 단백질을 암호화하고, 이러한 유전자에서 돌연변이체는 종종 미토콘드리아 DNA의 재조합된 대안적 구성의 축적을 초래한다. 이들 단백질은 세균의 RecA와 유사하게 가닥 교환을 촉매하는 리컴비나제를 포함한다. 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)는 3개의 RecA-유사 단백질 (RECA1-RECA3)을 갖는다(참조: Shedge 등, 2007). RECA1은 모든 식물에서 보존되고 색소체에 표적화된다. RECA2는 개화 식물과 이끼에 존재하고 미토콘드리아와 색소체 둘 다에 표적화한다. 대조적으로, RECA3 단백질은 미토콘드리아에만 표적화된다. 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)에서, *recA2* 및 *recA3* 돌연변이 둘 다는 중간 크기의 반복체에 걸쳐 증가된 이소성 재조합을 촉발한다. RecA2 돌연변이는 일반적으로 초기 묘목 단계에서 치

명적인 반면, *recA3* 녹아웃 식물은 일반적으로 1세대에서는 표현형이 정상이지만 이후 세대에서는 효과를 보여 줄 수 있다.

[0657] 따라서 본원 발명자들은 TWINKLE 및 RECA3가 벼에서 TA1과 동일한 과정에 관여할 수 있는지의 여부를 시험하였다. 벼 TWINKLE 및 RECA3 서열은 아라비도프시스 서열을 질의로 검색함에 의해 벼 게놈 서열로부터 동정하였다. 벼 단백질의 아미노산 서열, 이들 단백질을 암호화하는 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 이들 유전자에 대한 cDNA의 단백질 암호화 서열의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 61-66으로서 제공된다.

[0658] 일련의 실험에서, TWINKLE 및 RECA3 단백질과 TA1의 상호작용이 나타났다. 하나의 실험에서, 분할 황색 형광 단백질(YFP) 검정은 융합 단백질을 암호화하는 작제물 쌍과의 공동 형질전환에 의해 담배 잎에서 수행되었다. 각각의 쌍에서 하나는 YFP의 N-말단 절반을 암호화하고 다른 하나는 YFP의 C-말단 절반을 암호화하였다. 하나의 작제물은 키메라 유전자 p35S:TA1-nYFP를 가졌고 다른 하나는 p35S:RECA3-cYFP 또는 p35S:TWINKLE-cYFP를 가졌다. 형질전환된 세포는 공초점 현미경하에 조사하였다. 형광성 도트는 세포질에서 관찰되었다. 이것과 미토콘드리아 특이적 염색으로부터 TA1 단백질이 RECA3 및 TWINKLE 둘 다와 상호작용하고 3개 모두 미토콘드리아에 국소화된다는 결론을 내렸다.

[0659] TA1과 RECA3 및 TWINKLE의 생체내 상호작용은 또한 다른 폴리펩타이드가 공동 침전된 폴리펩타이드 중 하나를 특이적으로 회수하기 위한 면역침전 실험에 의해 입증되었다. 이를 수행하기 위해 p35S:TA1-MYC 작제물을 p35S:RECA3-HA 작제물 또는 p35S:TWINKLE-HA 작제물과 함께 담배 잎에 공동 침투시켜 태그 단백질의 일시적 발현을 위해 사용하였다. 침윤된 조직으로부터 총 단백질을 추출하고 동시 면역침전에 적용하고 수득된 단백질 분획을 웨스턴 블롯을 사용하여 시험하였다. 또 다른 실험에서, TA1이 RECA3 및 TWINKLE 둘 다와 상호작용한다는 것을 보여주기 위해 침윤된 담배 잎에서 분할 루시퍼라제 검정을 수행하였다.

[0660] 각각의 이들 실험으로부터, 본원 발명자들은 TA1 단백질이 RECA3 및 TWINKLE 단백질과 연합되어 있고 이들이 미토콘드리아에 국소화된다는 결론을 내렸다.

[0661] 실시예 15. RECA3 또는 TWINKLE 유전자의 하향조절은 벼에서 두꺼워진 호분을 생성한다

[0662] 미토콘드리아에서 RECA3 및 TWINKLE과 연관된 TA1 단백질을 보여주는 관찰의 관점에서, 본원 발명자들은 벼에서 RECA3 및 TWINKLE을 암호화하는 유전자의 발현 감소가 그레인에서 보다 두꺼운 호분을 생성하는지의 여부를 시험하였다. 이는 RecA3 및 TWINKLE 유전자의 발현을 감소시키기 위해 RNA 간섭(RNAi)을 사용하여 시험하였다. RNAi 작제물을 제조하기 위해 RecA3 및 TWINKLE 유전자 각각의 영역을 선택하여 헤어핀 RNA를 발현하는 역위 반복 작제물을 제조하는데 사용하였다. 이들 작제물은 표준 방법을 사용하여 야생형 벼의 아그로박테리움-매개 형질전환을 위해 사용되었고 형질전환체를 선택하였다. qRT-PCR로 나타난 바와 같이 그레인에서 유전자의 발현이 감소된 식물을 선택하였다(도 15). 3개의 계열은 각각의 작제물에 대해 선택하였다.

[0663] 선택된 계열의 성과를 가로로 절개하고 PAS로 염색하여 호분 두께에 대해 현미경으로 조사한 경우, 모든 유전자 전이 성과가 야생형에 비해 두꺼워진 호분을 가지고 있음이 관찰되었다. RecA3 및 TWINKLE 유전자에 대해 보다 많이 감소된 계열은 호분의 적어도 일부 영역에서 2-8층 범위의 보다 두꺼운 호분으로 보다 영향을 받는다. 또한 유전자전이 그레인의 전분이 많은 배유가 백악질 또는 불투명한 것으로 관찰되었다.

[0664] 이들 실험을 바탕으로 본원 발명자들은 그레인 발육 동안 mtDNA의 불법 재조합을 억제하여 하위 호분 세포의 분화를 결정하는 TA1-RECA3/TWINKLE 복합체에 의해 매개되는 호분 세포층의 에너지 항상성 조절을 기제하는 모델을 개발하였고, 상기 세포는 야생형 그레인에서 전분성 배유의 최외각 세포를 형성하는 세포이고 대신 호분 세포로서의 정체성을 유지하여 두꺼워진 호분을 생성하도록 되어 있다.

[0665] 실시예 16 기타 시리얼에서 벼 TA1 유전자의 동족체

[0666] 단일 가닥 DNA 결합(SSB) 단백질은 DNA 복제, 상동성 재조합 및 DNA 복구에 중요한 역할을 한다(참조: Moriyama 및 Sato, 2014). 세균에서, RecA 단백질은 상동성 가닥 교환을 촉매하고 SSB 단백질은 상기 반응을 증진시킨다(참조: McEntee 등 1980; Steffen 및 Bryant 2001). 아라비도프시스 탈리아나에서 미토콘드리아 표적화된 단일 가닥 DNA 결합 단백질(mtSSB)을 암호화하는 식물 유전자가 특징 분석되었고, 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 재조합에 관여하는 RecA, SSB 또는 기타 단백질의 미토콘드리아 표적화된 동족체가 식물에 존재한다는 최초의 직접적인 증거였다(참조: Edmondson 등, 2005). 서열번호 3을 질의로 사용하여 에이. 탈리아나 SSB 유전자 At4g11060 및 At3g18580(이하 각각 AtmtSSB-1 및 AtmtSSB-2라 함)은 데이터베이스(The Arabidopsis Information Resource (TAIR) 데이터베이스(<http://www.arabidopsis.org>))에서 아라비도프시스 게놈의 BLAST 검색에 의해 동정되었다. AtmtSSB-1 폴리펩타이드는 서열번호 3의 전장과 아미노산 서열이 66% 동일한 반면, AtmtSSB-2 폴리

펩타이드는 26% 동일성으로 훨씬 덜 상동성이었다(표 5). 따라서 에이. 탈리아나는 2개의 mtSSB 유전자를 갖는다. At4g11060은 28-잔기 추정 미토콘드리아 표적화 펩타이드 (MTP)를 포함하는, 201개 아미노산 (서열번호 15)의 단백질을 암호화한다. At3g18580은 23-잔기 추정 MTP를 포함하는, 217개 아미노산 (서열번호 31)의 단백질을 암호화한다. 모델 트리 중 포플러스 트리코카파(*Populus trichocarpa*) (포플라)는 또한 2개의 mtSSB 서열, 즉, PtmtSSB-1 (서열번호 21) 및 PtmtSSB-2 (서열번호 39)를 갖는다.

[0667] 벼(오리자 사티바(*Oryza sativa*), Japonica 그룹) 계놈은 Os05g0509700(OsTA1=OsmtSSB-1a를 암호화하는)과 관련된 2개의 다른 관련 유전자, 즉 Os04g0363700 및 Os01g0642900(이하 각각 OsmtSSB-1b 및 OsmtSSB-2로 지칭됨)을 갖는 것으로 관찰되었으며, 이는 벼 계놈 주석 프로젝트(Rice Genome Annotation Project)(RGAP) 데이터베이스([//rice.plantbiology.msu.edu/](http://rice.plantbiology.msu.edu/))에서 벼 계놈 및 아미노산 서열의 BLAST 검색에 의해 동정되었다. OsmtSSB-1b는 서열번호 3의 전장과 72% 동일성에서 OstmtSSB-1a에 서열이 보다 가까운 반면, OstmtSSB-2는 32% 동일성에서 덜 상동성이었다. OstmtSSB-1b는 또한 본원에서 OsTA1 유사 또는 OsTA1L로 지정된다. 벼는 따라서 3개의 mtSSB 유전자를 갖는다. AtmtSSB 단백질과 마찬가지로 3개의 OsmtSSB 폴리펩타이드 모두는 SSB 도메인을 갖고 OsmtSSB-1b의 경우 조사된 모든 식물 TAI 폴리펩타이드 서열에 존재하는 모티프 I-IV를 포함하였다.

[0668] 표 5는 다양한 상동성 식물 폴리펩타이드에 대한 벼 TAI(OsmtSSB-1a; 서열번호 3) 폴리펩타이드 및 OsTA1L에 대한 아미노산 서열 동일성을 제공한다. 도 7은 이들 식물 서열의 일부 정렬을 보여준다. 일부 단자엽 종이 일부가 그렇듯이 조사된 2개의 쌍자엽 종은 각각 단 2개의 mtSSB 서열을 가진 반면, 다른 단자엽 종은 OsTA1에 가장 가까운 것(적어도 80% 동일한) 및 서열이 OsTA1L에 더 가까운 것을 포함하는 3개의 mtSSB 서열을 가졌다. 전반적으로, 식물 mtSSB-1 서열은 서열번호 3과 적어도 60% 동일성을 갖는 반면, mtSSB-2 서열은 서열번호 3과 32% 이하의 동일성을 가졌다.

[0669] 도 16은 다른 식물 종, 주로 시리얼 종으로부터의 TAI(OsmtSSB-1a) 폴리펩타이드 동족체의 관련성을 보여주는 계통수를 제공한다. 각각의 경우에, 가장 상동성의 아미노산 서열은 서열번호 3의 전장을 따라 서열번호 3과 적어도 60% 동일하였다. 분석에 사용된 아미노산 서열은 OsTA1과 가장 관련된 mtSSB-1 또는 mtSSB-1a 서열에 대해 서열번호 15-23으로, OsTA1보다 OsTA1L과 보다 근접하게 관련된 mtSSB-1b 서열에 대해 서열번호 24-29로 및 mtSSB-2 서열에 대해 서열번호 30-39로서 제공된다.

[0670] 본 발명자들은 식물 종이 2개 또는 3개의 mtSSB 서열을 가지며, 이들 모두 기능적일 것으로 예상되어 어느 정도의 기능적 중복성을 제공한다고 결론지었다. 상기 분석은 다른 mtSSB 유전자의 조직 특이성을 다루지 않았다.

[0671] [표 5] 벼 *TAI* (OsmtSSB-1a) 및 *TAI*-유사 (OsmtSSB-1b)에 대한 식물 동족체의 아미노산 서열 동일성.

단백질	승인 번호	서열 번호	OsmtSSB-1a와의 동일성 (%)	OsmtSSB-1b와의 동일성 (%)
OsmtSSB-1a	Os05t0509700-01	3	100	72
OsmtSSB-1b	Os04t0363700-01	24	72	100
OsmtSSB-2	Os01t0642900-01	30	32	
AtmtSSB-1	AT4G11060.1	15	66	58
AtmtSSB-2	AT3G18580.1	31	26	
SbmtSSB-1	KXG22311	17	84	70
SbmtSSB-2	EES03342	32	32	
ZnmtSSB-1	Zm00001d000241_P001	16	79	70
ZnmtSSB-2	Zm00001d044086_P001	33	30	
SimtSSB-1a	KQL14798	23	84	66
SimtSSB-1b	KQL07192	25	67	72
SimtSSB-2	KQL06067	34	32	
HvmtSSB-1a	BAK06246.1	18	82	66
HvmtSSB-1b	HORVU_3Hr1G075580.1	26	63	74
HvmtSSB-2	HORVU3Hr1G057550.1	35	29	
TamtSSB-1:A	TraesCS3A02G322900.1	27	63	73
TamtSSB-2:A	TraesCS3A02G231400.1	36	25	
TamtSSB-1a:B	TraesCS1B02G341000.1	22	82	64
TamtSSB-1b:B	TraesCS3B02G342800.1	28	64	74
TamtSSB-2:B	TraesCS3B02G260600.1	37	31	
TamtSSB-1a:D	TraesCS1D02G329700.2	19	81	65
TamtSSB-1b:D	TraesCS3D02G308600.3	29	64	74
TamtSSB-2:D	TraesCS3D02G222000.1	38	30	

[0672]

[0673] 실시예 17. 기타 식물 중에서 벼 *RECA3* 및 *TWINKLE* 유전자의 동족체

[0674] 서열번호 61(벼 *RECA3* 폴리펩타이드)을 질의로 사용하여, 다양한 시리얼 및 관련 단자엽 식물 및 몇몇 쌍자엽 식물로부터의 상동성 아미노산 서열을 서열 데이터베이스의 BLAST 검색으로 동정되었다. 서로 다른 식물 중에서 *RECA3* 폴리펩타이드의 고도의 서열 보존성으로 인해 상동성 서열이 용이하게 동정되었다. 폴리펩타이드는 미토콘드리아 또는 색소체 전좌에 대한 N-말단 신호 서열을 포함하여 425-435개 아미노산 잔기의 길이를 가졌다(표 6). 이들 *RECA3* 단백질을 암호화하는 유전자에 대한 상응하는 cDNA 서열도 동정되었다(표 6). 시리얼 및 목초 *RECA3* 폴리펩타이드는 서열번호 61의 전장과 아미노산 서열이 적어도 80% 동일한 반면, 쌍자엽 식물로부터의 *RECA3* 폴리펩타이드는 덜 상동성이고 서열번호 61과 67 내지 72% 동일하였다. 각각의 아미노산 서열은 이들의 N-말단에 미토콘드리아 표적화 펩타이드(MTP)를 포함하는 것으로 추정되며, 이는 폴리펩타이드가 미토콘드리아로 전좌됨에 따라 절단될 것으로 예측되었다.

[0675] 본 발명자들은 식물 종이 미토콘드리아에서 기능할 야생형 *RECA3* 서열을 갖고 있으며 돌연변이 유발 또는 RNA를 사일런싱함에 의한 하향 조절에 의해 변형될 수 있다고 결론지었다.

[0676] 서열번호 64(벼 *TWINKLE* 폴리펩타이드)를 질의로서 사용하여, 다양한 단자엽 식물 및 쌍자엽 식물로부터의 상동성 아미노산 서열은 또한 서열 데이터베이스의 BLAST 검색에 의해 동정되었다. 서로 다른 식물 중에서 *TWINKLE* 폴리펩타이드의 고도의 서열 보존성으로 인해 상동성 서열이 또한 용이하게 동정되었다. 폴리펩타이드는 미토콘드리아 또는 색소체 전좌에 대한 N-말단 신호 서열을 포함하여 695-761개 아미노산 잔기의 길이를 가졌다(표 7). 이들 *RECA3* 단백질을 암호화하는 유전자에 대한 상응하는 cDNA 서열도 동정되었다(표 7). 이러한 많은 식물 종에 대해 여러 cDNA 서열이 동정되었고, 이는 아마도 유전자로부터의 전사체의 대안적 스플라이싱을 나타내는

것으로 보인다. 시리얼 및 목초 RECA3 폴리펩타이드는 서열번호 64의 전장과 아미노산 서열이 적어도 77% 동일한 반면, 쌍자엽 식물로부터의 RECA3 폴리펩타이드는 덜 상동성이고 서열번호 64과 67 내지 75% 동일하였다. 각각의 아미노산 서열은 이들의 N-말단에 미토콘드리아 표적화 펩타이드(MTP)를 포함하는 것으로 추정되며, 이는 폴리펩타이드가 미토콘드리아로 전좌됨에 따라 절단될 것으로 예측되었다.

[0677] 도 17은 시리얼 종을 포함하는 다른 식물 중으로부터의 TWINKLE 폴리펩타이드 동족체의 관련성을 보여주는 계통수를 제공한다. 각각의 경우에, 가장 상동성의 아미노산 서열은 서열번호 64의 전장을 따라 서열번호 64과 적어도 60% 동일하였다. 본 발명자들은 식물 종이 미토콘드리아에서 기능할 야생형 TWINKLE 서열을 갖는다고 결론지었다.

[0678] [표 6] 식물 종 범위에서 동정된 RECA3 상동성 단백질.

식물 종	상동성 유전자에 대한 cDNA의 승인 번호	서열 번호	단백질의 승인 번호	서열 번호	길이 (아미노산 잔기)	비 RECA3과의 동일성(%)
오리자 사티바	XM_015756709.2	63	XP_015612195.1	61	429	100
브라키포디움 디스타키온(<i>Brachypodium distachyon</i>)	XM_003564806	68	XP_003564854.1	67	429	87
디기타리아 엑실리스(<i>Digitaria exilis</i>)	-	-	CAB3479142.1	-	427	85
소르그움 바이컬러(<i>Sorghum bicolor</i>)	XM_002458886.2	70	XP_002458931.1	69	427	85
제아 메이스(<i>Zea mays</i>)	NM_001176740.1	72	NP_001170211.1	71	425	82
호르데움 볼가레(<i>Hordeum vulgare</i>)	AX366136.1	74	BAJ97339.1	73	429	84
트리티쿰 투르기둠 아종, 두럼(<i>Triticum turgidum subsp. durum</i>)	-	-	VAH82650.1	79	435	83
트리티쿰 아에스티븀(<i>Triticum aestivum</i>)	AX335548.1	76	CTM84906.1	75	435	83
아에길로포스 타우시(<i>Aegilops tauschii</i>)	XM_020339638.1	78	XP_020195227.1	77	433	83
파니툼 할리(<i>Panicum hallii</i>)	XM_025963278.1	-	XP_025819063	-	426	84
루피누스 안구스티폴리우스(<i>Lupinus angustifolius</i>)	XM_019607017.1	-	XP_019462562.1	-	419	72
트리폴리움 서브테라네움(<i>Trifolium subterraneum</i>)	DF973566.1	-	GAU34790.1	-	411	73
니코티아나 타바쿰(<i>Nicotiana tabacum</i>)	XM_016629478.1	-	XP_016484964.1	-	423	71
글리신 맥스(<i>Glycine max</i>)	XM_003549185.4	-	XP_003549233.1	-	459	68
솔라눔 튜버로섬(<i>Solanum tuberosum</i>)	XM_015308059.1	-	XP_015163545.1	-	424	67
솔라눔 리코페르시쿰(<i>Solanum lycopersicum</i>)	XM_004240132.4	-	XP_004240180.1	-	418	69

[0679]

[0680] [표 7] TWINKLE 동족체는 다양한 식물 중에서 동정되었다.

식물 종	상동성 유전자에 대한 cDNA의 승인 번호	서열 번호	단백질의 승인 번호	서열 번호	길이 (아미노산 잔기)	벼 TWINKLE에 대한 동일성 (%)
오리자 사티바	XM_015785659.2	66	XP_015641145.1	64	723	100
브라키포디움 디스타키온 (<i>Brachypodium distachyon</i>)	XM_010242321.3	81	XP_010240623.1	80	723	79
소르 그롬 바이컬러 (<i>Sorghum bicolor</i>)	XM_021450218.1	83	XP_021305893.1	82	761	80
제아 메이스 (<i>Zea mays</i>)	XM_008650737.2	85	XP_008648959.2	84	736	80
아에길로프스 타우시 (<i>Aegilops tauschii</i>)	XM_020311186.1	87	-	86	726	79
파니툼 할리 (<i>Panicum hallii</i>)	XM_025957680.1	89	XP_025813465.1	88	748	84
세타리아 비리디스 (<i>Setaria viridis</i>)	XM_034736031.1	91	XP_034591922.1	90	759	84
니코티아나 타바쿰 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	XM_016653437.1	93	XP_016508923.1	92	699	71
솔라눔 튜버오섬 (<i>Solanum tuberosum</i>)	XM_006360255.2	95	XP_006360317.1	94	695	75
솔라눔 리코페르시쿰 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	XM_004231508.4	97	XP_004231556.1	96	697	69

[0681]

[0682] 실시예 18. 흑미에 *tal* 돌연변이 육종

[0683]

"흑미"는 바깥층-겨와 껍질-에 안토시아닌이 착색되어 있는 벼 그레인을 기재하기 위해 사용되는 용어이다. 이들 안료는 실제로 검은색이 아닌 진한 보라색이지만 고농도의 안료는 그레인을 검정 또는 암회색으로 만든다. 안료는 다양한 건강상의 이득을 갖는 것으로 사료되는 강력한 항산화제이다(참조: Yao 등, 2013).

[0684]

상기한 유전학적 백그라운드에서 *tal* 돌연변이체 대립유전자를 도입하기 위해, 흑미 품종 Zixiangnuo 1306이 먼저 회귀 모체로서 선택되었다. 상기 품종은 Japonica 벼이고 *TAI* 유전자에 대해 야생형이다. 내한성, 염분토양에 대한 내성, 내병성이 우수하여 중국의 보다 북부 지방에서 성장하기에 적합하다. Zixiangnuo 1306은 성숙기에 잎수가 약 15개이고 식물 높이는 70-85cm가 이상적인 범위이며 잎색은 진한 녹색이고 묘목과 식물에서는 향기가 난다. mu당 총 그레인 수는 약 100개이고, 종자 설정 비율은 적어도 85%이다. 내화영의 색은 원추꽃차례 초기에는 녹색을 띠다가 그레인이 채워진 단계에 도달했을 때 연한 자주색을 띠다가 성숙기에 이르면 은회색을 띤다. 1000개의 성숙한 그레인의 중량은 전형적으로 약 23g이다. 일반적으로 mu당 수확량은 300-400 kg으로 양호하며 이상적인 성장 조건하에서는 450kg/mu 이상에 도달한다. 그레인의 전분의 아밀로스 함량은 약 5-6%이고 조리된 그레인은 먹을 때 식감이 부드러운 것으로 간주된다.

[0685]

tal-1 대립유전자를 도입하기 위해, *tal-1* 대립유전자를 자성 모체로서 갖는 Zhonghua 11 식물과 융성 모체로서 Zixiangnuo 1306 (*TAI*) 식물 간에 교배를 하였다. 이어서, 교배로부터의 F1 자손 식물을 2세대 동안 회귀 모체로서 Zixiangnuo 1306의 식물과 역교배하여 BC2F1 역교배 자손 식물의 집단을 확립하였다. 여러개의 이들 식물은 BC2F2 식물을 생성하기 위해 자가교배되었고, 이들로부터 *tal-1* 대립유전자에 대해 동형접합성인 BC2F3 자손이 동정되고 선택되었다. 상기 육종 프로그램에서, *TAI* 및 *tal-1* 대립유전자는 실시예 1에 기재된 바와 같이 PCR 생성물 (2014-17년)의 효소 분해에 의해 또는 고분리능 DNA 용융 곡선 (HRM, 2018부터 현재까지)에 의해 검출되었다. 벼 그레인의 단면에서 호분 층을 관찰함에 의해 호분 층 비후를 모니터링하였다. 4개의 유전학적으로 안정한 계열이 수득되고 이는 *tal-1*에 대해 동형접합성이고, Zhongzi1, Zhongzi2, Zhongzi3 및 Zhongzi4로 호칭된다. 이들 계열은 벼 도열병 저항성 및 두꺼워진 호분을 부여하는 도입된 *tal-1* 대립유전자와 같은 상기 연

급된 Zixiangnuo 1306의 유리한 특징 대부분을 유전받았다.

[0686] 새로운 품종을 필드에서 성장시키고 다양한 파라미터를 측정하고 야생형과 비교하였다. 데이터는 표 8에 나타난다. 이들 시험에서 야생형 품종(WT)은 Zixiangnuo 1306이었다.

[0687] Zhongzi *tal* 돌연변이체 그레이의 영양 성분은 다양한 영양물에 대해 결정되었고 정상적인 호분을 가진 *TAl* 유전자 또는 두꺼워진 호분을 가진 ZH11 유전학적 백그라운드에 *tal-1*을 갖는 야생형 Zhonghua11(ZH11), 야생형 Zixiangnuo 1306 (흑미, *TAl*) 및 Zhongzi (흑미, *tal*)과 비교하였다. *tal* 흑미는 단백질, 식이 섬유, 미네랄 및 비타민 B를 포함하여 측정된 모든 영양물의 양이 유의적으로 보다 높은 것으로 관찰되었다. 철, 아연 및 비타민 B6의 증가는 특히 인상적이었고 발명가들에게는 놀라운 일이었다.

[0688] 따라서 흑미 품종에 *tal* 돌연변이가 있는 이들 Zhongzi 고영양 벼 품종을 생산하기 위한 성공적인 육종은 보다 영양가 있는 벼 식품 및 음료에 사용할 수 있는 새로운 벼 품종을 제공하였다.

[0689] [표 8] *tal-1* 대립유전자를 함유하는 Zhongzi 품종에 대한 필드 시험 데이터

		평균	SD	T. 시험 (P. 값)
식물 높이 (cm)	WT	71.3	0.40	
	Zhongzi 1	99.3	0.76	0.000224
	Zhongzi 2	79.9	0.13	0.000305
	Zhongzi 4	82.4	0.50	0.001049
분얼수	WT	10.8	0.06	
	Zhongzi 1	9.9	0.26	0.011694
	Zhongzi 2	10.9	0.44	0.414874
	Zhongzi 4	12.2	0.26	0.008126
종자 설정의 길이(cm)	WT	18.5	0.19	
	Zhongzi 1	24.4	0.34	0.001319
	Zhongzi 2	18.9	0.54	0.189372
	Zhongzi 4	19.5	0.28	0.002693
종자 설정 당 그레이의 수	WT	176.3	0.86	
	Zhongzi 1	171.5	4.00	0.060319
	Zhongzi 2	185.3	2.91	0.026657
	Zhongzi 4	241.1	4.70	0.001026
종자 설정 당 그레이 (%)	WT	89.3	0.55	
	Zhongzi 1	94.1	0.21	0.000852
	Zhongzi 2	91.9	0.11	0.007130
	Zhongzi 4	93.1	0.23	0.005084
1000 그레이의 중량 (g)	WT	19.6	0.20	
	Zhongzi 1	23.6	0.09	0.000577
	Zhongzi 2	20.9	0.14	0.007057
	Zhongzi 4	19.2	0.04	0.054976
그레이의 평균 길이 (mm)	WT	6.3	0.05	
	Zhongzi 1	7.1	0.09	4.770523E-20
	Zhongzi 2	6.2	0.08	0.001368
	Zhongzi 4	6.4	0.04	0.000037
그레이의 평균 폭 (mm)	WT	2.5	0.02	
	Zhongzi 1	2.6	0.04	1.628774E-09
	Zhongzi 2	2.6	0.05	2.256365E-08
	Zhongzi 4	2.4	0.03	0.000001
그레이의 평균 두께(mm)	WT	1.8	0.05	
	Zhongzi 1	1.9	0.10	0.002619
	Zhongzi 2	2.0	0.07	0.000012
	Zhongzi 4	1.9	0.07	0.044645

[0690]

[0691] Zhongzi *tal* 돌연변이체 그레이의 영양 성분은 다양한 영양물에 대해 결정되었고 정상적인 호분을 가진 *TAl* 유전자 또는 두꺼워진 호분을 가진 ZH11 유전학적 백그라운드에 *tal-1*을 갖는 야생형 Zhonghua11(ZH11), 야생형 Zixiangnuo 1306 (흑미, *TAl*) 및 Zhongzi (흑미, *tal*)과 비교하였다. *tal* 흑미는 단백질, 식이 섬유, 미네랄 및 비타민 B를 포함하여 측정된 모든 영양물의 양이 유의적으로 보다 높은 것으로 관찰되었다(표 9). 철, 아연 및 비타민 B6의 증가는 특히 인상적이었고 발명가들에게는 놀라운 일이었다.

[0692] 따라서 흑미 품종에 *tal* 돌연변이가 있는 이들 Zhongzi 고영양 벼 품종을 생산하기 위한 성공적인 육종은 보다 영양가 있는 벼 식품 및 음료에 사용할 수 있는 새로운 벼 품종을 제공하였다.

[0693] [표 9] *tal* 흑미 그레인의 영양물 조성.

영양물	ZH11	<i>tal</i>	<i>TAl</i> 흑미	<i>tal</i> 흑미
총 단백질 (%)	7.63 ± 0.09	8.48 ± 0.10	9.48 ± 0.08	10.03 ± 0.10
총 지질 (%)	2.84 ± 0.03	3.00 ± 0.04	2.75 ± 0.09	3.42 ± 0.08
철 (mg/kg)	11.69 ± 0.36	12.45 ± 0.35	15.11 ± 0.31	18.16 ± 0.38
아연 (mg/kg)	16.02 ± 0.55	23.42 ± 0.52	23.18 ± 0.15	26.14 ± 0.42
식이 섬유 (g/100 g)	3.20 ± 0.06	4.25 ± 0.07	5.03 ± 0.12	6.23 ± 0.21
비타민 B2 (mg/100 g)	0.044 ± 0.002	0.054 ± 0.003	0.065 ± 0.003	0.072 ± 0.003
비타민 B6 (mg/100 g)	0.090 ± 0.003	0.102 ± 0.004	0.377 ± 0.009	0.822 ± 0.012

[0694]

[0695] **실시예 19. *tal* 돌연변이체 벼로부터 식음료 생산**

[0696] 두꺼워진 호분을 갖는 벼 그레인은 야생형 벼와 동량으로 만든 상응하는 성분, 식품 또는 음료에 비해 영양분이 증가된 양의 영양물을 갖는 식품 성분, 음료 성분, 및 식품 및 음료의 제조에 유용한 것으로 간주되었다. 따라서 다양한 식품과 음료를 제조하고 사람 자원 봉사자가 품질, 향 및 맛에 대해 시험하였다. 이를 위해 사용되는 벼 그레인은 품종 Zhongzi1, Zhongzi2, Zhongzi3 및 Zhongzi4 (실시예 18)이다. 수확 후 벼 그레인은 11.65%의 수분 함량 및 760 g/L의 밀도를 가졌다.

[0697] 로스팅된 벼 그레인과 흑미차

[0698] 벼 차는 전체 그레인을 불려 일정 시간 동안 로스팅(베이킹)한 다음 끓는 물에 그레인을 불려(침지 또는 양조) 제조하였다. 로스팅 온도 및 시간을 시험하기 위한 하나의 실험에서, 50g의 그레인의 샘플은 14시간 동안 물에 불리고, 물을 빼내고, 벼 그레인을 상이한 조건하에서 로스팅하였다 (표 10). 그 결과 로스팅 온도를 약 210°C에서 6분 이상 유지했을 때 로스팅 그레인의 향이 강하고 기분 좋은 것으로 나타났다. 향은 사람 지원자들에 의해 발효 소스를 연상시키는 것으로 간주되었다. 로스팅 온도가 180°C 이상이고 시간이 3.5분 이상인 경우 보다 낮은 온도에서 또는 짧은 시간 동안에 대한 것 보다 과립 향이 더 뚜렷하였다. 자원 봉사자들은 향이 입자 무결성과 향에 따라 프라이된 벼의 강한 느낌과 함께 독특한 "특별히 탄" 향을 갖고 있는 것으로 기재하였다.

[0699] [표 10] 벼 로스팅 (베이킹) 실험.

샘플	베이킹 온도	시간
T1	195°C	5.5 분
T2	195°C	9 분
T3	210°C	6.5 분
T4	210°C	7 분
T5	220°C	5 분
T6	230°C	4.5 분

[0700]

[0701] 흑미차를 만들기 위해서는 흑미 그레인을 끓는 물에 10분간 불린 후 물을 뺀다. 상이한 조건하에서 로스팅 시험을 위해 매번 50g의 무게를 잰다. 로스팅 흑미 그레인의 향은 부드럽고 탄 향이 없는 것으로 기재되었다. 입자 무결성 및 향 평가에 따르면, 샘플 T2의 벼 그레인이 가장 우수하였다.

[0702] Zhongzi1, Zhongzi2, Zhongzi3 및 Zhongzi4의 그레인 샘플을 180°C에서 3.5분 동안 로스팅하였다. 차를 끓이기 위해 로스팅된 벼 그레인 6g의 샘플을 끓는 물 150 mL에 10분 동안 첨가하였다. 7명의 지원자로 구성된 관능 패널이 양조 전후의 그레인 및 수득한 음료의 색과 맛을 평가하였다. Zhongzi1, Zhongzi2 및 Zhongzi3 각각의 그레인 샘플은 양조 전 강한 향과 풍미를 제공하였고 양조 후 최고의 갈색을 제공하였다. Zhongzi1 그레인의 맛과

입자 무결성은 Zhongzi2와 유사하였다. Zhongzi4의 향은 양조 전후에 덜 매력적이었고 일부 지원자들은 "불량한" 것으로 기재되었고 수득한 차의 색상은 양조 후 가장 옅은 색이었다.

[0703] 벼 포리지

[0704] 벼 포리지는 흑미 그레인 100 g을 물에서 적어도 1시간 최대 16시간 동안 불려 제조하였다. 1시간에 비해 16시간 동안 불리는 것이 추천되었다. 벼 그레인을 물로 2회 세정하고 물 1L에 전기밥솥에 90분 동안 조리하였다. 포리지를 맛본 지원자들은 그것이 너무 딱딱하지도 너무 부드러우지도 않고, 기분 좋은 맛과 "특별한 향"이 있고, 어린이 및 성인에 대해, 예를 들어 장 장애가 있는 성인에 대해 적합한 것으로 기재하였다.

[0705] 유아식에 적합한 흑미 페이스트를 만들기 위해 벼 그레인 500 g을 90℃에서 60분 동안 로스팅하였다. 로스팅된 그레인을 분쇄한 다음 체질(100 메쉬)하여 고운 밀가루를 생성한다. 흑미 가루 20g 샘플을 끓는 물 100 mL에서 불리고 흑미 페이스트가 생성될 때까지 혼합하였다. 벼 페이스트의 맛을 본 지원자는 이를 유아를 위해 적합한 것 뿐만 아니라 식용을 위해 간편한 패스트 푸드를 고려하였다. 그들이 예상했던 것보다 조금 더 달콤하였다.

[0706] 조리된 벼 그레인

[0707] 흑미 그레인 50g을 백미 200 g과 혼합하고, 물로 2회 세정하고 전기밥솥에 물 300~350 mL로 60분 동안 조리하였다. 흑미 그레인은 백미처럼 골고루 조리하였다. 흑미는 조리한 후에도 짙은 색이 남아 있어 식감이 부드러우며 맛이나 향이 "특수한 향"으로 기재된다.

[0708] 벼 막대

[0709] 흑미 그레인 500 g을 90℃에서 적어도 60분 초과 동안 로스팅하고, 분쇄하고 체질(100 메쉬)하고 초코바 제조기를 사용하여 막대 형태로 성형한다. 이것은 독특한 맛을 가진 소비에 적합한 식품으로 막대를 생산한다.

[0710] 흑미 오일

[0711] 흑미 그레인을 도정하고 도정으로부터 생성된 과피 및 호분 층을 포함하는 겨는 정미한 그레인으로부터 분리한다. 오일은 벼 겨에서 냉 압착하여 생산하여 벼 겨 오일을 생성한다. 오일은 야생형 벼로부터 벼 겨 오일에 비해 상대적으로 높은 수준의 항산화제와 오리지널을 함유한다.

[0712] 본 출원은 2020년 12월 1일자로 출원된 AU 2020904452의 우선권을 주장하고, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 인용된다.

[0713] 당업자는 광범위하게 기재된 본 발명의 취지 또는 범위를 벗어나지 않고 특정 구현예에 도시된 바와 같이 본 발명에 대해 다양한 변화 및/또는 변형이 만들어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 구현예는 모든 면에서 예시적인 것으로 간주되어야 하며 제한적이지 않다.

[0714] 본원에서 논의되고/되거나 참조 인용된 모든 공보는 이들의 전문이 본원에 인용된다.

[0715] 본 명세서에 포함된 문서, 행위, 물질, 장치, 제품 등에 대한 임의의 논의는 전적으로 본 발명의 맥락을 제공하기 위한 것이다. 이러한 문제의 일부 또는 전부가 본 출원의 각 청구항의 우선일 이전에 존재했기 때문에 선행 기술 기반의 일부를 형성하거나 본 발명과 관련된 분야의 일반적인 일반 지식이라고 인정하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0716] 참조문헌

- Akazawa and Haranishimura (1985) *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 36:441-472.
- Anzalone et al. (2019) *Nature* 576:149-157.
- Beck and Ziegler (1989) *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 40:95-117.
- Becraft et al. (2001a) In Bhojwani and Soh (eds). *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*, Kluwer Academic Publishers, pp353-374.
- Becraft et al. (2001b) *Plant Physiol.* 127:4039-4048.
- Becraft et al. (2002) *Development* 129:5217-5225.
- Becraft and Yi (2011) *J. Exp. Botany* 62:1669-1675.
- Brewer et al. (2006) *Nature Protocols*. 1:1462-1467.
- Buttrose et al. (1963) *Aust. J. Biol. Sci.* 16:768-774.
- Calhoun (1960) *Cereal Chemistry*. 37:755.
- Ciesielski et al. (2016) *Methods Mol. Biol.* 1351:211-222.
- Comai et al. (2004) *Plant J* 37: 778-786.
- Diray-Arce et al. (2013) *BMC Plant Biol.* 13:36. doi:10.1186/1471-2229-13-36.
- Durai et al. (2005) *Nucleic Acids Research* 33:5978-5990.
- Edmondson et al. (2005) *Molecular Genetics and Genomics* 273, 115-122.
- Farr et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279:17047-17053.
- Flynn and Zou (2010) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45 266-275.
- Gualberto and Newton (2017) *Annu. Rev. Plant Biol.* 68:225-52.
- Hayashi et al. (2004) *J Eukaryot Microbiol.* 51:321-324.
- Henikoff et al. (2004) *Plant Phys* 135:630-636.
- Hoshikawa (1993) in Matsuo and Hoshikawa (eds), *Science of the Rice Plant: Morphology*. Nobunkyo, Tokyo, pp 339-376.
- Hu et al. (2018) *Nature* 556:57-63.
- Huang (2002a) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:1815-1821.
- Huang (2002b) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:4437-4444.
- Huang (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1841-1856.
- Jayatilaka et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:15848-15853.
- Jones (1969) *Planta* 85:359-375.
- Kawakatsu et al. (2009) *The Plant J.* 59:908-920.
- Kazama et al. (2008) *Plant Biotechnology* 25: 113-117.
- Kessler et al. (2002) *Development* 129:1859-1869.
- Kim et al. (2016) *Rice* 9:12.
- Korhonen et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:48627-48632.

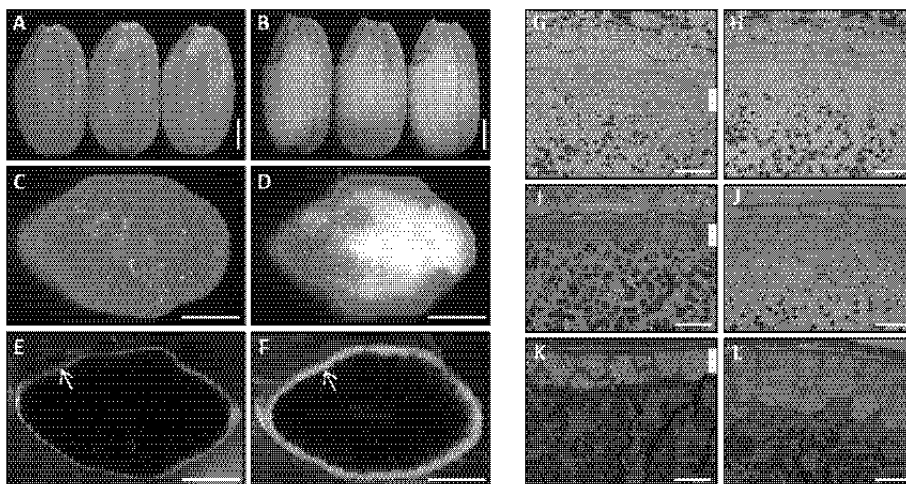
[0717]

- Lahey et al. (1999) Food Chemistry 65:129-133.
 Le Provost et al. (2009) Trends in Biotechnology 28:134-141.
 Lewis et al. (2009) Plant and Cell Physiol. 50:554-571.
 Li et al. (2008) J. Agric. Food Chem. 56:9732-9739.
 Lid et al. (2004) Planta 218:370-378.
 Liu et al. (2010) Biotechnology and Bioengineering 106:97-105.
 Mann et al. (2001) J. AOAC Int. 84:1593.
 McCleary et al. (1997) J AOAC Int. 80:571-580.
 McEntee et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:857-861.
 Moriyama and Sato (2014) Frontiers in Plant Science Vol 5, article 480.
 Murashige and Skoog (1962) Physiologia Plantarum 15:473-497.
 Nishimura et al. (2006) Nature Protocols. 1:2796-2802.
 Osakabe et al. (2020) Communications Biol 3:648.
 Prior (2005) Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53:4290-4302.
 Prosky et al. (1985) AOAC Official method 991.
 Reddy et al. (2001) J. Biol. Chem. 276 :45959-45968.
 Schlemmer (2009) Molecular Nutrition and Food Research. 55(Supplement 2):S330-S375.
 Shedge et al. (2007) Plant Cell 19:1251-64.
 Shen et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:6552-6557.
 Silva et al. (2017) DNA Repair 60:64-76.
 Slade and Knauf (2005) Transgenic Res. 14:109-115.
 Sreenivasulu (2010) The Plant Journal. 64:589-603.
 Steffen and Bryant (2001) Archives of Biochemistry and Biophysics 388 :165-170.
 Theander et al. (1995) J AOAC Int. 78:1030-1044.
 Toseland et al. (2010) Methods 51:259-268.
 Wolbang (2010) J. Agric Food Chem. 58, 1732-1740.
 Yao et al. (2013) Food & Function. 4: 1602-1608.
 Yi et al. (2011) Plant Physiol. 156:1826-1836.
 Zarcinas (1983a) CSIRO Division of Soils Technical Paper. 1-36.
 Zarcinas (1983b) Communications in Soil Science and Plant Analysis. 18:131-146.
 Zwar and Chandler (1995) Planta 197: 39-48.

