

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0050122 (43) 공개일자 2014년04월29일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0114034 (22) 출원일자 2012년10월15일 심사청구일자 2012년10월15일		(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교) (72) 발명자 안진홍 경기도 용인시 기흥구 공세동 133-8번지 대주피오 레아파트 210동 1703호 양정일 경기 과천시 향교말길 15-15, (중앙동) (74) 대리인 안소영

전체 청구항 수 : 총 11 항

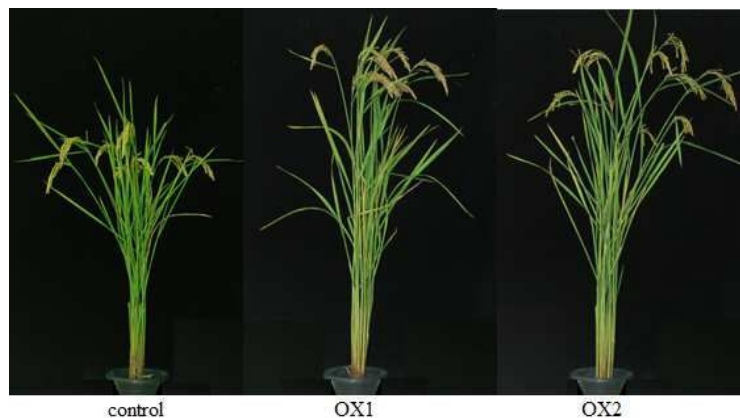
(54) 발명의 명칭 벼의 수량성 증진을 위한 LOC_Os02g05840 유전자, 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 이에 의한 형질전환 식물체 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 벼의 수량성 증진을 위한 LOC_Os02g05840 유전자, 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 이에 의한 형질전환 식물체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 LOC_Os02g05840 유전자는 수량 증가에 관여하는 형질인 이삭 수, 줄기 발달, 개화시기를 조절함으로써, 벼를 포함하는 주요 곡물의 수량성을 증대시키고 바이오매스를 증가시켜 생산성을 증가시킬 수 있으며 새로운 사료 작물의 개발에도 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008128
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대 바이오그린 21사업
연구과제명	벼 수량성 유전자 개발 및 기능 검정
기 여 율	1/1
주관기관	농촌진흥청
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 단자엽 식물의 수량성 증가를 위한 유전자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 수량성 증가는 야생형과 비교하여 이삭 수의 증가, 줄기 발달 또는 개화 시기 단축에서 선택되는 하나 이상에 의한 것인 단자엽 식물의 수량성 증가를 위한 유전자.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 유전자와 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 프로모터를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 3으로 표시되는 프로모터인 재조합 벡터.

청구항 5

제3항에 따른 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 세포는 아그로박테리움 속 미생물인 형질전환 세포.

청구항 7

제6항에 있어서, 아그로박테리움 속 미생물은 아그로박테리움 투메파시엔스 LB4404(*Agrobacterium tumefaciens* LB4404)인 형질전환 세포.

청구항 8

제3항에 따른 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 단자엽 식물체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 단자엽 식물체는 벼(*Oryza sativa*)인 형질전환 식물체.

청구항 10

제3항의 재조합 벡터로 단자엽 식물을 형질전환시켜 LOC_0s02g05840 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 단자엽 식물의 형질전환 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 하기의 단계들을 포함하는 LOC_0s02g05840 유전자가 발현되는 벼 형질전환체의 제조방법:

LOC_0s02g05840 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계;

벼에 상기 재조합 벡터를 도입하는 단계; 및

상기 재조합 벡터가 도입에 따라 LOC_0s02g05840 유전자가 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계.

명세서

기술분야

본 발명은 벼의 수량성 증진을 위한 LOC_0s02g05840 유전자, 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 이에 의한 형질전

[0001]

환 식물체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 벼(*Oryza sativa*)는 보리, 옥수수과 함께 세계에서 가장 중요한 식량 작물 중 하나이다. 벼는 인구 증가, 공업화로 인한 농지 부족, 기후 변화 등을 통해 그 수요가 증가되고 있으나, 생산량 증대를 위한 새로운 품종 개발은 미비한 실정이다. 이를 해결하기 위해 기존의 육종 방법을 벗어나 유용 유전자의 도입을 통한 새로운 품종 개발이 이루어지고 있다. 실제로 분자 생물학의 발달은 유용유전자의 분리 및 조작을 통해 벼를 포함한 많은 식물에 형질전환하여 새로운 형질전환 식물을 얻고 있다. 이러한 유용 유전자의 발굴과 이를 이용한 새로운 품종 개발은 식량 문제 해결과 산업 전반에 유용하게 사용 될 수 있다.
- [0003] 벼는 종자 생산이 목적인 세계적으로 가장 중요한 작물 중의 하나로 최근 몇 년간 전체 유전자 서열이 밝혀짐으로써 유용유전자를 대량으로 확보하고 이를 선점하고자 하는 많은 노력이 행해지고 있다. 종래 종자의 크기나 생육을 향상시키기 위한 기술로서, 식물 세포 내의 세포주기 제어 단백질(cell cycle control protein)의 농도나 촉매 활성을 변형하여 식물 세포 성장을 조절하는 방법(미국등록특허 6,087,175)이나 합성 징크핑거단백질(a synthetic zinc finger protein)을 코딩하는 뉴클레오타이드를 증진시키고자 목표 유전자에 결합시킨 발현벡터를 식물 세포에 도입시켜 식물 세포 내에서 목표 유전자의 발현정도를 조절하는 방법(미국등록특허7,151,201) 등이 개시되어 있다. 또한 애기장대 유래의 시토크롬 P450 단백질의 유전자를 식물 세포에 형질전환시켜 식물종자의 크기를 증가시키는 기술(한국등록특허 10-0794395) 등이 있다.
- [0004] 식물의 줄기, 잎 등 측생기관의 형태와 크기는 바이오매스를 증대시키고 농업생산성에 영향을 주는 중요한 요인이다. 최근 벼, 옥수수, 밀, 기장 등 주요 곡물의 줄기형성 기작 연구가 활성화 단계에 있다. 옥수수 육종을 가능하게 했던 줄기생성 억제 유전자인 *teosinte branched 1 (tb1)*이 규명된 이래, *zfl(FLORICAULA/LEAFY)*, *bif (barren inflorescence2)*, *pin (pinoid)* 등의 줄기에 관련된 유전자 규명이 가속화되고 있는 단계이다 (Lukens and Doebley 2001, Barazesh and McSteen 2008). 옥수수에서 처음 알려진 *tb1*은 벼와 애기장대에서도 측아 발생을 억제하는 주요한 유전자임이 확인되었다 (Takeda et al. 2003, Finlayson 2007, Aquilar-Martinez et al. 2007).
- [0005] 벼, 옥수수 등 주요 곡물 이외에도 토마토 등 원예작물의 측지 발생을 억제하는 유전자 (lateral suppressor, *blind*)가 이미 규명된 바 있고 (Schumacher et al. 1999, Schmitz et al. 2002), 사탕수수, 대나무 등의 바이오매스를 증진시키기 위한 줄기생성 조절 유전자를 탐색하는 연구가 시작단계에 있다 (Aiteken et al. 2008). 또한 최근 연구결과로는 옥수수의 *tb1* 유전자를 밀에 도입하여 분열을 억제하였는데 (Lewis 2008) 이는 이런 측아 발생 조절 유전자들이 생명공학기술의 측면에서 이용가능성이 있음을 보여주는 것이다.
- [0006] 식물의 수량 증대를 위해서는 이삭의 수가 증대되어야 할 뿐만 아니라 이삭을 많이 맺기 위한 알맞은 식물 형태를 가져야한다. 이를 위해서 벼의 줄기 발달, 개화시기, 이삭 발달 등의 조절이 중요하다.
- [0007] 예를 들어, 벼의 개화 시기는 계절 변화와 온도 변화 등 환경적인 요소를 인지하는 중요한 형질이다. 벼는 단일 조건에서 개화가 촉진되는 단자엽 식물로서 이들의 개화시기(출수기)는 광주기와 영양 생장기의 기간에 의해 영향을 받으며, 이러한 요인들은 벼가 다양한 경작지에서 성장하는데 관여하는 중요한 농업적 형질이다. 그 중에서 광주기는 벼의 개화시기 및 생체시계를 조절함으로써 중요하게 생장에 영향을 미쳐 직접적으로 생산성에 영향을 미친다. 또한, 최근에 벼의 전체 게놈에 대한 염기서열이 완료되고, 비교 유전체학에 대한 연구가 진행되면서 벼는 중요한 단자엽 모델식물로서 주목을 받고 있다.
- [0008] 즉, 수량 증대를 위해서 줄기 발달, 개화 시기, 이삭 발달을 조절하는 각각의 유전자 또는 이들 모두를 조절할 수 있는 하나의 유전자에 대한 연구 및 이를 이용하는 새로운 품종에 대한 연구가 필요하다.
- [0009] 하지만, 현재까지 벼에서 몇몇 개화 관련 유전자, 줄기 발달 관련 유전자 및 이삭 발달들이 밝혀졌지만 그 수가 제한적이며 애기장대와 구별되는 벼 특이적인 유전자에 대해서도 알려진 것이 거의 없다. 줄기 발달, 개화시기, 이삭 발달 등을 조절함으로써 막대한 농업적 이익을 얻을 수 있음을 고려할 때, 이에 관여하는 유전자를 탐색하기 위한 노력이 절실히 요구된다 할 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) (KR) 10-2007-7016825
(특허문헌 0002) (KR) 10-2006-0095687