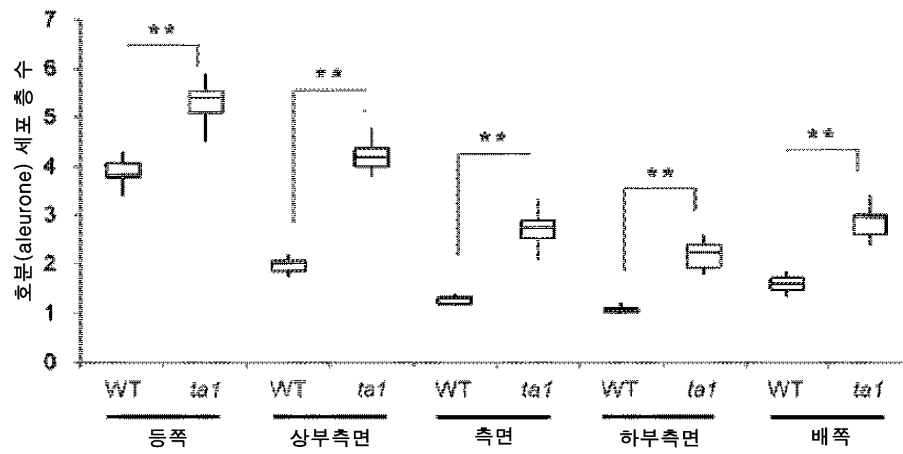
[0718]

도면

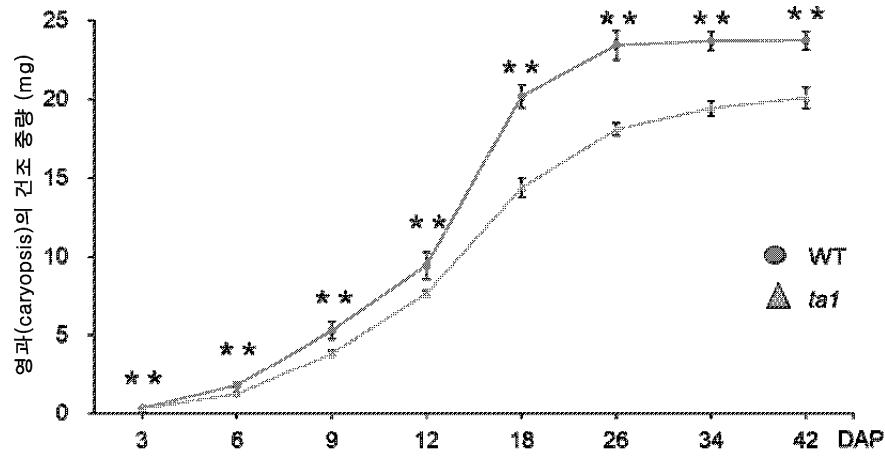
도면1



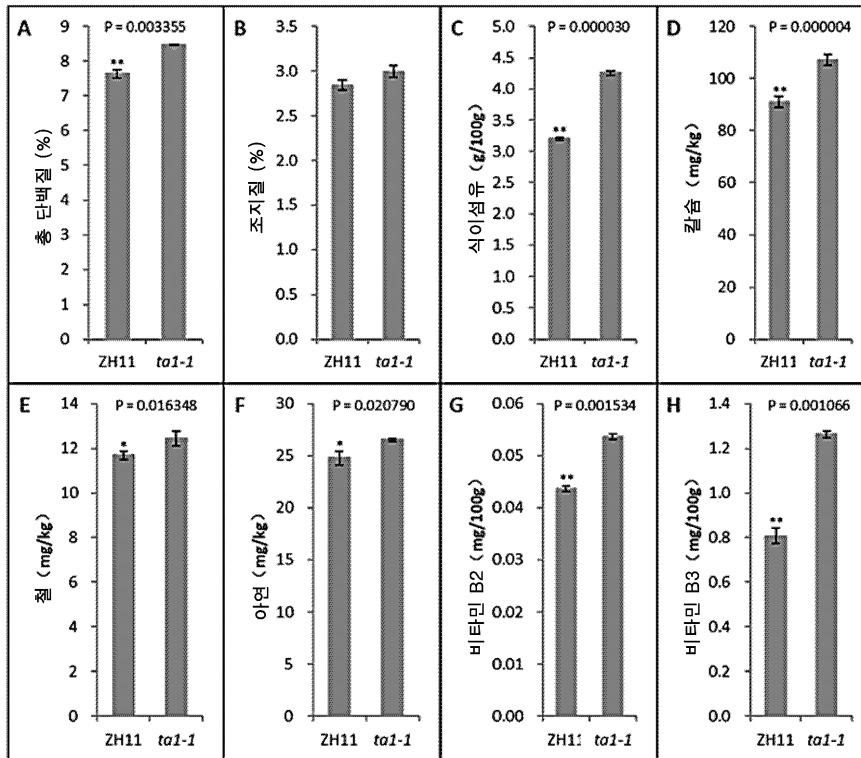
도면2



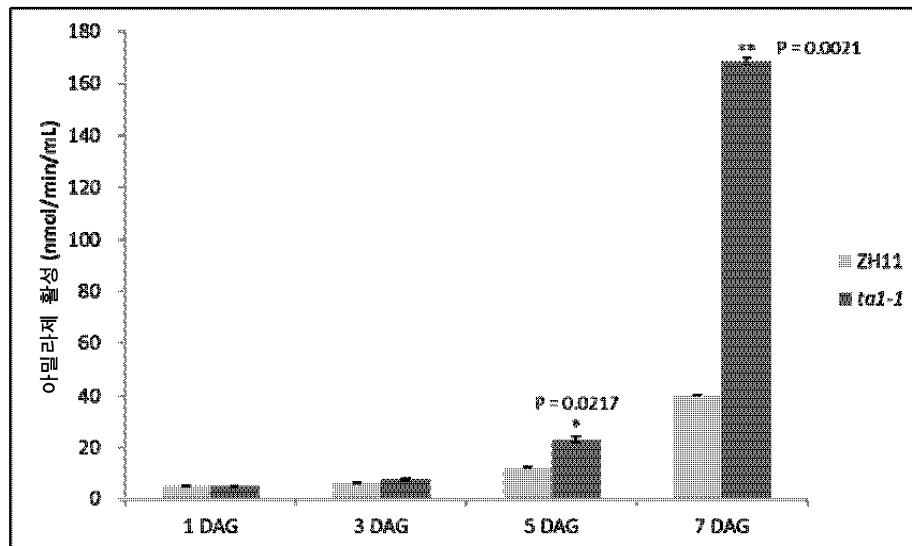
도면3



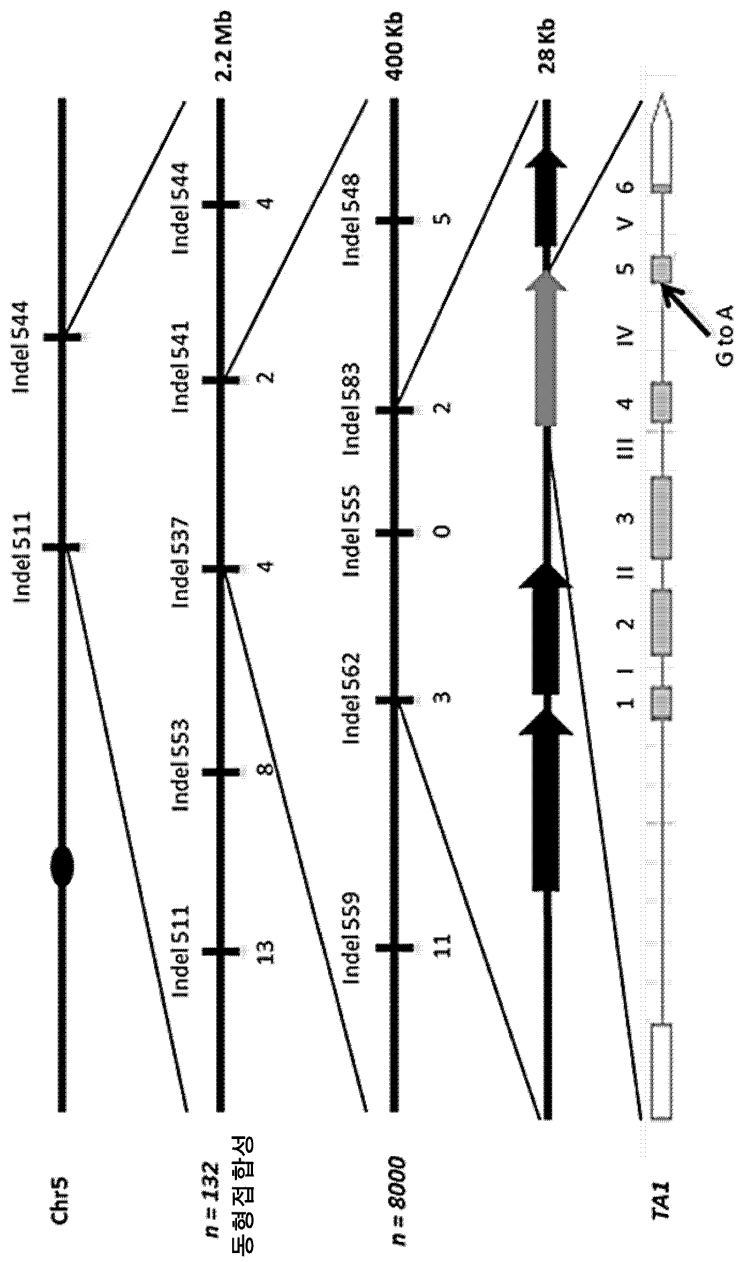
도면4



도면5



도면6



도면7

```

ZH11      GTATACAATGACAGCATTAAATGATCAAGTGAAAAATATACCAGAGATTTGCTTCGACGC
tal I     GTATACAATGACAGCATTAAATGATCAAGTGAAAAATATACCAGAGATTTGCTTCGACGC
tal II    GTATACAATGACAGCATTAAATGATCAAGTGAAAAATATACCAGAGATTTGCTTCGACGC
tal III   GTATACAATGACAGCATTAAATGATCAAGTGAAAAATATACCAGAGATTTGCTTCGACGC
          *****

ZH11      GATG-----GTAAGATTCTGGCTGATTAAATCTGG
tal I     GATGCTTATCCTTGAAAAATATTTATATGTACAAGTAAGATTCTGGCTGATTAAATCTGG
tal II    GATG-----
tal III   GATG-----TAAGATTCTGGCTGATTAAATCTGG
          ****

ZH11      CGAGAGTGCTGCTAGCATTTCATTAGATGAGCTAAGAGAAGGATTGTTCTAG
tal I     CGAGAGTGCTGCTAGCATTTCATTAGATGAGCTAAGAGAAGGATTGTTCTAG
tal II    -----GAGAAGGATTGTTCTAG
tal III   CGAGAGTGCTGCTAGCATTTCATTAGATGAGCTAAGAGAAGGATTGTTCTAG
          *****

```

도면8

```

ZH11      MNSLSNGLLKGLRRVLEQQRKPIDFYRKSQAWSSTVSFSDIDEKSEMGGDDDYTDSRREL
TA1 I     MNSLSNGLLKGLRRVLEQQRKPIDFYRKSQAWSSTVSFSDIDEKSEMGGDDDYTDSRREL
TA1 II    MNSLSNGLLKGLRRVLEQQRKPIDFYRKSQAWSSTVSFSDIDEKSEMGGDDDYTDSRREL
TA1 III   MNSLSNGLLKGLRRVLEQQRKPIDFYRKSQAWSSTVSFSDIDEKSEMGGDDDYTDSRREL
          *****

ZH11      EPQSVDPKKGWGFRGVHRAIICGKVGQVPVQKILRNGRTVTVFTVGTGGMFDQRVVGDAD
TA1 I     EPQSVDPKKGWGFRGVHRAIICGKVGQVPVQKILRNGRTVTVFTVGTGGMFDQRVVGDAD
TA1 II    EPQSVDPKKGWGFRGVHRAIICGKVGQVPVQKILRNGRTVTVFTVGTGGMFDQRVVGDAD
TA1 III   EPQSVDPKKGWGFRGVHRAIICGKVGQVPVQKILRNGRTVTVFTVGTGGMFDQRVVGDAD
          *****

ZH11      LPKPAQWHRIAIHNDQLGAFQVQKLVKNSAVYVEGDIETRVYNDSEINDQVKNIPEICLRR
TA1 I     LPKPAQWHRIAIHNDQLGAFQVQKLVKNSAVYVEGDIETRVYNDSEINDQVKNIPEICLRR
TA1 II    LPKPAQWHRIAIHNDQLGAFQVQKLVKNSAVYVEGDIETRVYNDSEINDQVKNIPEICLRR
TA1 III   LPKPAQWHRIAIHNDQLGAFQVQKLVKNSAVYVEGDIETRVYNDSEINDQVKNIPEICLRR
          *****

ZH11      DGKIRLIKSGESAASISLDELREGLF
TA1 I     DAYFWKNIYMYK-----
TA1 II    DGEGLF-----
TA1 III   DVRFG-----
          *

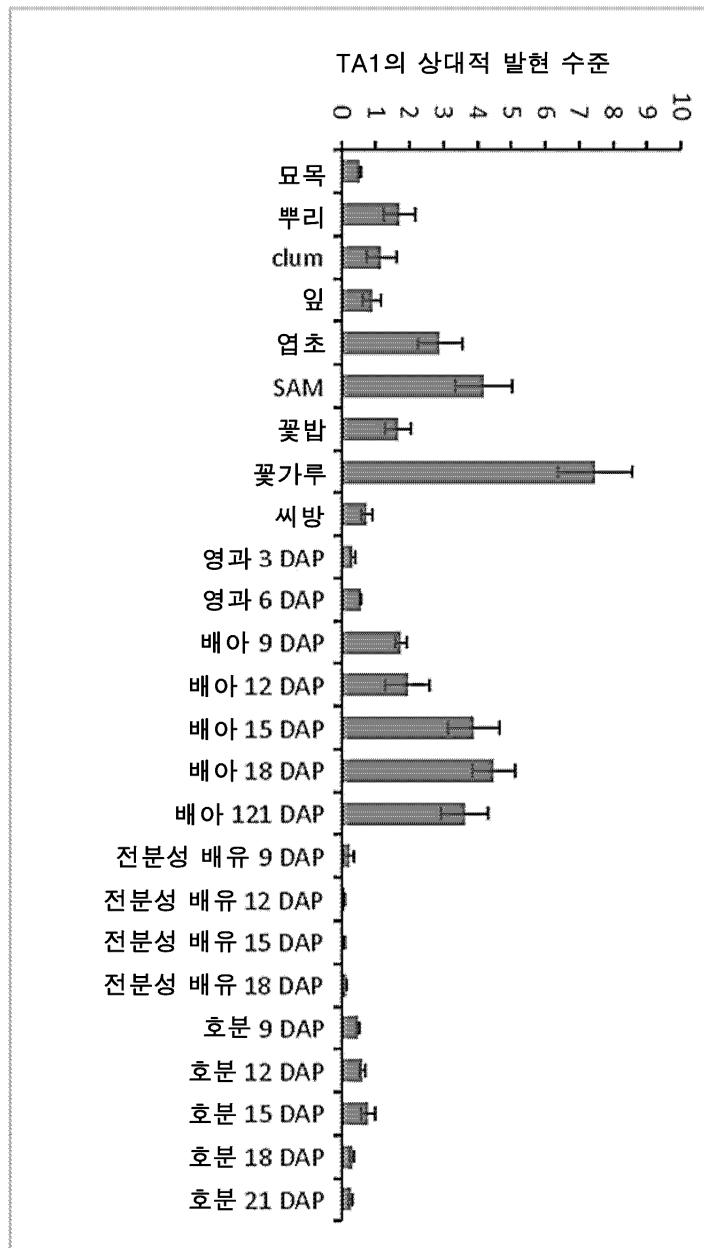
```

도면9

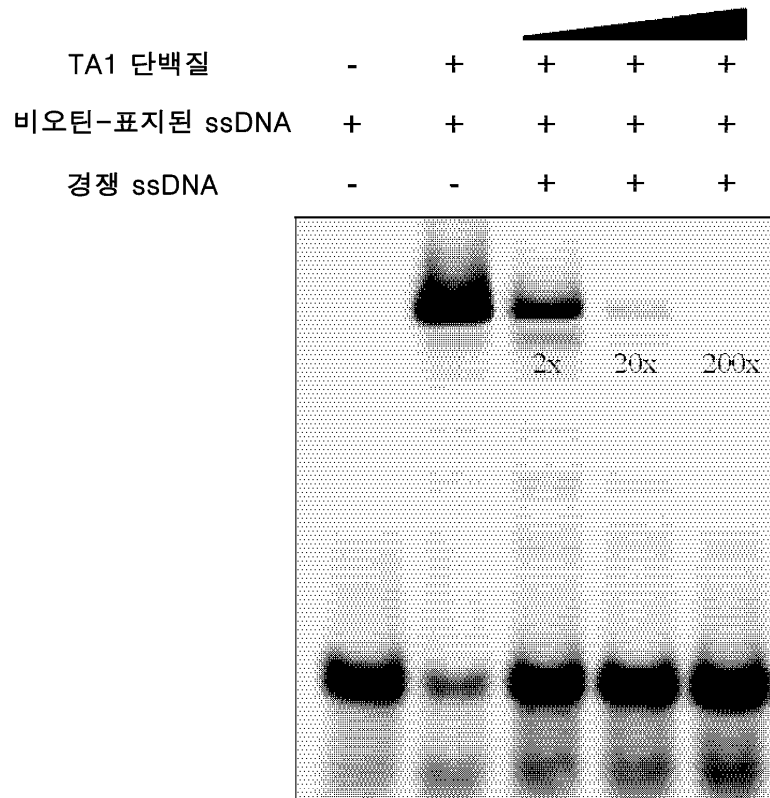
↓

PtTA1 (SEQ ID NO:21)	MSSLVLRFAKLLRVPSPVIMPTSSSLGVGLQRLRSCYSTVSFNSDNEEGKNDKVEEEFDD	60
AtTA1 (SEQ ID NO:15)	MNSLAIRVSKVLR----S-SSISPLAISAEGRSKSWFSTGPI---DEGVE----ED-FEE	47
OsTA1 (SEQ ID NO:3)	MNSLSNGLLKGLR----RVLEQQRKPIDFYRKSAWSSTVSFSDIDEKSE----MGGDDD	52
OsTA1L (SEQ ID NO:24)	MMSAKLLRSMVSR----RLGQQQRNSVEFYRKSAWNSTASFSDVDEKNR----KGGDAE	52
ZmTA1 (SEQ ID NO:16)	MTGVSTGLLTGLR----RVMEQQRISTAFCRQSRVSSSTVSFSDIDEKGD----MEYDDN	52
SbTA1 (SEQ ID NO:17)	MTRVSTGLLKGLR----RVMEQQRISTAFCRQSQVWSSTVSFSDIDEKGD----MEYDDN	52
BdTA1 (SEQ ID NO:20)	MGSGGTGLMKGLR----RFLEQQRKSVLDLCKRSRAWSSTVSFSDIDDKSD----MGDDGD	52
HvTA1 (SEQ ID NO:18)	MGSVGTGLLKGLR----RVLEQQRKSVLDLCKRSRAWSSTVSFSDIDEKDD----MGDDGD	52
TaTA1D (SEQ ID NO:19)	MGSVGTGLLKGLR----RVLEQQRKSVLDLCKRSRAWSSTVSFSDIDEKDD----MGDDGD	52
	* : * : * : * : * : * : * :	
PtTA1	LLGDRRESRFQGVDPKKGWFRGVHRAICGKVGQAPVQKILRNGRTVTIFTVTGGGMFD	120
AtTA1	NVTERPELQPHGVDPRKGWFRGVHRAICGKVGQAPLQKILRNGRTVTIFTVTGGGMFD	107
OsTA1	YTDSSRELEPQSVDPKKGWFRGVHRAICGKVGQVPVQKILRNGRTVTFTVTGGGMFD	112
OsTA1L	DDF-----THSRPDHVFGRGVHRAICGKVGQVPVQKILRNGHTVTFTVTGGGMFD	103
ZmTA1	SPNSKRELRPQGVDPKKGWFRGVHRAICGKVGQVPVQKILRNGHTVTFTVTGGGMFD	112
SbTA1	SPDSKRELRPQSVDPKKGWFRGVHRAICGKVGQVPVQKILRNGHTVTFTVTGGGMFD	112
BdTA1	YN-SRRELEPQTVDPKKGWFRGVHRAICGKVGQVPVQKILRNGRTITFTFTGGGMFD	111
HvTA1	LKDSRRELEPQSVDPKKGWFRGVHRAICGKVGQAPVQKILRNGRTVTIFTFTGGGMFD	112
TaTA1D	LKDSRRELEPQSVDPKKGWFRGVHRAICGKVGQAPVQKILRNGRTITIFTFTGGGMFD	112
	. . . *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
PtTA1	QRIIGSKDLPKPAQWHRIAVHNDSLGAYAVQQLTKNSSVYVEGDIETRVYNDISISGEVKN	180
AtTA1	QRLVGATNQPKPAQWHRIAVHNEVLGSYAVQKLAKNSSVYVEGDIETRVYNDISISSEVKS	167
OsTA1	QRVVGADLDPKPAQWHRIAHNDQLGAFVQKLVKNSAVYVEGDIETRVYNDISINDQVKN	172
OsTA1L	QRTVGAENLMPAQWHRI SVHNEQLGAFVQKLVKNSAVYVEGDIETRVYNDIRINDQVKN	163
ZmTA1	QRVIGPKDLPKPAQWHRIAVHNDYLSAYAVQKLVKNSAVYVEGDIETRVYNDISVNDQVKN	172
SbTA1	QRVIGPKDLPKPAQWHRIAVHNDQLGAYAVQKLVKNSAVYVEGDIETRVYNDISINDQVKN	172
BdTA1	QRVVESADVPKPAQWHRIAVHNEQLGAYAVQKLVKNSAVYIEGDIETRVYNDISINDQVKN	171
HvTA1	QRVIGSADTPKPAQWHRIAVHSEHLGAYAVQKLVKNSAVYIEGDIETRIYNDGIDGQVRN	172
TaTA1D	QRVIGSADTPKPAQWHRIAVHSEHLGAYAVQKLVKNSAVYVEGDIETRVYNDGVDGQVRN	172
	** : : * *****:*. : *. :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
PtTA1	---ICVRRDGKIRLIRSGENISNISFEDLREGLFS	212
AtTA1	IPEICVRRDGKIRMIKYGESISKISFDELKEGLI-	201
OsTA1	IPEICLRDDGKIRLIKSGESAASISLDELREGLF-	206
OsTA1L	IPEICVRRDGKIQLMQSGDSNVGKSLEELREGLF-	197
ZmTA1	IPEICVRRDGKIQLVKSGDSAANISLDELREGLF-	206
SbTA1	IPEICVRRDGKIRLVKSGDSAANISLDELREGLF-	206
BdTA1	IPEICVRRDGKIRLVKSGESAASISLDELREGLF-	205
HvTA1	IPEICIRGDGKIRLVKSGESAANISLDELREGLF-	206
TaTA1D	ISEICIRGDGKIRLVKSGESAASISLDELREGLF-	206
	:* ***:*. : *. :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	

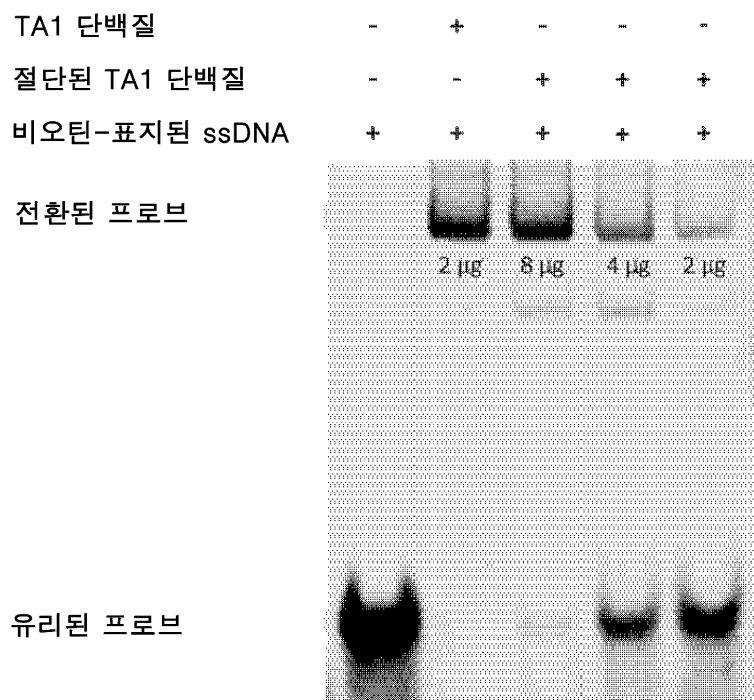
도면10



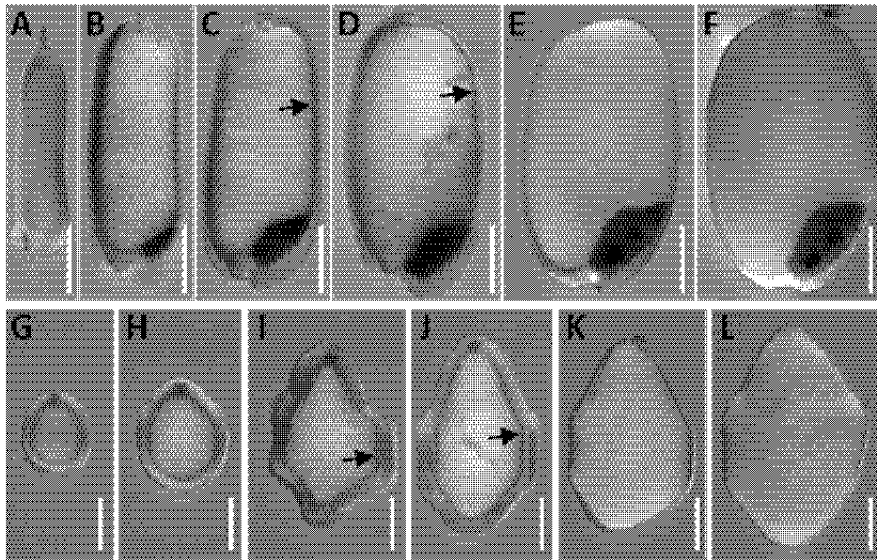
도면11



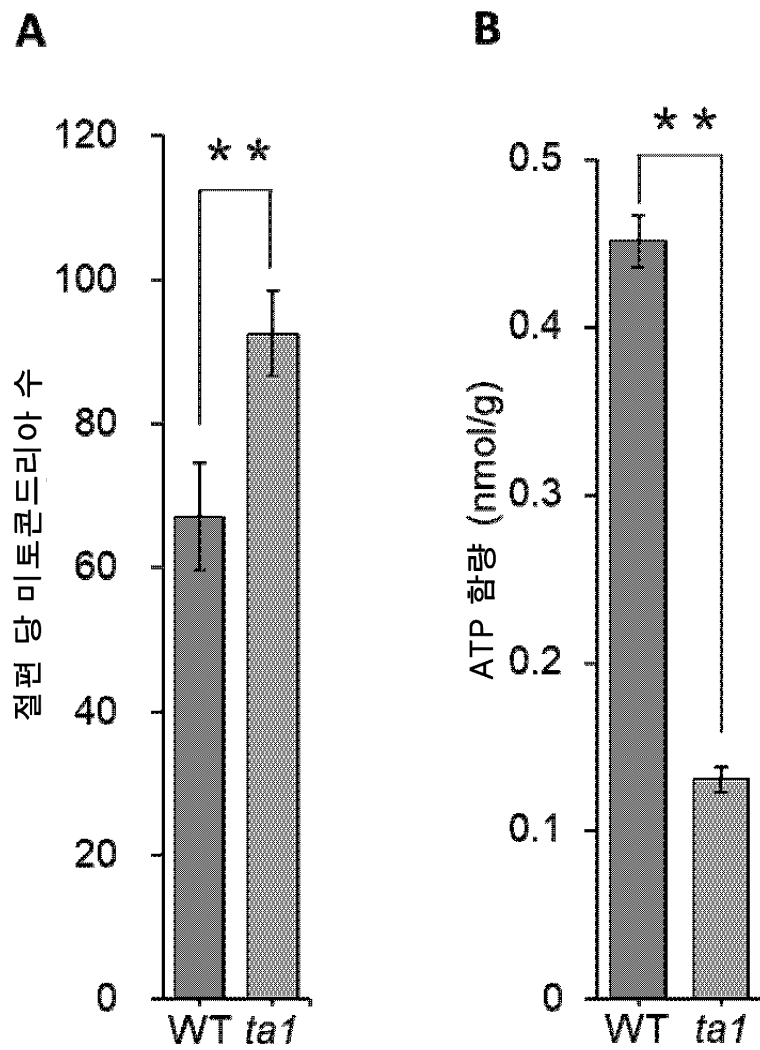
도면12



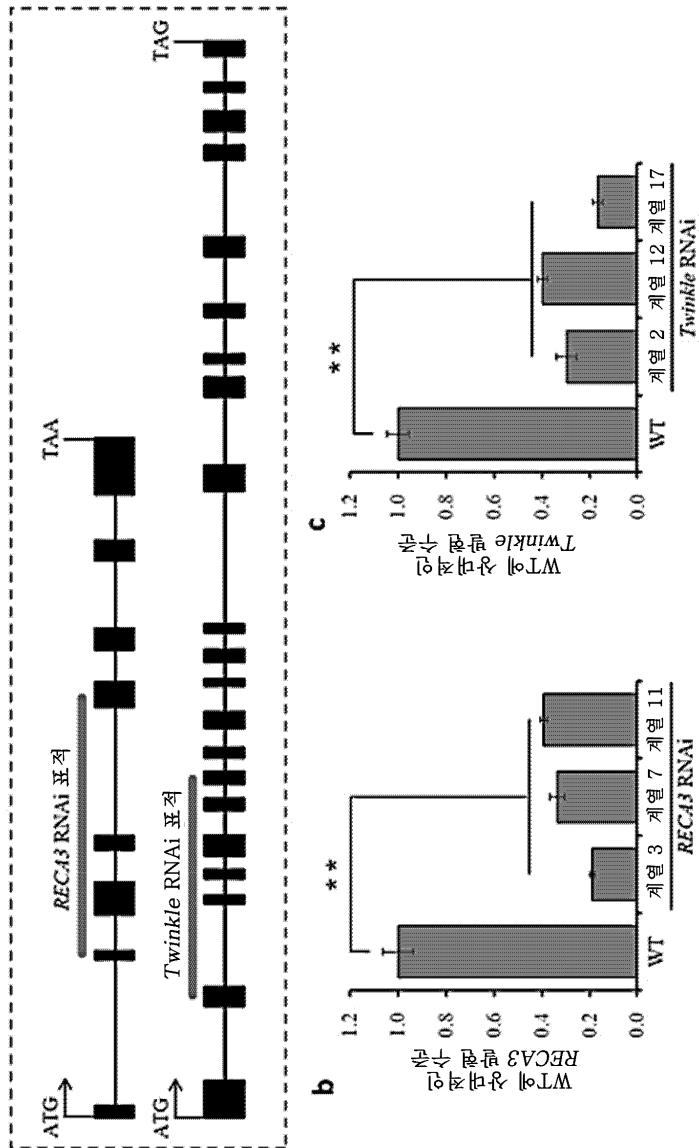
도면13



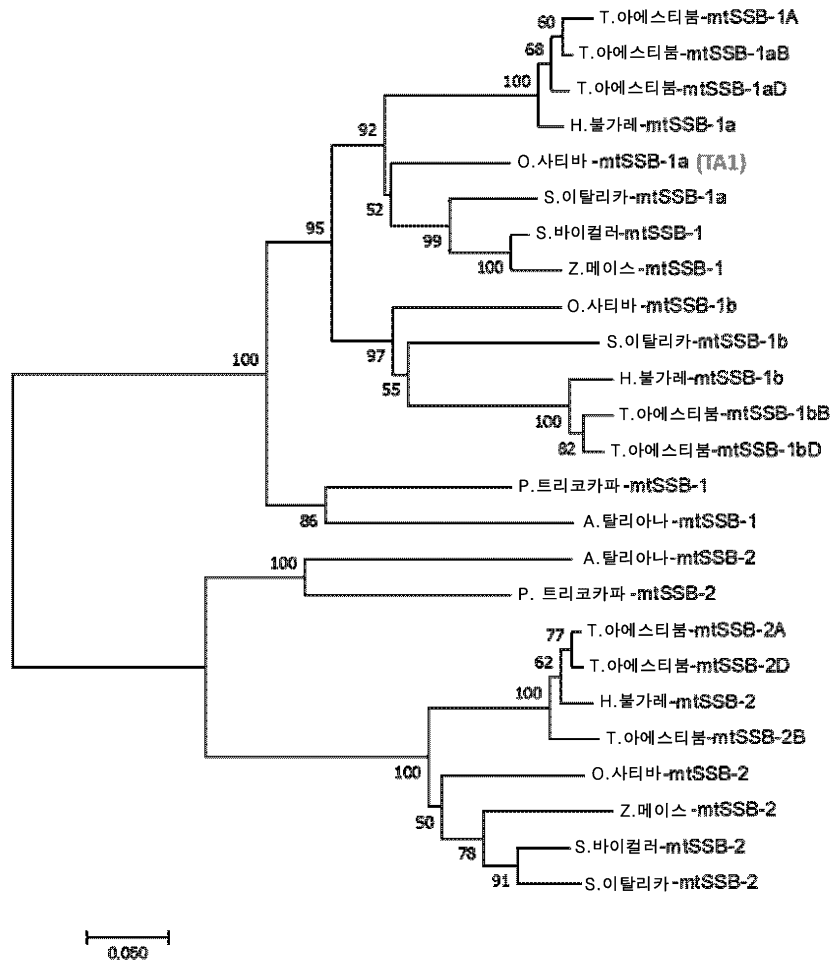
도면14



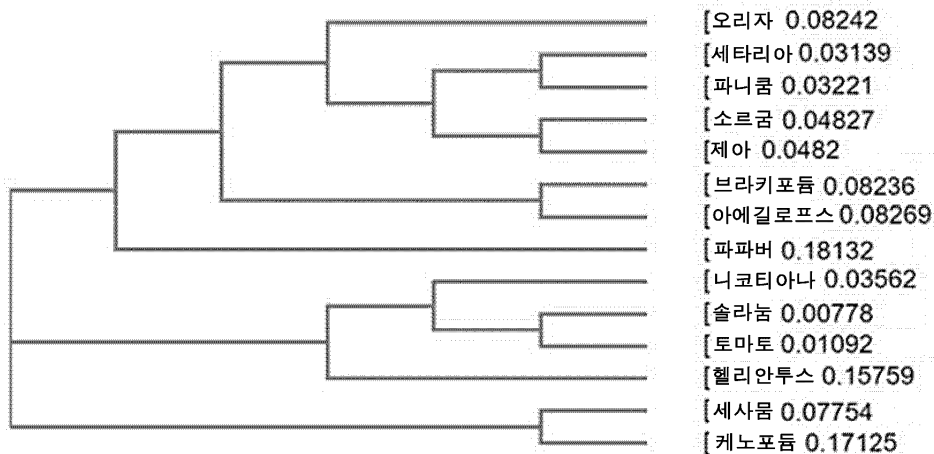
도면15



도면16



도면17



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research
Organisation

Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences

<120> Cereal grain with thickened aleurone

<130> 528362PCT

<150> AU2020904452

<151> 2020-12-01

<160> 99

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4938

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

ataactcaac cttttgatct cgctacgaag ctctctccgt ccaccaggc acgagcgccg 60

ccgcggccga ctccaccgga caccacccaa cgccgccagc cgctctctcc catctccct 120

cgatccgtac ggatagcctc cccgctcgct cggctctgcgc ccgtcgctgt cgtcccgcgc 180

tcttatccct cccgcgactc ggcgacgcgc gaaggcctcc ggcgcggggc tgaaggtacg 240

tccttttccc gagctcgttc tactgttcca actctgccat ggctgcagtt ttccattttg 300

ggctgggtct gccactgttc tatggggtat gcaactgttg tcgacgtcgc gtgaagcccc 360

tgaatggcca gtgtgcgatg cttgcaaggt gtttgttaaa atgtctcggt agaatatctt 420

ggaccgtttg catattttat ccatgcaaag tttagtccag taggctgtta atttttctgt 480

gattgcctat ttagatttta ggtggtgtta attcagcctc ctgaagaggg tggttattgg 540

atactacgat cctagaatgc cgctgcagct tagctaggcg gatcagccgc ttaggcaggt 600

agagcagctt ctttgtcttg gccggatgtc gtccctgagg ttccaacgga atggagctgc 660

tgtagctgaa taagaccata agttgttttt gtgcaggaaa gaataagcag aactgtcatg 720

gaactcctct gcactgttga gacaaacctg ggatgcctca tcataaagaa taagtgtctc 780

ccacgtgata ggccatcctg atgcacctta ttctctcatg tagttttttc cttgtagaag 840

gtcacactga acaaatgttt ttgagaatag aactgctacc aggaaaatgt tgaatgaagt 900

tgacgactgt gatgtttatg ttgttttgaa atccattaaa ggaataggaa aaaaatatat 960

gttctgatga ttatttttat gattttatta tttaacgttt ttctcaatg tgcgtagatt 1020

taccatgaat tcctcagca atggattact gaagggttg aggagggtct tagaacagca 1080

gagaaaacca attggtgggt tgtttttcat ggttgtttca agatttctac tcagttttta 1140

ctgagtaagt ttigattaaa tatttgtctg ttagatttc tacagaaaat ctcaagcttg	1200
gagttctact gtttcctttt ctgatattga tgagaagagt gaaatgggag gtgatgatga	1260
ttatacagat tcaagacgag agttagaacc ccaaagcgta gacccaaga agggctgggg	1320
attccgtggt gticacaggg tatttaagta taatatgaaa aggatacttc atgttttggt	1380
tttcaagctt aacttggtat taattgattg tttcaacttt ctaggctata atatgcggaa	1440
aagtcggaca ggttcctgtg cagaaaattt taaggaatgg tcgtacagtg actgttttta	1500
cagttggaac tggtagcatg tttagaccaga gggtagtagg ggatgcagat ctgccaaagc	1560
cagctcagtg gcatcggata gccattcata atgaccagct aggtgctttt gctgtccaga	1620
agctggtgaa gaagtacgtg gtttcagtga gaagatcacc cttttctttt tctccataca	1680
agtatacaac tatataccat ttcctagttc tatggcttga aattcttttt tactgtggtt	1740
ggtagctgtc ttgttcttgc cttatttcag ttctgcagtt tatgttgagg gtgatattga	1800
aaccagagta tacaatgaca gcattaatga tcaagtgaaa aatataccag agatttgtct	1860
tcgacgcgat ggtatgttga tctgccattc cactagaaac tttgtggtag taatatTTTA	1920
tagcaagaat aaataacgtt tgaagtttga acaattttct cggggtaaact ccataactct	1980
gttaccaaac tggacacaga agcctgctgc tttgtttaat tatactgcat ttgagtaatg	2040
ttgatagcta ttcttttgta cttatttatt ttgattgtct ttgttgttgt aaaagcttat	2100
ccttggaaaa atatTTtat gtacaggtaa gattcggctg attaaatctg gcgagagtgc	2160
tgctagcatt tcattagatg agctaagtaa gttcactgaa aaccttaata ttctgattta	2220
tgagaatctt gcattacttg tatttgttgt gattatgcaa ctatgattgg tctccacaat	2280
tatctgcatg cagatgtcca gtgttttaga ttttagtatt taccatttaa tcatgacaac	2340
ctttgtatgc aggagaagga ttgttctagt ttgaaagatc tcagcacaag caggccagga	2400
gtacaggcat gtttcaactc ttttgttgat tgttttaaca gtattaggat ttgacttct	2460
aagaagtgtc catgcacctt gttagctgtg ggtcatgtgt ttttatttaa ttgaacttg	2520
aaatgtgcat attgtgaatt atctgtagaa caccttcagc tttcaatcaa gcatttcctt	2580
gccaatactt atctgtcatt gattgggtgcc tcgtgctatc tttcagtaga aagtgatatt	2640
ttgatgcctt taccaggctc atttcttcat aagtttctca tagcgtggta ttttacttgt	2700
atcgctctt catcttaatg aaatatgttg ttacaacttc agcttggttac ataagggtga	2760
ttacaaatta taagaaatgt catagattca cggatcttgc gaatcaaata ttacaaacct	2820
ggaatggtag agtacctaatt tctatttata tttcttact ctatttgtac atgttgctga	2880
tagattctcc ctgggttatt tgtacatgaa tagttgcaca gtgacaatct taggccaatt	2940
tgttcaatga ttttaagaat gtaagacact gaaccataac tagtctctag ttggtggaat	3000

aaaagtgatc acctgtcatt attaatcttc atcatagatc atcaaatca attaggtgag 3060

 aaacaaacct ctgagtaaat attctcgagt ggcaagaag aacacaggat aacctgcatg 3120
 ttcacacaaa agcatagtat ctcttgtaa cgaagttgt agatcttcat gctgaaatgt 3180
 tgtgatcttg aaacttattc atatgaccaa attgtattta cacttgacat gttgccaggg 3240
 aatataaaag gtaatactag taaattaact gttgagtagg ttgagagaaa tcttacatca 3300
 gtcacacctt tatctaaaag cataattctg atgttcttcg ctttgaacc ttgtcaattg 3360
 tcaccaagta agaattgggtg tgcttttgat ggtatttcag gctttacctt atcctttgac 3420
 ctctttctga gcatctcctt catgccatcc gccacctga ctgcagggtg tgatagtgcc 3480

 atcctgcaga atgccaatag agctttgata gcatcttcga tgccatcctg ttctcttctg 3540
 tctttactga gctcatcccc taccgctctt gagcataagc cacaagcca ttccctccg 3600
 aagtttgctt tgacattctc tatgtattcc tgggtgcaat cctcttcag gccacagcac 3660
 gcacacctca ctgattcaat gtccatcttc aatgctgatg cctgatggaa agaggactaa 3720
 aagaacaata gtagatgcat gggagtagag aaggagaaag aaggtaggag aaggcaata 3780
 gaaggaaca gtatggagt ttaggactagg ttgctgcttg tgtggataat tttttagtag 3840
 ctctccttcc ttttggattg gcttgttttag ctgggtatgt tattgaaatt ttgagatttg 3900

 cccagaccca tagtatcttc aacagtgtac tacctcgtga aagaataaga aagataatat 3960
 gatttttttg atgcctacca gtttcttagg taaaatata ggaaaccgta gttcacatga 4020
 ctgcaactgt gttgaaggta aaggcaggag caggttccca tagcctgaat tagctagtag 4080
 agttttgttt ttctgtgtg aagacgcacg atggatgaca aataaacatg ctataagatc 4140
 caaatgaaaa tgcaaaagaa aagtatttcc catatctaaa aattgtatag ttgatcacat 4200
 gcggtcaatt agccatctac atatgcacat tacaaagaac acaacacaag cttatctacc 4260
 tttagtgaag gagggtgggc atatcacat cacattagct tatcctttta cgacagtata 4320

 aatttcaatg atttgtttt atataagtct ttacatgatg atgtctttaa aggttggtac 4380
 atgcctaata tgtgtgatat atactagaaa tgcagacac ctggtttcta acgcaacaac 4440
 ctgttttagg ttgattactg aaatgtcgca ctctaatat tagtcgcatc gccttcgttt 4500
 gtacgtatat acttttctgg gcaggtcgta acctgtttat ctgtgcatta ttaggttcaa 4560
 aagataaagt ggatacgtgc aggtcaacg atgatgctgg cctctcaaag aaaagaaaaa 4620
 cgacgatgct gcttcaccga agcgaaattt gttgtagcag gcatgtgaac cttgtcctgg 4680
 ccgccttcc agtcgtattt tcattatcaa catcctttaa tgtactcttg attaacatct 4740

tagcagtcaa atttacagta gtgtcatggt gtgtatgtgt tgggaacgta ttgctttggt 4800
ggctatacgt ctgttcacga caacacgacg atgtaacgat gaattctcgt tgttttggt 4860
cacgggtag atgcgctcag cctaactgct cgtgtcgcaa ctcgcaaag cagcgtcttt 4920
ttctgtcgag ttgtcaga 4938