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 식물의 줄기 발달, 이삭 증가, 개화 시기 조절을 통한 수량성 증가를 목적으로 하는 LOC_Os02g05840 유전자, 이 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 이 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 식물의 이삭 발달, 줄기 발달, 개화 시기 등의 수량성 증가를 위한 유전자를 발굴하기 위하여 예의 노력하였다. 이 과정에서 벼의 LOC_Os02g05840 유전자가 이삭 수, 줄기 발달, 개화시기를 조절하는 유전자임을 확인하고, 이에 따라, 이 유전자를 확보하여 이를 포함하는 재조합 벡터를 제조하고 이를 식물체에 도입하여 형질전환시킴으로써, 형질전환체에서 이삭 수가 많아지고 줄기가 발달되며 개화시기가 빨라짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0013] 보다 상세하게, 본 발명자들은 아그로박테리움(Agrobacterium)을 이용한 형질 전환 방법을 통해 만들어진 10만 개통의 벼 돌연변이 집단에서 이삭 수, 줄기 발달, 개화시기에 변화가 있는 돌연변이체를 관찰하였다. 각각의 돌연변이 식물체는 아그로박테리움(Agrobacterium)에 의해 T-DNA가 게놈 상에 삽입되어 삽입된 지역의 유전자가 기능을 못하게 된 돌연변이체이다. T-DNA 삽입 위치는 genomic DNA PCR과 염기서열 분석을 통해 확인할 수 있으며, 공개된 벼의 유전자 데이터베이스에서 유전자 locus id를 찾을 수 있다.
- [0014] 상기 돌연변이 집단의 표현형 관찰을 통해, 개화시기에 변화가 있는 2개의 계통 3A-10852와 1B-21530을 선발하였다. 3A-10852는 LOC_Os02g05840의 두 번째 intron에 T-DNA가 삽입되었으며, 1B-21530은 세 번째 exon에 T-DNA가 삽입된 돌연변이체로써, PCR을 통해 이 두 계통에서 LOC_Os02g05840의 기능이 상실된 것을 확인할 수 있었다.
- [0015] 염기서열 해독 정보를 바탕으로 LOC_Os02g05840의 DNA를 분리하고 pGA3426, pGA3428, pGA3438 벡터로 클로닝하였다. 이를 아그로박테리움(Agrobacterium)에 도입하여 형질전환에 이용하였다.
- [0016] 이렇게 형질전환된 식물체의 표현형을 분석하여 LOC_Os02g05840 유전자가 이삭 발달, 줄기 발달, 개화시기를 조절하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0017] 본 발명은 벼의 수량성 증가를 위한 LOC_Os02g05840 유전자(이하 '본 발명의 유전자'라 함)를 제공한다. LOC_Os02g05840 유전자에 의한 수량성 증가는 이삭 증가, 줄기 발달 또는 개화 시기 단축에서 선택되는 하나 이상에 의한 것이다.
- [0018] LOC_Os02g05840의 genome DNA 크기는 5600 bp이며 대표 coding sequence (LOC_Os02g05840.1)의 크기는 2250 bp로 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되며 749개의 아미노산으로 번역되어 단백질이 만들어진다. 이 단백질은 Plant homeo domain(PHD finger domain), the fibronectin Type III (FNIII) domain, and the VIN3 interacting domain (VID)을 암호화 하며 PHD finger domain은 DNA 중합체인 염색체가 감겨있는 histone 잔기에 결합하여 특정 유전자의 발현을 조절하는 역할을 한다고 보고하였다. LOC_Os02g05840이 암호화 하는 PHD finger domain도 histone H3과 결합한다.
- [0019] 유전자는 생물의 세포를 구성하고 유지하는데 필요한 정보를 암호화 하고 있으며, 본 발명에 따른 이삭, 줄기, 개화시기 발달에 관여하는 LOC_Os02g05840 유전자를 이용하여 수량성 증가를 유도할 수 있다.
- [0020] 또한 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 수량성 증가를 위한 재조합 벡터를 제공한다.
- [0021] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며, DNA를 복제하고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "재조합 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 재조합 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘 다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서 재조합 벡터는 재

조합 DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입 시, 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 재조합 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제가 가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 계승 내에 통합되는 것들을 포함한다.

[0022] 상기 통상의 벡터는 본 발명의 유전자를 도입할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하나, 바람직하게는 pCambia 계열 또는 pGA계열의 벡터, 예컨대, pGA3383, pCambia1381, pCambia1391, pGWB3, pGA3426, pGA3428, pGA3438, pGA2715, pGA2717 와 같이 Ti-plasmid에서 파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 보다 바람직하게는 pGA3426, pGA3428 또는 pGA3438이 사용 될 수 있다.

[0023] 바람직하게, 본 발명의 재조합 벡터는 LOC_Os02g05840 유전자와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 프로모터를 포함하는 재조합 벡터이다.

[0024] 예를 들어, 상기 프로모터는 식물체의 전신 또는 특별한 조직에만 국한시켜 발현되는 것이면 무엇이든 무방하며, 바람직하게는 전신발현 유도 하는 프로모터로서 예컨대 쌍떡잎식물용 프로모터로 사용되는 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터, 떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin), 옥수수 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자 프로모터 및 벼 시토크롬 C유전자(OsOcl)의 프로모터, 잎 등의 기타 조직 특이 프로모터로서 예컨대 벼와 옥수수 유래의 알비씨에스 (rbcS: ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 프로모터, 아그로박테리움 유래의 식물 뿌리 발현을 유도 하는 RoID 프로모터, 감자 유래 괴경 특이 발현 유도 파타틴 (patatin) 프로모터, 토마토 유래의 과일 성숙 특이 발현 유도 피디에스 (PDS: phytoene synthase) 프로모터, 본 발명 LOC_Os02g05840 유전자의 프로모터 등이다.

[0025] 보다 바람직하게, LOC_Os02g05840 유전자와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 서열번호 3으로 표시되는 프로모터인 LOC_Os02g05840의 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0026] "본 발명의 유전자"와 "기능적으로 동등한 절편"은 본 발명의 유전자와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분을 의미한다. 이러한 핵산 절편은 서열번호 1에 기재된 염기서열과 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지며, 이러한 핵산 절편은 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.

[0027] 상기 재조합 벡터는 통상의 벡터에 본 발명의 유전자를 도입한 것일 수 있으며, 이처럼 본 발명의 유전자를 도입하여 재조합 벡터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공지 방법에 따라 용이하게 실시 가능하다.

[0028] 또한 본 발명은 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질 전환 세포를 제공한다.

[0029] 상기한 재조합 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 형질전환 세포는 아그로박테리움 속 미생물인 형질전환 세포가 이용될 수 있으며, 보다 바람직하게, 아그로박테리움 속 미생물은 아그로박테리움 투메파시엔스 LB4404(Agrobacterium tumefaciens LB4404)가 이용될 수 있다.

[0030] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 임의의 식물 세포가 이용가능하다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 가능하다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 줄기, 잎, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다.

[0031] 또한 본 발명은 상기 벡터 또는 상기 형질전환 세포로 형질전환된 형질전환 단자엽 식물체를 제공한다.

[0032] 이러한 형질전환 단자엽 식물체는 도입된 LOC_Os02g05840 유전자에 의해 이삭 증가, 줄기 발달 또는 개화 시기 단축 등의 효과를 가짐으로써 단자엽 식물체의 수량성 증가 특성을 나타낸다.

[0033] "본 발명의 형질전환 단자엽 식물체"와 "기능적으로 동등한 형질전환 식물체"는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 변이체와 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 이용하여 제조된 형질 전환 단자엽

식물체로써, 이삭 증가, 줄기 발달 또는 개화 시기 단축 등에 의한 수량성 증가 효과가 실질적으로 동등한 특징을 가지는 형질전환 식물체이다.

[0034] 본 발명의 식물체의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키기 위한 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 예를 들어, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코딩된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.

[0035] 본 발명에서 형질전환되는 식물체는 본 실시예에서 사용된 벼(Oryza sativa L.)를 포함한 단자엽식물을 제한 없이 사용할 수 있다.

[0036] 바람직하게는 벼(Oryza sativa L.)가 사용된다.

[0037] 이러한 변이체는 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.

[0038] 또한 본 발명은 외래 프로모터를 이용 벡터로 식물을 형질전환시켜 이삭, 줄기, 개화시기 발달에 관여하는 유전자 LOC_Os02g05840 유전자를 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 형질전환 방법을 제공한다.