<210> 2

<211> 621

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 2

atgaattctc tcagcaatgg attactgaag ggcttgagga gggctctaga acagcagaga 60
aaaccaattg atttctacag aaaatctcaa gcttgagatt ctactgttc cttttctgat 120

attgatgaga agagtgaat gggaggatgat gatgattata cagattcaag acgagagtta 180
gaacccaaa gcgtagaccc caagaagggc tggggattcc gtggtgttca cagggtata 240
atatgcgga aagtcggaca ggttcctgtg cagaaaaatt taaggaatgg tcgtacagt 300
actgttttta cagtgggaac tgggtggcatg ttgaccaga gggtagtagg ggatgcagat 360
ctgcaaagc cagctcagtg gcctcggata gccattcata atgaccagct aggtgctttt 420
gtgtccaga agctggtgaa gaattctgca gtttatgttg aggtgatat tgaaccaga 480
gtatacaatg acagcattaa tgatcaagtg aaaaatatac cagagatttg tcttcgacgc 540

gatggtgaaga ttcggtgat taaatctggc gagagtgtg ctagcatttc attagatgag 600
ctaagagaag gattgttcta g 621

<210> 3

<211> 206

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 3

Met Asn Ser Leu Ser Asn Gly Leu Leu Lys Gly Leu Arg Arg Val Leu

1 5 10 15

Glu Gln Gln Arg Lys Pro Ile Asp Phe Tyr Arg Lys Ser Gln Ala Trp

20 25 30

Ser Ser Thr Val Ser Phe Ser Asp Ile Asp Glu Lys Ser Glu Met Gly

35 40 45

Gly Asp Asp Asp Tyr Thr Asp Ser Arg Arg Glu Leu Glu Pro Gln Ser

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

100 105 110
Gln Arg Val Val Gly Asp Ala Asp Leu Pro Lys Pro Ala Gln Trp His
115 120 125
Arg Ile Ala Ile His Asn Asp Gln Leu Gly Ala Phe Ala Val Gln Lys
130 135 140
Leu Val Lys Asn Ser Ala Val Tyr Val Glu Gly Asp Ile Glu Thr Arg
145 150 155 160
Val Tyr Asn Asp Ser Ile Asn Asp Gln Val Lys Asn Ile Pro Glu Ile

165 170 175
Cys Leu Arg Arg Asp Gly Lys Ile Arg Leu Ile Lys Ser Gly Glu Ser
180 185 190
Ala Ala Ser Ile Ser Leu Asp Glu Leu Arg Glu Gly Leu Phe
195 200 205

<210> 4

<211> 4938

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 4

ataactcaac cttttgatct cgctacgaag ctctctcgct ccaccagcgc acgagcgccg 60
ccgcggccga ctccaccgga caccacccaa cgccgccagc cgctctctcc catctctcct 120

cgatccgtac ggatagcctc cccgctcgct cggtctgcgc ccgtcgctgt cgtcccgccg 180
tcttatccct cccgcgactc ggcgacgcgc gaaggcctcc ggcgcggggc tgaaggtacg 240
tccttttccc gagctcgttc tactgttcca actctgccat ggctgcagtt ttccattttg 300
ggctgggtct gccactgttc tatggggtat gcaactgttg tcgacgtcgc gtgaagcccc 360
tgaatggcca gtgtgcgatg cttgcaaggt gtttgttaaa atgtctcggt agaatatctt 420
ggaccgtttg catattttat ccatgcaaag tttagtccag taggctgtta atttttctgt 480

gattgcctat ttagatttta ggtggtgtta attcagcctc ctgaagaggg tggttattgg 540

atactacgat cctagaatgc cgctgcagct tagctaggcg gatcagccgc ttaggcaggt 600

agagcagctt ccttgtcttg gccggatgtc gtccttgagg tccaacgga atggagctgc 660

tgtagctgaa taagaccata agttgttttt gtgcaggaaa gaataagcag aactgtcatg 720

gaactcctct gcactgttga gacaaacctg ggatgcctca tcataaagaa taagtgtctc 780

ccacgtgata ggccatcctg atgcacctta tttcctcatg tagttttttc cttgtagaag 840

gtcacactga acaaatgctt ttgagaatag aactgctacc aggaaaatgt tgaatgaagt 900

tgacgactgt gatgtttatg ttgttttgaa atccattaaa ggaataggaa aaaaatatat 960

gttctgatga ttatttttat gattttattt tttaacgttt ttcctcaatg tgcgtagatt 1020

taccatgaat tctctcagca atggattact gaagggttg aggagggtct tagaacagca 1080

gagaaaacca attggtgggt tgtttttcat ggttgtttca agatttctac tcagttttta 1140

ctgagtaagt ttgattaaa tatttgtctg ttagatttc tacagaaaat ctcaagcttg 1200

gagttctact gtttcctttt ctgatattga tgagaagagt gaaatgggag gtgatgatga 1260

ttatacagat tcaagacgag agttagaacc ccaaagcgta gacccaaga agggctgggg 1320

attccgtggt gttcacaggg tatttaagta taatatgaaa aggatacttc atgttttggt 1380

tttcaagctt aacttggat taattgattg tttcaacttt ctaggctata atatgcggaa 1440

aagtcggaca ggttcctgtg cagaaaattt taaggaatgg tcgtacagtg actgttttta 1500

cagttggaac tggtagcatg ttgaccaga gggtagtagg ggatgcagat ctgcaaagc 1560

cagctcagtg gcacggata gccattcata atgaccagct aggtgctttt gctgtccaga 1620

agctggtgaa gaagtacgtg gtttcagtga gaagatcacc cttttctttt tctccataca 1680

agtatacaac tatataccat ttctagtgc tatggcttga aattcttttt tactgtggtt 1740

ggtgctgtct ttgttcttgc cttatttcag ttctgcagtt tatgttgagg gtgatattga 1800

aaccagagta tacaatgaca gcattaatga tcaagtgaaa aatataccag agatttgtct 1860

tcgacgcgat ggtatgttga tctgccattc cactagaaac tttgtgtag taatatatta 1920

tagcaagaat aaataacgtt tgaagtttga acaattttct cggggttaact ccataactct 1980

gttacaaac tggacacaga agcctgctgc ttgttttaata tatactgcat ttgagtaatg 2040

ttgatagcta ttcttttgta cttatttatt ttgattgtct ttgttggtgt aaaagcttat 2100

ccttgaaaa atatttatat gtacaagtaa gattcggctg attaaatctg gcgagagtgc 2160

tgctagcatt tcattagatg agctaagtaa gttcactgaa aaccttaata ttctgattta 2220

tgagaatctt gcattacttg tatttgttgt gattatgcaa ctatgattgg tctccacaat	2280
tatctgcatg cagatgtcca gtgttttaga ttttagtatt taccatttaa tcatgacaac	2340
ctttgtatgc aggagaagga ttgttctagt ttgaaagatc tcagcacaag caggccagga	2400
gtacaggcat gtttcaactc ttttgttgat tgttttaaca gtattaggat ttgacttct	2460
aagaagtgtc catgcaccct gttagctgtg ggcatgtgt ttttattaa ttgaacttg	2520
aatgtgcat attgtgaatt atctgtagaa caccttcagc tttcaatcaa gcatttcct	2580
gccaaactt atctgtcatt gattggtgcc tcgtgctatc tttcagtaga aagtgatatt	2640
ttgatgcctt taccaggctc atttcttcat aagtttctca tagcgtggta ttttacttgt	2700
atcgctctt catcttaatg aaatatgttg ttacaacttc agcttggtac ataagggtga	2760
ttacaaatta taagaaatgt catagattca cggatcttgc gaatcaaata ttacaaacct	2820
ggaatgtag agtacctaatt tctatttata tttcttctc ctatttgtac atgttgctga	2880
tagattctcc ctggggattt tgtacatgaa tagttgcaca gtgacaatct taggccaatt	2940
tgttcaatga ttttaagaat gtaagacact gaaccataac tagtctctag ttggtggaat	3000
aaaagtgtc acttgtcatt attaatcttc atcatagatc atcaaaatca attaggtgag	3060
aaacaaacct ctgagtaaat attctcgagt ggcaagaag aacacaggat aacctgcatg	3120
ttcacacaaa agcatagtat ctcttgtcaa cgaagtttgt agatcttcat gctgaaatgt	3180
tgtgatcttg aaacttatc atatgaccaa attgtattta cacttgacat gttgccaggg	3240
aatataaaag gtaatactag taaattaact gttgagtagg ttgagagaaa tcttacatca	3300
gtcacacct tatctaaaag cataattctg atgttcttcg ctttgaacc ttgtcaattg	3360
tcaccaagta agaattgggtg tgcttttgat ggtatttcag gctttacctt atcctttgac	3420
ctctttctga gcatctcctt catgccatcc gccacctga ctgcagggtg tgatagtgcc	3480
atcctgcaga atgcatatg agctttgata gcatcttcca tgccatcctg ttctcttctg	3540
tctttactga gctcatcccc taccgctct gagcataagc cacaagcca tttccctccg	3600
aagtttgct tgacattctc tatgtattcc tgggtgcaat cctcttcag gccacagcac	3660
gcacacctca ctgattcaat gtccatcttc aatgctgatg cctgatggaa agaggactaa	3720
aagaacaata gtagatgcat gggagtagag aaggagaaag aaggtgggag aaggcaaata	3780
gaaggaaaca gtagggagt caggactagg ttgctgcttg tgtggataat tttttagac	3840
ctctcttcc ttttggattg gcttgttttag cttggtatgt tattgaaatt ttgagatttg	3900
cccagacca tagtatcttc aacagtgtac tacctcgtga aagaataaga aagataatat	3960
gatttttttg atgcctacca gtttcttagg taaaaatata ggaaaccgta gttcacatga	4020
ctgcaactgt gttgaaggta aaggcaggag caggttccca tagcctgaat tagctagtag	4080

agttttgttt ttctgtgtg aagacgcacg atggatgaca aataaacatg ctataagatc 4140
 caaatgaaaa tgcaaaagaa aagttattcc catatctaaa aattgtatac ttgatcacat 4200
 gcggtcaatt agccatctac atatgcacat tacaagaac acaacacaag cttatctacc 4260
 tttagtgaag gagtgggggc atatcaccat cacattagct tatcctttta cgacagtata 4320

aatttcaatg attttgttt atataagtct ttacatgatg atgtctttaa aggttggttac 4380
 atgcctaata tgtgtgatat atactagaaa tgcagacac ctggtttcta acgcaacaac 4440
 cttgtttagg ttgattactg aaatgtcgca ctctaatat tagtcgcac gccttcgttt 4500
 gtacgtatat acttttctgg gcaggtcgta acctgtttat ctgtgcatta ttaggttcaa 4560
 aagataaagt ggatacgtgc aggctcaacg atgatgctgg cctctcaaag aaaagaaaaa 4620
 cgacgatgct gcttcaccga agcgaaattt gttgtagcag gcatgtgaac cttgtcctgg 4680
 ccgcccttc agtcgtattt tcattatcaa catcctttaa tgtactcttg attaacatct 4740

tagcagtcaa atttacagta gtgtcatggt gtgtatgtgt tgggaacgta ttgctttggt 4800
 ggctatacgt cttgtcacga caacacgacg atgtaacgat gaattctcgt tgttttgta 4860
 cacggggtag atgcgctcag cctaactgct cgtgtcgcaa ctgcaaatg cagcgtcttt 4920
 ttctgtcgag ttgtcaga 4938

<210> 5
 <211> 652
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa
 <400> 5

atgaattctc tcagcaatgg attactgaag ggcttgagga gggctttaga acagcagaga 60
 aaaccaattg atttctacag aaaatctcaa gcttggagtt ctactgttc cttttctgat 120

attgatgaga agagtgaat gggaggtgat gatgattata cagattcaag acgagagtta 180
 gaaccccaaa gcgtagaccc caagaagggc tggggattcc gtggtgttca cagggtata 240
 atatcgga aagtcggaca ggttctgtg cagaaaattt taaggaatgg tcgtacagtg 300
 actgttttta cagttggaac tggtagcatg ttgaccaga gggtagtagg ggatgcagat 360
 ctgcaaagc cagctcagtg gcatcgata gccattcata atgaccagct aggtgctttt 420
 gctgtccaga agctggtgaa gaattctgca gtttatgtt agggatgat tgaaccaga 480
 gtatacaatg acagcattaa tgatcaagtg aaaaatatac cagagatttg tcttcgacgc 540

gatgcttata cttggaaaaa tatttatatg tacaagtaag attcggtga ttaaatctgg 600
 cgagagtgct gctagcattt cattagatga gctaagagaa ggattgttct ag 652

<210> 6

<211> 561

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 6

atgaattctc tcagcaatgg attactgaag ggcttgagga gggctttaga acagcagaga	60
aaaccaattg atttctacag aaaatctcaa gcttgaggtt ctactgtttc cttttctgat	120
attgatgaga agagtgaat gggaggtgat gatgattata cagattcaag acgagagtta	180
gaaccccaaa gcgtagacct caagaagggc tggggattcc gtggtgttca cagggtata	240
atatgcggaa aagtcggaca ggttcctgtg cagaaaattt taaggaatgg tcgtacagtg	300
actgttttta cagttggaac tggtagcatg ttgaccaga gggtagtagg ggatgcagat	360
ctgccaaagc cagctcagtg gcatcggata gccattcata atgaccagct aggtgctttt	420
gctgtccaga agctggtgaa gaattctgca gtttatgttg aggtgatata tgaaaccaga	480
gtatacaatg acagcattaa tgatcaagtg aaaaatatac cagagatttg tcttcgacgc	540
gatggagaag gattgttcta g	561

<210> 7

<211> 620

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 7

atgaattctc tcagcaatgg attactgaag ggcttgagga gggctttaga acagcagaga	60
aaaccaattg atttctacag aaaatctcaa gcttgaggtt ctactgtttc cttttctgat	120
attgatgaga agagtgaat gggaggtgat gatgattata cagattcaag acgagagtta	180
gaaccccaaa gcgtagacct caagaagggc tggggattcc gtggtgttca cagggtata	240
atatgcggaa aagtcggaca ggttcctgtg cagaaaattt taaggaatgg tcgtacagtg	300
actgttttta cagttggaac tggtagcatg ttgaccaga gggtagtagg ggatgcagat	360
ctgccaaagc cagctcagtg gcatcggata gccattcata atgaccagct aggtgctttt	420
gctgtccaga agctggtgaa gaattctgca gtttatgttg aggtgatata tgaaaccaga	480
gtatacaatg acagcattaa tgatcaagtg aaaaatatac cagagatttg tcttcgacgc	540
gatgtaagat tcggctgatt aaatctggcg agagtgtgc tagcatttca ttagatgagc	600
taagagaagg attgttctag	620

<210> 8

<211> 192

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 8

Met Asn Ser Leu Ser Asn Gly Leu Leu Lys Gly Leu Arg Arg Val Leu

1 5 10 15

Glu Gln Gln Arg Lys Pro Ile Asp Phe Tyr Arg Lys Ser Gln Ala Trp

20 25 30

Ser Ser Thr Val Ser Phe Ser Asp Ile Asp Glu Lys Ser Glu Met Gly

35 40 45

Gly Asp Asp Asp Tyr Thr Asp Ser Arg Arg Glu Leu Glu Pro Gln Ser

50 55 60

Val Asp Pro Lys Lys Gly Trp Gly Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile

65 70 75 80

Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Val Pro Val Gln Lys Ile Leu Arg Asn

85 90 95

Gly Arg Thr Val Thr Val Phe Thr Val Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp

100 105 110

Gln Arg Val Val Gly Asp Ala Asp Leu Pro Lys Pro Ala Gln Trp His

115 120 125

Arg Ile Ala Ile His Asn Asp Gln Leu Gly Ala Phe Ala Val Gln Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Tyr Asn Asp Ser Ile Asn Asp Gln Val Lys Asn Ile Pro Glu Ile

165 170 175

Cys Leu Arg Arg Asp Ala Tyr Pro Trp Lys Asn Ile Tyr Met Tyr Lys

180 185 190

<210> 9

<211> 186

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 9

Met Asn Ser Leu Ser Asn Gly Leu Leu Lys Gly Leu Arg Arg Val Leu
1 5 10 15

Glu Gln Gln Arg Lys Pro Ile Asp Phe Tyr Arg Lys Ser Gln Ala Trp
20 25 30
Ser Ser Thr Val Ser Phe Ser Asp Ile Asp Glu Lys Ser Glu Met Gly
35 40 45
Gly Asp Asp Asp Tyr Thr Asp Ser Arg Arg Glu Leu Glu Pro Gln Ser
50 55 60
Val Asp Pro Lys Lys Gly Trp Gly Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile
65 70 75 80

Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Val Pro Val Gln Lys Ile Leu Arg Asn
85 90 95
Gly Arg Thr Val Thr Val Phe Thr Val Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp
100 105 110
Gln Arg Val Val Gly Asp Ala Asp Leu Pro Lys Pro Ala Gln Trp His
115 120 125
Arg Ile Ala Ile His Asn Asp Gln Leu Gly Ala Phe Ala Val Gln Lys
130 135 140

Leu Val Lys Asn Ser Ala Val Tyr Val Glu Gly Asp Ile Glu Thr Arg
145 150 155 160
Val Tyr Asn Asp Ser Ile Asn Asp Gln Val Lys Asn Ile Pro Glu Ile
165 170 175
Cys Leu Arg Arg Asp Gly Glu Gly Leu Phe
180 185

<210> 10

<211> 185

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 10

Met Asn Ser Leu Ser Asn Gly Leu Leu Lys Gly Leu Arg Arg Val Leu

1 5 10 15

Glu Gln Gln Arg Lys Pro Ile Asp Phe Tyr Arg Lys Ser Gln Ala Trp

 20 25 30

Ser Ser Thr Val Ser Phe Ser Asp Ile Asp Glu Lys Ser Glu Met Gly

 35 40 45

Gly Asp Asp Asp Tyr Thr Asp Ser Arg Arg Glu Leu Glu Pro Gln Ser

 50 55 60

Val Asp Pro Lys Lys Gly Trp Gly Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile

65 70 75 80

Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Val Pro Val Gln Lys Ile Leu Arg Asn

 85 90 95

Gly Arg Thr Val Thr Val Phe Thr Val Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp

 100 105 110

Gln Arg Val Val Gly Asp Ala Asp Leu Pro Lys Pro Ala Gln Trp His

 115 120 125

Arg Ile Ala Ile His Asn Asp Gln Leu Gly Ala Phe Ala Val Gln Lys

 130 135 140

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

145 150 155 160

Val Tyr Asn Asp Ser Ile Asn Asp Gln Val Lys Asn Ile Pro Glu Ile

 165 170 175

Cys Leu Arg Arg Asp Val Arg Phe Gly

 180 185

<210> 11

<211> 141

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 11

gtatacaatg acagcattaa tgatcaagtg aaaaatatac cagagatttg tcttcgacgc 60

gatggtaaga ttcggctgat taaatctggc gagagtctg ctagcatttc attagatgag 120

ctaagagaag gattgttcta g 141

<210> 12
 <211> 172
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 12
 gtatacaatg acagcattaa tgatcaagtg aaaaatatac cagagatttg tcttcgacgc 60
 gatgcttatac ctiggaaaaa tatttataatg tacaagtaag attcggctga ttaaactctgg 120
 cgagagtgcct gctagcattt cattagatga gctaagagaa ggattgttct ag 172
 <210> 13
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 13
 gtatacaatg acagcattaa tgatcaagtg aaaaatatac cagagatttg tcttcgacgc 60
 gatggagaag gattgttcta g 81
 <210> 14
 <211> 140
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 14
 gtatacaatg acagcattaa tgatcaagtg aaaaatatac cagagatttg tcttcgacgc 60
 gatgtaagat tcggctgatt aaatctggcg agagtgtctgc tagcatttca ttagatgagc 120
 taagagaagg attgttctag 140
 <210> 15
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 15
 Met Asn Ser Leu Ala Ile Arg Val Ser Lys Val Leu Arg Ser Ser Ser

1 5 10 15
 Ile Ser Pro Leu Ala Ile Ser Ala Glu Arg Gly Ser Lys Ser Trp Phe
 20 25 30
 Ser Thr Gly Pro Ile Asp Glu Gly Val Glu Glu Asp Phe Glu Glu Asn

35 40 45
Val Thr Glu Arg Pro Glu Leu Gln Pro His Gly Val Asp Pro Arg Lys
50 55 60
Gly Trp Gly Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile Ile Cys Gly Lys Val

65 70 75 80
Gly Gln Ala Pro Leu Gln Lys Ile Leu Arg Asn Gly Arg Thr Val Thr
85 90 95
Ile Phe Thr Val Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp Gln Arg Leu Val Gly
100 105 110
Ala Thr Asn Gln Pro Lys Pro Ala Gln Trp His Arg Ile Ala Val His
115 120 125
Asn Glu Val Leu Gly Ser Tyr Ala Val Gln Lys Leu Ala Lys Asn Ser

130 135 140
Ser Val Tyr Val Glu Gly Asp Ile Glu Thr Arg Val Tyr Asn Asp Ser
145 150 155 160
Ile Ser Ser Glu Val Lys Ser Ile Pro Glu Ile Cys Val Arg Arg Asp
165 170 175
Gly Lys Ile Arg Met Ile Lys Tyr Gly Glu Ser Ile Ser Lys Ile Ser
180 185 190
Phe Asp Glu Leu Lys Glu Gly Leu Ile
195 200

<210> 16

<211> 206

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 16

Met Thr Gly Val Ser Thr Gly Leu Leu Thr Gly Leu Arg Arg Val Met
1 5 10 15
Glu Gln Gln Arg Ile Ser Thr Ala Phe Cys Arg Gln Ser Arg Val Ser
20 25 30
Ser Ser Thr Val Ser Phe Ser Asp Leu Asp Glu Lys Gly Asp Met Glu
35 40 45

Tyr Asp Asp Asn Ser Pro Asn Ser Lys Arg Glu Leu Arg Pro Gln Gly

50 55 60

Val Asp Pro Asn Lys Gly Trp Glu Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile

65 70 75 80

Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Val Pro Val Gln Lys Ile Leu Arg Asn

85 90 95

Gly His Thr Val Thr Val Phe Thr Val Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp

100 105 110

Gln Arg Val Ile Gly Pro Lys Asp Leu Pro Lys Pro Ala Gln Trp His

115 120 125

Arg Ile Ala Val His Asn Asp Tyr Leu Ser Ala Tyr Ala Val Gln Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Tyr Asn Asp Ser Val Asn Asp Gln Val Lys Asn Ile Pro Glu Ile

165 170 175

Cys Val Arg Arg Asp Gly Lys Ile Gln Leu Val Lys Ser Gly Asp Ser

180 185 190

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

195 200 205

<210> 17

<211> 206

<212> PRT

<213> Sorghum bicolor

<400> 17

Met Thr Arg Val Ser Thr Gly Leu Leu Lys Gly Leu Arg Arg Val Met

1 5 10 15

Glu Gln Gln Arg Ile Ser Thr Ala Phe Cys Arg Gln Ser Gln Val Trp

20 25 30

Ser Ser Thr Val Ser Phe Ser Asp Phe Asp Glu Lys Gly Asp Met Glu

35 40 45

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

 Gly His Thr Val Thr Val Phe Thr Val Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp
 100 105 110
 Gln Arg Val Ile Gly Pro Lys Asp Leu Pro Lys Pro Ala Gln Trp His
 115 120 125
 Arg Ile Ala Val His Asn Asp Gln Leu Gly Ala Tyr Ala Val Gln Lys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asn Ser Ala Val Tyr Val Glu Gly Asp Ile Glu Thr Arg
 145 150 155 160

 Val Tyr Asn Asp Ser Ile Asn Asp Gln Val Lys Asn Ile Pro Glu Ile
 165 170 175
 Cys Val Arg Arg Asp Gly Lys Ile Arg Leu Val Lys Ser Gly Asp Ser
 180 185 190
 Ala Ala Asn Ile Ser Leu Asp Glu Leu Arg Asp Gly Leu Phe
 195 200 205
 <210> 18
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare
 <400> 18
 Met Gly Ser Val Gly Thr Gly Leu Leu Lys Gly Leu Arg Arg Val Leu

 1 5 10 15
 Glu Gln Gln Arg Lys Ser Val Asp Leu Cys Arg Thr Ser Arg Ala Trp
 20 25 30
 Ser Ser Thr Val Ser Phe Ser Asp Ile Asp Glu Lys Asp Asp Met Gly
 35 40 45
 Asp Asp Gly Asp Leu Lys Asp Ser Arg Arg Glu Leu Glu Pro Gln Ser

50 55 60
 Val Asp Pro Lys Lys Gly Trp Gly Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile

 65 70 75 80
 Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Ala Pro Val Gln Lys Ile Leu Arg Asn
 85 90 95
 Gly Arg Thr Val Thr Ile Phe Thr Ile Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp
 100 105 110
 Gln Arg Val Ile Gly Ser Ala Asp Thr Pro Lys Pro Ala Gln Trp His
 115 120 125
 Arg Ile Ala Val His Ser Glu His Leu Gly Ala Tyr Ala Val Gln Lys

 130 135 140
 Leu Val Lys Asn Ser Ala Val Tyr Ile Glu Gly Asp Ile Glu Thr Arg
 145 150 155 160
 Ile Tyr Asn Asp Gly Ile Asp Gly Gln Val Arg Asn Ile Pro Glu Ile
 165 170 175
 Cys Ile Arg Gly Asp Gly Lys Ile Arg Leu Val Lys Ser Gly Glu Ser
 180 185 190
 Ala Ala Asn Ile Ser Leu Asp Glu Leu Arg Asp Gly Leu Phe

 195 200 205
 <210> 19
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 <400> 19
 Met Gly Ser Val Gly Thr Gly Leu Leu Lys Gly Leu Arg Arg Val Leu
 1 5 10 15
 Glu Gln Gln Arg Lys Ser Val Asp Leu Cys Arg Thr Ser Arg Ala Trp
 20 25 30
 Ser Ser Thr Val Ser Phe Ser Asp Ile Asp Glu Lys Asp Asp Met Gly
 35 40 45

 Asp Asp Gly Asp Leu Lys Asp Ser Arg Arg Glu Leu Glu Pro Gln Ser

50 55 60
 Val Asp Pro Lys Lys Gly Trp Gly Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Ala Pro Val Gln Lys Ile Leu Arg Asn
 85 90 95
 Gly Arg Thr Ile Thr Ile Phe Thr Ile Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp
 100 105 110

 Gln Arg Val Ile Gly Ser Ala Asp Thr Pro Lys Pro Ala Gln Trp His
 115 120 125
 Arg Ile Ala Val His Ser Glu His Leu Gly Ala Tyr Ala Val Gln Lys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asn Ser Ala Val Tyr Val Glu Gly Glu Ile Glu Thr Arg
 145 150 155 160
 Val Tyr Asn Asp Gly Val Asp Gly Gln Val Arg Asn Ile Ser Glu Ile
 165 170 175

 Cys Ile Arg Gly Asp Gly Lys Ile Arg Leu Val Lys Ser Gly Glu Ser
 180 185 190
 Ala Ala Ser Ile Ser Leu Asp Glu Leu Arg Asp Gly Leu Phe
 195 200 205
 <210> 20
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Brachypodium distachyon
 <400> 20
 Met Gly Ser Gly Gly Thr Gly Leu Met Lys Gly Leu Arg Arg Phe Leu
 1 5 10 15
 Glu Gln Gln Arg Lys Ser Val Asp Leu Cys Arg Lys Ser Arg Ala Trp

 20 25 30
 Ser Ser Thr Val Ser Phe Ser Asp Ile Asp Asp Lys Ser Asp Met Gly
 35 40 45
 Asp Asp Gly Asp Tyr Asn Ser Arg Arg Glu Leu Glu Pro Gln Thr Val
 50 55 60

Asp Pro Lys Lys Gly Trp Gly Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile Leu
65 70 75 80
Cys Gly Lys Val Gly Gln Val Pro Val Gln Lys Ile Leu Arg Asn Gly
85 90 95
Arg Thr Ile Thr Val Phe Thr Ile Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp Gln
100 105 110
Arg Val Val Glu Ser Ala Asp Val Pro Lys Pro Ala Gln Trp His Arg
115 120 125
Ile Ala Val His Asn Glu Gln Leu Gly Ala Tyr Ala Val Gln Lys Leu
130 135 140
Val Lys Asn Ser Ala Val Tyr Ile Glu Gly Asp Ile Glu Thr Arg Val
145 150 155 160
Tyr Asn Asp Ser Ile Asn Asp Gln Val Lys Asn Ile Pro Glu Ile Cys
165 170 175
Ile Arg Arg Asp Gly Lys Ile Arg Leu Val Lys Ser Gly Glu Ser Ala
180 185 190
Ser Ser Ile Ser Leu Asp Glu Leu Arg Glu Gly Leu Phe
195 200 205
<210> 21
<211> 212
<212> PRT
<213> Populus trichocarpa
<400> 21
Met Ser Ser Leu Val Leu Arg Phe Ala Lys Leu Leu Arg Val Pro Ser
1 5 10 15
Pro Val Ile Met Pro Thr Ser Ser Leu Gly Val Gly Leu Gln Arg Ser
20 25 30
Leu Arg Ser Cys Tyr Ser Thr Val Ser Phe Asn Ser Asp Asn Glu Glu
35 40 45
Gly Lys Asn Asp Lys Val Glu Glu Glu Phe Asp Asp Leu Leu Gly Asp
50 55 60

Arg Arg Glu Ser Arg Phe Gln Gly Val Asp Pro Arg Lys Gly Trp Glu
 65 70 75 80
 Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Ala
 85 90 95
 Pro Val Gln Lys Ile Leu Arg Asn Gly Arg Thr Val Thr Ile Phe Thr
 100 105 110
 Val Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp Gln Arg Ile Ile Gly Ser Lys Asp
 115 120 125

Leu Pro Lys Pro Ala Gln Trp His Arg Ile Ala Val His Asn Asp Ser
 130 135 140
 Leu Gly Ala Tyr Ala Val Gln Gln Leu Thr Lys Asn Ser Ser Val Tyr
 145 150 155 160
 Val Glu Gly Asp Ile Glu Ile Arg Val Tyr Asn Asp Ser Ile Ser Gly
 165 170 175
 Glu Val Lys Asn Ile Cys Val Arg Arg Asp Gly Lys Ile Arg Leu Ile
 180 185 190

Arg Ser Gly Glu Asn Ile Ser Asn Ile Ser Phe Glu Asp Leu Arg Glu
 195 200 205

Gly Leu Phe Ser
 210

<210> 22

<211> 206

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 22

Met Gly Ser Val Gly Thr Gly Leu Leu Lys Gly Leu Arg Arg Val Leu
 1 5 10 15
 Glu Lys Gln Arg Lys Pro Val Asp Leu Cys Arg Thr Ser Arg Ala Trp
 20 25 30

Ser Ser Thr Val Ser Phe Ser Asp Ile Asp Glu Lys Asp Asp Met Gly
 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Leu Lys Asp Ser Arg Arg Glu Leu Glu Pro Gln Ser

50 55 60
 Val Asp Pro Lys Lys Gly Trp Gly Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Ala Pro Val Gln Lys Ile Leu Arg Asn
 85 90 95

 Gly Arg Thr Ile Thr Ile Phe Thr Ile Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp
 100 105 110
 Gln Arg Val Ile Gly Ser Ala Asp Thr Pro Lys Pro Ala Gln Trp His
 115 120 125
 Arg Ile Ala Val His Ser Glu His Leu Gly Ala Tyr Ala Val Gln Lys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asn Ser Ala Val Tyr Ile Glu Gly Glu Ile Glu Thr Arg
 145 150 155 160

 Val Tyr Asn Asp Gly Ile Asp Gly Gln Val Arg Asn Ile Pro Glu Ile
 165 170 175
 Cys Ile Arg Gly Asp Gly Lys Ile Arg Leu Val Lys Ser Gly Glu Ser
 180 185 190
 Ala Ala Ser Ile Ser Leu Asp Glu Leu Arg Asp Gly Leu Phe
 195 200 205
 <210> 23
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> *Setaria italica*
 <400> 23
 Met Ser His Ala Ser Thr Gly Leu Leu Lys Gly Leu Arg Arg Val Leu

 1 5 10 15
 Glu Gln His Arg Ile Ser Thr Val Phe Cys Arg Gln Ser Arg Ala Trp
 20 25 30
 Ser Ser Thr Val Ser Phe Ser Asp Leu Asp Glu Lys Gly Asp Met Asp
 35 40 45
 Ile Asp Asp Asp Tyr Thr Asp Ser Lys Arg Glu Leu Gln Pro His Ser
 50 55 60

Val Asp Pro Lys Lys Gly Trp Ala Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile

65 70 75 80

Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Val Pro Val Gln Lys Ile Leu Arg Asn

85 90 95

Gly Arg Thr Val Thr Val Phe Thr Val Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp

100 105 110

Gln Arg Val Ile Gly Pro Glu Asp Leu Pro Lys Pro Ala Gln Trp His

115 120 125

Arg Ile Ala Val His Asn Asp Arg Leu Gly Ala Tyr Val Val Gln Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Tyr Asn Asp Ser Ile Asn Asp Gln Val Arg Asn Ile Pro Glu Ile

165 170 175

Cys Val Arg Arg Asp Gly Lys Ile Arg Leu Val Lys Ser Gly Asp Ser

180 185 190

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

195 200 205

<210> 24

<211> 197

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 24

Met Met Ser Ala Lys Leu Leu Arg Ser Met Ser Val Arg Arg Leu Leu

1 5 10 15

Gly Gln Gln Arg Asn Ser Val Glu Phe Tyr Arg Lys Ser Gln Ala Trp

20 25 30

Asn Ser Thr Ala Ser Phe Ser Asp Val Asp Glu Lys Asn Arg Lys Gly

35 40 45

Gly Asp Ala Glu Asp Asp Phe Thr His Ser Arg Pro Asp His Val Phe

50 55 60

Arg Gly Val His Arg Ala Ile Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Val Pro
 65 70 75 80
 Val Gln Lys Ile Leu Arg Asn Gly His Thr Val Thr Val Phe Thr Val
 85 90 95
 Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp Gln Arg Thr Val Gly Ala Glu Asn Leu
 100 105 110

Pro Met Pro Ala Gln Trp His Arg Ile Ser Val His Asn Glu Gln Leu
 115 120 125
 Gly Ala Phe Ala Val Gln Lys Leu Val Lys Asn Ser Ala Val Tyr Val
 130 135 140
 Glu Gly Asp Ile Glu Thr Arg Val Tyr Asn Asp Arg Ile Asn Asp Gln
 145 150 155 160
 Val Lys Asn Ile Pro Glu Ile Cys Val Arg Arg Asp Gly Lys Ile Gln
 165 170 175

Leu Met Gln Ser Gly Asp Ser Asn Val Gly Lys Ser Leu Glu Glu Leu
 180 185 190
 Arg Glu Gly Leu Phe
 195

<210> 25

<211> 196

<212> PRT

<213> *Setaria italica*

<400> 25

Met Gly Thr Arg Leu Leu Lys Gly Leu Ser Leu Lys Arg Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Cys Ser Ser Ala Asp Leu Tyr Ile Lys Ser Arg Ala Phe Ser Ser
 20 25 30

Thr Val Ser Phe Ser Asp Leu Asn Glu Lys Phe Gly Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Asp Asp Asp Asp Phe Lys Gly Pro Arg Lys Asn Lys Glu Tyr Gln Phe
 50 55 60

Arg Gly Val Tyr Arg Ala Ile Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Val Pro

65				70				75				80			
Val	Gln	Lys	Lys	Leu	Arg	Asn	Gly	His	Thr	Val	Thr	Val	Phe	Thr	Val
				85				90				95			
Gly	Thr	Ala	Gly	Met	Phe	Asp	Gln	Arg	Ile	Val	Ala	Asp	Asn	Leu	Pro
100				105				110							
Met	Pro	Ala	Gln	Trp	His	Arg	Ile	Ala	Val	His	Asn	Glu	Glu	Leu	Gly
115				120				125							
Ala	Tyr	Ala	Val	Gln	Lys	Leu	Val	Lys	Asn	Ser	Ala	Val	Phe	Val	Glu
130				135				140							
Gly	Asp	Ile	Glu	Thr	Arg	Val	Tyr	Ser	Asp	Ser	Val	Asn	Asp	Gln	Val
145				150				155				160			
Lys	Asn	Ile	Pro	Glu	Ile	Cys	Leu	Arg	Arg	Asp	Gly	Lys	Ile	Arg	Leu
165				170				175							
Leu	Gln	Ser	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Ser	Lys	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg
180				185				190							
Glu	Gly	Leu	Phe												
195															
<210>	26														
<211>	197														
<212>	PRT														
<213>	Hordeum vulgare														
<400>	26														
Met	Ser	Thr	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	Leu	Ser	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Gly
1				5				10				15			
Gln	Gln	Arg	Lys	Pro	Ile	Asp	Leu	Tyr	Thr	Ala	Ser	Arg	Ala	Trp	Ser
20				25				30							
Ser	Ser	Ala	Ser	Phe	Ser	Asp	Val	His	Glu	Lys	Lys	Asn	Gly	Met	Gly
35				40				45							
Val	Glu	Ala	Asp	Gly	Asp	Leu	Ala	Asp	Ser	Trp	Lys	Asp	Ala	Asp	Phe
50				55				60							
Arg	Gly	Val	Tyr	Arg	Ala	Ile	Ile	Cys	Gly	Ser	Val	Gly	Gln	Val	Pro
65				70				75				80			

Val Gln Lys Lys Leu Arg Asn Gly His Thr Val Thr Val Phe Thr Val

85 90 95

Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp Gln Arg Arg Leu Gly Ala Glu Asn Leu

100 105 110

Pro Met Pro Ala Gln Trp His Arg Ile Ala Val His Asn Glu His Leu

115 120 125

Gly Thr Tyr Ala Val Arg Lys Leu Val Lys Asn Ala Ala Val Tyr Val

130 135 140

Glu Gly Asp Ile Glu Thr Arg Val Tyr Asn Asp Asp Ile Asn Asn Leu

145 150 155 160

Val Lys Ile Val Pro Glu Ile Cys Val Arg Phe Asp Gly Lys Ile His

165 170 175

Leu Val Gln Ser Gly Gly Thr Asp Val Ser Lys Ser Leu Glu Glu Leu

180 185 190

Arg Glu Gly Leu Phe

195

<210> 27

<211> 196

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 27

Met Ser Thr Lys Leu Leu Asn Ser Leu Ser Leu Thr Arg Leu Leu Gly

1 5 10 15

Leu Arg Arg Asn Pro Ile Asp Leu Tyr Thr Ala Ser Arg Ala Trp Ile

20 25 30

Ser Ser Thr Ser Phe Ser Gly Val His Glu Lys Asn Gly Met Gly Val

35 40 45

Glu Ala Asp Gly Asp Leu Ala Asp Ser Trp Lys Asp Ala Asp Phe Arg

50 55 60

Gly Val Tyr Arg Ala Ile Ile Cys Gly Ser Val Gly Gln Val Pro Val

65 70 75 80

Gln Lys Lys Leu Arg Asn Gly His Thr Val Thr Val Phe Thr Val Gly
85 90 95
Thr Gly Gly Met Phe Asp Gln Arg Arg Val Gly Ala Glu Asn Leu Pro
100 105 110
Met Pro Ala Gln Trp His Arg Ile Ala Val His Asn Ala Gln Leu Gly
115 120 125
Ala Tyr Ala Val Gln Lys Leu Val Lys Asn Ala Ala Val Tyr Val Glu
130 135 140
Gly Glu Ile Glu Thr Arg Val Tyr Asn Asp Asp Ile Asn Asn Leu Val
145 150 155 160
Lys Ile Val Pro Glu Ile Cys Val Arg Tyr Asp Gly Lys Ile His Leu
165 170 175
Val Gln Ser Gly Gly Ser Asp Val Ser Lys Ser Leu Glu Glu Leu Arg
180 185 190
Glu Gly Leu Phe
195
<210> 28
<211> 196
<212> PRT
<213> Triticum aestivum
<400> 28
Met Ser Thr Lys Leu Leu Asn Ser Leu Ser Leu Arg Arg Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gln Gln Arg Asn Pro Ile Asp Leu Tyr Thr Ala Ser Arg Ala Trp Ser
20 25 30
Ser Ser Thr Ser Phe Ser Gly Val His Glu Lys Asn Gly Met Gly Val
35 40 45
Glu Ala Asp Gly Asp Val Ala Asp Ser Trp Lys Asp Ala Asp Phe Arg
50 55 60
Gly Val Tyr Arg Ala Ile Ile Cys Gly Ser Val Gly Gln Val Pro Val
65 70 75 80
Gln Lys Lys Leu Arg Asn Gly His Ile Val Thr Val Phe Thr Val Gly

85 90 95
Thr Gly Gly Met Phe Asp Gln Arg Arg Ala Gly Ala Glu Asn Leu Pro
100 105 110
Met Pro Ala Gln Trp His Arg Ile Ala Val His Asn Glu Gln Leu Gly
115 120 125
Thr Tyr Ala Val Gln Lys Leu Val Lys Asn Ala Ala Val Tyr Val Glu
130 135 140
Gly Asp Ile Glu Thr Arg Val Tyr Asn Asp Asp Ile Asn Asn Leu Val
145 150 155 160
Lys Ile Val Pro Glu Ile Cys Val Arg Phe Asp Gly Lys Ile His Leu
165 170 175
Val Gln Ser Gly Gly Ser Asp Val Ser Lys Ser Leu Glu Glu Leu Arg
180 185 190
Glu Gly Leu Phe
195
<210> 29
<211> 196
<212> PRT
<213> Triticum aestivum
<400> 29
Met Ser Thr Lys Leu Leu Asn Ser Leu Ser Leu Arg Arg Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gln Gln Arg Asn Pro Ile Asp Leu Tyr Thr Ala Ser Arg Ala Trp Ser
20 25 30
Ser Ser Thr Ser Phe Ser Gly Ala His Glu Lys Asn Gly Met Gly Val
35 40 45
Glu Ala Asp Gly Asp Leu Ala Asp Ser Trp Lys Asp Ala Asp Phe Arg
50 55 60
Gly Val Tyr Arg Ala Ile Ile Cys Gly Ser Val Gly Gln Val Pro Val
65 70 75 80
Gln Lys Lys Leu Arg Asn Gly His Thr Val Thr Val Phe Thr Val Gly
85 90 95

Thr Gly Gly Met Phe Asp Gln Arg Arg Ala Gly Ala Glu Asn Leu Pro

100 105 110
Met Pro Ala Gln Trp His Arg Ile Ala Val His Asn Glu Gln Leu Gly
115 120 125
Thr Tyr Ala Val Gln Lys Leu Val Lys Asn Ala Ala Val Tyr Val Glu
130 135 140
Gly Asp Ile Glu Thr Arg Ala Tyr Asn Asp Asn Ile Asn Asn Gln Val
145 150 155 160
Lys Ile Val Pro Glu Ile Cys Val Arg Phe Asp Gly Lys Ile His Leu

165 170 175
Val Gln Ser Gly Gly Ser Asp Val Ser Lys Ser Leu Glu Glu Leu Arg
180 185 190
Glu Gly Leu Phe
195

<210> 30
<211> 224
<212> PRT
<213> Oryza sativa
<400> 30

Met Ala Ala Thr Ala Ser Ser Phe Leu Ala Arg Arg Leu Leu Leu Thr
1 5 10 15
Arg Arg Val Leu Ser Ser Pro Leu Arg Pro Phe Ser Thr Thr Asp Ser
20 25 30

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Asp Ser Arg Ala Gly
35 40 45
Ser Asp Ala Gly Pro Asp Pro Glu Gln Gln Gln Pro Pro Pro Ala Gly
50 55 60
Gln Asp Gln Gln Ala Ala Ala Arg Pro Arg Ala Gly Asp Thr Arg Pro
65 70 75 80
Leu Glu Asn Gly Leu Asp Pro Gly Ile Tyr Lys Ala Ile Met Val Gly
85 90 95

Lys Val Gly Gln Glu Pro Ile Gln Lys Arg Leu Arg Ser Gly Arg Thr
 100 105 110
 Val Val Leu Phe Ser Leu Gly Thr Gly Gly Ile Arg Asn Asn Arg Arg
 115 120 125
 Pro Leu Asp Arg Glu Glu Pro His Gln Tyr Ala Glu Arg Cys Ser Val
 130 135 140
 Gln Trp His Arg Val Cys Ile Tyr Pro Glu Arg Leu Gly Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Leu Lys His Val Lys Thr Gly Ser Val Leu Tyr Leu Glu Gly Asn Leu
 165 170 175
 Glu Thr Lys Val Phe Ser Asp Pro Ile Thr Gly Leu Val Arg Arg Ile
 180 185 190
 Arg Glu Ile Ala Val Arg Ser Asn Gly Arg Leu Leu Phe Leu Gly Asn
 195 200 205
 Asp Cys Asn Ala Pro Lys Leu Gly Glu Ala Lys Gly Val Gly Tyr Phe
 210 215 220

<210> 31

<211> 217

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 31

Met Ala Asn Ser Met Ala Thr Leu Ser Arg Arg Leu Tyr Arg Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Asn Pro Arg Ile Ser Gln Ala Ser Met Ser Phe Cys Thr Asn
 20 25 30
 Asn Ile Thr Ser Pro Glu Asp Ser Asp Phe Asp Glu Leu Glu Ser Pro
 35 40 45
 Ile Glu Pro Lys Ala Ser Asp Pro Val Ser Arg Phe Ser Gly Glu Glu
 50 55 60
 Arg Val Met Glu Glu Arg Pro Leu Glu Asn Gly Leu Asp Ser Gly Ile
 65 70 75 80
 Phe Lys Ala Ile Leu Val Gly Gln Val Gly Gln Leu Pro Leu Gln Lys

85 90 95
 Lys Leu Lys Ser Gly Arg Thr Val Thr Leu Phe Ser Val Gly Thr Gly
 100 105 110
 Gly Ile Arg Asn Asn Arg Arg Pro Leu Ile Asn Glu Asp Pro Arg Glu
 115 120 125
 Tyr Ala Ser Arg Ser Ala Val Gln Trp His Arg Val Ser Val Tyr Pro
 130 135 140
 Glu Arg Leu Ala Asp Leu Val Leu Lys Asn Val Glu Pro Gly Thr Val
 145 150 155 160
 Ile Tyr Leu Glu Gly Asn Leu Glu Thr Lys Ile Phe Thr Asp Pro Val
 165 170 175
 Thr Gly Leu Val Arg Arg Ile Arg Glu Val Ala Ile Arg Arg Asn Gly
 180 185 190
 Arg Val Val Phe Leu Gly Lys Ala Gly Asp Met Gln Gln Pro Ser Ser
 195 200 205
 Ala Glu Leu Arg Gly Val Gly Tyr Tyr
 210 215
 <210> 32
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Sorghum bicolor
 <400> 32
 Met Ala Ala Ser Ser Ala Ser Leu Leu Ala Arg Arg Leu Ile Leu Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Thr
 20 25 30
 Pro Ser Ser Ser Thr Pro Ser Phe Asn Gly Ser Asp Ala Glu Ser Asp
 35 40 45
 Pro Glu His Glu His Tyr Gln Pro Arg Ala Asp Gln Asp Arg Gln Gln
 50 55 60
 Thr Ser Asn Arg Pro Arg Pro Pro Asp Thr Thr Arg Pro Leu Glu Asn
 65 70 75 80

Gly Leu Asp Pro Gly Ile Tyr Lys Ala Ile Leu Val Gly Lys Val Gly

85 90 95

Gln Glu Pro Met Gln Lys Arg Leu Arg Asn Gly Arg Thr Val Val Leu

100 105 110

Phe Ser Leu Gly Thr Gly Gly Ile Arg Asn Asn Arg Arg Pro Leu Asp

115 120 125

Arg Glu Glu Pro His Gln Tyr Ala Asp Arg Cys Ser Val Gln Trp His

130 135 140

Arg Val Cys Val Tyr Pro Glu Arg Leu Gly Thr Leu Ala Leu Lys Asn

145 150 155 160

Val Lys Thr Gly Thr Val Leu Tyr Leu Glu Gly Asn Leu Glu Thr Lys

165 170 175

Val Phe Cys Asp Pro Ile Thr Gly Leu Val Arg Arg Ile Arg Glu Ile

180 185 190

Ala Val Arg Ser Thr Gly Arg Leu Leu Phe Leu Gly Asn Asp Thr Asn

195 200 205

Ala Pro Lys Leu Gly Glu Val Lys Gly Val Gly Tyr Phe

210 215 220

<210> 33

<211> 224

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 33

Met Ala Ala Ser Ser Ala Ser Leu Leu Ala Arg Arg Leu Ile Met Ser

1 5 10 15

Arg Arg Phe Leu Ser Ser Pro Leu Gly Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ala

20 25 30

Thr Arg Ser Phe Ser Ile Ser Ser Pro Gly Phe Lys Ser Phe Val Val

35 40 45

Glu Ser Asp Leu Glu Asn Glu His Asp Gln Pro Pro Ala Asp Gln Asn

50 55 60

Arg Gln Gln Thr Ser Asn Ser Pro Arg Pro Pro Asp Thr Thr Arg Pro
65 70 75 80
Leu Glu Asn Gly Leu Asp Pro Gly Ile Tyr Lys Ala Ile Leu Val Gly
85 90 95
Lys Val Gly Gln Glu Pro Met Gln Lys Arg Leu Arg Ser Gly Lys Thr
100 105 110

Val Val Leu Phe Ser Leu Gly Thr Gly Gly Ile Arg Asn Asn Arg Arg
115 120 125
Pro Leu Asp Arg Glu Glu Pro His Gln Tyr Ala Asp Arg Cys Ser Val
130 135 140
Gln Trp His Arg Val Cys Val Tyr Pro Asp Arg Leu Gly Thr Val Ala
145 150 155 160
Leu Asn Asn Val Lys Thr Gly Thr Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Asn Leu
165 170 175

Glu Thr Lys Val Phe Cys Asp Pro Ile Thr Gly Leu Val Arg Arg Ile
180 185 190
Arg Glu Ile Ala Val Arg Ser Ser Gly Arg Leu Leu Phe Leu Gly Asn
195 200 205
Asp Ala Asn Ala Pro Lys Leu Gly Glu Val Lys Gly Val Gly Tyr Phe
210 215 220

<210> 34

<211> 225

<212> PRT

<213> *Setaria italica*

<400> 34

Met Ala Ala Ser Ser Ala Ser Leu Leu Ala Arg Arg Leu Leu Leu Ser

1 5 10 15
Arg Arg Phe Leu Ser Ser Pro Leu Arg Pro Phe Ser Thr Thr Thr Thr
20 25 30
Pro Ser Ser Ser Ser Ile Ser Ser Pro Ser Phe Asn Gly Ser Asp
35 40 45
Thr Glu Ser Asp Pro Glu Leu Glu Asn Asp Gln Ala Pro Gly Glu Gln

50					55					60									
Asp	Arg	Gln	Gln	Ala	Gln	Asn	Arg	Pro	Arg	Pro	Pro	Asn	Thr	Thr	Arg				
65					70					75					80				
Pro	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Asp	Pro	Gly	Ile	Tyr	Lys	Ala	Ile	Met	Val				
85					90					95									
Gly	Lys	Val	Gly	Gln	Glu	Pro	Met	Gln	Lys	Arg	Leu	Arg	Asn	Gly	Arg				
100					105					110									
Thr	Ile	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Gly	Thr	Gly	Gly	Ile	Arg	Asn	Asn	Arg				
115					120					125									
Arg	Pro	Leu	Asp	Arg	Glu	Glu	Pro	His	Gln	Tyr	Ala	Asp	Arg	Cys	Ser				
130					135					140									
Val	Gln	Trp	His	Arg	Val	Cys	Val	Tyr	Pro	Glu	Arg	Leu	Gly	Thr	Leu				
145					150					155					160				
Ala	Leu	Asn	His	Val	Lys	Thr	Gly	Thr	Val	Leu	Tyr	Leu	Glu	Gly	Asn				
165					170					175									
Leu	Glu	Thr	Lys	Val	Phe	Cys	Asp	Pro	Ile	Thr	Gly	Leu	Val	Arg	Arg				
180					185					190									
Ile	Arg	Glu	Ile	Ala	Val	Arg	Ala	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Phe	Leu	Gly				
195					200					205									
Asn	Asp	Ala	Asn	Gly	Pro	Lys	Leu	Gly	Glu	Val	Lys	Gly	Val	Gly	Tyr				
210					215					220									
Phe																			
225																			
<210> 35																			
<211> 217																			
<212> PRT																			
<213> Hordeum vulgare																			
<400> 35																			
Met	Ala	Ala	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Arg	Arg	Phe	Leu	Leu				
1					5					10					15				
Leu	Ser	Arg	Arg	Phe	Val	Ser	Ser	Pro	Leu	Arg	Pro	Leu	Ser	Thr	Thr				

				20						25					30				
Ser	Pro	Pro	Phe	Ser	His	Ser	Pro	Glu	Gly	Ser	Asp	Ala	Glu	Pro	Asp				
		35					40					45							
Pro	Asp	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Asp	Gln	Gly	Asn	Gln	Tyr	Arg	Asp	Gln				
	50					55					60								
Pro	Arg	Ala	Pro	His	Thr	Thr	Arg	Pro	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Asp	His				
65					70						75				80				
Gly	Ile	Tyr	Lys	Ala	Ile	Met	Val	Gly	Lys	Val	Gly	Gln	Glu	Pro	Val				
				85						90					95				
Gln	Lys	Arg	Leu	Arg	Ser	Gly	Lys	Thr	Val	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Gly				
			100					105					110						
Thr	Gly	Gly	Ile	Arg	Asn	Asn	Arg	Arg	Pro	Leu	Asp	Asn	Glu	Glu	Pro				
		115						120					125						
His	Gln	Tyr	Ala	Glu	Arg	Ser	Ser	Val	Gln	Trp	His	Arg	Val	Cys	Ile				
	130							135				140							
Tyr	Pro	Asp	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	Ala	Leu	Lys	His	Val	Lys	Thr	Gly				
145						150					155				160				
Ser	Val	Leu	Tyr	Leu	Glu	Gly	Asn	Leu	Glu	Thr	Lys	Val	Phe	Ser	Asp				
				165						170					175				
Pro	Ile	Thr	Gly	Leu	Val	Arg	Arg	Ile	Arg	Glu	Ile	Ala	Val	Arg	Gly				
			180							185					190				
Asn	Gly	Arg	Phe	Leu	Phe	Leu	Gly	Asn	Asp	Gly	Asn	Gly	Pro	Lys	Ile				
		195							200				205						
Gly	Glu	Val	Lys	Gly	Val	Gly	Tyr	Phe											
	210						215												
<210>	36																		
<211>	215																		
<212>	PRT																		
<213>	Triticum aestivum																		
<400>	36																		
Met	Ala	Ala	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Arg	Arg	Phe	Leu	Leu				

1 5 10 15
 Leu Ser Arg Arg Phe Val Ala Ser Pro Leu Arg Ser Leu Ser Thr Thr
 20 25 30
 Ala Pro Pro Ser Ser His Ser Ala Ala Gly Ser Asp Ala Glu Pro Asp
 35 40 45
 Pro Glu Pro Pro Ala Asp Gln Gly Asn Gln Tyr Arg Ser Gln Pro Arg
 50 55 60

 Pro Pro Ile Thr Thr Arg Pro Leu Glu Asn Gly Leu Asp His Gly Ile
 65 70 75 80
 Tyr Lys Ala Ile Met Val Gly Lys Val Gly Gln Glu Pro Val Gln Lys
 85 90 95
 Arg Leu Arg Ser Gly Lys Thr Val Val Leu Phe Ser Leu Gly Thr Gly
 100 105 110
 Gly Ile Arg Asn Asn Arg Arg Pro Leu Asp Asn Glu Glu Pro His Gln
 115 120 125

 Tyr Ala Glu Arg Ser Ser Val Gln Trp His Arg Val Cys Ile Tyr Pro
 130 135 140
 Asp Arg Leu Gly Ser Leu Ala Leu Lys His Val Lys Thr Gly Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Tyr Leu Glu Gly Asn Ile Glu Thr Lys Val Phe Ser Asp Pro Ile
 165 170 175
 Thr Gly Leu Val Arg Arg Ile Arg Glu Ile Ala Val Arg Gly Asn Gly
 180 185 190

 Arg Phe Leu Phe Leu Gly Asn Asp Gly Asn Gly Pro Lys Ile Gly Glu
 195 200 205
 Val Lys Gly Val Gly Tyr Phe
 210 215
 <210> 37
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 <400> 37

Met Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ser Leu Leu Gly Arg Arg Phe Leu Leu
1 5 10 15
Ser Arg Arg Phe Val Ser Ser Pro Phe Arg Pro Leu Ser Ser Thr Ala
20 25 30
Pro Pro Ser Ser His Ser Ala Ala Val Ser Asp Ala Glu Pro Asp Pro
35 40 45
Glu Pro Pro Ala Asp Gln Gly Asn Gln Tyr Arg Ser Gln Pro Arg Pro
50 55 60
Pro Asn Thr Thr Arg Thr Leu Glu Asn Gly Leu Asp His Gly Ile Tyr
65 70 75 80
Lys Ala Ile Met Val Gly Lys Val Gly Gln Glu Pro Met Gln Lys Arg
85 90 95
Leu Arg Ser Gly Lys Thr Val Val Leu Leu Ser Leu Gly Thr Gly Gly
100 105 110
Ile Arg Asn Asn Arg Arg Pro Leu Asp Asn Glu Glu Pro His Gln Tyr
115 120 125
Ala Glu Arg Ser Ser Val Gln Trp His Arg Val Cys Ile Tyr Pro Asp
130 135 140
Arg Leu Gly Ser Leu Ala Leu Lys His Val Lys Thr Gly Ser Leu Leu
145 150 155 160
Tyr Leu Glu Gly Asn Ile Glu Thr Lys Val Phe Ser Asp Pro Ile Thr
165 170 175
Gly Leu Val Arg Arg Ile Arg Glu Ile Ala Val Arg Gly Asn Gly Arg
180 185 190
Leu Leu Phe Leu Gly Asn Asp Gly Asn Gly Pro Lys Ile Gly Glu Val
195 200 205
Lys Gly Val Gly Tyr Phe
210
<210> 38
<211> 214
<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 38

Met Ala Ala Ala Thr Ser Ser Leu Leu Gly Arg Arg Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Arg Arg Phe Val Ser Ser Pro Leu Arg Pro Leu Ser Thr Thr Gly
 20 25 30
 Pro Pro Ser Ser His Ser Ala Ala Gly Ser Asp Val Glu Pro Asp Pro
 35 40 45
 Glu Pro Pro Ala Asp Gln Gly Asn Gln Tyr Arg Ser Gln Pro Arg Pro
 50 55 60

Pro Ile Thr Thr Arg Pro Leu Glu Asn Gly Leu Asp His Gly Ile Tyr
 65 70 75 80
 Lys Ala Ile Met Val Gly Lys Val Gly Gln Glu Pro Val Gln Lys Arg
 85 90 95
 Leu Arg Ser Gly Lys Thr Val Val Leu Phe Ser Leu Gly Thr Gly Gly
 100 105 110
 Ile Arg Asn Asn Arg Arg Pro Leu Asp Asn Glu Glu Pro His Gln Tyr
 115 120 125

Ala Glu Arg Ser Ser Val Gln Trp His Arg Val Cys Ile Tyr Pro Asp
 130 135 140
 Arg Leu Gly Ser Leu Ala Leu Lys His Val Lys Thr Gly Ser Val Leu
 145 150 155 160
 Tyr Leu Glu Gly Asn Ile Glu Thr Lys Val Phe Ser Asp Pro Ile Thr
 165 170 175
 Gly Leu Val Arg Arg Ile Arg Glu Ile Ala Val Arg Gly Asn Gly Arg
 180 185 190

Phe Leu Phe Leu Gly Asn Asp Gly Asn Gly Pro Lys Ile Gly Glu Val
 195 200 205
 Lys Gly Val Gly Tyr Phe
 210

<210> 39

<211> 238

<212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<400> 39

Met Ala Asn Ser Met Ala Val Leu Ser Arg Arg Leu Tyr Arg Ser Leu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Asn Pro Lys Ile Ser Gln Leu Ser Met Pro Phe Cys Thr

20 25 30

Ser Ser Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Asn Asn Leu Ser Phe

35 40 45

Arg Glu Glu Glu Ser Glu Leu Asp Gly Ser Asp Thr His Ser Val Pro

50 55 60

Asn Ser Thr Thr Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Thr Thr Thr Ser Glu

65 70 75 80

Gly Ser Ser Gly Ser Arg Met Val Gln Asp Arg Pro Leu Glu Asn Gly

85 90 95

Leu Asp Ala Gly Val Tyr Lys Ala Ile Leu Val Gly Gln Val Gly Gln

100 105 110

Asn Pro Leu Gln Lys Lys Leu Arg Ser Gly Arg Glu Ile Thr Ile Phe

115 120 125

Ser Met Gly Thr Gly Gly Ile Arg Asn Asn Arg Arg Pro Leu Gln Asn

130 135 140

Glu Asp Pro Arg Glu Tyr Ala Asn Arg Cys Ala Val Gln Trp His Arg

145 150 155 160

Val Ser Val Tyr Pro Glu Arg Leu Gly Arg Val Val Met Gln Asn Val

165 170 175

Leu Pro Gly Ser Ile Leu Tyr Val Glu Gly Asn Leu Glu Thr Lys Val

180 185 190

Phe Thr Asp Pro Ile Thr Gly Leu Val Arg Arg Ile Arg Glu Ile Ala

195 200 205

Val Arg Gln Asn Gly Arg Leu Val Phe Leu Gly Lys Gly Ala Asn Asp

210 215 220

Gln Gln Ala Ser Ser Leu Glu Leu Lys Gly Leu Gly Tyr Tyr

225 230 235

<210> 40

<211> 152

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Met Phe Arg Arg Pro Val Leu Gln Val Phe Arg Gln Phe Val Arg His

1 5 10 15

Glu Ser Glu Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Glu Arg Ser Leu Asn Arg

20 25 30

Val Gln Leu Leu Gly Arg Val Gly Gln Asp Pro Val Met Arg Gln Val

35 40 45

Glu Gly Lys Asn Pro Val Thr Ile Phe Ser Leu Ala Thr Asn Glu Met

50 55 60

Trp Arg Ser Gly Asp Ser Glu Val Tyr Gln Met Gly Asp Val Ser Gln

65 70 75 80

Lys Thr Thr Trp His Arg Ile Ser Val Phe Arg Pro Gly Leu Arg Asp

85 90 95

Val Ala Tyr Gln Tyr Val Lys Lys Gly Ala Arg Ile Phe Val Glu Gly

100 105 110

Lys Val Asp Tyr Gly Glu Tyr Met Asp Lys Asn Asn Val Arg Arg Gln

115 120 125

Ala Thr Thr Ile Ile Ala Gly Lys Lys Leu Val Val His Ser Val Ser

130 135 140

Gly Cys Ser Leu Glu Gly Leu Ala

145 150

<210> 41

<211> 148

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Phe Arg Arg Pro Val Leu Gln Val Leu Arg Gln Phe Val Arg His

1 5 10 15
 Glu Ser Glu Thr Thr Thr Ser Leu Val Leu Glu Arg Ser Leu Asn Arg
 20 25 30
 Val His Leu Leu Gly Arg Val Gly Gln Asp Pro Val Leu Arg Gln Val
 35 40 45
 Glu Gly Lys Asn Pro Val Thr Ile Phe Ser Leu Ala Thr Asn Glu Met
 50 55 60
 Trp Arg Ser Gly Asp Ser Glu Val Tyr Gln Leu Gly Asp Val Ser Gln

65 70 75 80
 Lys Thr Thr Trp His Arg Ile Ser Val Phe Arg Pro Gly Leu Arg Asp
 85 90 95
 Val Ala Tyr Gln Tyr Val Lys Lys Gly Ser Arg Ile Tyr Leu Glu Gly
 100 105 110
 Lys Ile Asp Tyr Gly Glu Tyr Met Asp Lys Asn Asn Val Arg Arg Gln
 115 120 125
 Ala Thr Thr Ile Ile Ala Asp Asn Ile Ile Phe Leu Ser Asp Gln Thr

130 135 140
 Lys Glu Lys Glu

145

<210> 42

<211> 146

<212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

<400> 42

Met Gln His Thr Arg Arg Met Leu Asn Pro Leu Leu Thr Gly Leu Arg
 1 5 10 15
 Asn Leu Pro Ala Arg Gly Ala Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 20 25 30
 Lys Val Glu Lys Thr Val Asn Thr Val Thr Ile Leu Gly Arg Val Gly

35 40 45
Ala Asp Pro Gln Leu Arg Gly Ser Gln Glu His Pro Val Val Thr Phe
50 55 60
Ser Val Ala Thr His Thr Asn Tyr Lys Tyr Glu Asn Gly Asp Trp Ala
65 70 75 80
Gln Arg Thr Asp Trp His Arg Val Val Val Phe Lys Pro Asn Leu Arg
85 90 95
Asp Thr Val Leu Glu Tyr Leu Lys Lys Gly Gln Arg Thr Met Val Gln

100 105 110
Gly Lys Ile Thr Tyr Gly Glu Ile Thr Asp Gln Gln Gly Asn Gln Lys
115 120 125
Thr Ser Thr Ser Ile Ile Ala Asp Asp Val Leu Phe Phe Arg Asp Ala
130 135 140

Asn Asn

145

<210> 43

<211> 135

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 43

Met Phe Leu Arg Thr Gln Ala Arg Phe Phe His Ala Thr Thr Lys Lys
1 5 10 15

Met Asp Phe Ser Lys Met Ser Ile Val Gly Arg Ile Gly Ser Glu Phe

20 25 30

Thr Glu His Thr Ser Ala Asn Asn Asn Arg Tyr Leu Lys Tyr Ser Ile

35 40 45

Ala Ser Gln Pro Arg Arg Asp Gly Gln Thr Asn Trp Tyr Asn Ile Thr

50 55 60

Val Phe Asn Glu Pro Gln Ile Asn Phe Leu Thr Glu Tyr Val Arg Lys

65 70 75 80

Gly Ala Leu Val Tyr Val Glu Ala Asp Ala Ala Asn Tyr Val Phe Glu

85 90 95

Arg Asp Asp Gly Ser Lys Gly Thr Thr Leu Ser Leu Val Gln Lys Asp
100 105 110

Ile Asn Leu Leu Lys Asn Gly Lys Lys Leu Glu Asp Ala Glu Gly Gln
115 120 125

Glu Asn Ala Ala Ser Ser Glu
130 135

<210> 44
<211> 184
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 44

Met Thr Val Arg Gly Ile Asn Lys Val Ile Ile Val Gly Asn Leu Gly
1 5 10 15

Gln Asp Pro Glu Val Arg Tyr Met Pro Asn Gly Gly Ala Val Ala Ser
20 25 30

Leu Ser Leu Ala Thr Ser Glu Ser Trp Arg Asp Lys Gln Thr Gly Glu
35 40 45

Ile Arg Glu Asn Thr Glu Trp His Arg Val Val Leu Phe Gly Lys Leu
50 55 60

Ala Glu Ile Ala Ser Glu Tyr Leu Arg Lys Gly Ala Gln Val Tyr Val
65 70 75 80

Glu Gly Gln Leu Arg Thr Arg Asn Trp Gln Asp Asp Ser Gly Val Thr
85 90 95

Arg Tyr Val Thr Glu Ile Val Val Gly Gln Asn Gly Thr Met Gln Met
100 105 110

Leu Gly Gly Arg Arg Asp Gly Gly Gln Pro Gln Asn Thr Ala Pro Gln
115 120 125

Gln Pro Ala Gln Pro Gln Thr Pro Ala Thr Pro Ala Gln Pro Ala Gly
130 135 140

Thr Pro Glu Lys Ser Pro Lys Lys Gly Gly Arg Lys Gly Arg Gln Ser
145 150 155 160

Ala Ala Pro Ser Gln Gln Val Pro Gln Pro Leu Pro Asp Asp Tyr Pro

	165	170	175
Pro Met Asp Asp Asp Ala Pro Phe			
	180		
<210>	45		
<211>	42		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	mtSSB consensus motif		
<220><221>	X		
<222>	(9)..(9)		
<223>	I or L		
<220><221>	X		
<222>	(16)..(16)		
<223>	V or A		
<220><221>	X		
<222>	(18)..(18)		
<223>	V or L		
<220><221>	X		
<222>	(26)..(26)		
<223>	R or H		
<220><221>	X		
<222>	(28)..(28)		
<223>	V or I		
<220><221>	X		
<222>	(30)..(30)		
<223>	V or I		
<220><221>	X		
<222>	(33)..(33)		
<223>	V or I		
<400>	45		
Phe Arg Gly Val His Arg Ala Ile Xaa Cys Gly Lys Val Gly Gln Xaa			
1	5	10	15
Pro Xaa Gln Lys Ile Leu Arg Asn Gly Xaa Thr Xaa Thr Xaa Phe Thr			

20 25 30

Xaa Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp Gln Arg

35 40

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mtSSB consensus motif

<220><221> X

<222> (2)..(2)

<223> K or M

<220><221> X

<222> (10)..(10)

<223> A or S

<220><221> X

<222> (11)..(11)

<223> V or I

<220><221> X

<222> (13)..(13)

<223>

> N or S

<220><221> X

<222> (14)..(14)

<223> D or E

<400> 46

Pro Xaa Pro Ala Gln Trp His Arg Ile Xaa Xaa His Xaa Xaa

1 5 10

<210> 47

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mtSSB consensus motif

<220><221> X

<222> (4)..(4)

<223> K or Q

<220><221> X

<222> (6)..(6)

<223> V or T

<220><221> X

<222> (10)..(10)

<223> A or S

<220><221> X

<222> (13)..(13)

<223> V or I

<220><221> X

<222> (16)..(16)

<223> D or E

<220><221> X

<222> (19)..(19)

<223> T or I

<220><221> X

<222> (21)..(21)

<223> V or I

<400> 47

Ala Val Gln Xaa Leu Xaa Lys Asn Ser Xaa Val Tyr Xaa Glu Gly Xaa

1 5 10 15

Ile Glu Xaa Arg Xaa Tyr Asn Asp

20

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mtSSB consensus motif

<220><221> X

<222> (3)..(3)

<223> L or V or I

<220>

><221> X

<222> (5)..(5)

<223> R or G

<400> 48

Ile Cys Xaa Arg Xaa Asp Gly Lys Ile

1 5

<210> 49

<211> 4550

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 49

cagtccttca ttggctatct tacattaccg taattttaaa gcattctgat ttgtggtttt 60

gttcctact tgaaggtaat tgaggatcac agaagtagcc tgataccgtt gcctggcatg 120

gttgggtctca taccttctgg ttctaagggtg ctttcatttt ccgaaatgaa gattgagatt 180

tcctttttgt tcttctgtta tcattaatga tatagatcaa cattcttaaat aactctaggt 240

gtttaatttc tgtgggtgat gttattttcaa gttaatagag tgctatctag gtagtaagga 300

tctgcataca tgttttctga tttctctctg attatggctt ataaaatgag ttcagtactt 360

gatttctctt actttttttt ttatctttac catgttgcca aatgccaatc atgtggtcgg 420

cctcttcate ttgaactact catcatcagt taaagtttct cataacacat ttaattttgt 480

gctcttcagg agaagaagaa gcaaacacca accaaacat ctgatgcaaa aagaatcgt 540

agggatcgca gggaactgga aaatattata ttcaagcttt ttgaaagaca gcccaattgg 600

gcactaaagg cgctgggtgca agaaactgac cagccagagg tatattcttg atttatttgg 660

cgctcttatt ttaagttaa aaaaacattg gttaagatac tttatttttg gtgttcctat 720

gaacaacaaa tattttattc attactctca atggttgctt tgtgattgtt tgtgcttcgt 780

tttatgcagc aattcctgaa ggagattctg aatgatctgt gtttttaca caaacgagga 840

ccaaaccagg gaacgcata gctcaagcct gactacaaga aatctacagg ggacactgat 900

gcttcttgaa tatgctagtt catttaactg ctttcggata accaacatac tcaacctgtt 960

gactctgaag tcacgaacat tgagtgtgac agacatctca tatttcagta acattcgttc 1020

tgctgctaaa tgctaagagg cataggcgaa tagttgtaag gatagtttga tacatttatt 1080

agagaaaaga atagaaaaga aaaatctgga atctatgttc aggtaaaata atgtgcctgg 1140

tgggagtcgc agcgtagagc atagtcctat tcataatttt cggtgtttat atgctgtttt 1200

tatgtctcat ttcattcttt gaaatgcagg atttatctga ttccttgaag atgttttttt 1260

tattaccaag aatattatgt cttcatattc ttataccccg tgtttccgta tttctttatc 1320

aattgaatca tatagtttta ttaattaagc aatgttacca acgcgtgaca aggtgttagc 1380

ctctcttatac aggaagaat aatTTTTTT tagagaaggg tattttctac ccggtttcca	1440
tatccaaccg gatataatcg gccattgaga tagggaatTT agccccgcaa acaaccaat	1500
ctaaaattcg ctccatagga gatttgaact taggaccttt gggtactact taggtcactg	1560
taaccactag gctatatcg ctttcgttac tgagttgcca acgcgagcat gagactacta	1620
attcccggtg gtaatgaaat ggtgctttgg cttaacacca accgtaaaag attgatttac	1680
tagagtgaat tgatcaatgc accactcttt ggattggcac cctaacttt tccatctcta	1740
actcagtgtc agatttgta ctttcgttac tcaacaagag ttggatcaaa ttttgatac	1800
ttgtggcaat cttttaaaac tgttaaactg tgtattttgt atgaaaactt tcaacaagat	1860
taatccatTT tttcaagttt gtaataattt agattcaatt aatcacacgt tattatcaca	1920
tcgttttacg taaaacactc gatctttatc ttcactttca gaagattcaa acaccaccta	1980
attcaccttt tgcatttate attttttttc ctatttcaag acaagaggag ggggtttctca	2040
agtttgaagt ttcaaccag aaccatgatg agaagcagaa gtctcgactc tcaaggatag	2100
cagcaacca ctaactttgg tgcaggttcg gcccgttacg ccaggagaag cagaaatatac	2160
caggccccgc ccaaagtttt cacaataact caaccttttg atctcgctac gaagctcttc	2220
cgctccacc aggcacgagc gccgcgcgg ccgactccac cggacaccac ccaacgccgc	2280
cagccgctc ctccatcct cctcgatcc gtacggatag cctccccgt cgctcggtct	2340
gcgccgtcg tcgtcgccc gccgtcttat cctccccgc actcggcgac gcgcgaaggc	2400
ctccggcgcg gggtgaagg tacgtcttt tcccgagctc gttctactgt tccaactctg	2460
ccatggctgc agttttccat tttgggctgg gtctgccact gttctatggg gtatgcaact	2520
gtgtcgacg tcgctgaag cccctgaatg gccagtgtgc gatgcttgca aggtgtttgt	2580
taaaatgtct cggtagaata tcttgaccg ttgcatatt ttatccatgc aaagtttagt	2640
ccagtaggct gtttaatttt ctgtgattgc ctatttagat tttagggtgt gtttaattcag	2700
cctcctgaag agggtggtta ttggatacta cgatcctaga atgccgctgc agcttagcta	2760
ggcggatcag ccgcttaggc aggtagagca gcttcttgt cttggccgga tgcgtccct	2820
gaggttccaa cggaatggag ctgctgtagc tgaataagac cataagttgt tttgtgcag	2880
gaaagaataa gcagaactgt catggaactc ctctgcactg ttgagacaaa cctgggatgc	2940
ctcatcataa agaataagt tctccacgt gataggccat cctgatgcac ctatttctc	3000
catgtagttt tticcttgta gaaggtcaca ctgaacaaat gcttttgaga atagaactgc	3060
taccaggaaa atgttgaatg aagttgacga ctgtgatgtt tatgtgttt tgaaatccat	3120

taaaggaata ggaaaaaaat atatgttctg atgattatit ttatgattit attatttaac 3180

gtttttcctc aatgtgcgta gatttaccat gaattctctc agcaatggat tactgaaggg 3240

cttgaggagg gtcttagaac agcagagaaa accaattggg ggggtgtttt tcatggttgt 3300

ttcaagattt ctactcagtt ttactgagt aagttttgat taaatatttg tctgtgtaga 3360

tttctacaga aaatctcaag ctggagttc tactgtttcc ttttctgata ttgatgagaa 3420

gagtgaatg ggaggtgatg atgattatac agattcaaga cgagagttag aaccccaaag 3480

cgtagacccc aagaagggtt ggggattccg tgggtttcac aggglattta agtataatat 3540

gaaaaggata cttcatgttt tggttttcaa gcttaacttg gtattaattg attgtttcaa 3600

ctttctaggc tataatatgc ggaaaagtgc gacaggttcc tgtgcagaaa attttaagga 3660

atggtcgtac agtgactgtt ttacagtgt gaactggtgg catgtttgac cagagggtag 3720

taggggatgc agatctgcca aagccagctc agtggcatcg gatagccatt cataatgacc 3780

agctagggtc ttttgcgtc cagaagctgg tgaagaagta cgtggtttca gtgagaagat 3840

cacccttttt cttttctcca tacaagtata caactatata ccatttccta gttctatggc 3900

ttgaaattct tttttactgt ggttgggtgt gctttgttc ttgccttatt tcagttctgc 3960

agtttatgtt gaggggtgata ttgaaaccag agtatacaat gacagcatta atgatcaagt 4020

gaaaaatata ccagagattt gtcttcgacg cgatgggatg ttgatctgcc attccactag 4080

aaactttgtg gtagtaatat ttatagcaa gaataaataa cgtttgaagt ttgaacaatt 4140

ttctcggggt aactccataa ctctgttacc aaactggaca cagaagcctg ctgctttgtt 4200

taattatact gcatttgagt aatgttgata gctattcttt tgtacttatt tattttgatt 4260

gtctttgttg ttgtaaaagc ttatccttgg aaaaatattt atatgtacag gtaagattcg 4320

gctgattaaa tctggcgaga gtgctgctag catttcatta gatgagctaa gtaagttcac 4380

tgaaaacctt aatattctga ttatgagaa tcttgcatia cttgtatttg ttgtgattat 4440

gcaactatga ttggtctcca caattatctg catgcagatg tccagtgttt tagattttag 4500

tatttaccat ttaatcatga caacctttgt atgcaggaga aggattgttc 4550

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 50

ttatcagctt ctcggttcat ccaa 24

<210> 51
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 51
 aaacagggtt agcaatttcg tttt 24

<210> 52
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 52
 tctgtcccat atatacaacc g 21

<210> 53
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 53
 atttgtgttt caatcctata ta 22

<210> 54
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 54
 ggtcctttca aacactccac a 21

<210> 55
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer

<400> 55	
ccaactttgc cttagcattc a	21
<210> 56	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 56	
actactccct atttctgtat tcact	25
<210> 57	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 57	
gagcgtcatg gttcacctct t	21
<210> 58	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 58	
taccagagat ttgtcttcga cgcgat	26
<210> 59	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 59	
ctagaacaat ccttctc	17
<210> 60	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 60

actccctctc ccttgcggat tcgaatggta gtacattctc ttcga

45

<210> 61

<211> 429

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 61

Met Ala Asn Leu Leu Arg Arg Ala Ser Leu Arg Arg Ala Val Ala Ala

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Pro Cys Pro Glu Ser Tyr Lys Gln Gly Ile

20 25 30

Cys Gly Ser Thr Phe His Cys Arg Tyr Phe Ser Ser Lys Ala Lys Lys

35 40 45

Lys Thr Lys Ser Ser Gly Thr Asp Ser Gly Glu Glu Asn Leu Ser Lys

50 55 60

Lys Asp Leu Ala Leu His Gln Ala Ile Asp Gln Ile Thr Ser Ala Phe

65 70 75 80

Gly Lys Gly Ala Ile Met Trp Leu Gly Arg Ser Glu Gly Arg Arg Glu

85 90 95

Val Pro Val Val Ser Thr Gly Ser Phe Ser Leu Asp Leu Ala Leu Gly

100 105 110

Thr Gly Gly Leu Pro Lys Gly Arg Val Ile Glu Val Tyr Gly Pro Glu

115 120 125

Ala Ser Gly Lys Thr Thr Leu Ala Leu His Val Ile Ala Glu Ala Gln

130 135 140

Lys His Gly Gly Tyr Cys Ala Phe Val Asp Ala Glu His Ala Leu Asp

145 150 155 160

Pro Ala Leu Ala Glu Ser Ile Gly Val Asn Thr Ser Asn Leu Leu Leu

165 170 175

Ser Gln Pro Asp Cys Gly Glu Gln Ala Leu Ser Leu Val Asp Thr Leu

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

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

 305 310 315 320
 Ala Gln Phe Glu Leu Glu Phe Gly Lys Gly Ile Cys Arg Ser Ser Glu
 325 330 335
 Leu Ile Glu Leu Gly Leu Lys His Lys Leu Val Lys Lys Leu Gly Gly
 340 345 350
 Ala Phe Tyr Ser Phe Asn Glu Glu Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Ala Leu
 355 360 365
 Lys Ser Tyr Leu Asn Glu Asn Glu Ser Ile Ala Lys Glu Leu Glu Thr

 370 375 380
 Asn Leu Arg Lys Leu Met Glu Thr Gln Ala Pro Lys Lys Gln Glu Asp
 385 390 395 400
 Glu Gly Asp Phe Leu Ser Asp Leu Pro Glu Glu Ser Leu Ala Thr Glu
 405 410 415
 Thr Ser Ser Glu Glu Glu Leu Ala Ala Val Ile Glu Ala
 420 425
 <210> 62