[0039] 바람직하게, 서열번호 1로 표시되는 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 벼에 상기 재조합 벡터를 도입하는 단계; 및 상기 재조합 벡터가 도입에 따라 이삭 증가, 줄기 발달, 개화시기 단축의 효과가 있는 벼 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 식물의 형질전환 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0040] 본 발명의 LOC_Os02g05840 유전자는 이삭 발달, 줄기 발달, 개화시기에 영향을 주어 수량성을 향상시키는 유전자로써, 벼를 포함한 다양한 곡물의 수량을 증대시키는 연구, 식물의 바이오매스 증가 연구, 사료 작물 연구 등에 이용 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 LOC_Os02g05840 유전자와 3A-10852 및 1B-21530 계통의 T-DNA 삽입 위치를 나타내는 도이다.

도 2는 3A-10852 및 1B-21530 계통의 개화 표현형 및 유전형에 따른 LOC_Os02g05840 transcript의 유무를 나타내는 도이다.

도 3은 LOC_Os02g05840 과발현 형질전환 단자엽 식물체 제조를 위한 벡터의 다이어그램을 나타내는 도이다.

도 4는 LOC_Os02g05840 유전자를 과발현하는 형질전환 벼의 LOC_Os02g05840 유전자 발현을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 LOC_Os02g05840 유전자를 과발현한 형질전환 벼의 표현형을 나타내는 도이다.

도 6은 LOC_Os02g05840 유전자 과발현 형질전환 벼의 신장 길이와 식물체의 절간(internode) 길이를 측정한 도이다.

도 7은 LOC_Os02g05840 유전자 과발현 형질전환 벼의 줄기 두께 및 횡단 모양을 나타내는 도이다.

도 8은 LOC_Os02g05840 유전자 과발현 형질전환 벼의 1차 및 2차 이삭 가지 수를 수치화 및 전체 종자 수 증가를 나타내는 도이다.

도 9는 LOC_Os02g05840 유전자 과발현 형질전환 벼의 세포 모양을 길이 및 폭을 중심으로 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 아래의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0043] <실시예 1> 수량에 영향을 미치는 개화 시기 조절 돌연변이 계통 선발

[0044] 수량성 증가에 영향을 주는 형질인 이삭, 줄기, 개화시기를 조절하는 유전자를 찾기 위해 10만 계통의 T-DNA 돌연변이 집단의 식물체 표현형을 관찰하였다. 이 중에서 개화 시기가 늦어지는 계통으로 두 계통 3A-10852와 1B-21530 을 선발하였다. 두 계통을 12 light/ 12 dark (단일 조건), 16 light/ 8 dark (장일 조건), 논 조건에서 키워 대조구인 동진 벼와 비교하여 개화 시기의 차이를 확인하였다.

[0045] 상기 개화시기에 대한 결과를 표 1에 나타내었다.

[0046] 표 1. 3A-10852와 1B-21530 계통의 개화 시기 변화

	단일 조건	장일 조건	논 조건
동진 벼	57.6±1.9(일)	74.7±3.0(일)	105.3±2.3(일)
3A-10852	68.2±0.5(일)	100.4±4.5(일)	134.4±3.0(일)
1B-21530	69.7±0.4(일)	100.2±5.0(일)	135.9±2.3(일)

[0047]

[0048] 표1에 나타난 바와 같이, 선발된 두 계통은 단일 조건, 장일 조건 또는 논 조건에서 모두 대조구인 동진 벼와 비교하여 개화시기가 늦추어진 것을 확인할 수 있었다.

[0049] <실시예 2> 3A-10852와 1B-21530 계통의 T-DNA 표지의 co-segregation 검증

[0050] T-DNA 삽입에 의해 만들어진 3A-10852와 1B-21530 계통은 각각 pGA2715, pGA2717 벡터에 의해 유전자가 trap 되었다. 두 계통에 대한 inverse-PCR 및 염기 서열 분석을 통해 T-DNA가 삽입된 염색체를 분석하였다.

[0051] 상기 선발된 2 계통의 벼 종자를 MSO 배지에 28℃에서 10일간 배양하였다. 이렇게 배양한 개체들의 잎 100mg을 채취하여 액체질소를 이용하여 급냉각한 후 분쇄하였다. 분쇄된 잎에서 one step buffer (1M Tris (pH9.5) 5ml, 0.5M EDTA 1ml, KCl 3.73g을 넣고 물로 50ml을 맞춰 조제하였다.)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

[0052] 3A-10852는 LOC_Os02g05840 유전자의 두 번째 intron에 T-DNA가 삽입된 계통으로 T-DNA 삽입위치 앞뒤에서 만들어진 프라이머(서열번호 5 및 서열번호 6)와 NGUS1 프라이머(서열번호 9)를 이용하여 PCR로 유전형 분석을 하였다.

[0053] 1B-21530은 LOC_Os02g05840 유전자의 세 번째 exon에 T-DNA가 삽입된 계통으로 삽입위치 앞뒤에서 만들어진 프라이머(서열번호 7 및 서열번호 8)와 NGUS1 프라이머(서열번호 9)를 이용하여 유전형을 분석하였다.

[0054] LOC_Os02g05840 유전자 내 3A-10852 및 1B-21530 삽입 위치 및 해당 서열은 도 1 및 서열번호 1에 나타내었으며 유전형 분석에 사용된 프라이머는 표 2에 나타내었다.

[0055] 표 2. 3A-10852 및 1B-21530의 프라이머

프라이머 정보	서열(5'-3')
3A-10852 F(서열번호 5)	GTGCCATCTTGAATGTGCTC
3A-10852 R(서열번호 6)	GGCGAGCATCTTAGCTATC
1B-21530 F(서열번호 7)	GCCGAGCAATACTTGACTGT
1B-21530 R(서열번호 8)	TCCTTCTGACAGCTTGCTT
NGUS1(서열번호 9)	AACGCTGATCAATCCACAG

[0056]

[0057] 도 1의 1은 서열번호 4의 뉴클레오타이드 160번 내지 178번이며, 2는 서열번호 4의 1627번 내지 2314번이며, 3A-10852 계통의 T-DNA 삽입위치는 2550이며, 3은 서열번호 4의 3298번 내지 3602이며, 1B-21530 계통의 T-DNA 삽입위치는 3591이며, 4는 서열번호 4의 3680번 내지 4917번이다. 도 1의 1 내지 4는 각각의 exon에 해당하는 서열이다.

[0058] PCR 반응은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 30초, 53℃에서 20초, 72℃에서 1분을 35회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 7분을 진행하였다. PCR 산물은 아가로스 젤을 이용하여 전기영동으로 확인하였다. 이를 통해 유전형을 확인하였다.

[0059] 그 결과를 도 2 A에 나타내었다.

[0060] 도 2 A는 순종(HO) 실험군 3A-10852 및 1B-21530의 개화시기를 야생형(WT)의 개화시기와 비교한 것을 나타내는 도이다. 도 2 A에 나타난 바와 같이, 순종(HO) 3A-10852 및 1B-21530의 꽃대가 나오는 시기에 야생형(WT)은 꽃

대가 이미 생성되었으며 종자가 발달되는 것을 확인할 수 있는 바, 그 개화 시기가 늦춰진 것을 확인할 수 있었다. 또한, PCR을 통한 유전형 분석 결과도 상기 결과를 뒷받침한다. 상단 밴드는 gene specific primer(서열번호 5 내지 서열번호 8)의 PCR 산물에 해당하며 하단의 밴드는 T-DNA의 RB(right border) 상의 NGUS1(서열번호 9)과 서열번호 5 또는 서열번호 7에 의한 PCR 산물에 해당한다. 두 실험군 모두에서 야생형(WT)은 gene specific primer에 의해서만 증폭되었으며 순종(HO)은 서열번호 5 또는 서열번호 7와 T-DNA의 RB(right border) 상의 NGUS1(서열번호 9)의해서만 증폭된 것을 확인할 수 있었다.

[0061] 즉, LOC_Os02g05840 유전자가 개화시기에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

[0062] 또한, 실제로 LOC_Os02g05840 유전자의 기능이 상실되었는지 확인하기 위해 도 1의 첫 번째 엑손에서 만들어진 프라이머(서열번호 10)와 도 1의 네 번째 엑손에서 만들어진 프라이머(서열번호 11)를 이용하여 mRNA가 만들어지는 확인하였다. 대조군으로 벼 유비퀴틴-5의 프라이머(서열번호 12 및 서열번호 13)를 사용하였다. 이와 같은 transcript 확인을 위한 프라이머는 표 3에 나타내었다.

[0063] 표 3. LOC_Os02g03670 transcript 확인용 프라이머

프라이머 정보	서열(5'-3')
LOC_Os02g05840 F(서열번호 10)	ATGGATCCACCCTA
LOC_Os02g05840 R(서열번호 11)	ATGCCAAAGTTCCATGCAG
ubi F(서열번호 12)	AACCAGCTGAGGCCCAAGA
ubi R(서열번호 13)	ACGATTGATTAAACCAGTCCATGA

[0064]

[0065] 두 계통의 종자를 MSO 배지에서 10일 키운 후, 개체들의 잎 100mg을 채취하여 액체질소를 이용해 급속냉동 시켰다. 냉동된 잎 조직을 분쇄하여 RNA iso buffer (takara, <http://www.takara-bio.com>)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 2 ug의 total RNA를 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison,WI,USA)를 이용하여 cDNA를 합성하고 합성된 cDNA는 PCR을 통해 확인하였다.

[0066] PCR 반응은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 30초, 53℃에서 20초, 72℃에서 2분을 25회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 7분을 진행하였다. PCR 산물은 아가로스 젤을 이용하여 전기영동으로 확인하였다.

[0067] 그 결과를 도 2 B에 나타내었다.

[0068] 도 2 B에 나타난 바와 같이, 순종(HO) 실험군 3A-10852 및 1B-21530에서 LOC_Os02g05840 유전자의 mRNA 생성이 없는 것을 PCR을 통해서 확인할 수 있었다. 도 2 B의 상단의 밴드는 LOC_Os02g05840의 mRNA primer(서열번호 10 및 서열번호 11)에 의한 PCR 산물에 해당하며 하단의 밴드는 벼의 ubiquitin 5의 specific primer(서열번호 12 및 서열번호 13)의 PCR 산물에 해당한다.

[0069] 즉, 유전형 분석을 통해 분리한 3A-10852 및 1B-21530은 대조군인 동진에 비해 개화가 늦어졌으며, 이 두 계통은 PCR을 통해 mRNA 유무를 관찰하였을 때 mRNA가 증폭되지 않았다.

[0070] 상기 결과를 통해 3A-10852 및 1B-21530 계통은 LOC_Os02g05840 유전자에 co-segregation 된 것이 확인되었다.

[0071] <실시예 3> LOC_Os02g05840 발현을 위한 유전자 클로닝

[0072] LOC_Os02g05840 유전자를 클로닝하기 위하여 상기 도 2 C에서 사용한 cDNA를 주형으로 표 3에 나타난 서열번호 10 및 서열번호 11을 이용하여 PCR을 수행하였다. 20 ng의 cDNA 주형과 각 프라이머 5 pmol을 사용하였다. PCR 반응은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 30초, 53℃에서 20초, 72℃에서 2분을 25회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 7분을 진행하였다. PCR 산물은 아가로스 젤을 사용하여 전기영동하고 정적크기의 사이즈 확인하고 분리 동정하여, pGA3724 벡터(sub-cloning용 벡터)에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다. 클로닝한 DNA를 HindIII와 Spe I으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단된 pGA3426 벡터(over-expression용 벡터)와 라이게이션을 28℃에서 3시간 수행하였다. 라이게이션 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 50μl과 혼합하여 1.5 ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 37℃ 오븐에 1분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 추가로 튜브에 넣은 다음 3시간 동안 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 카나마이신 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프랩하였다. 미니 프랩으로 얻은 DNA를 제한 효소 HindIII와 Spe I을 사용하여 절단 후 전기영동에서 아가로스 젤을 분리 하고서 밴드를 확인하였다. 얻어진 클로닝 DNA를 다시 분석하여 에러가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다. 이렇게 만들어진 LOC_Os02g05840 과다발현 식물체 제조를 위한 벡터의 다이어그램을 도 3에 나타내었다. 3730XL DNA

analyzer(AB,USA)와 BigDye v3.1(AB,USA)을 이용하여 염기서열 분석을 수행하였고 LOC_Os02g05840 유전자 내 서열을 이용한 프라이머들을 사용하였으며 이를 표 4에 나타내었다.

표 4. 염기 서열 분석을 위한 프라이머

프라이머 정보	서열(5'-3')
LOC_Os02g05840-1(서열번호 14)	CGCTTCTGCCACAATTTAGC
LOC_Os02g05840-2(서열번호 15)	TGTTGGTGCTGAAGTTCAGA
LOC_Os02g05840-3(서열번호 16)	TGGACTCAAATAATAACACT
LOC_Os02g05840-4(서열번호 17)	CCATTCTTTCTGATGAGATC
Tnos R(서열번호 18)	CCATCTCATAAATAACGTCATGC
pUbi F3(서열번호 19)	CAGCTATATGTGGATTTTTTTAGC

<실시예 4> 형질전환 세포의 제작

상기 실시예 3에서 제작한 식물 재조합 벡터를 추출하였다. 아그로박테리움 캄피터트 셀(Agrobacterium tumefaciens LB4404) 50 μ l와 10 μ g의 식물재조합 벡터를 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 액체질소에 1분 넣은 후, 37 $^{\circ}$ C 오븐에 5분을 다시 방치하는 과정을 3회 반복한 후 1 ml의 YEP 액체 배지를 넣은 다음 5시간 동안 28 $^{\circ}$ C 세이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 테트라사이클린 항생제가 든 YEP 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프랩한 후, HindIII와 Spe I 을 사용하여 효소 절단 후 사이즈를 확인하였다.

상기 생성된 형질전환된 아그로박테리움을 이용하여 벼의 형질전환 실험에 사용하였다.

<실시예 5> 형질전환 식물체의 제작

N6D 고체 배지에서 동진벼 종자를 30일 정도 28 $^{\circ}$ C 생장실에서 암 조건으로 키워서 벼의 캘러스를 생성하였다. 생성된 캘러스를 상기 실시예 4에서 얻은 식물 재조합 벡터로 형질 전환된 아그로박테리움을 72시간 키운 세포와 혼합하여 N6D-Acetosyringone 을 포함한 배지에서 22 $^{\circ}$ C 암처리 생장실에 방치하였다.

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

<실시예 6> 형질전환 식물체를 이용한 LOC_Os02g05840 유전자 발현 검증

재분화된 식물체에서 LOC_Os02g05840 발현이 증가된 것을 확인하기 위해 재분화된 식물체에서 total RNA를 분리 cDNA를 합성하여 Rotor-Gene 6000 PCR 기기를 이용하여 quantitative real-time RT-PCR을 수행하였다. 도 4 A의 네 번째 액손 및 5'UTR 부위에서 발현 확인에 사용될 프라이머를 제작하였다. 상기 프라이머는 표 5에 나타내었다.

표 5. 형질전환 식물체에서 LOC_Os02g05840 발현 검증 프라이머

프라이머 정보	서열(5'-3')
LOC_Os02g05840 EN+EX F (서열번호 20)	ACTGTGTTAAGGTGGTCAGG
LOC_Os02g05840 EN R (서열번호 21)	ATCAATGCAACGATCTGCTAC
LOC_Os02g05840 EX R (서열번호 22)	ATGCCAAAGTTCATGCAG

도 4 B에 나타난 바와 같이, 서로 다른 LOC_Os02g05840 과발현 형질전환 벼 OX1과 OX2에서 LOC_Os02g05840 발현을 관찰한 결과, 대조군 동진 벼에 비해 transcript의 양이 현저히 증가한 것을 확인하였다. 즉, LOC_Os02g05840 과발현 재조합 벡터를 이용해 LOC_Os02g05840 transcript가 증가한 형질전환 벼를 확인할 수 있었다.

<실시예 7> LOC_Os02g05840 과발현 형질전환 식물체를 형질 분석

LOC_Os02g05840 과발현 형질전환 벼의 표현형 관찰을 통해 변환된 형질을 확인하였다.

그 결과를 도 5 내지 도8에 나타내었다.