<211> 5131
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 62

ccgagaatta aaagggggca aaaaccaccg caaaaaaagg gggcaaaaac cctaaaccct	60
agcaatcccc accctcttcc tcgccgcacg gttccagggg tcgccgctgc cgtcgccgcc	120
gccgccgccg acgacgacga catggcgaac ctcttgaggc gcgcgtcgct gcggcgcgcc	180
gtcgccgccg tcggcgccgc agccgcgccc tgccccgagg tcgaaactcc cctcctctct	240
ccccgccgta ttgactgtg ttttttttgc ccccttggg ggccatggag tgttctact	300
ggcagcttgt gccatatgtg attgcgattt ggcatccttg ctggggtttg atcgcttgcg	360
tttggtgaac cgcgcggtt atatgccctc ggcgatttgc tctgtgccac cgaatgacct	420
ccattttgat cactgagggt acccctcccc ttattttgta ctacaaacct agaatccggg	480
attttggaga aatgcctatt aaggtatgt gcaatctgtg tgcttggaca gatgcttagg	540
ggagtaaaact gtgtctatit ttgccacgt ggtgtctgct gaggtgcttg ccgccaagtg	600
aaacagtcca tgcttgccag cgcttgcatt aaaaatggag tggagaagca cctgaaataa	660
ctaaagcgtc cgtaaaatag gtgttctcta ttggacatca aggtcttga acagatgcta	720
agggattttt ttctaagca tctgtactat ttgtacatgc ctttaaatgc gccataaata	780
tattttttgc ttacaataga ttaacctgca acaccaaagg tgatttaggt tattagatta	840
gtgtagcctc caggggtttt cttgagggtg caacacatct ccgtgtcctc tttatcctga	900
cctcagcatt tgtttgcacc ttccagacttg taggtatttg tatgcactta agacaaatac	960
tggatcattt gtgacacaca cagtatgcac aatgaaattg atgagaatgg aagagattca	1020
ctcatagtgt gcacttcaaa acaataactg aaatcatttg tgatagcac agtatgcata	1080
atgaaataa tgcggctgga agatatgtat tcataattag ctttaaatga tgccggttga	1140
gaatgaaca atgctgttta atctttcaca taaaaacctt gatatggttt tgctaagca	1200
tcaatctttg tgcagagcta taagcaaggg atctgtggct ctactttcca ctgccggtat	1260
ttctcgtcta aaggtagtag acacttattc cttttatgat ttattatgtg cataccttac	1320
cttagatata ctaaatactg cateccatgg ctccagtgtc atcatctta atcttgatat	1380
tacctgtatt gacacataag ttacatttg aattttgat gaaattgaac tgcattgattt	1440
tttttctttt gatttatgtt ttattgtgc catctactga atcttatatt tattcttttt	1500
gaatcatcta cttagccaaa aagaagacaa agtcagtggt aactgactct ggtgaagaga	1560
atctgtcaaa gaaagacttg gctctacacc aggctattga tcaaataaca tctgcatttg	1620

ggaagggcgc aataatgtgg ctggtcgtt ctgaaggtcg tagagaagta cctgttgtgt 1680

caactgggtc tttctctttg gatttggcat tgggaactgg tggacttcca aaggttaagga 1740

ttcctatgta gttacaaaat atcttgtaag tagaatctca cttgtatcaa tgtttaattt 1800

gtattgcatg atattctttg caaatctaag tttgtctgag tgttaactac cctaaaaatt 1860

agtcttctct catcatatga agtgtgcaaa tgttctttca tggacaaaac atactttgtt 1920

ttgtatgaat gtcattgctat tgttctctgt agggctcgtgt tatagagggtg tatgggccag 1980

aagcttcagg caagacaact cttgcacttc acgttattgc agaagcaca aagcatggcg 2040

gtaatatcag cacttcgaac ctaatctata tattttagca atagcatata ttttacctga 2100

gaaaagggtac agattattct gtgttctcct ttaatccaaa gatttaggct aacaacatct 2160

aatacgtata aaaattatta ccatgtgctt aatgctgtga acttgtgatg gtatagtcag 2220

tcagatgctt tttatgtagt atgcataagg gttttgctgg cttacaactg cttgacagtg 2280

aaagtgatct tgctaattat gatgtgaaca tagttcttaa acttgtctgt tcaaaatatt 2340

gtaccattga gtattttgtt gacatcatca gcaggggagg ccccccacgt gcgctatgta 2400

ttttaccaag cagcttggtta tctgtgtaat agccaatagc attatagtgt ctttatattt 2460

ggagtttgga gaatggaata tgacgaaacc agtttttagtg ttttagaaca tggaatatgc 2520

tgacattgtg tagcccaata ttagctcaaa gccagcaac catgggataa gctacatatg 2580

caaagttacct gtctgtgggt tttgtcctcg ttcgtcaga ggggttaggg aatgctatgt 2640

tttgagctca cagaggttat atagttaat tcagtgtaaa catttaaata tgaagggtgt 2700

atttgcctct tcatacttct agattactag cttcaccaaa taatgttggc cttcaaacac 2760

gcacagaacc tactcgggaa aatctgcctg taatgcaatt taatggagca tttcaaaaaa 2820

ccatgaacca tttggctcgg aaatcatgag cactgacaac tgcaagttca tctaaaatag 2880

aatttggacg aacctaatat atacctcacc gagtttttgt ttttgctatt tttctaggtt 2940

attgtgcctt cgtagatgca gagcatgcct tagatccagc tctggctgaa tcaattgggg 3000

tcaacaccag taatttactt ctctctcagc cagactgtgg cgagcaggca ctcagtcttg 3060

tggacacact gattcgaagc ggctctgttg atgttgtgt tgttgatagt gtaagaacct 3120

gacctctat cccctccca tttttatttt tcttttcgga gcattgcctt ctttcaaatt 3180

gataatagt cactttctgc ttaaaatttt aataacaatg tccaattagc agttggaaca 3240

tgcttatcga cactcaacgt taataaatac aacttcattt atatgagaag tttgctaagc 3300

agtgcatctt attttgtgac ataggtagca gctcttgtcc ctaagagtga gcttgacggg 3360

gagatgggtg atgcacatgt tgctctccag gctagattga tgagccaagc tcttcgcaag 3420
ctgagccact ctctctcact ttccagaca attttgttat tcattaacca ggtattaaac 3480
atgtgcactg ggcactgctc ttagtgtttg ttgaatttgc ttttttcaat ttatatatcc 3540
catgtttttg ttiggtgaag cgaaggaaca aatttaacta gtcttaaggc tgtaattcc 3600
atgatgatta gcttattagc tgaaaagctc caaaatacgt gacactacag ctaaataagg 3660
atggtatttt cagaaacatt attgtacaat tcagacattt gtttacagtg atgcaactga 3720
ttctacttga atcttgttcg tcgatcatga gtcttcacag agtgatcatt tgaacactcg 3780

ttcaatacat tctgtcccat cactactata gacttatatt caacctgtcc cagaaaaaaa 3840
ttaaatactt tgiacccac taatcaatgc agtctattcg cttcatttct ctcagittta 3900
tattatttgc atccttttga tgtgttatag atcaggtcta aagtgaccac atttggagga 3960
tttggaggtc caatggaggt tacttctggt ggaaatgccc ttaaattcta tgcttccgtt 4020
agaatgaaca tcaagcgtat tggtttggta aagaaaggcg aagaggtaat taaccaagtc 4080
atatccttga catttacctt atttagacag ttagtcaata cttgacatat atgcactgct 4140
atgccatat caaggtttct ttggaaccta gtttttcaact cctgcgtcat atctatttgg 4200

atagcatctc caaaacactg ttagacacgt ggcacatgca tgctttgtat ttagccatat 4260
gattttataa cctcatcaat caaaattaca gacctagtaa ccttacagat ttagcttcaa 4320
catattgtag tgcttcttga aatgttactg acaattttta cttctgtttg cagactatag 4380
glagtcaagt gcttgtgaag atttgtaaaa acaagcatgc cccaccgttc aagacagcac 4440
agtttgagct ggaatttgggt aaagggatat gccgcagttc agagcttatt gaacttggat 4500
taaagcacia gcttgtcaaa aagttaggtg gtgcatttta ttctttcaac gaagagtcac 4560
atcgtggtaa agatgccctt aaatcttacc tcaacgaaaa tgaaagtatc gcaaaagaac 4620

tggagacgaa ttttaaggaaa ttgatggaaa ctcaagcacc taaaaagcag gaggatgaag 4680
gtgatttctt gagtgatctg cctgaagaga gtctcgccac tgaaacatcc tccgaggagg 4740
aactggcagc tgtaatagaa gcttaatcag tgatgcttaa tcagtgatga tagatcaaca 4800
agaaggaata tgcgctgagc agttattcca ctgaaccata catatttttg ttcttggaga 4860
tgtcattttg gctgcaccgg gcatatagaa tgtgtggaat tcgtatttga acatccttca 4920
gttgtcaaat gcctggagcg aagttaggta gagccgggga aggaccgggg ggcttacgta 4980
tggacttgta tgggtggctat ttagacattg aaagggttat tagtagaatg taaccatgta 5040

tatatgtcgc atatctggga ttctctgctg gttctggctt gagatacact tactaaatgc 5100
ttctgatatt tgattattcc ggttcattc c 5131

<210> 63

<211> 1796

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 63

ccgagaatta aaagggggca aaaaccaccg caaaaaaagg gggcaaaaac cctaaaccct	60
agcaatcccc accctcttcc tcgccgcacg gtccagggg tcgccgtgc cgtccgcc	120
gccgccgcgc acgacgacga catggcgaac ctctgaggc gcgcgtcgt gcggcgcgcc	180
gtccgccgcgc tcgccgcgc agccgcgccc tgccccgaga gctataagca agggatctgt	240
ggctctactt tccactgccg gtatttctcg tctaaagcca aaaagaagac aaagtccagt	300
ggaactgact ctggtgaaga gaatctgtca aagaaagact tggctctaca ccaggctatt	360
gatcaataa catctgcatt tgggaagggc gcaataatgt ggcttggtcg ttctgaaggt	420
cgtagagaag tacctgttgt gtcaactggg tctttctct tggatttggc attgggaact	480
ggtggacttc caaagggtcg tggtatagag gtgtatggc cagaagcttc aggcaagaca	540
actcttgca ttcacgttat tgcagaagca caaaagcatg gcggttatg tgccttcgta	600
gatgcagagc atgccttaga tccagctctg gctgaatcaa ttgggggtcaa caccagtaat	660
ttacttctct ctccagcaga ctgtggcgag caggcactca gtcttgtgga cacactgatt	720
cgaagcggct ctgttgatgt tggttgtgt gatagttag cagctctgt ccctaagagt	780
gagcttgacg gggagatggg tgatgcacat gttgctctcc aggctagatt gatgagccaa	840
gctcttcgca agctgagcca ctctctctca ctttcccaga caattttgtt attcattaac	900
cagatcaggt ctaaagtac cacatttga ggatttggag gtccaatgga ggttacttct	960
ggtggaaatg cccttaaatt ctatgcttcc gttagaatga acatcaagcg tattggtttg	1020
gtaaagaaag gcgaagagac tataggtagt caagtgttg tgaagattgt gaaaaacaag	1080
catgccccac cgttcaagac agcacagttt gagctggaat ttggtaaagg gatatgccgc	1140
agttcagagc ttattgaact tggattaaag cacaagcttg tcaaaaagtt ggggtgtgca	1200
ttttattctt tcaacgaaga gtcatatcgt ggtaaagatg cccttaaact ttacctcaac	1260
gaaaatgaaa gtatcgcaaa agaactggag acgaatttaa ggaaattgat ggaaactcaa	1320
gcacctaaaa agcaggagga tgaagtgat ttcttgatg atctgcctga agagagtctc	1380
gccactgaaa catcctccga ggaggaactg gcagctgtaa tagaagctta atcagtgatg	1440
cttaatcagt gatgatagat caacaagaag gaatatgcgc tgagcagtta ttccactgaa	1500
ccatacatat ttgtgttctt ggagatgtca ttttggtgc accgggcata tagaatgtgt	1560
ggaattcgta ttgaacatc cttcagttgt caaatgcctg gagcgaagtg aggtagagcc	1620

ggggaaggac cggggggcctt acgtatggac ttgtatggtg gctatttaga cattgaaagg 1680
gttattagta gaatgtaacc atgtatatat gtgcataatc tgggattcct cgtcggttct 1740
ggcttgagat acacttacta aatgcttctg atatttgatt attccggttc cattcc 1796

<210> 64

<211> 723

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 64

Met Pro Pro Arg Pro Ser Leu Gln Ser Leu Leu Leu Met Ala Ala Ser

1 5 10 15
Ala Ala Ala Gly Gly Asp Ser Gly Leu Leu Leu Ala Ala Arg Arg Arg

20 25 30
Leu Pro Ala Ala Ala Leu Ala Ala Gly Gly His Arg Ile Arg Leu Leu

35 40 45
His Ala Phe Ser Ala Ala Ser Arg Arg Gly Arg His Glu Val Ala Cys

50 55 60
Cys Val Arg Thr Glu Pro Ala Pro Arg Pro Ala Ser Pro Val Ala Val

65 70 75 80
Arg Ser Arg Ser Val His Ser Thr Glu Asn Tyr Lys Lys Gly Cys Glu

85 90 95
Gln Arg Leu Gly Gln Leu Ile Glu Arg Leu Lys Lys Glu Gly Ile Ser

100 105 110
Pro Lys Gln Trp Arg Leu Gly Thr Tyr Gln Arg Met Met Cys Pro Lys

115 120 125
Cys Asn Gly Gly Ser Thr Glu Glu Pro Ser Leu Ser Val Met Ile Arg

130 135 140
Met Asp Gly Lys Asn Ala Ala Trp Gln Cys Phe Arg Ala Asn Cys Gly

145 150 155 160
Trp Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp Gly Val Leu Lys Leu Ser Gln Ala

165 170 175
Lys Asn Asn Thr Glu Cys Glu Thr Asp Gln Asp Gly Glu Ala Asn Leu

180 185 190

Ala Val Asn Lys Val Tyr Arg Lys Ile Cys Glu Glu Asp Leu His Leu

195 200 205

Glu Pro Leu Cys Asp Glu Leu Val Thr Tyr Phe Ser Glu Arg Met Ile

210 215 220

Ser Pro Glu Thr Leu Arg Arg Asn Ser Val Met Gln Arg Asn Trp Ser

225 230 235 240

Asn Lys Ile Val Ile Ala Phe Thr Tyr Arg Arg Asp Gly Val Leu Val

245 250 255

Gly Cys Lys Tyr Arg Glu Val Ser Lys Lys Phe Ser Gln Glu Ala Asn

260 265 270

Thr Glu Lys Ile Leu Tyr Gly Leu Asp Asp Ile Lys Arg Ala Arg Asp

275 280 285

Ile Ile Ile Val Glu Gly Glu Ile Asp Lys Leu Ser Met Glu Glu Ala

290 295 300

Gly Tyr Arg Asn Cys Val Ser Val Pro Asp Gly Ala Pro Pro Lys Val

305 310 315 320

Ser Ser Lys Leu Pro Asp Lys Asp Gln Asp Lys Lys Tyr Gln Tyr Leu

325 330 335

Trp Asn Cys Lys Glu Tyr Leu Asp Pro Ala Ser Arg Ile Ile Leu Ala

340 345 350

Thr Asp Ala Asp Pro Pro Gly Gln Ala Leu Ala Glu Glu Leu Ala Arg

355 360 365

Arg Leu Gly Lys Glu Arg Cys Trp Arg Val Asn Trp Pro Lys Lys Asn

370 375 380

Glu Asn Glu Ile Cys Lys Asp Ala Asn Glu Val Leu Met Phe Leu Gly

385 390 395 400

Pro Gln Ala Leu Arg Lys Val Ile Glu Asp Ala Glu Leu Tyr Pro Ile

405 410 415

Arg Gly Leu Phe Ser Phe Lys Asp Phe Phe Pro Glu Ile Asp Asn Tyr

420 425 430

Tyr Leu Gly Ile Arg Gly Asp Glu Leu Gly Val Pro Thr Gly Trp Lys

435 440 445
Ser Met Asp Glu Leu Tyr Lys Val Val Pro Gly Glu Leu Thr Val Val

450 455 460
Thr Gly Val Pro Asn Ser Gly Lys Ser Glu Trp Ile Asp Ala Leu Leu
465 470 475 480

Cys Asn Ile Asn Asp Gln Val Gly Trp Lys Phe Val Leu Cys Ser Met

485 490 495
Glu Asn Lys Val Arg Glu His Ala Arg Lys Leu Leu Glu Lys Arg Ile

500 505 510
Lys Lys Pro Phe Phe Asp Ala Arg Tyr Gly Gly Ser Ala Glu Arg Met

515 520 525
Ser Leu Asp Glu Phe Glu Glu Gly Lys Gln Trp Leu Asn Glu Thr Phe

530 535 540
His Leu Ile Arg Cys Glu Asp Asp Cys Leu Pro Ser Val Asn Trp Val

545 550 555 560
Leu Glu Leu Ala Lys Ala Ala Val Leu Arg Tyr Gly Val Arg Gly Leu

565 570 575
Val Ile Asp Pro Tyr Asn Glu Leu Asp His Gln Arg Pro Ser Asn Gln

580 585 590
Thr Glu Thr Glu Tyr Val Ser Gln Met Leu Thr Lys Ile Lys Arg Phe

595 600 605
Ala Gln His His Ser Cys His Val Trp Phe Val Ala His Pro Arg Gln

610 615 620
Leu His Asn Trp Asn Gly Gly Pro Pro Asn Met Tyr Asp Ile Ser Gly

625 630 635 640
Ser Ala His Phe Ile Asn Lys Cys Asp Asn Gly Ile Val Ile His Arg

645 650 655
Asn Arg Asp Pro Asn Ser Gly Pro Leu Asp Val Val Gln Val Cys Val

660 665 670
Arg Lys Val Arg Asn Lys Val Ile Gly Gln Ile Gly Asp Ala Phe Leu

675 680 685

Ser Tyr Glu Arg Val Ser Gly Glu Phe Arg Asp Ala Asp Lys Asp Thr

690

695

700

Ala Lys Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Asn Val Ala Lys Ala Pro Gln

705

710

715

720

Arg Lys Gly

<210> 65

<211> 7684

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 65

aaaccctaaa cctccgcgac ccaatccaaa ctccatcctc tcctccctcc tcctttttct	60
tcctttttctt ccccaagccc ctctccctc cctctcgcc tcctctgctc cgcgccccgc	120
atgccccgcg cggcgaaacc ctagacctcg tgatgccacc gcgccccctc ctccagtcgc	180
tcctctcat ggccgectcc gctgccgccg gcgggggactc cggcctctc ctcgccgcgc	240
gccgccgcct ccccgccgcc gccctcgccg cggggggcca ccgtatccgg ctgctccacg	300

ctttctccgc cgcgagccgg cgggggaggc acgaggtagc ctgctgcgtc aggactgaac	360
ccgcgccgcg gcccgccagc cccgtcgccg ttcgctccag gagggtatg gaacaactcg	420
ctttcgagct ccgaacatgc gcgatactgt tttcgccatg ttttactagg agatcggtct	480
ctgggaatac gcttctcaat ggctgtctc cgattaattt cgtggctcgt tactactgta	540
cttttaggcg tttagctgtt aatcctccca aatgctgtgt tcttaacttc ttatcgccag	600
gaactccttg aggatitcaa tcaatcgtgc tgggtaaate gttttgattg attgattcta	660
ctctttcaaa ctcttttagt tgaaattgtc acattaattt ggagcgcttt tactgttttg	720

tgacagtttg agtgaactgt tcgtccaagg cattatgtct gccttgtttt cgcagttctg	780
gtgccactt gttcttctta ggccggtac atgtcatagt ttgagcattt gcaagtgate	840
tataacaatt ggatgtagta gcggtgatac tttccgttga tgcgtgtct ctttgataa	900
cagttcattc aacggaaaac tacaaaaagg gttgcgagca gcgactagga cagttaattg	960
agagactgaa gaaagaagga ataagtccaa agcaatggag gcttgggtact tatcaacgaa	1020
tgatgtgccc aaaggatttg tgcgtttctt ttttaattact ctaattattg gtcattgttc	1080
ccttttttac atgaagagcc ccatcgtttg gcttatcgt ggaataagcc aaatggcata	1140

tttgcaaacg aaaaataatt tgtgaataaa acttttatat acgtgttctt agcgatctaa	1200
---	------

aagcaaaggc tgaagaataa actttgatga aaaaaacccc aaaatcaact tcaaatttaa	1260
ggttgaaaat tcaaattttg gctgataagc ataagcttaa gcggaagat gaggctagaa	1320
gtgtctagct agataagaag caattgtttt gtggtttaag acatcaagag aaatgagaga	1380
cattgtggca tcaaatccat tgttttctac tagtatctga tttgattagc ctacccctgt	1440
atcataaagt atcatcgttt tgggtggctgg ttcataaaac ccactagttt ctacttatag	1500
catgctcacc tgctcatgat cctttggtga tccatttact ttacatgctg agctatcaga	1560
cagcaatgat gagtattact ttccatatgt tcactagtgc aatgggggat ctactgagga	1620
gccgagcctc agtgttatga tccgaatgga tgggtgagat tttatattta cccttcttca	1680
acttttactt cttcagatgt agtacggcct gtctcatctg atgtttctcc tatttttgtt	1740
cttcaggaaa aatgctgcat ggcaatgttt tagagctaata tgtggttgga agggttttgt	1800
cgaggtgcct ttaccaaata aatataggaa taaagattga agttaataaa atgtcctgat	1860
atcactattg ttctctctgc agcctgatgg agttctcaaa ctatcacaag caaaaaataa	1920
tacagaatgt gaaacggacc aggatggtga agctaactctg gcagtcaata aggtttacag	1980
aaaaatttgt gaggaggacc tccatcttga gccactttgc gatgaggtaa gaaattgttt	2040
tttaggctgg aatattacca attactgtac aaatatcatc aaaagtttct tgttgttttt	2100
attcttttcc cattcttctt tgatgaatcc taatagaagt ttttgcacat ggggtgttcta	2160
caaaacaate acattttggc agcttgtaac atacttctca gagagaatga tatcgccaga	2220
aacacttcgg agaacacgcg taatgcagcg taactggagt aataaggtat agatggatgc	2280
atttccgtag atctgcttgg gataacaacat ctttgtgtta gcattgtaag tacattttgt	2340
ttgcagatag ttattgcttt cacctacagg cgtgatgggg tcctcgttgg ctgcaaatac	2400
agggaagtct ctaagaaatt ttcacaggtt tgggtgcta ctcgttttta ggggtgatga	2460
gcttatgcta tatttctttt gttcttattt ttgcacttat ataccaggaa gcaaacacag	2520
agaaaatttt atatggtctg gacgatataa agcgagcacg agatattatc attgtatgtt	2580
caaaatctgt tacttgatat tctttttgca tattgtcctt gaagatttgt gccaatgttt	2640
tcatatccce agatttttag ttgtttgttc tccttactga catggcaggt tgagggtgaa	2700
attgataagc tcicaatgga agaagctggc taccgtaatt gtgtcagtgt accagatggt	2760
gcaccaccga aagtatccag caagctccca gataaagatc aggttagcgc tactttctgc	2820
tgttgccaaa gtttttgtcc ctcaagattc acgacaactt atgtcttctt gtcactatta	2880
tattcttcag tttagagtgt gatctctggt acagtttttag ctaatctgcg acctaacagt	2940
tgcttatgtt cctgttaaag ctaggataag aagtaccaat atctgtggaa ttgcaaagaa	3000
tatcttgacc cgggtggcat tttattatct cagaataatt tgtttataga actgtgtagc	3060

tgagatacac aggtatcatt ttaattccit tatttgccat ggaaacaggc gtctaggata	3120
atactggcaa cagatgctga tctccaggg caggctctgg ctgaggaact tgctcgtcgt	3180
cttggtaaag aaaggtttgt gtatcagtgt gttgctatca taagcttcgt gatgaataag	3240
aatgattata aaagccctca tgtattgtat ttaacttgat gcaatcagat gctggagggt	3300
caattggcca aagaagaacg agaacgaaat ttgcaaagac gcaaatgagg tttgtcatgg	3360
catacatggg ttctctgac ttgcacatta tatcttacc ctaaagttgg actgattttc	3420
tcattgtagt tacaacttga ttaaacagta aacatgttgt tccttttgtt tgtgtatatg	3480
ctatccttaa tggtgttcc tggctgaagt atttgacata tgaggctagt gtggcagtta	3540
ataaacatga gttggctacc tcgggtgtaa ataatagttg tgaatttagc taaatcaatg	3600
tacaagttaa ggctgttgat atgtgcatga tactgaactt acatttatat attattttta	3660
attaattgat tgaggctatc aactgcttag tgcgtaccaa attatcatat tgatctgtaa	3720
cttcacagga agttagtta tatactatga taaatatgca gtcaaactcc ttgtcctttt	3780
aggtcttgta ttttatgcag aaatgtatac tagaatttac aggcggctctg gccctgcaag	3840
gtagtgtgta agacttgaag tgtgaggaaa tagtctatit ctagaatatg gtttccaaga	3900
tgagttttta ttcaacttca gaatttctat tgaggcataa gcttcctaac cctaaattat	3960
ggtattagta ttagtagtgc tccctataag cttcagcatg tccatatac tgtgcagata	4020
ttcttattaa aaatctataa gtttttttcc gtcaagaaaa aaatctataa tgatttttgt	4080
gltgtttgca tctacgtcct gatggacat ctgaaacata tgatcatgta tgaattgagt	4140
tgttctgcc attggctcca tttgttgaa atgagaatat gacatcacat catittgcaa	4200
gttagagttt gagaacttct gacactggac ctgtaatgc cttttctac tacaggtact	4260
gatgttttta ggaccacaag cattgagaaa ggttatagaa gacgcggaac tgtatcccat	4320
aagaggtctt ttctccttca aagatttctt ccttgagatc gataattatt atcttggaat	4380
ccgtggggat gagcttggtg ttctactgg atggaaatcc atggatgagc tttacaaggt	4440
atttcttagt tgcattcagt tatgtcataa cttattgctg tatgttgac ctgaaatctg	4500
gcttgccat ttttttgta ttgcttgtt ttctttcgct atatttttt gtggagcta	4560
cccatcttgt ttgcatcact ctgttctcga tggcatcact taactttttt tttattttgg	4620
gcgtagaatg taaacaatta ttgcccactg tttttacccc atgaatctgc atgcatttcc	4680
aatataggca tgcagaaatt atttgctgac ttgactaaga gcaacttaga gaagtgcata	4740
ttttttccct tgagtgtaac tatcacctaa atctgattgt gacttgaacc tagatgatct	4800
acacttccca gaagcacggg aaattgtgct gtcaaactt ttttatcatt ctcccatcat	4860

aaacaattca tcatggttct gttgttttct gttttgtagg ttgttcctgg ggagttgact	4920
gtagtaacag gagtgccgaa ttctggtaaa agtgagtgga ttgatgcttt actgtgcaat	4980
ataaatgacc aggttgggtg gaaattcggt ctgtgctcaa tggaaaacaa ggcaagcaat	5040
tactgatggt actaaattaa ctattaatgt cattggggag attcaaataa tggttatattt	5100
ggtatttagg tcagggagca tgctagaaag ctcttagaga agcgcatata gaaaccattc	5160
tttgatgcta ggtaagtaat atatttgtgt ttaatctcat gataatccct gtcttttgag	5220
cattttgaga agcacacagc aaaagcctct gtgattatgc ctggcaagtt caatgtgaaa	5280
tcctctcggg ataaatggtt ttatgaatca tatgtgctga gaagttggac ttaagttggc	5340
tgtttgcagt atttgttttg aaggttatgt tgttatgtgt aattggttta gcaatccttg	5400
tttaatacag atatgggggc tctgcagaaa gaatgagtct agacgaattt gaagaaggca	5460
agcaatggct gaatgaaaca ttccatctga tccggtatat ttatatctt ttgataacat	5520
aattgtcaca atgggttagc caatttcact aaagtcagct ttagttcatt tttttgctgg	5580
ggtgttcagc ttctccaact atatctgcat actccacatt tgctggttgg gtgcaaacca	5640
ttttctttt tccgtcaacc ctagecctgt attagtactc ttattgtagt aatatgctgg	5700
aatgcaataa gatctcctgg cttttccttg ataatatgcc tctcctaag atgatttgta	5760
tacacagggt tacattcttg ttgtgacac tgaatctgct taattaatca ggtgtgaaga	5820
tgattgcctt ccatctgtta attgggttct cgagcttgct aaagctgcag ttctaagata	5880
tggagtgcgt ggtcttctga ttgatcccta caatgaactt gatcaccaac gcccctcaaa	5940
tcagtaagca ttgcctaagc ctctttttta gattgaattt gtcattagtg atacatggtg	6000
ttatcatatg ctgcattcga actggctggg ttggaacacc tctctctatc atggaaaacg	6060
gagcgactca ttagcatgtg attaattaag tgttagctaa aaaaaacttg aaaaatggat	6120
taatatgatt ttctaaagca actttccttg aaacttcctt tteccaactt ctactccctt	6180
ttccatgcgc acgttctctg aactctgaac tactaaacag tgtgtttttt gcaaaaaaaa	6240
aattatagga aagtgtcttt taaaaatcat attaatctct ttttttcag atatttttag	6300
ctaataattca attagtcatt cactaatttg ctccctcggt ttgtgtgccg aggttgaatg	6360
gttccaacc ctaccaccg aacacagcct tggcctcaac catactcggc tctcaagcac	6420
ttaacttcat gtttgccttt ccttactgta ttgtgccatt gacagaaccg aaacagaata	6480
tgtcagtcag atgcttacca agattaaagcg gtttgctcag caccattctt gtcattgttg	6540
gtttgttgc caccctagac aggttaagaag attgaacata gttgcatatt aatctttgta	6600

acattattga atacacaatt agccttacat gctgttactg ctttgctagc ttcataactg 6660
 gaatggtggt cctcctaata tgtatgacat cagtgggaagc gcacatttca taaacaaatg 6720
 tgataatgga attgtcatcc atcgaacag ggatccaaac agtggccac ttgatgttgt 6780
 gcaggttact ttigccctct ttattacctt ataagttaaa atcttaatgc ttcaatttag 6840
 ggccctgcct aactcgtgta tttttttata ttatgttggg gttggattgg gttatcacag 6900
 gtttgtgtga ggaagggtcg caacaaagtg attggacaaa taggagatgc ttctttgtca 6960
 tatgaacggt atgtctgttt atggagcatg cttttataac cattccatat gtcagttttc 7020

tgtctacttt tgtatgtatc actgtaaata agtactatat ctagttcata tttaccaagt 7080
 ctccaagtgt cttgctaact aaatcaccaa atcaatcggt ttgccccac agggtttagt 7140
 gtgagttcag ggatgctgat aaagatactg caaagaaggc tgctgttgca gccgctaattg 7200
 tagcaaaagc cccacagagg aaaggataga tccgctgatt tgatttactc actcactgac 7260
 cgatcgaca aggtggagcg atattgttct tgatgctgca cactactgga gaccgtggcc 7320
 aacttcatat gctggagctg actggtcagt attttttttg cgacaagacc ctttggaggt 7380
 cacctgtctg ctgcagaatt tgggtgggaag atggttaacc ttgttacatg gcctacaaga 7440

cattatttgg gcgatgtata tcaaagcatc aattgtagtt aattttacac caggtgctat 7500
 gaacatattg gtggattcta tcagtaggga aacttcacga gattattatg tactatgccc 7560
 ttccaaaagt ttagttgtct ggaaggcggt ttattaatcc atcagatgta ttattccag 7620
 gcttccacat ctatgatcag aatctaata ttttttatta cccaaattgt ggagtcttaa 7680
 gatt 7684

<210> 66

<211> 2779

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 66

aaaccctaaa cctccgcgac ccaatccaaa ctccatcctc tectcctcc tctttctct 60
 tctttctctt ccccaagccc ctctccctc cctctcgcc tctctgctc cgcgccccgc 120
 atgccccgcg cggcgaaacc ctgacctcg tgatgccacc gcgccccctc ctccagtcgc 180
 tctctctcat ggccgctcc gctgcgccc ggggggactc cggcctctc ctgcgcgcgc 240
 gccgccgct ccccgccgc gccctcgccg cggggggcca ccgtatccgg ctgctccacg 300
 cttctctcg cgcgagccgg cgggggaggg acgaggtggc ctgctgcgtc aggactgaac 360
 ccgcgcgcgc gcccgccagc ccgctcgccg ttcgctccag gagtgttcat tcaacggaaa 420

actacaaaaa gggttgcgag cagcgactag gacagttaat tgagagactg aagaaagaag 480

gaataagtcc aaagcaatgg aggcttggta cttatcaacg aatgatgtgc ccaaagtgca 540

atgggggatc tactgaggag ccgagcctca gtgttatgat ccgaatggat gggaaaaatg 600

ctgcatggca atgttttaga gctaattgtg gttggaaggg tttgtcgag cctgatggag 660

ttctcaaact atcacaaaga aaaaataata cagaatgtga aacggaccag gatggtgaag 720

ctaactctggc agtcaataag gtttacagaa aaatttgtga ggaggacctc catcttgagc 780

cactttgcga tgagcttcta acatacttct cagagagaat gatatcgcca gaaacacttc 840

ggagaaacag cgtaatgcag cgtaactgga gtaataagat agttattgct ttcacctaca 900

ggcgtgatgg ggicctcgtt ggctgcaaat acagggaagt ctctaagaaa ttttcacagg 960

aagcaaacac agagaaaatt ttatatggtc tggacgatat aaagcgagca cgagatatta 1020

tcattgttga gggtgaaatt gataagctct caatggaaga agctggctac cgtaattgtg 1080

tcagtgtacc agatgggtga ccaccgaaag tatccagcaa gctcccagat aaagatcagg 1140

ataagaagta ccaatatctg tggaattgca aagaatatct tgacccggcg tctaggataa 1200

tactggcaac agatgctgat cctccagggc aggctctggc tgaggaactt gctcgtcgtc 1260

ttggtaaaga aagatgctgg agggccaatt ggccaaagaa gaacgagaac gaaatttgca 1320

aagacgcaaa tgaggtactg atgttttttag gaccacaagc attgagaaag gttatagaag 1380

acgcggaact gtatccata agaggtcttt tctccttcaa agatttcttc cctgagatcg 1440

ataattatta tcttggaaac cgtggggatg agcttggtgt tcctactgga tggaaatcca 1500

tggatgagct ttacaaggtt gttcctgggg agttgactgt agtaacagga gtgccgaatt 1560

ctggtaaaag tgagtggatt gatgctttac tgtgcaatat aaatgaccag gttgggtgga 1620

aattcgttct gtgctcaatg gaaaacaagg tcaggagca tgctagaaag ctcttagaga 1680

agcgcattaa gaaaccattc tttgatgcta gatatggggg ctctgcagaa agaagagtc 1740

tagacgaatt tgaagaaggc aagcaatggc tgaatgaaac attccatctg atccggtgtg 1800

aagatgattg ccttccatct gttaattggg ttctcgagct tgctaaagct gcagtcttaa 1860

gatatggagt gcgtgggtctt gtgattgac cctacaatga acttgatcac caacgccct 1920

caaatcaaac cgaacagaa tatgtcagtc agatgcttac caagattaag cggtttgctc 1980

agcaccattc ttgtcatgtt tggtttgttg ccacccctag acagcttcat aactggaatg 2040

gtggtcctcc taatatgtat gacatcagtg gaagcgaca tttcataaac aaatgtgata 2100

atggaattgt catccatcga aacagggatc caaacagtgg ccacttgat gttgtgcagg 2160

tttgtgtgag gaaggtgctc aacaaagtga ttggacaaat aggagatgct ttccttgcac 2220
atgaacgggt tagtggtgag ttcaggatg ctgataaaga tactgcaaag aaggctgctg 2280
ttgcagccgc taatgtagca aaagccccac agaggaaagg atagatccgc tgatttgatt 2340
tactcactca ctgaccgatc gcacaagggt gagcgatatt gttcttgatg ctgcacacta 2400
ctggagaccg tggccaactt catatgctgg agctgactgg tcagtatttt ttttgcgaca 2460
agaccctttg gaggtcacct gtctgctgca gaatttggtg ggaagatggt taaccttgtt 2520
acatggccta caagacatta tttgggcgat gtatatcaaa gcatcaattg tagttaattt 2580

tacaccaggt gctatgaaca tatttggtgga ttctatcagt agggaaactt catcagatta 2640
ttatgtacta tgccttcca aaagtgttag ttgctggaag ggcgtttatt aatccatcag 2700
atgtatttat tccaggcttc cacatctatg atcagaatct aatgattttt tattacccaa 2760
attgtggagt ctttaagatt 2779

<210> 67

<211> 429

<212> PRT

<213> Brachypodium distachyon

<400> 67

Met Ala Thr Leu Leu Arg Arg Ala Ser Val Arg Arg Ala Ile Ala Ala

1 5 10 15

Val Ala Ser Ser Pro Cys Pro Glu Ser Tyr Arg Gln Val Ile Cys Gly

20 25 30

Ser Thr Phe His Cys Arg Asp Phe Ala Ser Lys Ala Lys Lys Lys Thr

35 40 45

Lys Ser Ser Gly Thr Asp Ser Gly Glu Glu Asn Met Ser Lys Lys Asp

50 55 60

Leu Ala Leu His Gln Ala Ile Asp Gln Ile Thr Ser Ser Phe Gly Lys

65 70 75 80

Gly Ala Ile Met Trp Leu Gly Arg Ser Glu Gly His Arg Glu Val Pro

85 90 95

Val Val Ser Thr Gly Ser Phe Ser Leu Asp Leu Ala Leu Gly Ile Gly

100 105 110

Gly Leu Pro Lys Gly Arg Val Val Glu Val Tyr Gly Pro Glu Ala Ser

115 120 125

Gly Lys Thr Thr Leu Ala Leu His Val Ile Ala Glu Ala Gln Lys His
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Tyr Cys Ala Phe Ile Asp Ala Glu His Ala Leu Asp
145 150 155 160

Pro Ser Leu Ala Glu Ser Ile Gly Val Asp Thr Ser Asn Leu Leu Leu
165 170 175

Ser Gln Pro Asp Ser Ala Glu Gln Ala Leu Ser Leu Val Asp Thr Leu
180 185 190

Ile Arg Ser Gly Ser Val Asp Val Val Val Val Asp Ser Val Ala Ala
195 200 205

Leu Val Pro Lys Thr Glu Leu Asp Gly Glu Met Gly Asp Ala His Val
210 215 220

Ala Leu Gln Ala Arg Leu Met Ser Gln Ala Leu Arg Lys Leu Ser His
225 230 235 240

Ser Leu Ser Leu Ser Gln Thr Ile Leu Leu Phe Ile Asn Gln Ile Arg
245 250 255

Ala Lys Val Ser Thr Phe Gly Gly Phe Gly Gly Pro Thr Glu Val Thr
260 265 270

Ser Gly Gly Asn Ala Leu Lys Phe Tyr Ala Ser Val Arg Leu Asn Ile
275 280 285

Arg Arg Val Gly Leu Val Lys Lys Gly Glu Glu Thr Ile Gly Ser Gln
290 295 300

Val Asn Val Lys Ile Val Lys Asn Lys His Ala Pro Pro Phe Arg Thr
305 310 315 320

Ala Gln Phe Glu Leu Glu Phe Gly Lys Gly Ile Ser Arg Ser Ser Glu
325 330 335

Leu Val Glu Leu Gly Leu Lys His Lys Leu Val Lys Lys Thr Gly Gly
340 345 350

Ala Tyr Tyr Ser Phe Asn Glu Lys Ala Phe His Gly Lys Asp Ala Leu
355 360 365

Lys Ser Phe Leu Thr Gly Asn Glu Ser Ile Ala Lys Glu Leu Glu Met

370	375	380	
Glu Leu Arg Arg Leu Ile Glu Thr Glu Ala Pro Ile Lys Gln Glu Ala			
385	390	395	400
Glu Asp Asp Leu Leu Ser Asp Leu Pro Glu Glu Thr Val Arg Ser Asp			
	405	410	415
Thr Ser Ser Glu Glu Asp Leu Ala Ala Val Ile Glu Ala			
	420	425	
<210> 68			
<211> 1800			
<212> DNA			
<213> Brachypodium distachyon			
<400> 68			
ccatggtgct ggctagtggg ccacacgctc gctccctct tcccggcgcc cgagaacggg		60	
gagagagacc ggaggcgcaa aacggggtgg aagcgccga aaatataagc gcaaaacct		120	
aaacctagt ccccttccat cttctccacg cggctccagg gggtcggaga cgaagccgca		180	
atcgccgccg acgcatggc gacctctctg aggcgcgct cggtacggcg cgccatcgcc		240	
gccgtcgct cttccccctg ccctgagagc tataggcagg tgatctgtgg ctcaactttt		300	
cattgccgag atttcgcac taaagccaaa aagaagacaa agtcaagtgg cactgactct		360	
ggtgaggaga atatgtcaaa aaaggacttg gccttacatc aggccatcga tcaaataaca		420	
tcttcgtttg ggaagggagc aataatgtgg ctggccgct ctgaaggtca tagagaagta		480	
cctgttgtct ctactgggtc tttctctttg gacctggcac tgggaattgg tggccttcca		540	
aagggacgtg ttgtagaggt gtatggccca gaggttcag gcaagacaac tcttgctctc		600	
catgttattg cagaagcaca aaagcatggc ggtggcgggt attgtgcatt tatagatgca		660	
gagcatgctt tggatccatc tttggcagaa tccatcggtg ttgacaccag taatttactt		720	
ctctctcagc cagactctgc tgagcaagca ctcatgttg tagacacact gattcgaagt		780	
ggctctgttg atgttgtgt tgttgacagt gtagcagctc tcgtccctaa gactgagctt		840	
gatggagaga tgggtgatgc acatgtggct ctccaggcta gactgatgag ccaagctctt		900	
cgaaactga gccattctct ttactttcc cagacaattt tgctatttat taatcagatc		960	
agggctaagg taagcacatt tggaggattt ggaggaccaa cggagggtcac ttctggtgga		1020	
aatgccctta aattttatgc ctctgttcgc ttgaacatca ggcgtgttgg tttggtaaag		1080	
aaaggcgaag agactattgg cagtcagggt aatgtcaaaa ttgtgaaaaa caagcatgcc		1140	

ccaccgttca ggactgcgca atttgaacta gaatttggaa aaggatatac cgcagctca 1200
gagcttgttg aacttgggtt gaagcacaag ctgttataaa agactggggg tgcataattat 1260
tctttcaacg aaaaggcatt tcatggtaaa gatgccctta aatctttcct aactggaaat 1320
gagagtattg caaaagaact ggagatggag ttaaggagat tgattgaaac tgaagcacct 1380
attaagcagg aggcgtgaaga cgatttactg agtgacttgc ctgaagagac tgtcagatct 1440

gatacatcgt cagaagagga tctggcagct gtaatcgaag cttaccagat aatgataatt 1500
cagctaggag cgacacttgc agggcaatta gttttggatc tccagccttc ggttatcact 1560
gggaaatgtg acaggatgct caggaggcca agttatgatg gttgtttaga cttgacattt 1620
tgggagtcag ggattcagta gcatgtaatg atgtatatgt gttgcataac ttaacgattc 1680
ctcgtgtaag ttaagtccaa ccgagcctga gccaccctca agagcagccc attagcagct 1740
ttttgctgga aagaacttaa gccagcgaa ttggttctaa atttaaatct ctttctatac 1800

<210> 69

<211> 427

<212> PRT

<213> Sorghum bicolor

<400> 69

Met Ala Thr Leu Leu Arg Arg Ala Ser Leu Arg Arg Val Val Ala Ala

1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala Ser Ser Ser Gln Pro Glu Ser Tyr Lys Gln Val Ile

20 25 30

Cys Gly Ser Thr Phe His Cys Arg Glu Phe Ala Ser Lys Ala Lys Lys

35 40 45

Lys Lys Ser Ser Gly Thr Asp Ser Gly Glu Glu Asn Met Ser Lys Lys

50 55 60

Asp Leu Ala Leu His Gln Ala Ile Asp Gln Ile Thr Ser Ala Phe Gly

65 70 75 80

Lys Gly Ala Ile Met Trp Leu Gly Arg Ser Gln Gly His Arg Asp Val

85 90 95

Pro Val Val Ser Thr Gly Ser Phe Ala Leu Asp Met Ala Leu Gly Thr

100 105 110

Gly Gly Leu Pro Lys Gly Arg Val Ile Glu Val Tyr Gly Pro Glu Ala

115	120	125	
Ser Gly Lys Thr Thr Leu Ala Leu His Val Ile Ala Glu Ala Gln Lys			
130	135	140	
Asn Gly Gly Tyr Cys Ala Phe Val Asp Ala Glu His Ala Leu Asp Pro			
145	150	155	160
Ala Leu Ala Glu Lys Ile Gly Val Asp Thr Asn Asn Leu Leu Leu Ser			
165	170	175	
Gln Pro Asp Cys Ala Glu Gln Ala Leu Ser Leu Val Asp Thr Leu Ile			
180	185	190	
Arg Ser Gly Ser Val Asp Val Val Val Val Asp Ser Val Ala Ala Leu			
195	200	205	
Val Pro Lys Thr Glu Leu Asp Gly Glu Met Gly Asp Ala His Val Ala			
210	215	220	
Leu Gln Ala Arg Leu Met Ser Gln Ala Leu Arg Lys Leu Ser His Ser			
225	230	235	240
Leu Ser Leu Ser Gln Thr Ile Leu Leu Phe Ile Asn Gln Ile Arg Ala			
245	250	255	
Lys Val Ala Thr Phe Gly Phe Gly Gly Pro Thr Glu Val Thr Ser Gly			
260	265	270	
Gly Asn Ala Leu Lys Phe Tyr Ala Ser Val Arg Leu Asn Ile Arg Arg			
275	280	285	
Ile Gly Leu Val Lys Lys Gly Glu Glu Thr Ile Gly Ser Gln Ile Ala			
290	295	300	
Val Lys Ile Val Lys Asn Lys His Ala Pro Pro Phe Lys Thr Ala Gln			
305	310	315	320
Phe Glu Leu Glu Phe Gly Lys Gly Ile Cys Arg Ser Ser Glu Leu Phe			
325	330	335	
Glu Leu Gly Leu Lys His Lys Leu Ile Lys Lys Thr Gly Gly Ala Phe			
340	345	350	
Tyr Ser Phe Asn Asp Met Ser Phe Cys Gly Lys Asn Asn Leu Lys Ser			
355	360	365	