- [0089] 도 5는 형질전환 벼의 표현형을 나타내는 도이다. 형질전환 벼는 크게 3가지의 형질이 대조군과 비교하여 달라졌다.
- [0090] 첫 번째로 OX1과 OX2는 대조군에 비해 신장 길이가 길어졌으며 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0091] 도 6에 나타난 바와 같이, 신장 길이가 대조군과 비교하여 길어진 것을 확인 할 수 있다. 신장 길이는 식물체의 줄기 끝부터 이삭 끝까지를 측정하였다. 도 6 A 에서 대조군(control)의 평균 신장 길이는 122 cm이었으며, OX1 식물체 및 OX2 식물체의 평균 신장 길이는 각각 158과 173 cm이었다. 이 수치는 OX1 및 OX2 식물체가 대조군과 비교해 각각 30% 및 42% 의 길이가 길어진 것으로, 이러한 신장 길이의 증가는 절간(internode) 각각의 길이가 길어졌기 때문이다. 대조군과 두 계통의 형질전환체의 major 및 minor 절간 길이를 측정한 결과는 도 6 B에 나타내었다. 도 6 B에 나타난 바와 같이, 형질전환체 두 계통 모두가 대조군에 비해 모든 절간의 길이가 길어져 있음을 확인 할 수 있었다.
- [0092] 도 6에서 나타난 바와 같이 LOC_0s02g05840 발현이 증가하면 수량성에 관련된 형질인 신장이 길어지는 결과를 확인하였다. 즉, LOC_0s02g05840은 식물체의 신장 발달을 조절하여 수량성 증가에 중요한 역할을 할 수 있다.
- [0093] 두 번째로 두 계통의 형질전환체 모두가 대조군과 대비하여 줄기 두께가 두꺼워진 것을 확인할 수 있었다.
- [0094] 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0095] 도 7 A에 나타난 바와 같이, 버니어캘리퍼를 이용해 각 절간의 마디 위 4cm 위치에서 대조군과 두 계통의 형질전환체 OX1 식물체와 OX2 식물체의 major 및 minor 줄기의 두께를 측정하였다. 형질전환체의 major 줄기 두께는 대조군에 비해 평균 19% 두꺼워졌고, minor 줄기 두께는 평균 20% 두꺼워져 있음을 확인할 수 있었다.
- [0096] 이를 세포단위에서 확인하기 위해 section을 하여 관찰하였다.
- [0097] section을 통한 절간의 관찰을 위해 개화가 이루어지고 30일이 지난 식물체의 세 번째 절간을 잘라 FAA fix 용액 (formalin (35%): acetic acid: alcohol (70%) = 1:1:18)에 담구어 세포를 고정시켰다. 절간 조직은 LEICA RM2265 section 기기를 이용하여 1um 이내로 횡단으로 자르고, 슬라이드 글라스 위에 놓고 커버글라스로 고정한 후 0.05% toluidine blue 용액으로 염색하여 광학현미경에서 20-40배율로 단면을 관찰하였다.
- [0098] 그 결과를 도 7 B에 나타내었다.
- [0099] 도 7 B에 나타난 바와 같이, OX1 식물체는 대조군에 비해 줄기 두께가 두꺼워졌음을 확인할 수 있었다.
- [0100] 즉, LOC_0s02g05840 유전자는 줄기의 길이 신장뿐만 아니라 두께 발달에도 영향을 미치는 것을 통해 전체적인 줄기 발달에 관여하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0101] 세 번째로 main tiller의 전체 종자 수가 증가하였다.
- [0102] 형질전환체는 대조군에 비해 1차 이삭 가지 수 및 2차 이삭 가지 수가 증가하여 전체 종자 수가 증가하였으며, 이를 도 8에 나타내었다.
- [0103] 도 8에 나타난 바와 같이, 도 8 A에서 형질전환체는 대조군과 비교하여 1차 이삭 가지 수가 40% 증가하였고, 도 8 B에서 형질전환체는 대조군과 비교하여 2차 이삭 가지 수 가 28% 증가하였다. 이삭 가지 수의 증가는 전체 종자 수의 증가를 가져오는 바, 도 8 C에서 나타난 바와 같이, OX1 식물체의 종자 수가 대조군에 비해 47% 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0104] 도 8의 결과는 수량을 증가시키는 요소 중의 하나인 신장 길이를 조절하는 역할뿐만 아니라, 직접적으로 종자의 수를 증가시켜 수량을 증대할 수 있는 것을 보여준다.
- [0105] <실시예 8> LOC_0s02g05840 과발현 형질전환 세포학적 관찰
- [0106] 상기에서 보여준 LOC_0s02g05840 과다 발현체가 보여주는 형질의 변화를 세포학적으로 관찰하고자 하였다.
- [0107] 세포의 종단면 관찰하여 세포의 크기와 수를 관찰하고자 개화가 이루어지고 30일이 지난 식물체의 세 번째 절간을 잘라 FAA fix 용액 (formalin (35%): acetic acid: alcohol (70%) = 1:1:18)에 담구어 세포를 고정시켰다. 절간 조직은 LEICA RM2265 section 기기를 이용하여 1um 이내로 종단으로 자르고, 슬라이드 글라스 위에 놓고 커버글라스로 고정한 후 0.05% toluidine blue 용액으로 염색하여 광학현미경에서 20-40배율로 단면을 관찰하였다.
- [0108] 도 9 A에 나타난 바와 같이, OX1 형질전환체의 세포는 대조군에 비해 크기가 작고 같은 범위 내에서 세포수가

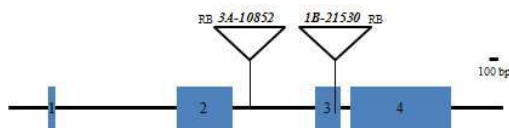
많은 것을 확인할 수 있었다. 이를 수치화하여 관찰하였을 때 도 9 B에 나타난 바와 같이, 형질전환체의 세포는 대조군에 비해 길이가 40% 정도로 작아진 것을 확인할 수 있었다.

[0109] 즉, 도 9는 도 6 및 도 7에서 줄기의 신장 및 두께 증가에 대한 효과가 식물체를 구성하는 세포 수가 증가함에 따른 신장 및 두께 증가에 의한 것임을 뒷받침해 준다.

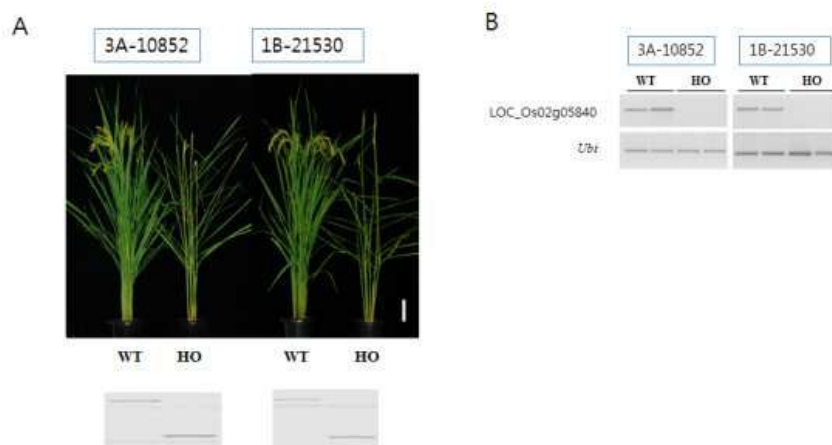
[0110] 상기 결과를 바탕으로 LOC_Os02g05840 유전자는 개화시기, 신장 길이 및 이삭 수량 증대와 같은 수량성 증가와 관련되는 여러 형질을 한 유전자를 통해서 조절할 수 있음을 보여준다. 즉, LOC_Os02g05840 유전자를 통해 수량성 증가를 이룰 수 있음을 확인하였다.

도면

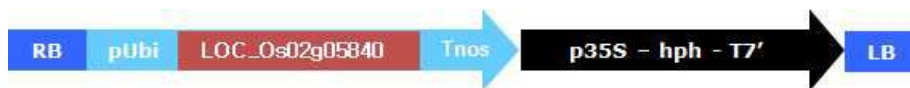
도면1



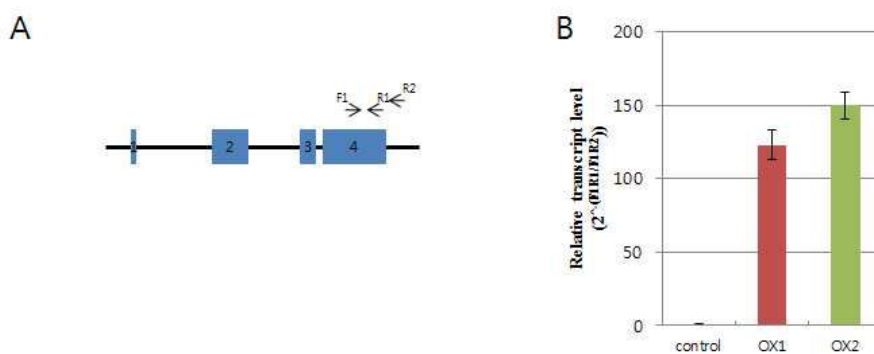
도면2



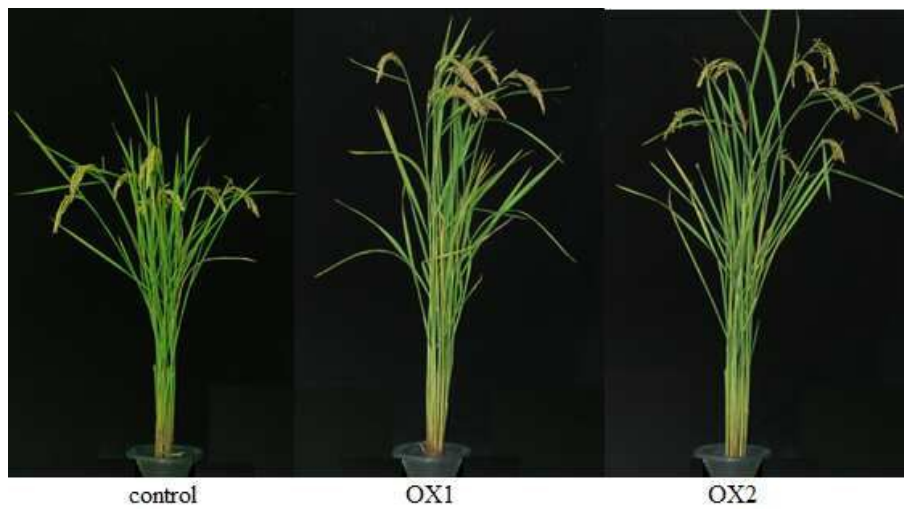
도면3



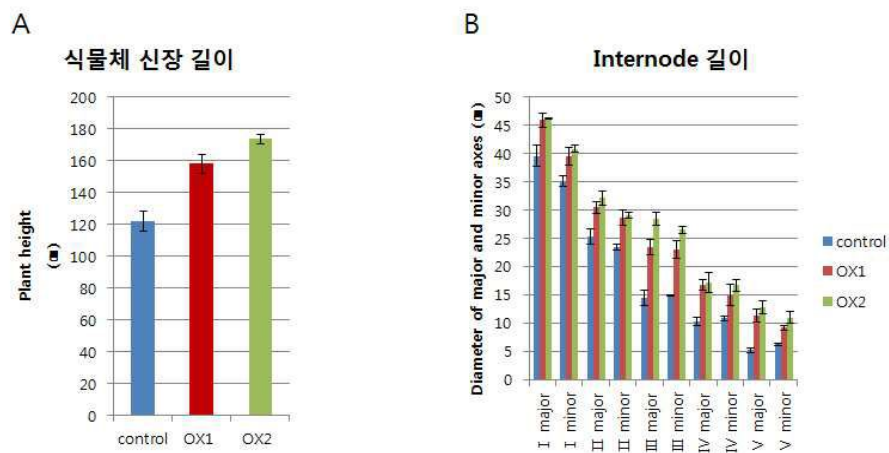
도면4



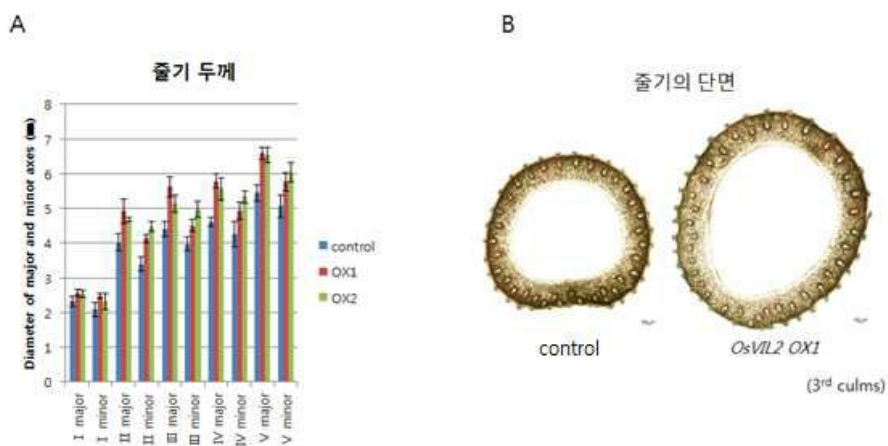
도면5



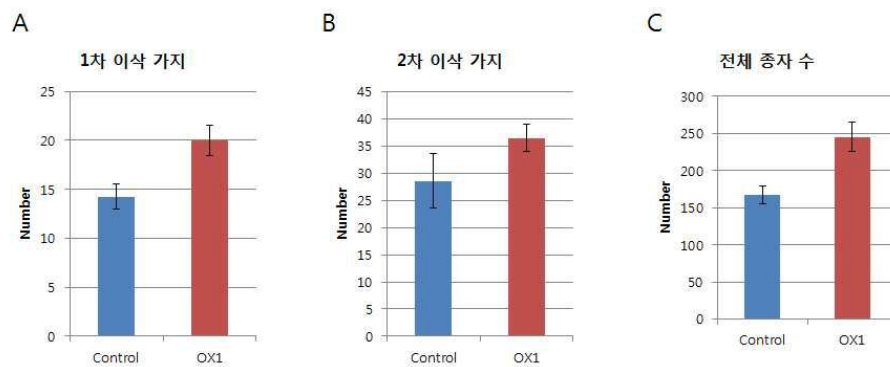
도면6



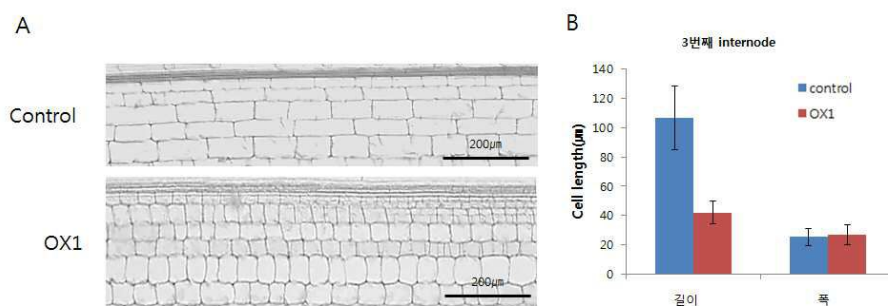
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> LOC_Os02g05840 gene, recombinant vector comprising the same, transformed plants thereby and method for preparation thereof for a yield-enhancing of *Oryza sativa*
- <130> P12-086-KHU
- <160> 22
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 2247
- <212> DNA
- <213> *Oryza sativa*
- <220><221> CDS
- <222> (1)..(2247)
- <223> LOC_Os02g05840
- <400> 1

atg gat cca ccc tac gca gga gta cct att gat cct gct aaa tgc cga

48

Met Asp Pro Pro Tyr Ala Gly Val Pro Ile Asp Pro Ala Lys Cys Arg	
1 5 10 15	
ttg atg agt gtg gat gaa aag cgg gaa ctt gtc cgt gaa tta tcg aag	96
Leu Met Ser Val Asp Glu Lys Arg Glu Leu Val Arg Glu Leu Ser Lys	
20 25 30	
cgg cca gaa agt gct cct gac aaa ctg cag tct tgg agt cgc cgt gaa	144
Arg Pro Glu Ser Ala Pro Asp Lys Leu Gln Ser Trp Ser Arg Arg Glu	
35 40 45	
att gta gag att ctt tgt gct gat tta gga agg gaa agg aag tac act	192
Ile Val Glu Ile Leu Cys Ala Asp Leu Gly Arg Glu Arg Lys Tyr Thr	
50 55 60	
gga tta tcg aag cag aga atg ttg gaa tat ctc ttc aga gtt gtg act	240
Gly Leu Ser Lys Gln Arg Met Leu Glu Tyr Leu Phe Arg Val Val Thr	
65 70 75 80	
ggc aaa tca tct ggt ggt ggc gtt gtg gag cat gtg caa gag aag gag	288
Gly Lys Ser Ser Gly Gly Gly Val Val Glu His Val Gln Glu Lys Glu	
85 90 95	
cct acc cct gaa ccc aac aca gcc aac cat cag tcc cct gcg aaa cgg	336
Pro Thr Pro Glu Pro Asn Thr Ala Asn His Gln Ser Pro Ala Lys Arg	
100 105 110	
cag cga aag agt gac aac cca tca cga cta cca att gtt gca agc agt	384
Gln Arg Lys Ser Asp Asn Pro Ser Arg Leu Pro Ile Val Ala Ser Ser	
115 120 125	
cca act aca gaa ata ccc agg cca gca agt aat gct cgc ttc tgc cac	432
Pro Thr Thr Glu Ile Pro Arg Pro Ala Ser Asn Ala Arg Phe Cys His	
130 135 140	
aat tta gct tgc aga gcg act ctt aat cca gaa gat aaa ttt tgc aga	480
Asn Leu Ala Cys Arg Ala Thr Leu Asn Pro Glu Asp Lys Phe Cys Arg	
145 150 155 160	
cgc tgt tca tgc tgt att tgt ttc aag tac gat gac aat aag gat cct	528
Arg Cys Ser Cys Cys Ile Cys Phe Lys Tyr Asp Asp Asn Lys Asp Pro	

165	170	175	
agc ctc tgg tta ttc tgt agt tca gat caa ccc ttg cag aaa gat tct			576
Ser Leu Trp Leu Phe Cys Ser Ser Asp Gln Pro Leu Gln Lys Asp Ser			
180	185	190	
tgt gta ttt tcg tgc cat ctt gaa tgt gct ctt aag gat gga aga act			624
Cys Val Phe Ser Cys His Leu Glu Cys Ala Leu Lys Asp Gly Arg Thr			
195	200	205	
ggc atc atg cag agt ggg cag tgc aag aaa ctt gat ggt ggt tat tac			672
Gly Ile Met Gln Ser Gly Gln Cys Lys Lys Leu Asp Gly Gly Tyr Tyr			
210	215	220	
tgc act cgc tgt cgg aaa cag aat gat ctg ctt ggg tcc tgg aag aaa			720
Cys Thr Arg Cys Arg Lys Gln Asn Asp Leu Leu Gly Ser Trp Lys Lys			
225	230	235	240
caa ctg gtg ata gct aaa gat gct cgc cgg ttg gat gta ttg tgt cat			768
Gln Leu Val Ile Ala Lys Asp Ala Arg Arg Leu Asp Val Leu Cys His			
245	250	255	
cgg att ttt ttg agt cat aag att ctt gtc tcc acg gag aag tac ttg			816
Arg Ile Phe Leu Ser His Lys Ile Leu Val Ser Thr Glu Lys Tyr Leu			
260	265	270	
gtt ttg cat gaa att gtt gac aca gcg atg aag aaa ctg gag gct gag			864
Val Leu His Glu Ile Val Asp Thr Ala Met Lys Lys Leu Glu Ala Glu			
275	280	285	
gtt ggt cct ata tct gga gtt gca aat atg ggt cgt gga att gtg agc			912
Val Gly Pro Ile Ser Gly Val Ala Asn Met Gly Arg Gly Ile Val Ser			
290	295	300	
cgg ctt gct gtt ggt gct gaa gtt cag aaa ctt tgt gct cga gca ata			960
Arg Leu Ala Val Gly Ala Glu Val Gln Lys Leu Cys Ala Arg Ala Ile			
305	310	315	320
gaa acc atg gag tct ctg ttt tgt gga tct cct tct aac ttg caa ttt			1008
Glu Thr Met Glu Ser Leu Phe Cys Gly Ser Pro Ser Asn Leu Gln Phe			
325	330	335	