Tyr Leu Asp Glu Asn Lys Ser Val Ala Asn Asp Leu Glu Met Glu Leu
370 375 380

Arg Arg Leu Met Ala Thr Glu Ala Pro Lys Glu Gln Glu Ala Glu Asp
385 390 395 400
Ser Ser Pro Ser Asp Leu Pro Glu Glu Ile Val Thr Pro Glu Val Ser
405 410 415
Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ala Val Ile Glu Gly
420 425

<210> 70

<211> 1981

<212> DNA

<213> Sorghum bicolor

<400> 70

gggtccacgg gaggtccatc ggagtgtatg gcgagcgccg gcccgcgggg cgctcttccc 60
gacacccgga gtgggagccc ggagaggcgg agaccggact caaaagggga cgaggcggag 120

cgcagccaaa aaccccaagc cccgcaaac ccctaaacc tagcacctcc ataccccgtc 180
cccggggttc tccgcgcggc ttccaacggt tggaggcgaa gccgccgcca tggcgacact 240
cctcaggcgc gcgtcgctgc ggcgcgctgc cgccgcgcc gcctccgcct cttcttctca 300
acctgagagc tataagcaag tgatctgtgg ctccacgttt cattgccgag agttcgcatc 360
aaaagctaaa aaaaagaagt caagtggaa agactctggt gaggagaata tgtcaaagaa 420
agacttggct ttacaccagg ctattgatca aataacgtct gcatttggga agggggcgat 480
aatgtggctt gggcgttcac aaggccatag agatgtacct gtcgtgtcta ctggctcttt 540

cgctttggat atggctctag gaactgggtg tcttcaaag gggcgtgtca tagaggtcta 600
tgggtccagag gcttcaggca agacaacgct tgctctacat gtcattgcag aagcacaaaa 660
gaatgggggt tactgtgcct ttgtagatgc agagcacgct ttggatccag ctctcgaga 720
gaaaattggt gttgacacta acaatttgct cttttctcag ccagactgtg ctgagcaggc 780
actcagtctt gtggatacac tgattcgaag tggatctgtt gatgttgtt tagtagacag 840
ttagctgctg ctgtttccaa agactgagct cgatggtag atgggtgatg cacatgttgc 900
tcttcaggct aggttgatga gccaaactct tcgcaagctt agccactccc tttcgctttc 960

gcagacaatt ttgttattta ttaatcagat cagggccaaag gtagccacat ttggatttgg 1020
aggaccaact gaggtcactt ctggtggcaa cgccttgaag ttttatgctt ctgttcgctt 1080

gaacatcagg cgtattgggtt tggtaaagaa aggtgaagag acaataggta gtcagattgc 1140
tgtgaagatt gtaaaaaaca agcatgctcc acccttcaag accgcacagt ttgagcttga 1200
atttgaaaag gggatatgcc gcagttctga gcttttcgaa ctcggattga agcacaagct 1260
tatcaaaaag aciggtgggtg cattttatag tttcaatgat atgtctttct gtggtaaaaa 1320
taaccttaaa tcttaccttg atgaaaacaa gagtggtgca aatgatctgg agatggaact 1380

aaggagattg atggcaactg aagcacctaa agagcaggag gcagaagata gttcacccgag 1440
tgatttgcct gaagagattg tcacacctga agtatcgtca gaagaggatc tgggagctgt 1500
aatcgaaggt tagccagtga tttgatgtgc tggcaagtgg gaagagaatt tctggagcag 1560
ttgttcccgt attttgggcc ctgaagtcac caccgtttgg atcaacatga cctgtggtgt 1620
tctggtgatc tcattgtaac agacttcagt tcttactgtg cttatacggg agttagcat 1680
gaagagaatt cgcattgtgt gaaatcatgc tgataactga gagtggaag ttgaagtaag 1740
ccgggaatgg tgaggtactg tggtcctgtg ggcaatttga actttattaa gcgatggtaa 1800

aatgtagtgg cgtggctgtg tataatatgat gtgcacattt tgagctcttg ttgtcacgtc 1860
gaagtcaatt tcaaaagcat tctttattga gtgctgctag aattacattg agctccatcc 1920
acttccggta cttcagtact tgccttgggt tttgcttgga gtagcgagtt ttggtttttg 1980
a 1981

<210> 71

<211> 425

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 71

Met Thr Thr Leu Leu Arg Arg Ala Ser Leu Arg Arg Val Ile Ala Ala

1 5 10 15

Ala Ala Ala Ser Ser Phe His Pro Glu Ser Tyr Lys Gln Gly Ile Cys

20 25 30

Gly Ser Thr Phe His Cys Arg Glu Phe Ala Ser Lys Ala Lys Lys Lys

35 40 45

Ser Ser Gly Thr Asp Ser Gly Glu Glu Asn Met Ser Lys Lys Asp Leu

50 55 60

Ala Leu His Gln Ala Ile Asp Gln Ile Thr Ser Ala Phe Gly Lys Gly

65 70 75 80

Ala Ile Met Trp Leu Gly Arg Ser Gln Gly His Arg Asp Val Pro Val

85 90 95

Val Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Asp Met Ala Leu Gly Thr Gly Gly

100 105 110

Leu Pro Lys Gly Arg Val Val Glu Val Tyr Gly Pro Glu Ala Ser Gly

115 120 125

Lys Thr Thr Leu Ala Leu His Val Ile Ala Glu Ala Gln Lys Asn Gly

130 135 140

Gly Tyr Cys Ala Phe Val Asp Ala Glu His Ala Leu Asp Pro Ala Leu

145 150 155 160

Ala Glu Ser Ile Gly Val Asp Thr Asn Asn Leu Leu Leu Ser Gln Pro

165 170 175

Asp Cys Ala Glu Gln Ala Leu Ser Leu Val Asp Thr Leu Ile Arg Ser

180 185 190

Gly Ser Val Asp Val Val Val Val Asp Ser Val Ala Ala Leu Val Pro

195 200 205

Lys Thr Glu Leu Asp Gly Glu Met Gly Asp Ala His Ile Ala Leu Gln

210 215 220

Ala Arg Leu Met Ser Gln Ala Leu Arg Lys Leu Ser His Ser Leu Ser

225 230 235 240

Leu Ser Gln Thr Ile Leu Leu Phe Ile Asn Gln Ile Arg Ala Lys Val

245 250 255

Ala Thr Phe Gly Phe Gly Gly Pro Thr Glu Val Thr Ser Gly Gly Asn

260 265 270

Ala Leu Lys Phe Tyr Ala Ser Val Arg Leu Asn Ile Arg Arg Ile Gly

275 280 285

Leu Val Lys Lys Gly Glu Glu Thr Ile Gly Ser Gln Ile Ala Val Lys

290 295 300

Ile Val Lys Asn Lys His Ala Pro Pro Phe Lys Thr Ala Gln Phe Glu

305 310 315 320

Leu Glu Phe Gly Lys Gly Ile Cys Arg Ser Ser Glu Leu Phe Glu Leu

325 330 335
Gly Leu Lys His Lys Leu Ile Arg Lys Ser Gly Gly Ser Tyr Tyr Ser

340 345 350
Phe Asn Gly Lys Ala Phe Asn Gly Lys Ser Asn Leu Lys Ser Tyr Leu

355 360 365
Thr Glu Asn Lys Ser Val Ala Asn Asp Leu Glu Met Glu Leu Lys Arg

370 375 380
Leu Met Gly Thr Asp Ala Ser Lys Glu Gln Glu Ala Gly Asp Ser Ser

385 390 395 400
Gln Ser Asp Phe Pro Glu Glu Ser Val Thr Pro Glu Ala Ser Ser Glu

405 410 415
Glu Asp Leu Gly Ala Ile Ile Glu Gly

420 425

<210> 72

<211> 1711

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 72

cctctcgct cgcctcat cgcacgact tgcagcggtt ggaggcgaag ccggtccat 60

gacgaccctc ctcaggcgcg cgtcgctgcg gcgcgtcatt gccgccgccc cgcctcttc 120

ttttaccct gagagctata agcaagggat ctgtggctcc acatttcatt gccgagagtt 180

cgcacaaaa gcaaaaaaga agtcaagtgg aacagactct ggggaggaga acatgtcaaa 240

gaaagacttg gctttacacc aggctattga tcagataacg tctgcatttg ggaagggggc 300

aataatgtgg cttgggcgtt cacaaggcca tagagatgta ccagtcgtgt ctactgggtc 360

tttgatattg gatatggctc taggaactgg tggctctcca aaggggcgtg ttgtagaggt 420

atatgggtcca gaggcttcag gcaagacaac gcttgctcta catgtcattg cagaagcaca 480

aaagaatgga ggttactgtg cctttgtaga tgcagagcac gctttggatc cagctctcgc 540

cgagtcaatt gggttgaca ctaacaattt actcctttct cagcccgatt gtgctgagca 600

ggcactcagt cttgtggaca cactgattcg aagtggatct gttgatgttg ttgtagtaga 660

cagtgttgct gcgcttgctt caaagactga gcttgatggg gagatgggtg atgcacatat 720

tgctcttcag gctaggttga tgagtcaagc ccttcgcaag cttagccact ccctttcact 780

ttcacaaaca attttgttat ttattaatca gatcagggcc aaggtagcca catttgatt 840
 tggaggacca actgaggta cttctggtgg caacgccttg aagttttatg catctgttcg 900
 ctgaaacatc aggcgtattg gtttggtaaa gaaaggcgaa gagacaatag gtagtcagat 960
 tgctgtgaag attgtaaaaa acaagcatgc cccacccttc aagactgcac agtttgagct 1020
 tgaatttga aaggggatat gccgcagttc tgagcttttt gaacttggat tgaagcacia 1080

gcttatccga aagagtgggtg gttcgtatta tagtttcaat ggtaaggctt tcaatggtaa 1140
 aagtaacctt aaatcttacc ttactgaaaa caagagtgtt gccaatgatc tggagatgga 1200
 actaaagaga ttgatgggaa ctgatgcgtc taaagagcag gaggcaggag acagttcgca 1260
 gagtgatttt cctgaagaga gtgtcacacc tgaagcatcg tcagaagagg atctgggagc 1320
 cataattgaa ggtagccag tgatctgatg tgctggcaag tgggaacaga atttctggag 1380
 cagttgttcc tgtaaaaaca tatcttgggt cctgaagtca ccaccgttg gatcgacatg 1440
 cctgtggtgt tctggtgatc tcatcatagc agacttcagt ctttactgtg cttatacagt 1500

agtcagcag gaagagaatt cacattgtgt gaaatcatgg tgatatctga gagtggaag 1560
 ttgtagtaag ccgggaaggg tgaggtattg tggccgtgg catttaaact tcagtaagca 1620
 aacgccgtgt atatatgatg tgcacatttt gaaaccgggc attctttatt gactgctgct 1680
 agatttacat tgagctccct ccacttccaa t 1711

<210> 73

<211> 429

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 73

Met Ala Thr Leu Leu Arg Arg Ala Ser Leu Arg Arg Ala Ile Ala Ser

1 5 10 15

Ala Ala Ala Ser Cys Pro Glu Ser Tyr Arg Gln Val Ile Cys Gly Ser

20 25 30

Ser Phe His Cys Arg Asp Phe Ala Ser Lys Ala Lys Lys Lys Ser Lys

35 40 45

Ser Ser Gly Thr Asp Ser Gly Glu Glu Asn Met Ser Lys Lys Asp Leu

50 55 60

Ala Leu His Gln Ala Ile Asp Gln Ile Thr Thr Ser Phe Gly Lys Gly

65 70 75 80

Ala Ile Met Trp Leu Gly Arg Ser Glu Gly His Arg Glu Val Pro Val
85 90 95

Val Ser Thr Gly Ser Phe Ser Leu Asp Leu Ala Leu Gly Ile Gly Gly
100 105 110

Leu Pro Lys Gly Arg Val Ile Glu Val Tyr Gly Pro Glu Ala Ser Gly
115 120 125

Lys Thr Thr Leu Ala Leu His Val Ile Ala Glu Ala Gln Lys Leu Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Tyr Cys Ala Phe Val Asp Ala Glu His Ala Leu Asp Pro
145 150 155 160

Thr Leu Ala Glu Ser Ile Gly Val Asp Thr Ser Asn Leu Leu Leu Ser
165 170 175

Gln Pro Asp Ser Ala Glu Gln Ala Leu Ser Leu Val Asp Thr Leu Ile
180 185 190

Arg Ser Gly Ser Val Asp Val Val Val Val Asp Ser Val Ala Ala Leu
195 200 205

Val Pro Lys Thr Glu Leu Asp Gly Glu Met Gly Asp Ala His Val Ala
210 215 220

Leu Gln Ala Arg Leu Met Ser Gln Ala Leu Arg Lys Leu Ser His Ser
225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Gln Thr Val Leu Leu Phe Ile Asn Gln Ile Arg Ser
245 250 255

Lys Val Gln Thr Phe Gly Gly Gly Phe Gly Gly Pro Gln Glu Val Thr
260 265 270

Ser Gly Gly Asn Ala Leu Lys Phe Tyr Ala Ser Val Arg Leu Asn Ile
275 280 285

Arg Arg Ile Gly Met Val Lys Lys Gly Glu Glu Ile Ile Gly Ser Gln
290 295 300

Val Thr Val Lys Ile Val Lys Asn Lys His Ala Pro Pro Phe Arg Thr
305 310 315 320

Ala Gln Phe Glu Leu Glu Phe Gly Lys Gly Ile Cys Arg Ser Ser Glu

325	330	335				
Leu Phe Glu Leu Gly Leu Lys His Lys Leu Val Lys Lys Thr Gly Gly						
340	345	350				
Ala Tyr Tyr Ser Phe Asn Glu Gln Gln Phe His Gly Lys Asp Ala Val						
355	360	365				
Lys Ser Phe Leu Thr Lys Asn Glu Gly Ala Ala Lys Glu Leu Glu Met						
370	375	380				
Glu Leu Arg Arg Leu Ile Gln Thr Glu Pro Pro Arg Lys Gln Glu Ala						
385	390	395	400			
Glu Asp Asp Met Leu Gly Asp Leu Pro Glu Glu Thr Val Arg Pro Glu						
405	410	415				
Thr Ser Glu Glu Glu Asp Leu Ala Ala Ile Ile Glu Ala						
420	425					
<210>	74					
<211>	1622					
<212>	DNA					
<213>	Hordeum vulgare					
<400>	74					
gactgagcag	agaagaaaaa	accgagcgcg	taaaacccta	aaccctagcc	ccctccctc	60
cccaaatect	cccctcgcgg	ctgcagggga	cggagaacca	ccgagcgcgc	cgacggcagc	120
catggcgacc	ctctgaggc	gcgcgtcgct	gcggcgggcc	atgcctccg	ccgccgcctc	180
ctgccccgag	agctataggc	aggtgatctg	tggttcttcc	tttcattgcc	gagatttcgc	240
atctaaagcc	aaaaagaagt	caaagtcaag	tggaaccgac	tccggtgagg	agaacatgtc	300
aaagaaagac	ttggctttac	atcaggccat	tgatcaaata	acaacttcgt	ttggaaaagg	360
agcaataatg	tggtctggcc	gctctgaagg	tcatagagaa	gtacctgttg	tgtctaccgg	420
atctttctct	ttggatctgg	cactgggaat	tggtagggctt	ccaaagggac	gtgttataga	480
ggtgtacggt	ccagaggctt	caggaaagac	aactcttgct	cttcacgtta	ttgcagaagc	540
acaaaagctt	agcggtggtg	gttattgtgc	attttagat	gcagagcatg	ctttggatcc	600
aactctggca	gagtcaattg	gtgtcgacac	cagtaactta	cttctctctc	agccagactc	660
tgctgagcag	gcactcagtc	ttgtagacac	gctgattcga	agtggctctg	ttgatgttgt	720
tgttgttgac	agtgtagcag	ctcttgctcc	caagacagag	cttgatggag	agatgggtga	780

tgcacatgtc gctctccaag ccagactgat gagtcaagct cttcgcaagc tgagccattc 840
tcttttactg tcccagacag ttttgttatt tattaatcag atcaggtcta aggtacagac 900
gtttggggga ggatttggag ggccacaaga ggtcacttcc ggtggaaatg cccttaaatt 960
ttatgcctcg gticgcctga atatcaggcg aattggcatg gtaaagaaag gtgaagagat 1020

tataggaagt caggttactg tgaagattgt gaaaaataag cagcccccac cattcaggac 1080
cgcacagttt gagctggaat ttggaaaagg aatatgccgc agttcagagc ttttcgagct 1140
tggattaaag cacaagcttg ttaaaaagac tggaggcgca tattattctt tcaacgaaca 1200
gcagtccat ggtaaagatg cgtttaaatc tttccttact aaaaacgagg gtgctgcgaa 1260
ggaactggag atggagctaa ggagattgat ccagactgaa ccaccgagaa agcaagaggc 1320
tgaagacgac atgctgggag atctgcctga ggagactgtc aggcctgaaa catcagaaga 1380
agaagatctg gctgctataa tcgaggcttg aaccagcgat gataggttag ctaggaatgt 1440

tacttgtggc acgaactgtg ttctggactt ggacattgag ttcttactgc actggaaaac 1500
gaggaggttg cttcttagag tagacactgg gtgtgttttg ggaggagggg gaagggtca 1560
ggattcagta gcatgtaatc atgtactgta tatatgttgc atgccttgac tattcttgac 1620
tg 1622

<210> 75

<211> 435

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 75

Met Ala Thr Leu Leu Arg Arg Ala Ser Leu Arg Arg Ala Ile Ala Ser

1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala Ala Thr Ala Ser Ala Ser Cys Pro Glu Ser Tyr Arg

20 25 30

Gln Val Ile Cys Gly Ser Thr Phe His Cys Arg Asp Phe Ala Ser Lys

35 40 45

Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ser Ser Gly Thr Asp Ser Gly Glu Glu Asn

50 55 60

Met Ser Lys Lys Asp Leu Ala Leu His Gln Ala Ile Asp Gln Ile Thr

65 70 75 80

Thr Ser Phe Gly Lys Gly Ala Ile Met Trp Leu Gly Arg Ser Glu Gly

85	90	95
His Arg Glu Val Pro Val Val Ser Thr Gly Ser Phe Ser Leu Asp Leu		
100	105	110
Ala Leu Gly Ile Gly Gly Leu Pro Lys Gly Arg Val Ile Glu Val Tyr		
115	120	125
Gly Pro Glu Ala Ser Gly Lys Thr Thr Leu Ala Leu His Val Ile Ala		
130	135	140
Glu Ala Gln Lys Leu Ser Gly Gly Gly Tyr Cys Ala Phe Val Asp Ala		
145	150	155
Glu His Ala Leu Asp Pro Thr Leu Ala Glu Ser Ile Gly Val Asp Thr		
165	170	175
Gly Asn Leu Leu Leu Ser Gln Pro Asp Ser Ala Glu Gln Ala Leu Ser		
180	185	190
Leu Val Asp Thr Leu Ile Arg Ser Gly Ser Val Asp Val Val Val Val		
195	200	205
Asp Ser Val Ala Ala Leu Val Pro Lys Thr Glu Leu Asp Gly Glu Met		
210	215	220
Gly Asp Ala His Val Ala Leu Gln Ala Arg Leu Met Ser Gln Ala Leu		
225	230	235
Arg Lys Leu Ser His Ser Leu Ser Leu Ser Gln Thr Val Leu Leu Phe		
245	250	255
Ile Asn Gln Ile Arg Ser Lys Val Gln Thr Phe Gly Gly Gly Phe Gly		
260	265	270
Gly Pro Gln Glu Val Thr Ser Gly Gly Asn Ala Leu Lys Phe Tyr Ala		
275	280	285
Ser Val Arg Leu Asn Ile Arg Arg Ile Gly Met Val Lys Lys Gly Glu		
290	295	300
Glu Ile Ile Gly Ser Gln Val Thr Val Lys Ile Val Lys Asn Lys His		
305	310	315
Ala Pro Pro Phe Arg Thr Ala Gln Phe Glu Leu Glu Phe Gly Lys Gly		
325	330	335

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

Pro Arg Lys Pro Glu Ala Glu Asp Asp Leu Leu Asp Asp Ser Pro Glu
 405 410 415
 Glu Ile Val Arg Pro Glu Thr Ser Ser Glu Glu Asp Met Ala Ala Ile
 420 425 430

Ile Arg Ala
 435

<210> 76

<211> 1715

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 76

gcggagcaaa aaagaaaaaa ccgagcgcgc aaaaccctaa accctagccc ccccccctccc 60

tccccaaatc ctcccctcgc ggctgcaggg gacggagacc accgagccgc catggcgacc 120

ctcctgaggc gcgcgtcgtc gcggcgggcc atcgctccg ccgcctcggc cgccaccgcc 180

tccgcctcct gccccgagag ctataggcag gtgatctgtg gctctacctt tcattgccga 240

gatttcgcat ctaaagccaa aaagaagtca aagtcaagtg gcaccgactc cggtagaggag 300

aatatgtcaa agaaagactt ggctttacat caggccattg atcaaataac aacttcgttt 360

gggaaaggag caataatgtg gcttggccgc tctgaaggtc atagagaagt acctgttgtg 420

tctaccggat ctttctcttt ggatctggca ctgggaattg gtgggcttcc aaagggacgt 480

gttatagagg tgtacggccc agaggcttca ggaaagacaa ctcttgcaact tcacgttatt 540

gcagaagcac aaaagcttag cggcgggtgtt tattgtgcat ttgtagatgc agagcatgct 600

ttggatccaa ctctggcaga gtcaatttgt gtcgacaccg gtaacttact tctctctcag 660

ccagactctg ctgagcaggc actcagtcctt gtagacacgc tgattcgaag tggctctgtt 720

gatgttgttg ttgttgacag tgtagcagct cttgtcccca agaccgagct tgatggggag 780

atgggtgatg cacatgtggc tctccaagcc agactgatga gtcaagctct tcgcaagctg 840
agccattctc ttctactatc ccagacagtt ttgctattta ttaatcagat caggtctaag 900
gtacagacat ttgggggagg atttggaggg ccacaagagg tcacttccgg tggaaatgcc 960

cttaaatttt atgcctcggc cgcctgaac atcaggcgaa ttggtatggt aaagaaaggt 1020
gaagagatta taggaagtca ggttactgtg aagattgtga aaaacaagca tgccccaccg 1080
ttcaggactg cacagtttga gctggaattt ggaaaaggaa tatgccgcag ctcagagctt 1140
ttcgatcttg ggttaaagca caagcttggt aagaagaccg ggggcgcgta ctattctttc 1200
aacgaacagc agttccatgg taaagatgcc gttaaagctt tccttactaa aaatgagagt 1260
gttgcggaag aactggagat ggagctaagg agattgatcc aaactgaacc gcctagaaag 1320
ccggaggctg aggacgatct gctggacgat tcgcctgaag agattgtcag acctgaaacg 1380

tcacggaag aggatatggc cgctataatc agggcttaac cagcgatgat aggtgagcta 1440
ggaatgttac ttgcggtcgc gattgtattt tgtacttggg acctgtgttt cttactgtat 1500
tgaaaaatga ggaaggcaaa attatggtag ctgcttaggg taggcattgg ggtggatttg 1560
gggaggggcg aggggagggg tcaggattca gtagcatgta atcatgtata tatgttgcac 1620
gccttgacta ttctctcttg tctaagtaag gccagcaac attcttgact gagcagctaa 1680
cttgccgctg ctactggaaa aaaaaaaaaa aacga 1715

<210> 77

<211> 433

<212> PRT

<213> Aegilops tauschii

<400> 77

Met Ala Thr Leu Leu Arg Arg Ala Ser Leu Arg Arg Ala Ile Ala Ser

1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala Ala Thr Ala Ser Cys Pro Glu Ser Tyr Arg Gln Val

20 25 30

Ile Cys Gly Ser Thr Phe His Cys Arg Asp Phe Ala Ser Lys Ala Lys

35 40 45

Lys Lys Ser Lys Ser Ser Gly Thr Asp Ser Gly Glu Glu Asn Met Ser

50 55 60

Lys Lys Asp Leu Ala Leu His Gln Ala Ile Asp Gln Ile Thr Thr Ser

65 70 75 80

Phe Gly Lys Gly Ala Ile Met Trp Leu Gly Arg Ser Glu Gly His Arg
 85 90 95
 Glu Val Pro Val Val Ser Thr Gly Ser Phe Ser Leu Asp Leu Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ile Gly Gly Leu Pro Lys Gly Arg Val Val Glu Val Tyr Gly Pro
 115 120 125

 Glu Ala Ser Gly Lys Thr Thr Leu Ala Leu His Val Ile Ala Glu Ala
 130 135 140
 Gln Lys Leu Ser Gly Gly Gly Tyr Cys Ala Phe Val Asp Ala Glu His
 145 150 155 160
 Ala Leu Asp Pro Thr Leu Ala Glu Ser Ile Gly Val Asp Thr Ser Asn
 165 170 175
 Leu Leu Leu Ser Gln Pro Asp Ser Ala Glu Gln Ala Leu Ser Leu Val
 180 185 190

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

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

 Pro Phe Arg Thr Ala Gln Phe Glu Leu Glu Phe Gly Lys Gly Ile Cys

325 330 335
 Arg Ser Ser Glu Leu Phe Asp Leu Gly Val Lys His Lys Leu Val Lys
 340 345 350
 Lys Thr Gly Gly Ala Tyr Tyr Ser Phe Asn Glu Gln Gln Phe His Gly
 355 360 365
 Lys Asp Ala Val Lys Ala Phe Leu Thr Lys Asn Glu Ser Val Ala Lys
 370 375 380

Glu Leu Glu Met Glu Leu Arg Arg Leu Ile Gln Thr Glu Pro Pro Arg
 385 390 395 400
 Lys Pro Glu Ala Glu Asp Asp Leu Leu Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile
 405 410 415
 Val Arg Pro Glu Thr Ser Ser Glu Glu Asp Leu Ala Ala Ile Ile Gly
 420 425 430
 Ala

<210> 78

<211> 1785

<212> DNA

<213> Aegilops tauschii

<400> 78

aggcggccga aaacactgag caaaaagaaa aaagaaaaaa ccgagcgcgc aaaaccctaa 60

accctagccc cctccctcc ccaaatctc ccctcgcggc tgcaggggac ggagaccacc 120

gagccgccat ggcgaccctc ctgaggcgcg cgtcgtcgcg gcgggccatc gcctcggccg 180

cctcggccgc caccgcctcc tgccccgaga gctataggca ggtgatctgt ggctctacct 240

ttcattgccg agatttcgca tctaaagcca aaaagaagtc aaagtcaagt ggcaactgact 300

ccggtgagga gaatatgtca aagaaagact tggctttaca tcaggccatc gatcaaataa 360

caacttcgtt tgggaaagga gcaataatgt ggcttgccg ctctgaaggt catcgagaag 420

tacctgttgt gtctactgga tctttctctt tggatctggc actgggaatt ggtgggcttc 480

caaagggacg tgtttagtag gtttacggcc cagaggcttc aggaaagaca actcttgctc 540

ttcacgttat tgcagaagca caaaagctta gcggcgggtgg ttattgtgca tttgtagatg 600

cagagcatgc tttgatcca actctggcag agtcgattgg tgtcgacact agtaatttac 660

ttctctctca gccagactct gctgagcagg cgctcagtct tgtagacact ctgattcgaa 720

gtggctctgt tgatgttgtt gttgttgaca gtgtagcagc tcttgcccc aagaccgagc 780
 ttgatggaga gatgggtgat gcacatgtgg ctctccaagc tagactgatg agtcaagctc 840
 ttcgcaagct gagccattct ctttcactat ccagacagc tttggtatctt attaatcaga 900

tcaggctctaa ggtacagaca tttgggggag gatttggagg accacaggag gtcacttccg 960
 gtggaaatgc ctttaaattt tatgcctcgg ttcggctgaa catcaggcga attggcatgg 1020
 taaagaaagg tgaagagatt ataggaagtc aggttactgt gaagattgtg aaaaacaagc 1080
 atgccccacc gttcaggact gcacagtctt agctggaatt tggaaaagga atatgccgca 1140
 gctcagagct tttgatctt ggggtaaagc acaagcttgt taagaagacc gggggcgcgt 1200
 actactcttt caacgaacag cagttccatg gtaaagatgc tgttaaagct ttccttacia 1260
 aaaatgagag tgttgcgaaa gaactggaga tggagctaag gagattgatc caaactgagc 1320

cgccatagaaa gccggaggct gaggacgatc tgcaggacga ttcgcctgaa gagattgtca 1380
 gacctgaaac gtcacaggaa gaggacctgg ccgctataat cggggcctta ccagcgatga 1440
 taggtgagct aggaacgtta cttgcggcgc ggattgtatt ttggacttgg gaccttgtgt 1500
 gctcactgta ctggaaaatg aggaagggtg ctcgagaggc aaaattatgg tagctgctta 1560
 gggtaggcat tggggtggat ttggggaggg gagggatcag gattcagtag catgtaatca 1620
 tgtatatatg ttgcatgcct tgactattcc tcttgtctaa gtaaggcca gcaacattct 1680
 tgactgagca gctaacttgc cgctgctacc ggaagaatt tgattctct gctccagaaa 1740

cattctccgg tcttgccctgc tagtagttgt tttgagtggc agcac 1785

<210> 79

<211> 435

<212> PRT

<213> Triticum turgidum

<400> 79

Met Ala Thr Leu Leu Arg Arg Ala Ser Leu Arg Arg Ala Ile Ala Ser

1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala Ala Thr Ala Ser Ala Ser Cys Pro Glu Ser Tyr Arg

20 25 30

Gln Val Ile Cys Gly Ser Thr Phe His Cys Arg Asp Phe Ala Ser Lys

35 40 45

Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ser Ser Gly Thr Asp Ser Gly Glu Glu Asn

50 55 60

Met Ser Lys Lys Asp Leu Ala Leu His Gln Ala Ile Asp Gln Ile Thr
65 70 75 80

Thr Ser Phe Gly Lys Gly Ala Ile Met Trp Leu Gly Arg Ser Glu Gly
85 90 95

His Arg Glu Val Pro Val Val Ser Thr Gly Ser Phe Ser Leu Asp Leu
100 105 110

Ala Leu Gly Ile Gly Gly Leu Pro Lys Gly Arg Val Ile Glu Val Tyr
115 120 125

Gly Pro Glu Ala Ser Gly Lys Thr Thr Leu Ala Leu His Val Ile Ala
130 135 140

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

Glu His Ala Leu Asp Pro Thr Leu Ala Glu Ser Ile Gly Val Asp Thr
165 170 175

Gly Asn Leu Leu Leu Ser Gln Pro Asp Ser Ala Glu Gln Ala Leu Ser
180 185 190

Leu Val Asp Thr Leu Ile Arg Ser Gly Ser Val Asp Val Val Val Val
195 200 205

Asp Ser Val Ala Ala Leu Val Pro Lys Thr Glu Leu Asp Gly Glu Met
210 215 220

Gly Asp Ala His Val Ala Leu Gln Ala Arg Leu Met Ser Gln Ala Leu
225 230 235 240

Arg Lys Leu Ser His Ser Leu Ser Leu Ser Gln Thr Val Leu Leu Phe
245 250 255

Ile Asn Gln Ile Arg Ser Lys Val Gln Thr Phe Gly Gly Gly Phe Gly
260 265 270

Gly Pro Gln Glu Val Thr Ser Gly Gly Asn Ala Leu Lys Phe Tyr Ala
275 280 285

Ser Val Arg Leu Asn Ile Arg Arg Ile Gly Met Val Lys Lys Gly Glu
290 295 300

Glu Ile Ile Gly Ser Gln Val Thr Val Lys Ile Val Lys Asn Lys His

305 310 315 320
 Ala Pro Pro Phe Arg Thr Ala Gln Phe Glu Leu Glu Phe Gly Lys Gly
 325 330 335
 Ile Cys Arg Ser Ser Glu Leu Phe Asp Leu Gly Leu Lys His Lys Leu
 340 345 350
 Val Lys Lys Thr Gly Gly Ala Tyr Tyr Ser Phe Asn Glu Gln Gln Phe
 355 360 365

 His Gly Lys Asp Ala Val Lys Ala Phe Leu Thr Lys Asn Glu Ser Val
 370 375 380
 Ala Lys Glu Leu Glu Met Glu Leu Arg Arg Leu Ile Gln Thr Glu Pro
 385 390 395 400
 Pro Arg Lys Pro Glu Ala Glu Asp Asp Leu Leu Asp Asp Ser Pro Glu
 405 410 415
 Glu Ile Val Arg Pro Glu Thr Ser Ser Glu Glu Asp Met Ala Ala Ile
 420 425 430

 Ile Arg Ala
 435
 <210> 80
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> Brachypodium distachyon
 <400> 80
 Met Pro Pro Arg Pro Ser Leu Gln Ser Leu Leu Leu Met Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Ala Ala Gly Gly Ser Gly Leu Leu Leu Ala Ala Arg Arg
 20 25 30
 Arg Arg Phe Pro Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Gly Ala His Arg Ile
 35 40 45
 Arg Leu Leu His Ser Phe Ser Ala Gly Thr Arg Leu Pro Arg Arg Pro

 50 55 60
 Glu Leu Val Cys Cys Phe Gly Thr Thr Pro Val Ala Ala Pro Val Ala
 65 70 75 80

Asp Pro Val Val Pro Gln Pro Arg Asn Val Arg Ser Lys Glu Asp Lys
 85 90 95
 Lys Ala Cys Glu Glu Arg Ile Gly Ile Leu Val Glu Lys Met Lys Lys
 100 105 110
 Glu Gly Ile Asn Ser Glu Arg Trp Lys Leu Asp Ile Tyr Asp Lys Leu
 115 120 125
 Leu Cys Pro Val Cys Asn Gly Gly Ser Thr Glu Glu Arg Ser Leu Ser
 130 135 140
 Val Phe Ile Arg Gln Asp Gly Leu Ser Ala Ser Trp Lys Cys Phe Arg
 145 150 155 160
 Ala Thr Cys Gly Trp Lys Gly Ser Ala Lys Pro Asp Gly Val Ser Glu
 165 170 175
 Val Ser Gln Ala Lys Tyr Val Arg Gly Lys Glu Asn Asn Gln Val Val
 180 185 190
 Lys Ala Asn Gln Ala Val Lys Val Tyr Arg Lys Leu His Glu Glu Asp
 195 200 205
 Leu Pro Leu Glu Pro Leu Cys Asp Glu Leu Val Thr Tyr Phe Ser Glu
 210 215 220
 Arg Met Ile Ser Ala Gly Thr Leu Gln Arg Asn Asn Val Met Gln Arg
 225 230 235 240
 Lys Trp Asn Lys Lys Ile Val Ile Ala Phe Thr Tyr Lys Arg Gly Lys
 245 250 255
 Val Leu Val Gly Cys Lys Tyr Arg Glu Val Asn Lys Lys Phe Ser Gln
 260 265 270
 Glu Pro Asn Thr Glu Lys Ile Leu Tyr Gly Leu Asp Asp Ile Lys Gln
 275 280 285
 Ala Arg Asp Val Ile Ile Val Glu Gly Glu Ile Asp Lys Leu Ser Met
 290 295 300
 Glu Glu Ala Gly Tyr Arg Asn Cys Val Ser Val Pro Asp Gly Ala Pro
 305 310 315 320
 Ser Gln Val Ser Asn Lys Leu Pro Asp Lys Asp Glu Asp Lys Lys Tyr

325 330 335
 Gln Tyr Leu Trp Asn Cys Lys Glu Tyr Leu Asp Lys Ala Ser Arg Ile
 340 345 350
 Ile Leu Ala Thr Asp Ala Asp Pro Pro Gly Gln Ala Leu Ala Glu Glu
 355 360 365
 Leu Ala Arg Arg Leu Gly Lys Glu Arg Cys Trp Arg Val Ile Trp Pro

 370 375 380
 Lys Lys Asn Glu Thr Asp Ile Cys Lys Asp Ala Asn Glu Val Leu Met
 385 390 395 400
 Phe Leu Gly Thr Gln Ala Leu Lys Lys Val Ile Glu Gly Ala Glu Leu
 405 410 415
 Tyr Pro Ile Arg Gly Leu Phe Asn Phe Lys Asp Phe Phe Pro Asp Ile
 420 425 430
 Asp Asn Tyr Tyr Leu Gly Ile Arg Gly Asp Glu Leu Gly Ile Pro Thr

 435 440 445
 Gly Trp Lys Cys Met Asp Glu Leu Tyr Lys Val Val Pro Gly Glu Leu
 450 455 460
 Thr Ile Val Thr Gly Val Pro Asn Ser Gly Lys Ser Glu Trp Ile Asp
 465 470 475 480
 Ala Leu Leu Cys Asn Ile Asn Asp Gln Cys Gly Trp Lys Phe Val Leu
 485 490 495
 Cys Ser Met Glu Asn Lys Val Arg Asp His Ala Arg Lys Leu Leu Glu

 500 505 510
 Lys His Ile Lys Lys Pro Phe Phe Gly Ala Arg Tyr Gly Gly Ser Val
 515 520 525
 Glu Arg Met Ser Pro Asp Glu Phe Glu Glu Gly Lys Gln Trp Leu Asn
 530 535 540
 Glu Thr Phe His Leu Ile Arg Cys Asp Asp Asp Cys Leu Pro Ser Ile
 545 550 555 560
 Asp Trp Val Leu Asn Leu Ala Lys Ala Ala Val Leu Arg His Gly Val

 565 570 575

Arg Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Asn Glu Leu Asp His Gln Arg Pro
580 585 590
Ser Asn Gln Thr Glu Thr Glu Tyr Val Ser Gln Ile Leu Thr Lys Ile
595 600 605
Lys Arg Phe Ala Gln His His Ser Cys His Val Trp Phe Val Ala His
610 615 620
Pro Lys Gln Leu Gln Asn Trp Asn Gly Ala Pro Pro Asn Met Tyr Asp

625 630 635 640
Ile Ser Gly Ser Ala His Phe Ile Asn Lys Cys Asp Asn Gly Ile Val
645 650 655
Ile His Arg Asn Arg Asp Pro Asp Ala Gly Pro Ile Asp Val Val Gln
660 665 670
Val Ser Met Lys Lys Val Arg Asn Lys Val Ile Gly Thr Ile Gly Asp
675 680 685
Ala Phe Leu Thr Tyr Asp Arg Val Thr Gly Glu Tyr Lys Asp Ala Asp

690 695 700
Lys Glu Ile Val Ala Lys Val Val Lys Gln Gln Ser Lys Lys Thr Ala
705 710 715 720
Ile Arg Arg

<210> 81

<211> 2824

<212> DNA

<213> Brachypodium distachyon

<400> 81

aaaatcctct gcttcctcgt cgcctctcct ctttcttctt cgcgaagacc cccaaaacga	60
agccccacct cctcctctc cgttccatgc cccgtcccc gccctgaagc cctaggcccc	120
ccgtctctcgt gatgccaccg cggcgtctc tccaatcgct cctcctcatg gcggcctcct	180
ccacctccgc cgcggggggc tccggcctcc tctcgcgcgc gcgcgcgcgc cgcttccccg	240
ccgcctccgc tgcgcgcgcg ggggcccacc gcattccgctt gctgcactcc ttctccgcgc	300
ggaccgcct gccaggcgg cccgagctgg tctgtgctt cggaaccacc ccagtggcgg	360
cgccagtcgc cgaccagtg gttccgcaac cgaggaatgt tcgttcgaag gaggacaaga	420

aggcttgtga agaacgcata gggatactag ttgagaagat gaaaaaagaa ggaataaatt 480
cggagcgtat gaagcttgac atttatgaca agctgctttg cccagtgtgc aatgggggat 540
caactgagga gcgaagcctc agtgtcttca tccgacagga tggcttaagt gcatcatgga 600

aatgttttag ggcgacttgt ggttggaaag gcagtgccaa gcccgatgga gtttccgaag 660
tctcccaagc aaaaatgtgc agaggaaaag aaaacaatca ggttgtcaaa gctaatacagg 720
cagtcaaggt ttacaggaag cttcatgagg aggacctccc tcttgagcca ctttgcatg 780
agctcgtaac atacttttct gaaagaatga tatcggcagg aacacttcaa aggaacaatg 840
taatgcaacg taaatggaat aaaaagatag ttattgcttt cacctataaa cgtggtaaa 900
tccttggttg ctgcaaatac aggggaagtca ataagaaatt ttcacaggag ccgaacacag 960
agaaaatttt gtatggtctg gacgatataa agcaagcacg tgatgttatc attgttgagg 1020

gtgaaattga taaactttcc atggaggagg ctggctatcg taactgtgtg agtgtgccag 1080
atggtgcacc atcgcaagta tccaacaaac tcccagacaa agatgaggat aagaagtatc 1140
aatactgtg gaactgcaaa gaatatcttg acaaggcatc taggataata ctggcaacag 1200
atgctgatcc tccaggcgag gctcttgctg aggaacttgc tcgtcggtt ggtaaagaaa 1260
ggtgttgag ggtcatctgg ccaaagaaga acgagacaga tatttgcaaa gatgcaaatg 1320
aggtactgat gtttttaggg acacaggcat tgaagaaagg tatagaagg gcagaactgt 1380
atcctataag aggtcttttc aacttcaaag atttcttccc tgacattgat aattattatc 1440

ttggaatccg cggggatgag cttgttattc ctactggttg gaaatgtatg gatgagctat 1500
acaaggttgt tcttggggag ttgactatag taactggagt cccaaattct ggcaaaagt 1560
agtggattga tgcatattg tgcaatataa acgatcagtg tgggtggaaa tttgtactat 1620
gctcaatgga gaacaaggc agagaccatg ctaggagct attggagaag cacattaaga 1680
aaccattctt tgggtgcaaa tatgggggtt ccgtggagcg gatgagtcca gatgagtttg 1740
aagaaggcaa gcaatggta aacgagacat tccatctgat tcggtgtgat gatgattgcc 1800
ttccatccat tgactgggtt cttaatcttg caaaagctgc agttctaaga catggagtgc 1860

gcggtcttgt gattgatcct tataatgaac ttgacatca acgcccctca aatcaaaccg 1920
agacagaata tgcagccag atactacca aaattaagcg ctttgctcag catcattcat 1980
gtcacgtttg gtttgttgc caccctaagc agcttcaaaa ctggaatggt gcaccgccta 2040
atatgtatga catcagtga agtgcacatt tcatcaaca atgtgataat gggattgtca 2100
tccaccgaaa cagggatcca gatgctggtc ctattgatgt cgtgcaggtt tctatgaaga 2160
aggtgcggaa caaagtgata gggacaatag gggatgcttt cttgacatat gaccgggtta 2220

ctggtgaata caaggatgcc gataaagaaa ttgtggcaaa ggtcgtcaag cagcagtcaa 2280

agaagacggc gattcgacgc tgatttgctt tactatctcc ctggatagtt aacaaacacg 2340

agatgatatg gttgcttcta tggcatgtcg cagtttgctg tatgatcagc actattggcg 2400

gagatggtcg tacattgtag ctgactgctg cctaattctt cagcaacatc gtcctcctga 2460

acggtatgca cgccttcagg tgtctcccag actcgtggtc aaaatgtggt ttgaaggcta 2520

accttgctaa gataggcaca tgacattgct tggttgtgac gtatagcagt aagcttatat 2580

tgtaatat taatcgtgc accagctggg tcatgtcagc agcaaaaagc tcataatc 2640

cttaggttat ttgtatgcc ctccaacgg ttgtagcagt tggaagtcca tcaattagca 2700

gtccatcaga aatattctatt ccagattcaa gtattcatac cagaattctg gaacctagt 2760

ctttcttttt tgttctacca ccacacacat gcaatgcaat ccatcggcca tgtggtaga 2820

gcaa 2824

<210> 82

<211> 761

<212> PRT

<213> Sorghum bicolor

<400> 82

Met Pro Pro Arg Pro Ser Leu His Ser Leu Leu Leu Met Ala Ala Ser

1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Ala Ala Ala Ala Gly Gly Asp Ser Gly Leu Leu Leu

20 25 30

Ala Ala Arg Arg Arg Leu Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Gly His Arg

35 40 45

Ile Arg Leu Leu His Ser Phe Ser Pro Gly Arg Val Pro Arg Arg Pro

50 55 60

Glu Val Ala Cys Cys Val Arg Gly Ala Pro Asp Ala Arg Arg Ser Ala

65 70 75 80

Pro Ala Pro Thr Pro Leu Arg Ser Arg Asn Val His Ser Ala Asn Asn

85 90 95

Tyr Ala Ala Ala Ser Glu Glu Arg Leu Gly Gln Leu Ile Gln Lys Leu

100 105 110

Lys Asn Glu Gly Ile Asn Pro Lys Gln Trp Arg Leu Gly Asn Phe Gln

115	120	125	
Arg Met Leu Cys Pro Gln Cys Asn Gly Gly Ser Ser Glu Glu Leu Ser			
130	135	140	
Leu Ser Val Tyr Ile Arg Lys Asp Gly Met Asn Ala Thr Trp Asn Cys			
145	150	155	160
Phe Arg Ser Lys Cys Gly Trp Arg Gly Phe Ile Gln Ala Asp Gly Val			
165	170	175	
Thr Asn Ile Ser Gln Gly Lys Thr Asp Ile Glu Ser Glu Thr Asp Gln			
180	185	190	
Glu Val Glu Ser Lys Lys Thr Ala Asn Lys Val Tyr Arg Lys Val Ile			
195	200	205	
Glu Glu Asp Leu Asn Leu Glu Pro Leu Cys Asp Glu Leu Val Glu Tyr			
210	215	220	
Phe Ser Thr Arg Met Ile Ser Ala Glu Thr Leu Arg Arg Asn Lys Val			
225	230	235	240
Met Gln Arg Asn Trp Asn Asn Lys Ile Ser Ile Ala Phe Thr Tyr Arg			
245	250	255	
Arg Asp Gly Val Leu Val Gly Cys Lys Tyr Arg Ala Val Asp Lys Thr			
260	265	270	
Phe Ser Gln Glu Pro Asn Thr Glu Lys Ile Phe Tyr Gly Leu Asp Asp			
275	280	285	
Ile Lys Arg Ala His Asp Val Ile Ile Val Glu Gly Glu Ile Asp Lys			
290	295	300	
Leu Ser Met Asp Glu Ala Gly Tyr Arg Asn Cys Val Ser Val Pro Asp			
305	310	315	320
Gly Ala Pro Pro Lys Val Ser Ser Lys Ile Pro Asp Lys Glu Gln Asp			
325	330	335	
Lys Lys Tyr Asn Tyr Leu Trp Asn Cys Lys Asp Tyr Leu Asp Ser Ala			
340	345	350	
Ser Arg Ile Ile Leu Ala Thr Asp Asp Asp Gly Pro Gly Gln Ala Leu			
355	360	365	

Ala Glu Glu Leu Ala Arg Arg Leu Gly Lys Glu Arg Cys Trp Arg Val
370 375 380

Lys Trp Pro Lys Lys Asn Asp Thr Asp Thr Cys Lys Asp Ala Asn Glu
385 390 395 400

Val Leu Met Phe Leu Gly Pro Gln Ala Leu Arg Lys Val Ile Glu Asp
405 410 415

Ala Glu Leu Tyr Pro Ile Arg Gly Leu Phe Ser Phe Lys Asp Phe Phe
420 425 430

Pro Glu Ile Asp Asn Tyr Phe Leu Gly Ile His Gly Asp Glu Leu Gly
435 440 445

Ile His Thr Gly Trp Lys Ser Leu Asp Asp Leu Tyr Lys Val Val Pro
450 455 460

Gly Glu Leu Thr Val Val Thr Gly Val Pro Asn Ser Gly Lys Ser Glu
465 470 475 480

Trp Ile Asp Ala Leu Leu Cys Asn Ile Asn Thr Gln Cys Gly Trp Lys
485 490 495

Phe Val Leu Cys Ser Met Glu Asn Lys Val Lys Glu His Ala Arg Lys
500 505 510

Leu Leu Glu Lys Arg Ile Gly Lys Pro Phe Phe Asp Ala Arg Tyr Gly
515 520 525

Gly Asp Ala Gln Arg Met Thr Pro Asp Asp Phe Glu Ala Gly Lys Glu
530 535 540

Trp Leu Asn Glu Thr Phe His Leu Ile Arg Cys Glu Asp Asp Ser Leu
545 550 555 560

Pro Ser Ile Asn Trp Val Leu Asp Leu Ala Lys Ala Ala Val Leu Arg
565 570 575

His Gly Val Arg Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Asn Glu Leu Asp His
580 585 590

Gln Arg Pro Ser Asn Gln Thr Glu Thr Glu Tyr Val Ser Gln Ile Leu
595 600 605

Thr Lys Val Lys Arg Phe Ala Gln His His Ser Cys His Val Trp Phe

610 615 620
Val Ala His Pro Arg Gln Leu His Asn Trp Asn Gly Gly Pro Pro Asn
625 630 635 640
Met Tyr Asp Ile Ser Gly Ser Ala His Phe Ile Asn Lys Cys Asp Asn
645 650 655
Gly Ile Val Ile His Arg Asn Arg Asp Gln Asn Ala Gly Pro Leu Asp
660 665 670

Val Val Gln Val Cys Val Arg Lys Val Arg Asn Lys Val Ile Gly Gln
675 680 685
Ile Gly Asp Ala Phe Leu Thr Tyr Asp Arg Val Thr Gly Gln Tyr Lys
690 695 700
Asp Ala Gly Lys Ser Thr Ile Ala Ala Val Thr Ala Val Gln Asn Arg
705 710 715 720
Gln Asn Ser Tyr Ala Lys Ser Lys Lys Asp Asn Val Ala Tyr Glu Met
725 730 735

Pro Phe Pro His Pro Val Glu Asp Asp Ser Val Ser Ala Glu Asp Asp
740 745 750
Gly Asn Ser Phe Gly Leu Asn Ser Ala
755 760

<210> 83

<211> 3035

<212> DNA

<213> Sorghum bicolor

<400> 83

ctatctcttc cgtccgccc ctctttcttc ttcaccaagg cccccacccc ccaaacggcc 60
aaacccctct tctcccttg ctccgctccg gccggcccat gcgcccgcgc ccctgaccaa 120
ccaggctgcc ggaaccctac ccggcgccgc gtgatgcccc cgcggccgtc tctccactcg 180

ctgctcctca tggccgctc cgcctcgtcg tccgccgccg cggccggcgg ggactcgggc 240
ctctctctcg ccgcgcgccg ccgcctcgcg gcgacggccg ccgcgggagg acaccgcatc 300
cgctctctc actcgttctc gccgggacgc gtccccaggc ggcccagagt ggctgctgc 360
gtgcgcggcg caccggacgc gcggcggtcg gcgcccgcgc cactccct gcgtcaagg 420
aacgttcatt cagcaaaca ctatgcagct gcttctgagg agagacttgg gcagtcatt 480

cagaagtga aaaatgaagg tattaatccc aagcagtga gacttgaaa tttccagcgc 540
atgttgtgcc cacagtgcaa tgggtggatct agcgaggagt tgagtctcag tgtctacatc 600

cgaaaggacg gtatgaatgc aacatggaac tgttttagat ctaaatgtgg ctggagaggt 660
tttatccagg ctgatggagt taccaacata tccaaggaa agactgacat agaaagtga 720
actgaccaag aggttgaatc taagaagacg gcaataaagg tatacagaaa agtcattgaa 780
gaggacctca atcttgagcc actttgcgac gagctttag aatacttctc tacgagaatg 840
atttcagcgg aaacacttcg aaggaataaa gtaatgcaac gtaactggaa taataagata 900
tccattgctt ttacctatag acgtgatgga gttcttgttg gctgcaaata cagggcagtc 960
gataagacat tttcacagga gccaaacacg gagaaaattt tttatggtct ggatgatata 1020

aagcgtgcac atgatgttat cattgtggag ggtgaaattg ataagctgtc catggatgaa 1080
gctgggtatc gtaatttgtt cagtgtgcca gatggtgcac cacccaaagt gtccagtaaa 1140
atcccagaca aagaacagga taagaagtat aactatcttt ggaactgcaa agactatctt 1200
gattcggcat caaggataat attagcaact gatgatgatg gtccaggtca ggctctggcc 1260
gaggaacttg ctctcgact tggtaagaa agatgttga gagtcaagtg gccaaagaag 1320
aatgatacag atacttgtaa ggatgcaaat gaggtactga tgttttagg tccacaagca 1380
ttaagaaagg ttatagaaga tgcagaactg tatccaataa gaggcctttt ttcattcaaa 1440

gatttcttcc cagagattga taattacttt ctggaatac atggtgatga gcttggattt 1500
catactggat ggaaatcttt ggatgatctt tacaagttg ttcctgggga attgactgta 1560
gtaactggag taccgaattc tggtaagagc gagtggatag atgctttatt atgcaatata 1620
aacacacaat gtgggtggaa atttgttctg tgctcgatgg aaaacaaggt aaaggagcat 1680
gctagaaaac tcttagagaa gcgcattgga aaaccattct ttgatgctag gtatggtggg 1740
gatgcgcagc ggatgactcc tgatgatatt gaagcaggaa aagaatggtt aaatgaaact 1800
ttccatctta tccggtgtga agatgatagc ctccatcta ttaattgggt tcttgacctt 1860

gcaaaagctg cagtcttaag acatggagtg cgtggtcttg tgattgatcc ttataatgaa 1920
cttgaccatc agcgccctc aaaccagaca gaaacagaat acgtcagcca gattcttacc 1980
aaggttaagc gctttgctca gcaccattca tgcattgat ggtttgttgc gcatcctaga 2040
cagcttcata actggaatgg aggccacct aatatgtatg acataagtgg aagcgcatat 2100
ttcataaaca aatgtgataa tggaattgtc atccacagaa acagggatca aaatgctggc 2160
ccccttgatg ttgtgcaggt ttgtgtgagg aaggtgcgga ataaagtgat tggacaaata 2220

ggagatgctt tcttgacata tgaccgggtt actggtcaat ataaagatgc tggtaaattcc 2280

actatagcag ccgtaacagc agtgcaaaat cggcaaaaca gttatgcaa gagtaaaaag 2340

gacaatgtgg catatgagat gccatttcca catctgttg aagacgactc agtttctgct 2400

gaagacgatg ggaatagttt tgggtctgaac agtgcataag aaagacatgt tctgctgat 2460

ttgctgtact cttgtatcaa tcaacgcaag tgagattaca cgattgtttc tggggatggc 2520

ctgttggagc tcaggtagtc ctcatgtatg aactggattg gaaaccccag gtttctctg 2580

attctgtctg caaatgaggt tcaaagctaa aacttagatg cacacaagac atttgcgggg 2640

tgggtatag cagtaagctt atgtagatta attgccacac caggtgctat cctatgaaca 2700

tttgggtggg ttatatcagt agctaaactt tagtgctagg gtagtaaggt taatcatgca 2760

ggcctttgcc aaaaaaaag tagcatttgg aagggttttt ctgttcacac ttctccacac 2820

ctgacgagga acctactatg tctttaatgt gccccagccg cgaattcagg tgttcgtttg 2880

acacatgcaa agcaatctac cgaccatgtg ccgagcattt tagattgggg accgtctccg 2940

tcaatctgtt ttgtaacagg agccgcgtg ctgtgctgtg cagctggaac aattagcatg 3000

aatgaatgca tcctaaatct cagatcattt gcacc 3035

<210> 84

<211> 736

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 84

Met Pro Pro Arg Pro Ser Leu His Ser Leu Leu Leu Met Ala Ala Ser

1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ser Gly Asp Ser Gly Pro Leu Leu Ala Ala Arg Arg

20 25 30

Arg Leu Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Gly His Arg Ile Arg Leu Leu

35 40 45

His Ser Phe Ser Pro Gly Arg Val Pro Arg Arg Pro Glu Val Val Cys

50 55 60

Cys Val Arg Ser Ala Pro Asp Ser Arg Arg Ser Ala Pro Ala Pro Pro

65 70 75 80

Cys Ser Arg Asn Val Leu Ser Ala Lys Asn Tyr Ser Thr Ala Ser Glu

85 90 95

Glu Arg Leu Gly Lys Ile Ile Gln Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ile Asn
 100 105 110
 Pro Lys Gln Trp Arg Leu Gly Asn Phe Gln Arg Met Leu Cys Pro Gln
 115 120 125

 Cys Asn Gly Gly Ser Ser Glu Glu Leu Ser Leu Ser Val Tyr Ile Arg
 130 135 140
 Lys Asp Gly Ile Asn Ala Thr Trp Asn Cys Phe Arg Ser Lys Cys Gly
 145 150 155 160
 Trp Arg Gly Phe Val Gln Ala Asp Gly Val Thr Asn Ile Ser Gln Gly
 165 170 175
 Lys Ser Gly Ile Glu Ser Glu Thr Asp Gln Glu Val Glu Ala Lys Lys
 180 185 190

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

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

 Ser Ser Lys Ile Pro Asp Gln Glu Gln Asp Lys Lys Tyr Ser Tyr Leu
 325 330 335
 Trp Asn Cys Lys Asp Tyr Leu Asp Ser Ala Ser Arg Ile Ile Leu Ala

340 345 350
 Thr Asp Asn Asp Arg Pro Gly Gln Ala Leu Ala Glu Glu Leu Ala Arg
 355 360 365
 Arg Leu Gly Lys Glu Arg Cys Trp Arg Val Asn Trp Pro Lys Lys Asn
 370 375 380

 Asp Thr Asp Thr Cys Lys Asp Ala Asn Glu Val Leu Met Phe Leu Gly
 385 390 395 400
 Pro Gln Ala Leu Arg Lys Val Ile Glu Asp Ala Glu Leu Tyr Pro Ile
 405 410 415
 Arg Gly Leu Phe Ser Phe Glu Gln Phe Phe Pro Glu Ile Asp Asn Tyr
 420 425 430
 Phe Leu Gly Ile His Gly Asp Glu Leu Gly Ile His Thr Gly Trp Lys
 435 440 445

 Ser Met Asp Asp Leu Tyr Lys Val Val Pro Gly Glu Leu Thr Val Val
 450 455 460
 Thr Gly Val Pro Asn Ser Gly Lys Ser Glu Trp Ile Asp Ala Leu Leu
 465 470 475 480
 Cys Asn Ile Asn Lys Gln Ser Gly Trp Lys Phe Val Leu Cys Ser Met
 485 490 495
 Glu Asn Lys Val Lys Glu His Ala Arg Lys Leu Leu Glu Lys His Ile
 500 505 510

 Gln Lys Pro Phe Phe Asn Ala Arg Tyr Gly Gly Ser Ala Gln Arg Met
 515 520 525
 Thr Pro Asp Glu Phe Glu Ala Gly Lys Gln Trp Leu Asn Lys Thr Phe
 530 535 540
 His Leu Ile Arg Cys Glu Asp Asp Ser Leu Pro Ser Ile Asn Trp Val
 545 550 555 560
 Leu Asp Leu Ala Lys Ala Ala Val Leu Arg His Gly Val Arg Gly Leu
 565 570 575

 Val Ile Asp Pro Tyr Asn Glu Leu Asp His Gln Arg Pro Ser Asn Gln
 580 585 590

Thr Glu Thr Glu Tyr Val Ser Gln Ile Leu Thr Lys Ile Lys Arg Phe
595 600 605

Ala Gln His His Ser Cys His Val Trp Phe Val Ala His Pro Arg Gln
610 615 620

Leu Gln Asn Trp Asn Gly Gly Pro Pro Asn Ile Tyr Asp Ile Ser Gly
625 630 635 640

Ser Ala His Phe Ile Asn Lys Cys Asp Asn Gly Ile Val Ile His Arg
645 650 655

Asn Arg Asp Pro Asn Ala Gly Pro Leu Asp Thr Val Gln Val Cys Val
660 665 670

Arg Lys Val Arg Asn Lys Val Val Gly Gln Ile Gly Asp Ala Phe Leu
675 680 685

Thr Tyr Asp Arg Val Thr Gly Glu Phe Lys Asp Ala Gly Lys Ala Thr
690 695 700

Thr Ala Pro Ser Ala Lys Ala Ala Lys Gln Ser Arg Lys Glu Ala Tyr
705 710 715 720

Lys Met Pro Phe Gln His Ala Ala Glu Asp Gly Glu Asn Ser Gly Leu
725 730 735

<210> 85

<211> 2809

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 85

caatctatct tccccgccc cgctctctcc ttctctcttt accaagcccc ccacacccaa 60

accctctctc cctgctctg cctgccccat gtccccgcgc ctctgaccaa ccaggtctgc 120

ggaaccttac ccggtgcccc gtgatgcccc cgcggccgtc gctccactct ctgctctca 180

tggccgcctc cgccgccgcg gccagcgggg actcgggccc gctcctcgt gcgcgccgcc 240

gtctagctgc gacggccgcc gcaggggggc accgcatccg gctgctccac tccttctcgc 300

cgggacgcgt cccagggcgg cctgaggtgg tctgctgcgt gcgcagcgcc cccgactcgc 360

ggcggtcggc ccccgcccc ccgtgctcca ggaacgttct ttcggcaaaa aactactcaa 420

ctgcttctga ggagaggttt gggaagatca ttcagaagtt gaaaaacgaa ggtattaatc 480

ccaagcagtg gagacttggg aattttcagc gcattgtgtg tccacagtgc aatggtggat 540

ctagtgagga attgagtctc agtgtctaca tccgaaagga tggcataaat gcaacatgga 600

actgttttag gtctaagtggt ggctggagag gttttgtcca ggctgatgga gttaccaaca 660

tatcccaagg aaagagtggc atagaaagtg aaactgacca agaggttgaa gctaagaagg 720

cagcaataa ggtttataga aaaatcagtg acgaggacct caatcttgag ccactctgtg 780

atgagcttgt agagtacttt gctacgagaa tgatttcggc ggaaacactt cggaggaata 840

aagtcattga acgtaactgg aataataaga tatccattgc ttttacctat agacgtgatg 900

gagctcttgt tggctgcaaa tacagggcag tcgataagac attttcacag gaggcaaaaa 960

cggagaaaaat tttttatggt ctggacgata taaagcgtgc acatgatgtt atcattgttg 1020

agggtgaaat tgataagctg tccatggatg aagctggtta tcgtaattgt gtcagtgtgc 1080

cagatggatg accacccaaa gtgtccagta agattccaga ccaagaacag gataagaagt 1140

atagctatct ttggaactgc aaagactatc ttgactcggc atctaggata atattagcaa 1200

ccgataatga tcgtccaggt caggctctgg ctgaggaact tgctcgtcgg cttggtaaag 1260

aaagatgttg gagagtcaat tggccgaaga agaatagata agatacttgc aaagatgcaa 1320

atgaggttct aatgttttta ggtccacaag cattgagaaa gggttatagaa gatgcagaac 1380

tgtatcctat aagaggcctt ttttcattcg aacagtctt cccagagatt gacaattact 1440

ttcttggaa acatggtgat gagcttggta ttcatactgg atggaaatct atggatgatc 1500

tttacaaggt tgttcctggt gaattgactg ttgttactgg agtaccaaat tctggtaaaa 1560

gcgagtggat agatgcttta ttgtgcaata taaacaaaca atctgggtgg aaatttgttc 1620

tgtgctcaat ggaaaacaag gtaaaggagc atgctaggaa actcttagag aagcacattc 1680

agaagccatt cttaaatgct aggtatgggt ggctctgaca gcggatgact cctgatgaat 1740

ttgaagcagg aaaacaatgg ttaaataaaa ctttccatct tatccggtgt gaagatgata 1800

gccttccatc tattaattgg gttcttgacc ttgcgaaagc tgcagttcta agacatggag 1860

tgcgtggtct ggtgatagat ccttataatg aacttgacca tcagcgcccc tcaaaccaga 1920

cggaaacaga atatgtcagc cagattctga ccaagattaa gcgctttgct cagcaccatt 1980

catgtcatgt atggtttgtt gcacatccia gacagcttca aaactggaat ggaggccac 2040

caaatatata cgacataagt ggaagcgac attttataaa caaatgtgat aatggaattg 2100

tcattccacag aaacaggagc ccaaatgctg gccccctga taccgtgcag gtttgtgtga 2160

ggaaggtgca gaataaagtg gttgggcaaa taggagatgc tttctgaca tatgaccggg 2220

ttactggtga attcaaggat gctggttaagg ccactacagc acccagtga aaagcgga 2280

aacagtcacg caaagaggca tataagatgc catttcaaca tgctgctgaa gacgggtgaga 2340
atagtggctct gtgactgcat aagaaagaca tgttcctgct gatttgatgt atctgtatca 2400
ttcaacgaaa gtgagatttc acgattgttt ctggggatgg cctgctggag ctcaggcagt 2460
acctcattga acigggatttg aaacccagg atttcaccga ttctgctgc aaatgaagtt 2520
gaaagctaaa cttgctcaga tgcgcacaag acattggcgg ggtggtgtat agtagtaaga 2580
ttaatgtaaa tcaattgcc aaccagggtgc taatctatga acattgggt gggttatatc 2640
agtagctaaa ctttagcagc taaggtagta cgattaatca tgcaggcttt cccaaaaaat 2700

tgtagcagtt ggaagggttt ttatgttcac cttctcaac gcctgaccag gaaccaatgc 2760
ctttaatgtg gccgtatattt ttaaaaaaga tgcctttaat gtgacccaa 2809

<210> 86

<211> 726

<212> PRT

<213> Aegilops tauschii

<400> 86

Met Pro Pro Arg Pro Ser Leu Gln Ser Leu Leu Leu Met Ala Ala Ser

1 5 10 15

Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gly Ser Gly Leu Leu Leu Ala Ala Arg Arg

20 25 30

Arg Phe Pro Ala Ala Phe Ala Ala Ala Gly Gly His Arg Val Gly Leu

35 40 45

Leu His Ser Phe Pro Ser Arg Thr Arg Leu Pro Arg Arg Pro Glu Leu

50 55 60

Ala Cys Cys Phe Gly Thr Ala Pro Ala Glu Ala Val Pro Ala Ala Ala

65 70 75 80

Pro Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asn Val Arg Ser Met Glu Glu Arg Arg

85 90 95

Ala Cys Glu Glu Arg Leu Gly Gln Val Val Glu Lys Met Lys Lys Glu

100 105 110

Gly Ile Asp Met Ser Gln Trp Arg Leu Gly Thr Phe Gln Arg Thr Ile

115 120 125

Cys Pro Gln Cys Glu Gly Gly Ser Thr Glu Glu Arg Ser Leu Ser Val

130 135 140

Phe Ile Arg Glu Asp Gly Thr His Gly Asn Trp Thr Cys Phe Arg Ala
 145 150 155 160
 Asn Cys Gly Trp Lys Gly Tyr Thr Gln Pro Asp Gly Val Pro Lys Ala

 165 170 175
 Tyr Gln Ala Lys Lys Asp Ser Gly Asn Glu Asn Glu Ser Asp Gln Glu
 180 185 190
 Val Lys Ala Asn Gln Pro Val Lys Val Ile Arg Lys Leu Arg Glu Glu
 195 200 205
 Asp Leu Arg Leu Glu Pro Leu Cys Asp Glu Leu Val Thr Tyr Phe Ser
 210 215 220
 Glu Arg Met Ile Ser Ala Lys Thr Leu Arg Arg Asn Asn Val Ser Gln

 225 230 235 240
 Arg Lys Arg Asn Asn Lys Ile Val Ile Ala Phe Thr Tyr Arg Arg Asp
 245 250 255
 Lys Val Leu Val Gly Cys Lys Tyr Arg Glu Val Ser Lys Lys Phe Ser
 260 265 270
 Gln Glu Ala Asn Thr Glu Lys Ile Leu Tyr Gly Leu Asp Asp Ile Lys
 275 280 285
 Gln Ala Arg Asp Ile Ile Ile Val Glu Gly Glu Ile Asp Lys Leu Ser

 290 295 300
 Met Glu Glu Ala Gly Tyr Cys Asn Cys Val Ser Val Pro Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 Pro Ala Gln Val Ser Asn Lys Leu Pro Asp Lys Asp His Asp Lys Lys
 325 330 335
 Tyr Ser Tyr Leu Trp Asn Cys Lys Glu Tyr Leu Asp Pro Ala Ser Arg
 340 345 350
 Ile Ile Leu Ala Thr Asp Ala Asp Pro Pro Gly Gln Ala Leu Ala Glu

 355 360 365
 Glu Leu Ala Arg Arg Leu Gly Lys Glu Arg Cys Trp Arg Val Lys Trp
 370 375 380
 Pro Lys Lys Asn Glu Thr Glu Phe Cys Lys Asp Ala Asn Glu Val Leu

385 390 395 400
 Met Phe Leu Gly Pro Arg Ala Leu Lys Glu Val Ile Glu Gly Ala Glu
 405 410 415
 Leu Tyr Pro Ile Arg Gly Leu Phe Asn Phe Lys Asp Phe Phe Pro Glu

 420 425 430
 Ile Asp Ser Tyr Tyr Leu Gly Ile His Gly Asp Glu Leu Gly Ile Pro
 435 440 445
 Thr Gly Trp Lys Cys Met Asp Gly Leu Tyr Lys Val Val Pro Gly Glu
 450 455 460
 Leu Thr Ile Val Thr Gly Val Pro Asn Ser Gly Lys Ser Glu Trp Ile
 465 470 475 480
 Asp Ala Leu Leu Cys Asn Ile Asn Asn Gln Cys Gly Trp Lys Phe Val

 485 490 495
 Leu Cys Ser Met Glu Asn Lys Val Arg Asp His Ala Arg Lys Leu Leu
 500 505 510
 Glu Lys His Ile Lys Lys Pro Phe Phe Asp Ala Arg Tyr Gly Gly Ser
 515 520 525
 Val Glu Arg Met Ser Lys Asp Glu Phe Glu Glu Gly Lys Glu Trp Leu
 530 535 540
 Asn Glu Ser Phe His Leu Ile Arg Cys Glu Asp Asp Cys Leu Pro Ser

 545 550 555 560
 Ile Asp Trp Val Leu Asn Leu Ala Lys Ala Ala Val Leu Arg His Gly
 565 570 575
 Val Arg Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Asn Glu Leu Asp His Gln Arg
 580 585 590
 Pro Pro Asn Gln Thr Glu Thr Glu Tyr Val Ser Gln Ile Leu Thr Lys
 595 600 605
 Ile Lys Arg Phe Ala Gln His His Ser Cys His Val Trp Phe Val Ala

 610 615 620
 His Pro Arg Gln Leu His Asn Trp Thr Gly Ala Pro Pro Asn Met Tyr
 625 630 635 640

Asp Ile Ser Gly Ser Ala His Phe Ile Asn Lys Cys Asp Asn Gly Ile

645 650 655

Val Ile His Arg Asn Arg Asp Pro Asp Ala Gly Pro Val Asp Val Val

660 665 670

Gln Val Cys Met Lys Lys Val Arg Asn Lys Val Ile Gly Gln Ile Gly

675 680 685

Asp Ala Phe Leu Thr Tyr Asp Arg Ile Thr Gly Glu Tyr Lys Glu Ala

690 695 700

Asp Glu Ala Ile Val Ala Lys Val Val Lys Gln Gln Ile Arg Gln Lys

705 710 715 720

Ser Thr Ser Tyr Gln Arg

725

<210> 87

<211> 2773

<212> DNA

<213> Aegilops tauschii

<400> 87

ccccccccc cccgcccgcc tccgccccgc catgccgccg cggccgtccc tccagtcgct 60

gctcctcatg gccgcctcca cctccgcggg cgcggggggc tggggcctcc tctcgcgcgc 120

gcgccgccgc ttccccgccg ctttcgccgc cgcggggggc caccgcgtcg gcctgctcca 180

ctccttcccc tcccgaccgc gcctccccgc gcggcccgag ctgcctgct gcttcgggac 240

cgccccgcc gagggcgtgc ccgccgccgc ccccgccacc ccgcgtcca ggaatgttcg 300

ttccatggag gagagaagg cttgtgaaga acgactaggg caggtagttg agaagatgaa 360

aaaggaagga atagatatga gccaatggag gcttggcact tttcaacgga cgatttgccc 420

acagtgcgaa gggggctcaa ctgaggaacg aagcctcagc gtattcatcc gggaagatgg 480

tacacatgga aactggactt gttttagagc gaattgtgga tggaaaggct ataccagcc 540

tgatggagtt ccgaaggcgt accaagcaaa gaaggactcg ggaaatgaaa atgaaagtga 600

ccaggaagtc aaagcaaatc agccagtcaa ggttatcaga aaacttcgtg aagaggacct 660

gcgtctcgag cctctttgtg atgagctcgt gacatacttt tcagaaagaa tgatatcggc 720

aaaaacactt agaaggaaca atgtatcgca acgtaaaagg aataacaaga tcgttattgc 780

tttacctat agacgtgata aagtccttgt tggctgcaaa tacaggaag tatctaagaa 840

attttcacag gaggcgaaca cagagaaaat ttgtacggt ctggatgata taaagcaagc	900
acgcgatatt atcattgttg aggggtgaaat tgataaactt tccatggagg aggctggcta	960
ttgtaattgt gtgagtgtgc cagatgggtgc accagcgcaa gtatcaaaca aactcccga	1020
caaagatcat gataaaaagt attcatatct gtggaactgc aaagagtatc ttgaccggc	1080
atctaggata atactggcaa cggatgctga tccatccaggg caggctcttg ctgaggaact	1140
tgctcgacgt cttggtaaag aaaggtgttg gaggggtcaaa tggccaaaga agaacgagac	1200
agaattttgc aaagatgcta acgaggtact tatgttctta ggaccacgag cattgaaaga	1260
ggttatagaa ggtgcagaac tgtatcctat aagaggtcta ttcaacttca aagatttctt	1320
ccctgagatc gatagttatt atctaggaat tcatggggat gagcttgaa ttcctactgg	1380
ttggaaatgt atggatgggc tctacaaggt tgttctggg gaattgacca tagtaacagg	1440
agtaccaaat tccggcaaaa gtgagtggat cgatgcatta ctgtgtaata taaacaatca	1500
gtgtggatgg aaattttgac tatgtctgat ggaaaacaag gtcagagacc atgcccgaa	1560
actattggag aagcacatta agaaaccttt ctttgatgct agatatggg gctctgtgga	1620
acggatgagt aaagatgaat ttgaagaagg caaagaatgg ttgaatgagt cattccatct	1680
gattaggtgt gaagatgatt gccttccatc catcgattgg gttcttaac ttgctaaagc	1740
cgcagttcta agacatggag tacgtggtct tgtgattgat ccttataac agcttgacca	1800
tcagcgcccc ccaaatcaaa ccgagacaga atatgtcagc cagatcctta cgaagattaa	1860
gcgttttgca caacatcatt catgtcatgt atggtttgtt gcgcacccta ggcagcttca	1920
caactggact ggcgcaccgc ctaatatgta cgacatcagt ggaagtgcgc atttcataaa	1980
caaatgtgat aatggatcgc tcataccgc aaacagggat ccagatgctg gccctgtgga	2040
tgtcgtcgag gtctgtatga agaaggttcg gaacaaagtg attgggcaaa taggggatgc	2100
tttcttgaca tacgaccgga ttactggtga atacaaggaa gccgatgagg ccattgtagc	2160
aaaggtgggtg aagcagcaga ttcgtcagaa atcgacaagt taccaacgt gatttacttt	2220
gctcgtcttc ccggacagtt gccacggtt agatattatg gccctcgctt ctgtggatgt	2280
cacagttgac agtttgccgt gtgatcgtgg cagattggct aacttgatcg ttcatgcatc	2340
tgagctgatt cctgggtgca aaaatgtgtt cgaaggtac taaccttact aagacggcca	2400
catggcattg ctggggtgtg gtgggtgtata gcaagctaga tcatattatt gtaattaatc	2460
gtcgcaccag gcggaggtcg tgtcagcagg gaaagctcat ctcaaccgt agtaggttat	2520
ttttgtatg cccttccgac ggtttagca gttggaagtc catgacactc acacgtaccg	2580

ttggcatcag ttgcatgca tcagcagaag cccatgattt gctcatcgga ggcccatgt 2640
 ttggaacctt cctaccaccc agcacatgcc atcgaccatg tggtagacaa atctatttgg 2700
 atctgagctg gaacgacaaa tgcttccaaa atctatgata attagatcat taaccagcat 2760
 ttttctttcc cgc 2773

<210> 88

<211> 748

<212> PRT

<213> Panicum hallii

<400> 88

Met Pro Pro Arg Pro Ser Leu His Ser Leu Leu Leu Met Ala Ala Ser

1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Gly Gly Asp Ser Gly Leu Leu Leu

20 25 30

Ala Ala Arg Arg Arg Leu Pro Ala Ala Ala Gly His Arg Ile Arg Leu

35 40 45

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

50 55 60

Cys Cys Val Arg Ser Asp Pro Asp Ala Arg Pro Ala Gly Pro Val Thr

65 70 75 80

Val Arg Ser Arg Asn Val His Ser Ala Asn Asn Tyr Lys Ala Thr Ser

85 90 95

Glu Gly Arg Leu Gly Gln Leu Val Gln Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ile

100 105 110

Asn Pro Lys Gln Trp Lys Leu Gly Asn Phe Gln Arg Met Met Cys Pro

115 120 125

Lys Cys Asn Gly Gly Ser Asn Glu Glu Leu Ser Leu Ser Val Tyr Ile

130 135 140

Arg Met Asp Gly Met Asn Ala Ser Trp Asn Cys Phe Arg Ser Thr Cys

145 150 155 160

Gly Trp Arg Gly Phe Ile Gln Pro Asp Gly Val Pro Lys Leu Ser Gln

165 170 175

Ala Lys Thr Gly Ile Lys Ser Glu Thr Asp Gln Glu Val Glu Pro Asn

180	185	190	
Lys Ala Ala Asn Lys Val Tyr Arg Lys Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn			
195	200	205	
Leu Glu Pro Leu Cys Asp Glu Leu Val Thr Tyr Phe Ser Glu Arg Arg			
210	215	220	
Ile Ser Ala Glu Thr Leu Arg Arg Asn Lys Val Met Gln Arg Lys Trp			
225	230	235	240
Lys Asn Lys Ile Ser Ile Ala Phe Thr Tyr Arg Arg Asp Gly Val Val			
245	250	255	
Val Gly Cys Lys Tyr Arg Glu Val Asp Lys Lys Phe Ser Gln Glu Ala			
260	265	270	
Asn Thr Glu Lys Ile Phe Tyr Gly Leu Asp Asp Ile Lys Arg Thr Gln			
275	280	285	
Asp Ile Ile Ile Val Glu Gly Glu Ile Asp Lys Leu Ser Met Asp Glu			
290	295	300	
Ala Gly Tyr Arg Asn Cys Val Ser Val Pro Asp Gly Ala Pro Pro Lys			
305	310	315	320
Val Ser Ser Lys Ile Pro Asp Arg Asp Gln Asp Lys Lys Tyr Gln Tyr			
325	330	335	
Leu Trp Asn Cys Lys Asp Tyr Leu Asp Ser Ala Ser Arg Ile Ile Leu			
340	345	350	
Ala Thr Asp Ala Asp Pro Pro Gly Gln Ala Leu Ala Glu Glu Leu Ala			
355	360	365	
Arg Arg Leu Gly Lys Glu Arg Cys Trp Arg Val Lys Trp Pro Lys Lys			
370	375	380	
Asn Glu Thr Asp Thr Cys Lys Asp Ala Asn Glu Val Leu Met Phe Leu			
385	390	395	400
Gly Pro Gln Ala Leu Arg Lys Val Ile Lys Asp Ala Glu Leu Tyr Pro			
405	410	415	
Ile Arg Gly Leu Phe Ala Phe Lys Asp Phe Phe Pro Glu Ile Asp Asn			
420	425	430	

Tyr Tyr Leu Gly Ile His Gly Asp Glu Leu Gly Ile Arg Thr Gly Trp
 435 440 445
 Lys Ser Met Asp Asp Leu Tyr Lys Val Val Pro Gly Glu Leu Thr Val
 450 455 460

 Val Thr Gly Val Pro Asn Ser Gly Lys Ser Glu Trp Ile Asp Ala Leu
 465 470 475 480
 Leu Cys Asn Ile Asn Lys Glu Cys Gly Trp Lys Phe Val Leu Cys Ser
 485 490 495
 Met Glu Asn Lys Val Arg Glu His Ala Arg Lys Leu Leu Glu Lys Arg
 500 505 510
 Ile Lys Lys Pro Phe Phe Asp Ala Arg Tyr Gly Ala Ser Ala Glu Arg
 515 520 525

 Met Thr Pro Asp Glu Phe Glu Ala Gly Lys Gln Trp Leu Asn Glu Thr
 530 535 540
 Phe His Leu Ile Arg Cys Glu Asp Asp Ser Leu Pro Ser Ile Asn Trp
 545 550 555 560
 Val Leu Asp Leu Ala Lys Ala Ala Val Leu Arg His Gly Val Arg Gly
 565 570 575
 Leu Val Ile Asp Pro Tyr Asn Glu Leu Asp His Gln Arg Pro Ser Asn
 580 585 590

 Gln Thr Glu Thr Glu Tyr Val Ser Gln Ile Leu Thr Lys Ile Lys Arg
 595 600 605
 Phe Ala Gln His His Ser Cys His Val Trp Phe Val Ala His Pro Arg
 610 615 620
 Gln Leu His Asn Trp Asn Gly Gly Pro Pro Asn Met Tyr Asp Ile Ser
 625 630 635 640
 Gly Ser Ala His Phe Ile Asn Lys Cys Asp Asn Gly Ile Val Ile His
 645 650 655

 Arg Asn Arg Asp Lys Asn Ala Gly Pro Leu Asp Val Val Gln Val Cys
 660 665 670
 Val Arg Lys Val Arg Asn Lys Val Ile Gly Gln Ile Gly Asp Ala Phe

675	680	685	
Leu Thr Tyr Asp Arg Val Thr Gly Gln Phe Lys Asp Ala Gly Lys Ala			
690	695	700	
Thr Ile Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Val Gln Lys Gln Lys Asn Ser			
705	710	715	720
Tyr Val Lys Ser Thr Lys Asp Asn Val Ala Tyr Glu Met Pro Leu Pro			
725	730	735	
His Val Glu Pro Ala Asp Ser Val Asp Gly Lys Gly			
740	745		
<210> 89			
<211> 2888			
<212> DNA			
<213> Panicum hallii			
<400> 89			
accccccttc cgcttgcgc cctctctcgc tccctctcgc ccccatgcgc ccccgcccc	60		
gcgcctgacc agcaagcaag gctgccgaga ccccccgtga tgccccgcgc gccgtccctc	120		
cactcgtgc tctcatggc cgctccgcc tctctctct cgcgcgcgcgc cggcggggac	180		
tcgggcctcc tctcgcgcgc gcgcgcgcgc ctccccgcgc cggcggggcca cgcctccgg	240		
ctgctccact ccttctcggg gccccgcgtc ccaggcgagg cgcaggtggc ctgctgcgtg	300		
cggagcgacc cggacgcgcgc gcccgcggga cccgtcaccg tgcgtccag gaacgttcat	360		
tcagcgaaca actacaaggc tacttctgag gggagacttg ggcagctcgt tcagaagttg	420		
aaaaacgaag gtattaatcc caagcagtgg aagcttggaa attttcagcg tatgatgtgc	480		
ccgaagtgca atggtggatc taatgaggag ttgagcctta gtgtatacat ccgaatggat	540		
ggtatgaacg catcatggaa ttgttttaga tcgacgtgtg gttggagagg ttttatccag	600		
cctgatggag ttccaaagct atcacaagca aaaactggca taaaaagtga aacggatcaa	660		
gaggtcgaac ctaacaaggc agcaataag gtttacagaa aaatcagtga agaggacctc	720		
aaccttgagc cacttttgta tgagcttgta acatacttct ctgagagaag gatatccgct	780		
gaaacacttc gaaggaataa agtaatgcaa cgtaaatgga agaataagat atccattgct	840		
ttcacctata gacgtgatgg tgctgttgtt ggctgcaaat acagggaagt tgataagaaa	900		
ttttcacagg aggcaaacac ggagaaaatt ttttatggtc tggatgatat aaagcgaca	960		
caagatatta tcattgttga gggtgaaatt gataagctgt cgatggatga agctggctat	1020		

cgtaattgtg tcagcgtacc agatgggtgca ccaccaaag tatccagtaa aatcccagac 1080

agagaccagg ataagaagta tcaatatctg tggaactgca aagactatct tgactcggca 1140

tctaggataa tactggccac cgatgctgat cctccaggcc aggctctggc tgaagaactt 1200

gctcgtcgac ttggtaaaga aagatgctgg agagtcaagt ggccaaagaa gaatgagaca 1260

gatacttgca aagatgcaaa tgaggtactg atgttttttag gtccacaagc attgagaaag 1320

gttataaaag atgcagaact gtatcccata agaggccttt ttgcattcaa agattttctt 1380

cctgagattg ataattacta tcttggaatc catggggatg agctcggtat tcgtactgga 1440

tggaaatcta tggatgacct ttacaaggtt gtgcctgggg agttgactgt agtaacagga 1500

gtaccaaatt ctggtaagag tgagtggata gatgcgttgt tgtgcaatat aaacaaagaa 1560

tgtgggtgga aatttgttct gtgctcaatg gaaaacaagg tcaggaggca tgctaggaaa 1620

ctcttagaga agcgcattaa gaaaccattc ttgatgcta ggtatggtgc gctcgcagag 1680

cgaatgactc ctgacgaatt tgaagcagga aaacaatggt tgaatgaaac ttccatctt 1740

atccggtgtg aagatgatag ccttccgtct attaattggg ttcttgacct tgcgaaagct 1800

gcagtgctaa gacatggagt gcgcggtctt gtgattgac cttacaacga acttgaccat 1860

cagcgcacct caaaccaaac ggagacagag tatgtcagcc agattcttac caagattaag 1920

cgctttgctc agcaccattc gtgtcatgta tggtttggtg cccatcctag acagctccat 1980

aactggaatg gagggccacc gaatatgtat gacatcagtg gaatgcaca ttcataaac 2040

aatgtgaca atggaattgt catccacaga aacagggata agaatgcagg ccctcttgat 2100

gtcgtgcagg tttgtgtgag gaaggtgcgg aacaaagtga ttgggcaaat aggagatgct 2160

ttcttgacat atgaccgggt tactggtcaa ttcaaggatg ctggtaaaag caccatagca 2220

gccactacgg cagcaacggt acaaaagcaa aagaacagct atgtaaagag tacgaaggac 2280

aatgtggcat atgagatgcc attaccgat gttgaaccag ccgactcggt tgatggtaaa 2340

gggtaactgc ctggcacagt agcacacat aatccttcgt cctgagttca gtttgctctg 2400

gtttcggcgg cgcagaagaa atagacatgt ttttggtgtt tttctctact cactggtatc 2460

atttgacgca agtgagattg caccattgtt tctggggatg ggctgttgc agctaggttc 2520

actgttcacc tcacacatag ggtactgac tctagtctt ccgtgatgtg gcactcctga 2580

attgggttgg aaatcaagt tctactgctt cctgctgcga atggggttgg aggctaacct 2640

cccttgatg gatacaagac attggcgggg tgggtgatag taagcttatg taattaattg 2700

ccacaccagg cgtagctct atgagcagtt gctgggtgga ttttagcgg ctagggtcat 2760

catcctttcc aaaaattgta gcagttggaa gggcatctgt tgatctctgt tcacacttat 2820

acacctgacc tgggaaacta tatttaatgt gccagaattg tgaaatcagg tgttgcgctt 2880

gtttcttc

2888

<210> 90

<211> 759

<212> PRT

<213> *Setaria viridis*

<400> 90

Met Pro Pro Arg Leu Ser Leu His Ser Leu Leu Leu Met Ala Ala Ser

1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Ala Ala Ala Ala Gly Gly Asp Ser Gly Leu Leu Leu