caa cgt tca cgg atg ata cca tca aac ttc gta aag ttt gaa gct ata	1056
Gln Arg Ser Arg Met Ile Pro Ser Asn Phe Val Lys Phe Glu Ala Ile	
340 345 350	
acc caa aca tct gtc act gta gtt ttg gat ttg ggt cct ata ctt gct	1104
Thr Gln Thr Ser Val Thr Val Val Leu Asp Leu Gly Pro Ile Leu Ala	
355 360 365	
caa gat gta aca tgc ttt aat gta tgg cac aga gtg gca gcc aca ggc	1152
Gln Asp Val Thr Cys Phe Asn Val Trp His Arg Val Ala Ala Thr Gly	
370 375 380	
tcg ttc tca tca agt cca act ggc atc ata ctt gca cca tta aaa acg	1200
Ser Phe Ser Ser Ser Pro Thr Gly Ile Ile Leu Ala Pro Leu Lys Thr	
385 390 395 400	
tta gtg gtc act caa ctt gtg cca gct aca agc tat ata ttc aag gta	1248
Leu Val Val Thr Gln Leu Val Pro Ala Thr Ser Tyr Ile Phe Lys Val	
405 410 415	
gtt gcc ttc agt aac tac aag gag ttt gga tcg tgg gaa gcc aaa atg	1296
Val Ala Phe Ser Asn Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Trp Glu Ala Lys Met	
420 425 430	
aag aca agc tgt cag aag gaa gtt gat ctg aag ggt ttg atg cca ggt	1344
Lys Thr Ser Cys Gln Lys Glu Val Asp Leu Lys Gly Leu Met Pro Gly	
435 440 445	
ggg tct ggg cta gac caa aac aat ggg agc cca aag gca aac agt ggt	1392
Gly Ser Gly Leu Asp Gln Asn Asn Gly Ser Pro Lys Ala Asn Ser Gly	
450 455 460	
ggg cag tct gat cct tct tca gaa ggt gtg gac tca aat aat aac act	1440
Gly Gln Ser Asp Pro Ser Ser Glu Gly Val Asp Ser Asn Asn Asn Thr	
465 470 475 480	
gcg gtg tat gct gat ctc aat aaa tca cca gaa agt gat ttt gaa tat	1488
Ala Val Tyr Ala Asp Leu Asn Lys Ser Pro Glu Ser Asp Phe Glu Tyr	
485 490 495	
tgt gaa aat cct gag ata ctt gat tca gac aaa gca agt cat cac ccc	1536

Cys Glu Asn Pro Glu Ile Leu Asp Ser Asp Lys Ala Ser His His Pro	
500 505 510	
aat gaa cct aca aac aac tca cag agt atg ccg atg gtc gta gct agg	1584
Asn Glu Pro Thr Asn Asn Ser Gln Ser Met Pro Met Val Val Ala Arg	
515 520 525	
gtt acg gag gta tct gga ttg gag gaa gct cct gga ctc tca gca tca	1632
Val Thr Glu Val Ser Gly Leu Glu Glu Ala Pro Gly Leu Ser Ala Ser	
530 535 540	
gct ttg gac gag gag ccc aat tca gca gtt caa aca caa tta ctt aga	1680
Ala Leu Asp Glu Glu Pro Asn Ser Ala Val Gln Thr Gln Leu Leu Arg	
545 550 555 560	
gaa tcc tca aat tca atg gag cag aac cag aga agc gaa gtt cct gga	1728
Glu Ser Ser Asn Ser Met Glu Gln Asn Gln Arg Ser Glu Val Pro Gly	
565 570 575	
tca cag gat gca tca aat gct cct gct gga aat gag gtg gtg att gtt	1776
Ser Gln Asp Ala Ser Asn Ala Pro Ala Gly Asn Glu Val Val Ile Val	
580 585 590	
cca cct cga tat tct ggc tct att cca cca act gca cct aga tat atg	1824
Pro Pro Arg Tyr Ser Gly Ser Ile Pro Pro Thr Ala Pro Arg Tyr Met	
595 600 605	
gaa aat ggt aag gat atc agt ggg agg agc ttg aaa gca aaa cct ggt	1872
Glu Asn Gly Lys Asp Ile Ser Gly Arg Ser Leu Lys Ala Lys Pro Gly	
610 615 620	
gat aac atc ctt caa aat ggc tct tcc aag cct gaa agg gaa cca ggg	1920
Asp Asn Ile Leu Gln Asn Gly Ser Ser Lys Pro Glu Arg Glu Pro Gly	
625 630 635 640	
aat tct tca aat aaa aga aca tca ggt aaa tgt gag gaa atc ggc cac	1968
Asn Ser Ser Asn Lys Arg Thr Ser Gly Lys Cys Glu Glu Ile Gly His	
645 650 655	
aag gat gga tgc cca gaa gca tct tat gag tac tgt gtt aag gtg gtc	2016
Lys Asp Gly Cys Pro Glu Ala Ser Tyr Glu Tyr Cys Val Lys Val Val	

660	665	670	
agg tgg ctg gaa tgt gag ggt tac att gag acc aac ttc aga gtg aag			2064
Arg Trp Leu Glu Cys Glu Gly Tyr Ile Glu Thr Asn Phe Arg Val Lys			
675	680	685	
ttt ctg act tgg tat agc ctt cgt gct acc cct cat gac agg aag ata			2112
Phe Leu Thr Trp Tyr Ser Leu Arg Ala Thr Pro His Asp Arg Lys Ile			
690	695	700	
gtc agc gtc tac gta aac act ctt att gat gat cct gtt agc ctt tct			2160
Val Ser Val Tyr Val Asn Thr Leu Ile Asp Asp Pro Val Ser Leu Ser			
705	710	715	720
ggc cag ctt gct gac act ttc tct gag gcc atc tac agc aaa agg cca			2208
Gly Gln Leu Ala Asp Thr Phe Ser Glu Ala Ile Tyr Ser Lys Arg Pro			
725	730	735	
cct tct gtt cgc tcc ggt ttc tgc atg gaa ctt tgg cat			2247
Pro Ser Val Arg Ser Gly Phe Cys Met Glu Leu Trp His			
740	745		
<210>	3		
<211>	3000		
<212>	DNA		
<213>	Oryza sativa		
<220><221>	promoter		
<222>	(1)..(3000)		
<223>	Promoter of LOC_Os02g05840		
<400>			
>	3		
ttggttccta aactctcaaa atacatatcc aaagtcccaa aacttatcaa aatatgttat			60
ttaggtctca aatcgccaca acctcttcag aattttacgt ggggctcccc acatggatgt			120
ggcgtggtat catcttgact gaaaaatagg acccacttat tttttttctt tttttttctt			180
ttctttttcc ttctcttttt ttctcttttc tgttcctttc tctgtgacct gagtacccca			240
tgcggcggta gcctattttt agtgagagga aggagaagaa atgaaaaaaa taagagaagg			300
agaagaaaaa taattttttt taagtaggtc ccatttttaa gtcaagatta tgctacatca			360
cattcgtgtg gtatgccata tcagcgccat gtagaattct agacctatat gacactttaa			420