20 25 30

Ala Ala Arg Arg Arg Leu Pro Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly

35 40 45

Gly His Arg Ile Arg Leu Leu His Ser Phe Ala Gly Gly Arg Val Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Ala Gly Pro Val Thr Val Arg Ser Arg Asn Val His Ser Glu Asn

85 90 95

Asn Tyr Lys Ala Ala Ser Glu Glu Arg Leu Gly Gln Leu Val Gln Lys

100 105 110

Leu Lys Ser Glu Gly Ile Asn Pro Lys Gln Trp Arg Leu Gly Asn Phe

115 120 125

Gln Arg Met Met Cys Pro Lys Cys Asn Gly Gly Ser Asn Glu Glu Leu

130 135 140

Ser Leu Ser Val Tyr Ile Arg Met Asp Gly Thr Asn Ala Thr Trp Thr

145 150 155 160

Cys Phe Arg Ser Thr Cys Gly Trp Arg Gly Phe Ile Gln Pro Asp Gly

165 170 175

Val Pro Lys Val Ser Gln Ala Lys Gly Asp Ile Glu Ser Glu Thr Asp

180 185 190

Gln Glu Val Glu Ala Asn Lys Ala Ala Lys Lys Val Tyr Arg Lys Ile

195 200 205
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Leu Glu Pro Leu Cys Asp Glu Leu Val Thr
 210 215 220
 Tyr Phe Ser Glu Arg Arg Ile Ser Ala Glu Thr Leu Arg Arg Asn Lys
 225 230 235 240
 Val Met Gln Arg Lys Trp Lys Asn Lys Ile Ser Ile Ala Phe Thr Tyr
 245 250 255
 Arg Arg Asp Gly Val Val Val Gly Cys Lys Tyr Arg Glu Val Asp Lys
 260 265 270

 Lys Phe Ser Gln Glu Ala Asn Thr Glu Lys Ile Phe Tyr Gly Leu Asp
 275 280 285
 Asp Ile Lys Arg Ala Gln Asp Ile Ile Ile Val Glu Gly Glu Ile Asp
 290 295 300
 Lys Leu Ser Met Asp Glu Ala Gly Tyr Arg Asn Cys Val Ser Val Pro
 305 310 315 320
 Asp Gly Ala Pro Pro Lys Val Ser Ser Lys Ile Pro Asp Lys Glu Gln
 325 330 335

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

 Glu Val Leu Met Phe Leu Gly Pro Gln Ala Leu Arg Lys Val Ile Glu
 405 410 415
 Asp Ala Glu Leu Tyr Pro Ile Arg Gly Leu Phe Ala Phe Lys Asp Phe
 420 425 430
 Phe Pro Glu Ile Asp Asn Tyr Tyr Leu Gly Thr His Gly Asp Glu Leu
 435 440 445

Gly Ile His Thr Gly Trp Lys Ser Met Asp Asp Leu Tyr Lys Val Val
450 455 460

Pro Gly Glu Leu Thr Val Val Thr Gly Val Pro Asn Ser Gly Lys Ser
465 470 475 480

Glu Trp Ile Asp Ala Leu Leu Cys Asn Ile Asn Lys Glu Ser Gly Trp
485 490 495

Lys Phe Val Leu Cys Ser Met Glu Asn Lys Val Arg Glu His Ala Arg
500 505 510

Lys Leu Leu Glu Lys Arg Ile Lys Lys Pro Phe Phe Asp Ala Arg Tyr
515 520 525

Gly Gly Ser Ala Glu Arg Met Thr Pro Asp Glu Phe Glu Ala Gly Lys
530 535 540

Gln Trp Leu Asn Glu Thr Phe His Leu Ile Arg Cys Glu Asp Asp Ser
545 550 555 560

Leu Pro Ser Ile Asn Trp Val Leu Asp Leu Ala Lys Ala Ala Val Leu
565 570 575

Arg His Gly Val Arg Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Asn Glu Leu Asp
580 585 590

His Gln Arg Pro Ser Asn Gln Thr Glu Thr Glu Tyr Val Ser Gln Ile
595 600 605

Leu Thr Lys Ile Lys Arg Phe Ala Gln His His Ser Cys His Val Trp
610 615 620

Phe Val Ala His Pro Arg Gln Leu His Asn Trp Asn Gly Gly Pro Pro
625 630 635 640

Asn Met Tyr Asp Ile Ser Gly Ser Ala His Phe Ile Asn Lys Cys Asp
645 650 655

Asn Gly Ile Val Ile His Arg Asn Arg Asp Lys Asn Ala Gly Pro Leu
660 665 670

Asp Val Val Gln Val Cys Val Arg Lys Val Arg Asn Lys Val Ile Gly
675 680 685

Gln Ile Gly Asp Ala Phe Leu Thr Tyr Asp Arg Val Thr Gly Gln Phe

690	695	700	
Arg Asp Ala Gly Lys Ala Thr Ile Ala Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala			
705	710	715	720
Gln Thr Ala Thr Arg Lys Asn Ser Tyr Gly Lys Ser Thr Lys Asp Asn			
	725	730	735
Val Ala Tyr Glu Met Pro Val Pro His Val Ala Glu Asp Asp Ser Val			
	740	745	750
Ser Gly Leu Asp Ser Leu Phe			
	755		
<210> 91			
<211> 2906			
<212> DNA			
<213> Setaria viridis			
<400> 91			
cgctccgccc catgcgtccc cgccctgac ccagcaaggc tgccgagacc cctaccgccc	60		
gtccccgtga tgccccgcg gctgtccctc cactcgtgc tctcatggc cgctccgccc	120		
tctctctccg ccgcccgggc cggcggggac tcgggtctcc tctcgcgc gcgcccgcgc	180		
ctccccgtcg ccgcccgcg ggccgccgcg gggggccacc gcatccggct gctccactcc	240		
ttcgcggggg gccgcgtcac caggcggtc gaggtggcct gctgcgtccg gagcgcgccg	300		
ggcgcgcggc ccgcccggacc cgtcaccgtg cgtccagga acgttcattc ggagaacaac	360		
tacaaggctg catctgagga gagacttggg cagctcgttc agaagttgaa aagtgaaggt	420		
attaatccca agcagtggag gcttggaaat ttccagcgca tgatgtgccc caagtgcaat	480		
ggtggatcta atgaggagtt gaggctcagt gtctacatcc gaatggatgg tacgaacgca	540		
acatggactt gttttagatc gacatgtggg tggagaggtt ttatccagcc tgatggagtt	600		
cccaagggtat cccaagcgaa aggtgacata gaaagtgaaa cggatcaaga ggtcgaagct	660		
aacaaggcag caaaaaaggt ttacagaaaa atcagcgaag aggacctcaa tcttgagcca	720		
ctttgcgatg agcttctaac gtacttttct gagagaagga tatccgcgga aacacttcga	780		
aggaataaag taatgcaacg taaatggaaa aataagatat ccattgcttt cacctacaga	840		
cgtgatgggtg ttgttgttgg ctgcaaatac agggaagttg ataagaaatt ttcacaggag	900		
gcaaacacgg agaaaatttt ttatggtctg gatgatataa agcgtgcaca agatattatc	960		
attgttgagg gtgaaattga caagctgtcg atggatgaag ctggctatcg taattgtgtt	1020		

agcgtgcctg atggtgcacc accaaaagta tccagtaaaa tcccagacaa agagcaggat 1080
 aagaagtatc aatatctgtg gaactgcaaa gactatcttg actcgacatc taggataata 1140
 ctgtccaccg atgctgatcc tccaggccag gctctggctg aagaacttgc tcgtcgactt 1200
 ggtaaagaaa gatgttggag agttaagtgg ccaaagaaga atgagacaga tacttgcaaa 1260
 gatgcaaatg aggtactgat gtttttaggt ccgcaagcat tgagaaaggt tatagaagac 1320
 gcggaactgt atcctataag aggccttttt gcattcaaag atttcttccc cgagattgat 1380

 aattactatc ttggaaccca tggggatgag ctggtattc atactggatg gaaatctatg 1440
 gatgaccttt acaaggttgt gcctggggag ttgactgtag taacaggagt accaaattct 1500
 ggtaaaagtg agtggattga tgcgttgttg tgcaatataa acaaagaaag tgggtggaaa 1560
 tttgttctgt gctcaatgga aaacaaggtc agggagcatg ctaggaaact cttagagaag 1620
 cgcatlaaga aaccattctt tgatgctagg tatggtgggt ctgcagagcg aatgactcct 1680
 gatgaatttg aagcaggaaa acaatggttg aatgaaactt ttcatttat ccggtgtgaa 1740
 gatgatagcc ttccatctat taattgggtt ctgaccttg cgaaagctgc agttctaaga 1800

 catggagtgc gtggtcttgt gattgacct tacaacgaac ttgaccatca gcgccctca 1860
 aaccaaacag agacagagta cgtcagccag attcttacca agattaagcg ctttgctcaa 1920
 caccattcat gtcatgtatg gtttgttct catcctagac agtccataa ctggaatgga 1980
 ggcccaccaa atatgtatga cataagtgga agtgcacatt tcataaaca atgtgataat 2040
 ggaattgtga tccacagaaa caggataaa aatgcaggcc ctcttgatgt cgtgcagggt 2100
 tgtgtgagga aggtgcggaa caaagtatt ggacaaatag gagatgctt ctgacatat 2160
 gaccgggtta ctggtcaatt cagggatgct ggtaaagcca ccatagcagc cgcaacggca 2220

 gcaacagcac aaaccgcaac gcgaaaaaac agttatggaa agagtacaaa ggacaatgtg 2280
 gcatatgaga tgccagttcc gcatgtggt gaagatgact cggtttctgg tctagactct 2340
 ctcttttagg tcggccttct gctgaagact aactgcctgg cacaatcctt aatcctgaat 2400
 tcagtttct cgggtttcaa tgggtcagaa gaaatggaca tgttcttggg tgttttctc 2460
 tacttgtgtc aattggcgca agtgagatgg caccattgtt tctgggatg gcctgttgca 2520
 gctaggttca ctgttcacct catacatagc gtacttatct ctagttcttc tgtgatatgg 2580
 cactcatgag ttgggttggg aacctcaagt gcctactgtt cctgctgcaa atggggttgg 2640

 aggctaacct cactcgatg gatacaagaa attggcgggg tgggtatag taagcttatg 2700
 taattaattg ccacaccaga agctagcaca atgagcagct gggttatcat gtaggccttt 2760
 acaaaaattg tagcagttgg acgggcatca attgatatct gttcacactt ctatacacct 2820
 gacctagtga ctgggaacc tataattaat gtgccagaat tgtgaaatca ggtgttcgtt 2880

tcttcgaccg gacacatgcc atgcaa

2906

<210> 92

<211> 699

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 92

Met Ile Leu Leu Pro Tyr Arg Arg Leu Val Leu Asn Asn Ser Asn Asn

1	5	10	15
Phe	Ala	Met	Gly
Ser	Lys	Tyr	Phe
Leu	His	Lys	Pro
Ser	Ile	Thr	Ile
20	25	30	
His	Lys	Thr	Ile
Ile	Pro	Val	Leu
Ser	Ser	Lys	Thr
His	Leu	Phe	Gln
35	40	45	
Asn	Gln	Arg	Leu
Ile	Phe	Ser	Thr
Phe	Ala	Ser	Lys
Pro	Ile	Ser	Pro
50	55	60	
Ile	Arg	Gly	Thr
Ser	Asn	Leu	Ser
Tyr	Arg	Pro	His
Arg	Ile	Pro	Pro

65	70	75	80
Pro	Val	Ser	Gly
Val	Val	Leu	Glu
Asp	Pro	Val	Glu
Gly	Ile	Ala	Glu
85	90	95	
Ser	Glu	His	Val
Lys	Ala	Leu	Lys
Glu	Lys	Leu	Ser
Gln	Val	Gly	Ile
100	105	110	
Asp	Ile	Gly	Ser
Cys	Gly	Pro	Gly
Gln	Tyr	Ser	Gly
Leu	Leu	Cys	Pro
115	120	125	
Met	Cys	Thr	Gly
Gly	Asp	Ser	Asn
Glu	Lys	Ser	Leu
Ser	Leu	Phe	Ile

130	135	140
Thr	Gln	Asp
Gly	His	Ala
Ala	Thr	Trp
Thr	Cys	Phe
Arg	Ala	Lys
Cys		
145	150	155
Gly	Trp	Arg
Gly	Gly	Thr
Arg	Ala	Phe
Ala	Asp	Val
Lys	Thr	Ala
Phe		
165	170	175
Ala	Asp	Met
Lys	Arg	Ile
Gly	Lys	Val
Thr	Lys	Lys
Tyr	Arg	Gln
Ile		
180	185	190
Thr	Glu	Glu
Ser	Leu	Gly
Leu	Glu	Pro
Leu	Cys	Asp
Val	Leu	Leu
Ser		

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

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

 325 330 335
 Lys Ala Ser Arg Ile Ile Leu Ala Thr Asp Gly Asp Pro Pro Gly Gln
 340 345 350
 Ala Leu Ala Glu Glu Leu Ala Arg Arg Leu Gly Arg Glu Arg Cys Trp
 355 360 365
 Arg Val Thr Trp Pro Lys Lys Ser Thr Lys Asp Arg Phe Lys Asp Ala
 370 375 380
 Asn Glu Val Leu Met Tyr Leu Gly Pro Gly Ala Leu Arg Glu Val Ile

 385 390 395 400
 Glu Gly Ala Glu Leu Tyr Pro Ile Gln Gly Leu Phe Asn Phe Lys Asp
 405 410 415
 Tyr Phe Thr Glu Ile Asp Ala Tyr Tyr His Gln Thr Ile Gly Tyr Glu
 420 425 430
 Leu Gly Val Ser Thr Gly Trp Arg Ser Leu Asn Gln Leu Tyr Asn Val
 435 440 445

Val Pro Gly Glu Leu Thr Ile Val Thr Gly Val Pro Asn Ser Gly Lys

450 455 460

Ser Glu Trp Ile Asp Ala Leu Leu Cys Asn Leu Asn Gln Ser Val Gly

465 470 475 480

Trp Lys Phe Ala Leu Cys Ser Met Glu Asn Lys Val Arg Asp His Ala

485 490 495

Arg Lys Leu Leu Glu Lys His Ile Lys Lys Pro Phe Phe Asp Val Arg

500 505 510

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

515 520 525

Lys Gln Trp Leu Ser Asp Thr Phe Phe Leu Ile Arg Cys Glu Asn Asp

530 535 540

Cys Leu Pro Asn Ile Asp Trp Val Leu Ser Leu Ala Lys Ala Ala Val

545 550 555 560

Leu Arg His Gly Val Asn Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Asn Glu Leu

565 570 575

Asp His Gln Arg Pro Ser Ser Gln Thr Glu Thr Glu Tyr Val Ser Gln

580 585 590

Met Leu Thr Lys Ile Lys Arg Phe Ala Gln His His Ser Cys His Val

595 600 605

Trp Phe Val Ala His Pro Arg Gln Leu His His Trp Val Gly Gly Pro

610 615 620

Pro Asn Leu Tyr Asp Ile Ser Gly Ser Ala His Phe Ile Asn Lys Cys

625 630 635 640

Asp Asn Gly Ile Val Ile His Arg Asn Arg Asp Pro Ser Ala Gly Pro

645 650 655

Val Asp Gln Val Gln Val Cys Val Arg Lys Val Arg Asn Lys Val Ser

660 665 670

Gly Thr Ile Gly Asp Ala Phe Leu Ser Tyr Asp Arg Val Thr Gly Glu

675 680 685

Phe Met Asp Leu Asp Glu His Pro Ser Lys Gly

690	695	
<210>	93	
<211>	2802	
<212>	DNA	
<213>	Nicotiana tabacum	
<400>	93	
ctactgtaga acccttcctt aaccctctgc atttcgaagt ttcttacaaa aacacaacac	60	
tcacacacca tgactgcaaa ttctacattg taaaatagca ggatgattct tctaccttat	120	
cgcagacttg tactaaacaa ctctaacaat ttgccatgg gctccaaata tttctccac	180	
aagccatcca ttaccataca caagactatt attcctgtcc tttcttcaaa aaccacctt	240	
tttcaaaacc aaagactcat cttttcaaca ttgcttcaa aaccatctc cccaattcgt	300	
ggaacttcaa acttgtctta caggcccccac cgtattcctc caccagtttc tggagtagtt	360	
ctggaagacc cagtggaggg aattgcggag tcagaacatg tgaaggcact gaaggagaaa	420	
ttaagccagg ttggaataga tattggttct tgtggaccag ggcaatactc tggtttgctt	480	
tgtccaatgt gcacaggtgg ggattcaaat gaaaagagct tatctctctt cattactcag	540	
gatggcatg cagctacatg gacatgcttt cgagctaaat gtgggtggag aggtggtacc	600	
cgggcctttg catagtga gacagctttt gcagatatga aaaggattgg aaaagtgact	660	
aagaagtaca gacagataac tgaggagagt ttggggctgg aacctttatg tgatgtgtta	720	
ctctcatact tttctgagcg aatgatatcg agagaaacat tgcggagaaa tgcggttatg	780	
caacggagat atggtgatca gattgttatt gcatttacat atcggaggga tggagcactt	840	
glaagctgca agtaccggga catcacaaa aagttttggc aggaagctga tacattaaag	900	
atattttatg gtctagacga tataaaagga gcaagtgata tcatcattgt tgagggtgag	960	
atggacaagc ttgctatgga agaagctggc ttccggaact gtgtgagcgt tcccgatggg	1020	
gcacctccag ttgtttcaga taaagagttg ccacctgtag ataaggacac aaagtatcag	1080	
tatctttgga actgcaaaga gtatttagaa aaggcatctc gcataatact ggcaactgat	1140	
ggggatccac ctggtcaagc tttagctgaa gaacttgccc gccgcttggg gcgagaaagg	1200	
tgctggcgag tcacatggcc gaaaaagagc actaaagacc gtttcaaaga tgcaaatgag	1260	
gtacttatgt atctggggcc tgggtgcactg agggagggtta ttgaaggtgc agagctatac	1320	
ccaatacaag ggttattcaa ctttaaagat tacttcactg agattgatgc atattatcac	1380	
caaacaattg gctatgagct tggggtttca actggatgga gatctttaaa tcaactatac	1440	
aatgttgtgc ctggagagtt gactattgtt acaggagtcc caaattcggg gaagagtga	1500	

tggattgatg ctcttttgtg caatctcaat cagagtgttg gctggaaatt tgcactttgc 1560
tctatggaaa ataaggtgcg ggaccatgct aggaaacttt tggagaaaca cataaagaaa 1620
ccattctttg atgtgagata tggggaatct gttcaacgga tgagtgtca agagtttgaa 1680
gagggaaaagc aatggctcag tgatactttt ttctcataa ggtgtgagaa tgattgccta 1740

ccgaatattg actgggttct gtcacttgca aaagctgcag ttttaagaca tggggtgaat 1800
ggactcgtaa ttgatecata caatgagctt gatcatcaac gtccttcaag ccagactgaa 1860
acagagtatg tcagccagat gctgacaaag atcaaacggt ttgcgcaaca ccattcctgt 1920
catgttttgt ttgttgaca tccgagacag ttgcatcatt gggtaggagg tcctccaaat 1980
ctgtacgata ttagcggaag tgcacacttc ataacaaat gtgacaatgg tattgttatt 2040
cacgtaaca gagacccttc ggctggccct gtggatcaag tgcaggtctg tgtaagaaag 2100
gtgcggaata aagttagtgg aacaatttgt gatgccttct tgtcatatga cagggttact 2160

ggtgaattca tggacctga cgagcaccca agcaaaggct agtaaattct ggctgttctt 2220
ccattttgga aggtaatgcg tgtgcgatac ttgacttttg atggaagatc acagctccta 2280
caagaagtgg gagccatact ttgagtggaa aatcaggcgg aaaaatctca gtgattgccc 2340
attggttgga aacatatatg taacggagca ttatgcagag ttatgttctc ttagtggag 2400
gatcttttaa gataaggtaa caagcgacat attaaagtgc acgaaatctg ttgcgcctta 2460
agagtatcca tcacttagg gtataccctt acagggtgac acaagatcga agtgttgat 2520
gccttaaac ttttccccag cttcagctat tgtaaattat ttacaaagtg cagataggca 2580

aatagtcagt gcttaggtga gcagatatca tgttgtcaag taacaaatgt acgtgtaatt 2640
ataaaaaact tatagtttct tttctathtt ggtggcttat ttctgataat tattggtatc 2700
aactgttgag gcggtttgta tttctgttac ttcaccaatc tgtaaaatta gttgtgttgc 2760
caacatgtta atgattgtga cgtggtactg tctccgtga tc 2802

<210> 94

<211> 695

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 94

Met Lys Phe Leu Pro Tyr Arg Arg Ile Val Val Asn Asn Ser Asn Asn

1 5 10 15

Phe Val Met Gly Ser Lys Tyr Phe Leu His Lys Pro Ser Ile Thr Leu

20 25 30

Pro Thr Ile Tyr Lys Ser Ile Pro Val Leu Phe Gln Thr Gln Arg Leu
35 40 45

Ile Phe Ser Ala Phe Ala Ser Lys Pro Ile Ser Pro Asn Arg Gly Thr
50 55 60

Ser Ser Phe Ser Tyr Arg Pro Gln Arg Ile Pro Pro Pro Val Ser Gly
65 70 75 80

Val Met Leu Glu Asp Pro Lys Glu Glu Ile Ala Glu Ser Asp His Glu
85 90 95

Lys Ala Leu Lys Gln Lys Leu Ser Gln Val Gly Ile Asp Ile Gly Ser
100 105 110

Cys Gly Pro Gly Gln Tyr Asn Gly Leu Leu Cys Pro Met Cys Lys Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Asn Glu Lys Ser Leu Ser Leu Phe Ile Thr Pro Asp Gly
130 135 140

His Ala Ala Thr Trp Thr Cys Phe Arg Ala Lys Cys Gly Trp Arg Gly
145 150 155 160

Gly Thr Arg Ala Phe Ala Asp Val Arg Thr Ala Phe Ala Asp Met Lys
165 170 175

Arg Ile Gly Lys Val Lys Lys Lys Tyr Arg Gln Ile Thr Glu Glu Ser
180 185 190

Leu Gly Leu Glu Pro Leu Cys Asp Val Leu Leu Thr Tyr Phe Ser Glu
195 200 205

Arg Met Ile Ser Arg Glu Thr Leu Arg Arg Asn Ala Val Met Gln Gln
210 215 220

Arg His Gly Asp Gln Val Val Ile Ala Phe Thr Tyr Arg Arg Asp Gly
225 230 235 240

Ala Leu Val Ser Cys Lys Tyr Arg Asn Met Thr Lys Lys Phe Trp Gln
245 250 255

Glu Ala Asp Thr Leu Lys Ile Phe Tyr Gly Leu Asp Asp Ile Lys Gly
260 265 270

Ala Ser Asp Ile Ile Ile Val Glu Gly Glu Met Asp Lys Leu Ala Met

275 280 285
 Glu Glu Ala Gly Phe Arg Asn Cys Val Ser Val Pro Asp Gly Ala Pro
 290 295 300
 Pro Ser Ile Ser Asp Lys Asp Leu Pro Pro Val Asp Lys Asp Thr Lys
 305 310 315 320
 Tyr Gln Tyr Leu Trp Asn Cys Lys Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Ser Arg
 325 330 335

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

 Leu Tyr Pro Ile Gln Gly Leu Phe Asp Phe Lys Asn Tyr Phe Thr Glu
 405 410 415
 Ile Asp Ala Tyr Tyr His Gln Thr Ile Gly Tyr Glu Leu Gly Val Pro
 420 425 430
 Thr Gly Trp Arg Ser Leu Asn Gln Leu Tyr Asn Val Val Pro Gly Glu
 435 440 445
 Leu Thr Ile Val Thr Gly Val Pro Asn Ser Gly Lys Ser Glu Trp Ile
 450 455 460

 Asp Ala Leu Leu Cys Asn Leu Asn His Ser Val Gly Trp Lys Phe Ala
 465 470 475 480
 Leu Cys Ser Met Glu Asn Arg Val Arg Glu His Ala Arg Lys Leu Leu
 485 490 495
 Glu Lys His Ile Lys Lys Pro Phe Phe Asp Val Arg Tyr Gly Glu Ser
 500 505 510
 Val Glu Arg Met Ser Ala Gln Glu Phe Glu Glu Gly Lys Gln Trp Leu
 515 520 525

Ser Asp Thr Phe Phe Leu Ile Arg Cys Glu Asn Asp Cys Leu Pro Asn
530 535 540
Ile Asp Trp Val Leu Ser Leu Ala Lys Ala Ala Val Leu Arg His Gly
545 550 555 560
Val Asn Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Asn Glu Leu Asp His Gln Arg
565 570 575
Pro Ser Ser Gln Thr Glu Thr Glu Tyr Val Ser Gln Met Leu Thr Lys
580 585 590

Ile Lys Arg Phe Ala Gln His His Ser Cys His Val Trp Phe Val Ala
595 600 605
His Pro Arg Gln Leu His His Trp Val Gly Gly Pro Pro Asn Leu Tyr
610 615 620
Asp Ile Ser Gly Ser Ala His Phe Ile Asn Lys Cys Asp Asn Gly Ile
625 630 635 640
Val Ile His Arg Asn Arg Asp Pro Ser Ala Gly Pro Val Asp Gln Val
645 650 655

Gln Val Cys Val Arg Lys Val Arg Asn Lys Val Ser Gly Thr Ile Gly
660 665 670
Asp Ala Phe Leu Ser Tyr Asp Arg Val Thr Gly Glu Phe Met Asp Ile
675 680 685
Asp Glu His Pro Arg Lys Gly
690 695

<210> 95

<211> 2748

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<400> 95

tgagaaacca taaacccctt ccttaacccc ctaacggatg agtgcagttt tgtgtgttg	60
aaaattagca gtagcagtag cagtagcagg aatgaaattt cttccttacc gcagaattgt	120
agtgaataac tctaacaact ttgtgatggg ctccaaatat tttctccaca agccatccat	180
tactttacca acaatataca agtcgattcc tgtacttttt caaactcaaa gactcatctt	240
ttcagcattt gcttcaaaac ccatatcccc aaatcgcgga acttcaagct tctcatacag	300

gcctcaacga attcctccac cagtttctgg agtaatgctg gaagacccaa aggaggaaat 360
 tgcagagtca gaccacgaga aggcactgaa gcagaaattg agccaggttg gaatagatat 420
 tggttcttgt ggaccaggcc agtacaatgg gttgctttgt ccaatgtgca aaggtggggg 480
 ctcaaacgaa aagagcttat ctctctttat tactcctgat gggcatgcag ctacatggac 540

atgctttcga gctaaatgtg gatggagagg tggtagacgg gcctttgcag atgtgaggac 600
 agcttttgcg gatatgaaaa ggattggaaa agtgaaaaag aagtacagac agataactga 660
 ggagagtttg gggctggaac ctttatgtga tgtgttactc acatactttt ctgagcgaat 720
 gatatcaaga gaaacattgc ggagaaatgc tgttatgcaa caaagacatg gtgatcaggt 780
 tgttattgca tttacgtatc ggagggatgg agcacttgtg agctgtaagt accggaacat 840
 gacaaaaag ttttggcagg aagctgatac tttaaaaata ttctatggtc tcgacgatat 900
 aaaggagca agtgatatca tcattgttga gggtagatg gacaagcttg ctatggaaga 960

agcaggcttt cggaattgtg tgagcgttcc agatggcgct cctccatcta tttcagataa 1020
 agatttgccg cctgtagata aggacacaaa gtatcagtat ctttgggaact gcaaagaata 1080
 tttggaaaag gcatctcgca taatactggc aactgatggg gatccacctg gtcaagcatt 1140
 agctgaagag ctgccccgcc ggttagggag agaaagggtgc tggcgagtta catggccaaa 1200
 aaagagcact atagaccact tcaaagatgc aatataggta cttatgtgtc tggggcctgg 1260
 tgctctgagg gaggttatg aaggtgcaga gctgtacca atacaaggat tattcgactt 1320
 taaaaattac tttactgaga ttgatgcata ttatcaccaa acaattggct acgagcttgg 1380

ggttccaact ggatggaggt ccttaaatca actatacaat gttgttcctg gagagttgac 1440
 tattgttaca ggagtcccaa actcggggaa gagtgagtgg attgatgctc ttttatgcaa 1500
 tctcaatcac agtgttggtt ggaaatttgc actttgctct atggaaaaca gggtagggga 1560
 gcatgctagg aaacttttgg agaagcacat aaagaaacct tttttgatg tgagatatgg 1620
 ggaatctgtt gaacggatga gtgctcagga gtttgaagag ggaaagcaat ggctcagtga 1680
 tacattttct ctcataaggt gtgagaatga ttgctaccg aatattgact gggttctctc 1740
 gcttgcaaaa gctgcagttt taagacatgg ggtgaatgga cttgtaatg acccatacaa 1800

tgaacttgat catcaacgct cttcaagcca gaccgaaaca gagtatgtca gccagatgct 1860
 gacgaagata aaacggtttg cacaacacca ttctgtcat gtttggtttg ttgcacatcc 1920
 gagacagttg catcattggg taggaggtcc tccaaatctg tatgatatta gtggaagtgc 1980
 acacttcata acaaatgtg acaatggtat tgttattcat cgaaacagag acccttcagc 2040
 tggccccgtg gatcaagtgc aggttttgtt aagaaaggta cggaataaag ttagtggaac 2100
 aattggtgat gccttcttat catatgacag ggttactggg gaattcatgg acattgatga 2160

gcaccaagg aaaggctagc tagctaattc tggatattct tccattgtac ataaggggaa 2220

tgatactcga cttttgatga ctgacacag tgctcctaga agaagtttgg agccatattg 2280

tgtggaaaat ctggcagaaa aatctcacag tggttggcat acatatatgt ggtggaggcg 2340

tggagcattg tgcctagtga agttcttcgc tttagtggct cttgtaagat aaggtaacaa 2400

gcaactatta agcttagaac atccattttc ttagggcggc ggtgttgga gctttaaaat 2460

ttacctcttg ttgaattgtt cagtaagtgt gcttgattcc tggcagatta aattagtctg 2520

atagtctta ggigatcaaa tgtcatattc tcaagttaca tttgttttag tgggtggtta 2580

ttggttctga taagttgtaa aattaattgg gttgatccca ataggaaata ttaatgattt 2640

attgtaggca tccttctctc acagatattt tiggctttgc ctatgtattc actatattaa 2700

tattgtattt gtttttctag tctagccaat tatgttgttg taggttaa 2748

<210> 96

<211> 697

<212> PRT

<213> Solanum lycopersicum

<400> 96

Met Ile Leu Leu Pro Tyr Arg Arg Ile Val Val Asn Asn Ser Asn Asn

1 5 10 15

Phe Val Met Gly Ser Lys Tyr Phe Leu His Lys Pro Ser Ile Thr Leu

20 25 30

Pro Thr Ile Tyr Lys Ser Ile Pro Val Leu Phe Lys Thr Gln Arg Leu

35 40 45

Ile Phe Ser Ala Phe Ala Ser Lys Pro Ile Ser Pro Asn Arg Gly Thr

50 55 60

Ser Ser Phe Ser Tyr Arg Pro Gln Arg Ile Pro Pro Pro Val Ser Val

65 70 75 80

Ser Gly Val Met Leu Glu Asp Pro Lys Glu Asp Ile Thr Glu Ser Asp

85 90 95

His Glu Lys Ala Leu Lys Gln Lys Leu Ser Gln Val Gly Ile Asp Ile

100 105 110

Gly Ser Cys Gly Pro Gly Gln Tyr Asn Gly Leu Leu Cys Pro Met Cys

115 120 125

Lys Gly Gly Gly Ser Asn Glu Lys Ser Leu Ser Leu Phe Ile Thr Pro
 130 135 140
 Asp Gly Tyr Ala Ala Thr Trp Thr Cys Phe Arg Ala Lys Cys Gly Trp
 145 150 155 160
 Arg Gly Gly Thr Arg Ala Phe Ala Asp Val Arg Thr Ala Phe Ala Asp
 165 170 175
 Met Lys Arg Ile Gly Lys Val Asn Lys Lys Tyr Arg Gln Ile Thr Glu
 180 185 190
 Glu Ser Leu Gly Leu Glu Pro Leu Cys Asp Val Leu Leu Thr Tyr Phe
 195 200 205
 Ser Glu Arg Met Ile Ser Arg Glu Thr Leu Arg Arg Asn Ala Val Met
 210 215 220
 Gln Gln Arg His Gly Asp Gln Val Val Ile Ala Phe Thr Tyr Arg Arg
 225 230 235 240
 Asp Gly Ala Leu Val Ser Cys Lys Tyr Arg Asn Met Thr Lys Lys Phe
 245 250 255
 Trp Gln Glu Ala Asp Thr Leu Lys Ile Phe Tyr Gly Leu Asp Asp Ile
 260 265 270
 Lys Gly Ala Ser Asp Ile Ile Ile Val Glu Gly Glu Met Asp Lys Leu
 275 280 285
 Ala Met Glu Glu Ala Gly Phe Arg Asn Cys Val Ser Val Pro Asp Gly
 290 295 300
 Ala Pro Pro Ser Ile Ser Asp Lys Asp Leu Pro Pro Val Glu Lys Asp
 305 310 315 320
 Thr Lys Tyr Gln Tyr Leu Trp Asn Cys Lys Glu Tyr Leu Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ser Arg Ile Ile Leu Ala Thr Asp Gly Asp Pro Pro Gly Gln Ala Leu
 340 345 350
 Ala Glu Glu Leu Ala Arg Arg Leu Gly Arg Glu Arg Cys Trp Arg Val
 355 360 365
 Thr Trp Pro Lys Lys Ser Thr Ile Asp His Phe Lys Asp Ala Asn Glu

370 375 380
 Val Leu Met Cys Leu Gly Pro Gly Ala Leu Arg Glu Val Ile Glu Gly
 385 390 395 400
 Ala Glu Leu Tyr Pro Ile Gln Gly Leu Phe Asn Phe Asn Asn Tyr Phe
 405 410 415
 Thr Glu Ile Asp Ala Tyr Tyr His Gln Thr Ile Gly Tyr Glu Leu Gly

 420 425 430
 Val Pro Thr Gly Trp Arg Ser Leu Asn His Leu Tyr Asn Val Val Pro
 435 440 445
 Gly Glu Leu Thr Ile Val Thr Gly Val Pro Asn Ser Gly Lys Ser Glu
 450 455 460
 Trp Ile Asp Ala Leu Leu Cys Asn Leu Asn Tyr Ser Val Gly Trp Lys
 465 470 475 480
 Phe Ala Leu Cys Ser Met Glu Asn Arg Val Arg Glu His Ala Arg Lys

 485 490 495
 Leu Leu Glu Lys His Ile Lys Lys Pro Phe Phe Asp Val Arg Tyr Gly
 500 505 510
 Glu Ser Val Glu Arg Met Ser Ala Gln Glu Phe Glu Glu Gly Lys Gln
 515 520 525
 Trp Leu Ser Asp Thr Phe Phe Leu Ile Arg Cys Glu Asn Asp Cys Leu
 530 535 540
 Pro Asn Ile Asp Trp Val Leu Ser Leu Ala Lys Ala Ala Val Leu Arg

 545 550 555 560
 His Gly Val Asn Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Asn Glu Leu Asp His
 565 570 575
 Gln Arg Pro Ser Ser Gln Thr Glu Thr Glu Tyr Val Ser Gln Met Leu
 580 585 590
 Thr Lys Ile Lys Arg Phe Ala Gln His His Ser Cys His Val Trp Phe
 595 600 605
 Val Ala His Pro Arg Gln Leu His His Trp Val Gly Gly Pro Pro Asn

 610 615 620

Leu Tyr Asp Ile Ser Gly Ser Ala His Phe Ile Asn Lys Cys Asp Asn
 625 630 635 640
 Gly Ile Val Ile His Arg Asn Arg Asp Pro Ser Ala Gly Pro Val Asp
 645 650 655
 Gln Val Gln Val Cys Val Arg Lys Val Arg Asn Lys Val Ser Gly Thr
 660 665 670
 Ile Gly Asp Ala Phe Leu Ser Tyr Asp Arg Val Thr Gly Glu Phe Met

 675 680 685
 Asp Ile Asp Glu His Pro Arg Lys Gly
 690 695

<210> 97

<211> 2905

<212> DNA

<213> Solanum lycopersicum

<400> 97

tagtccattt ccaatacatt aaataccaat ttgaagtaaa tgagaaacca taaaaccctt	60
ccttaacccc ctaacggatg agtgtagttt tgtgttgttg aaaattagca ttagcattag	120
caggagcagg agcaggaatg attcttcttc cttatcgtag gattgtagtg aataactcca	180
acaactttgt aatgggctcc aaatatatttc tccacaagcc atccattact ttaccaacaa	240
tatacaagtc gattcctgta ctttttaaaa cccaaagact catcttttca gcatttgctt	300
caaaacccat atccccaat cgcggaactt caagcttctc atacagacct caacgaattc	360
ctctccagt ttcagtttct ggagtaatgc tggaagatcc gaaggaggat attacagagt	420
cagaccacga gaaggcactg aagcagaaat taagccagggt tgggtagatg attggttctt	480
gtggaccagg ccagtacaat ggggttgcttt gtccaatgtg caaaggtggg ggctcaaatg	540
aaaagagctt atctctcttt attactccgg atgggtatgc agctacatgg acatgctttc	600
gagctaaatg tggatggaga ggtgtgtacac gggcctttgc agatgtgagg acagcttttg	660
cggatatgaa aaggattggg aaagtgaata agaagtacag acagataact gaggagagtt	720
tggggctgga acctttatgt gatgtgttac tcacatactt ttctgagcga atgatatcaa	780
gagaaacatt gcggagaaat gctgttatgc aacaaagaca tggtagatcag gttgttattg	840
catttacgta tcggagggat ggagcacttg taagctgtaa gtaccggaac atgacaaaaa	900
aattttggca ggaagctgat actttaaaaa tattctatgg tctcgacgat ataaaggag	960
caagtgatat catcattgtt gagggtgaga tggacaagct tgctatggaa gaagcaggat	1020

ttcggaattg tgtgagcgtt ccagatggcg ctccctccatc tatttcagat aaagatttgc	1080
cgctttaga gaaggacaca aagtatcagt atctttggaa ctgcaaagaa tatctggaaa	1140
agacatctcg cattatactg gcaactgatg gggatccacc tggtaagca ttagctgaag	1200
agcttgcccc ccggttaggg agagaaaggt gctggcgagt tacatggcca aaaaagagca	1260
ctatagatca cttcaaagat gcaaatgagg tactttatgtg tctggggcct ggtgcactga	1320
gagaggttat tgaaggtgca gagctgtacc cgatacaagg attattcaac tttataaatt	1380
actttactga gattgatgca tattatcatc aaacaattgg ctacgagctt ggggttccaa	1440
ctggatggag gtccttaaat catctataca atgttgtacc gggagagttg actattgtta	1500
caggagtccc aaactccggg aagagtgaat ggattgatgc tcttctatgc aatctcaatt	1560
acagtgttgg ctggaaattt gcactttgct ctatggaaaa cagggtacgg gagcatgcta	1620
gaaaactttt ggagaagcac ataaagaaac ctttttttga tgtgagatat ggggaatctg	1680
ttgaacggat gagcgctcag gagtttgaag agggaaaaca atggctcagt gatacatttt	1740
tcctcataag gtgtgagaat gattgcctgc cgaatatga ctgggttctc tcgcttgcaa	1800
aagctgcagt ttttaagacat ggggtgaatg gacttgtaat tgacccatac aatgaacttg	1860
atcatcaacg tccttcaagc cagaccgaaa cagagtatgt cagccagatg ctgacgaaga	1920
taaaacggtt tgcacaacac cattcatgtc atgtttgggt tgttgacat ccgagacagt	1980
tgcattcattg ggtaggaggt cctccaaatc tgtacgatat tagtggaaat gcacacttca	2040
taaacaaatg tgacaatggt attgttattc atcgtaacag agatccttcg gctggccccg	2100
tggatcaagt gcaggtttgt gtaagaaagg tacggaataa agttagtgga acaattggtg	2160
atgccttctt atcatatgac aggggttactg gtgaattcat ggacattgat gagcacccaa	2220
ggaaaggcta gttagcaaat tctggatatt ctccattgt acataacggg aatgatactt	2280
acttgacctg tgatgaatga tcacatcgct cctagaagaa gtttgagcc atattatgtg	2340
gaaatcaggc agaaaaatgt cgcagtgggt ggcatacata tatglagtgg agcattgtgc	2400
ctagtgaagt tcttcgcttt agtggctctt gtaagataag gtaacaagca actattaagc	2460
ttagaacatc aattttctta gggcgcggtt gttggaagct ttaaaattta cctcttggtg	2520
aattgttcag taagtgtgct tgattcctgg cagattaaat tagtctgata gtgcttaggt	2580
gatccaatgc catatttca agttaacatt tgttttggtc gtggcttatt gttgtaaaat	2640
taattgggtt gatcccaata ggaaatatt atgattgatt gtaggcatcc ttctttcaca	2700
gatgttattg gctttgccta tgtattcact atattactat tgatgtgtt ctctagtcta	2760

gccaattgtg tggttgtagg ttaatgtag ctcctttttg ctctgggctt cttactcaac 2820
 tacacaggtg aaaaaaagtt tatgcctagt gtatttatgt ggtataaata gctatataat 2880
 gtatcgattc gaaattttat attaa 2905

<210> 98
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer

<400> 98
 cattcataat gaccagctag gtgct 25
 <210> 99
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer

<400> 99
 gagttgaaac atgcctgtac tcctg 25