caagttttga gatctagatt tacatttaag agattgggga cctagatgac actctaagga	480
ctgctcatgc actttactct atttttctag aaatgtcggc accttctttg tgatcctggt	540
cgaatttgag gaggtttttg cttaaaacaa atccaaaacg acttataaac ttgacaagtt	600
tagatatttg ttacaaacga cttatattaa cgacaaatct agacaatctt ttatctaaaa	660
cctaagctct aaccatttgc ccagattagi tatattagag caagttaat agtatagccc	720
actactagct ccaatttacc tatagccaat ctaatagcta attcatacaa tagttgttta	780
ctatactatt aatataatgg ctcacctgtc atacacatac tgtgtcttgg agtccgtgct	840
acagctggct acagatctgt agactgcttc tcttatctct catcttttat ctcattaaaa	900
tatgtttata gctgactaat agtctgctat tgtacctgct tttaggaggg gttatatttg	960
gttgagtatt tttcgggacg gatggagtac actgcaatat agctgtagaa tattcataaa	1020
attttctcta aaaaatactc ctcgtgaaat gattgttcat tagtcttaag tatactccta	1080
ggtcacaaaa aattgccaa tgaggcttta ataaaagaaa gggagaaaagg cgtttgcact	1140
gcatgcagca actgcagcag tagtggtagi taattaatta attaattaat aatggcgatc	1200
gacagctcag ctcggaagac gatgcccacc cctctctcgg aggccgaggc cgcacgaatc	1260
ttgaagcgcc tagccgttcg ccgcgcgtgc cgcgggcggc ggaggcggtg gccacgtaag	1320
cgcgcgcgc acgcatgcag ccgtcggatt ccgattcctt ttgccgttt tcccgtctgc	1380
ccccctcgtt ctcgcgcgc tttaaaccta gagtaatcaa tcaattgatt tattggtaat	1440
tcacgattaa ttaattgttt tctttctcca tcaaccccaa ttaggttata aattatgctt	1500
atatacccta atgtataaag tattctttta ttctagtact ttatactagc actattactc	1560
catactattg tactccctcc attccaaatt gactacatat agtttttttt aaggttattc	1620
ctaaatgac tacatatattg tgcttattta ttaagtctat tcgttacttg tgcattggag	1680
taaatagaca ttgatgcatg catccatgca cacaagtatt tataacacac atgcaatac	1740
ttgatttgct attggctagg aaatagtggg gatggtgttt gagtttggtt ctagaataaa	1800
tatagtatga gagagttatt agcttttctt ggtcttggtg tacctatgaa atatgtatg	1860
caatttgaaa tggaggaggt actatagtag atgtagatcc actggattat gatttggag	1920
gaagattatg acggtgtgta tagtatagta ttggtgttag ctgaatgcac cttttacaaa	1980
atggcatatt gtttgtttgc gtcttagata catgtcattt taattatcaa tgtcatctgc	2040
caaatacaat tcttttcattg tgttttattt tactataatc aactacagg catatttgtg	2100
acaaaaaaaa gaatgggaat tatgtggtag tatgtatcac tttatcatgt atatgtatg	2160
caggagagctt agctaagcga agactacatt taatattgat tagcggatct aattacacac	2220
aaacggttgg ttcaactaac cctacaactt gttacgtgcg atcctataag cttttgttta	2280

tattgtacgt aaactatata aaaatgacct aaaaataact caattgaaat atgaatcaac 2340
gcgacaaaaa tctacaagat gtttggtaca gttgaactcc agctgtgtga cacttacaac 2400
tacaatacca agagatcgaa atatacaact ttggtgttac agcgtaccg gctataccca 2460
tagcccaacc acatgtcaga cctcatccaa ccctagatcc accgcaactc gatattatca 2520

cacttctcaa cctactctta ttatcatact acaagcttgt tagcttggtt acaatgtatg 2580
ctaatttgaa gctctgaact atgaacacga actataccac tattactatt ttgccaaca 2640
aaccccaagt agagccgcct aaccaacaac caacctcgtt gaccgctaga gccgctaac 2700
actctggagt cgggacctat caccgaatac gcgagaaccc gaggaccaa ccgcaaaagc 2760
ctcacctcac cctaggcttt gatatgcgtg cggacgccta aggctaggag ttaacctcgc 2820
glagagagag agagagagag agagagataa ctagcagagc actcgcggag gcgaggagag 2880
agagagagag agagagaggt tggaagagga ggggagagtc cacgtgagt agaggaggag 2940

gaggaggagg agatccctct cccgcgcgca tccgccctc tcgccgatcc ccaattcgcc 3000
3000

<210> 4
<211> 5619
<212> DNA
<213> Oryza sativa
<220><221> gene
<222> (1)..(5619)
<223> LOC_Os02g05840
<400> 4

gagagataac tagcagagca ctgcggagg cgaggagaga gagagagaga gagagaggtt 60
ggaagaggag gggagagtcc acgtgagtga gaggaggagg aggaggagga gatccctctc 120
ccgcgcgcac ccgcccctct cgccgatccc caattcgcca tggatccacc ctacgcaggt 180

cggtcagcgc cgccccgca tccgcggttt tcgccttgtt tttttttttt gttgttgttg 240
ttgcgtgtgt gtggtggtgg tgatggctca ggtctcgcgg cggcgtcggg gggagctcga 300
tctgtttgtt ccggcgacga atccgctgtt ccggcggtgt aattgcgggc ttggtggtgg 360
aggaggagga atttgtgggc gtggatttta ggggtgggagg cggttttttt ttttttgggg 420
ggggggtggt gtagtggtcg tcgagattta gactttttgt gtggatggat ggatgggtta 480
gattatgcgc gcgtggatta gattcggcgc gtagagggtt tgtactgttc attgattggt 540
ttgttgggtt gatttggagc ttagctgat gcgtggtaga ggggtggagg tggaagcgcg 600

ttggggaggg tggatggcga tgccgctggt gtcagattcg ccgctgcatg cggatgatggg	660
tactcacatt gcgccccctc tctaccgggg gaggtggcag cggagtgggt cctgcggctt	720
tacgtcgttt tcgtgggatt tacgtccgcg ggcggttgga gcagcagcct atcctctttt	780
gggacgggaa aataatatgg cgttaggctg tttaggcct cctgttcgtg cgttgggtgt	840
tgcattggtg ctgatttggt gggatcacgg ctgccgaagg cgggtttgtt tgctgttagt	900
tgatggaag gattggctga tacgtcgatt atatcttcta gaggagctgc gtctacttgc	960
atgtcaaggt taccacgttt aggggttata tgattgatga tagtttcttt gtttagtggt	1020
ccaaaattag aaagactcat ttcttttttag tttctcgtt tcccttagac agtctgtaga	1080
gagttgactt tctgcggctc gtgccagctt cgatagctct agttaacatt gcgccttggt	1140
glatcacaac tgtgctttgt agttcacatt tagtcctata caatatggta catgttgatg	1200
agcctttaat tcttagatta ttgaccgaat catctttttt ttccgaggtt aagacttatt	1260
ctgttgcaat gtgctataat tataatttga cttctactcc agtaagacag tgtgctactc	1320
acattaattt gattcagcat gtcgagaatt taatttcctt tggaacgtca ttcattgagt	1380
ttttccttgc acgctaagtt actcagtacc gtctcatagt tgttctgaag aagagaaaga	1440
atgatgcctt caaaatatgt attcttctac tggatctaata gaactttaaa cctttccatt	1500
ctggactgta aatatgaatg aacgtctaaa tttccttcgt tgtttgcttc ttgtccgact	1560
ggattttgta actatttctg actttatcaa attgataata atagtittca gtgttctctt	1620
gtttaggagt acctattgat cctgctaaat gccgattgat gagtgtggat gaaaagcggg	1680
aacttgctcg tgaattatcg aagcggccag aaagtgtcc tgacaaactg cagtcttgga	1740
gtcgccgtga aattgtagag attctttgtg ctgatttagg aagggaagg aagtacactg	1800
gattatcgaa gcagagaatg ttggaatatc tcttcagagt tgtgactggc aatcatctg	1860
gtggtggcgt tgtggagcat gtgcaagaga aggagcctac cctgaaccc aacacagcca	1920
accatcagtc cctgcgaaa cggcagcgaa agagtgacaa cccatcacga ctaccaattg	1980
ttgcaagcag tccaactaca gaaatacca ggccagcaag taatgctcgc tctgccaca	2040
atttagcttg cagagcgact cttaatccag aagataaatt ttgcagacgc tgttcattgt	2100
gtatttgttt caagtacgat gacaataagg atcctagcct ctggttattc ttagttcag	2160
atcaaccctt gcagaaaagt tcttggtat tttcgtgcca tcttgaatgt gctcttaagg	2220
atggaagaac tggcatcatg cagagtgggc agtgcaagaa acttgatggt ggttattact	2280
gcactcgctg tcggaaacag aatgatctgc ttgggtattc tccctaaaca actttattat	2340
ttgcacagtt ttttttctg ttctgtaact atacgaaatt atgttttaat tattcctatg	2400
cctccagttt ttactgcctt aagtaatgtt accattattt attgcaacga taactactag	2460

aaatatgtta gtttgacttt tgtgagagtt agctttgata atttgcacgc attcttgctt	2520
tccagccact ttgattacct tactgattct gtttttagga ttcttcggtg aagatccttg	2580
tagtgtcatc atcattgggc caatcatatg atgcataatt ctcaattgtg tcttaagaag	2640
tgggttggct gcttttgccc ttacagcttca tgccttgagc ttgtggctctg tgtgcttact	2700
tctgcattaa gctgaattag tgttggattc ttccttctcc atctggagta aatttgtttg	2760
ctgggataac cctattttca taggttgcca gctgcgaaaa caggctttcg actgcatttt	2820
ggtgtctttg tgttgattc catagggttc ttgtagtca agtttcaggg tatgaaccaa	2880
gttactaagc cagtaaaact tggtaggcca ctgaggccag gtggattcaa tattttcaag	2940
gatgaataga tcatggagaa atgcttagac tagtatatgc aaggagtctc taatttgtct	3000
gtgcatgttt ataagccatt tgagtaacct gggaaatagg attcattttg aagttttgaa	3060
ctacaagaca agtgattaat tgtctttctc aaaagaatct gcttggctat tagtatcttg	3120
tagtagtaag ttttgaacca gttatatgtt atttagagtt caagattctt tggccagtcc	3180
agcacaatgc acttaagtaa ttcaatcaag ttactggcc cattttccaa aactatgctc	3240
ctttcaagag ttggatatt gaaacagtaa attagcttgc cgagcaatac ttgactgttt	3300
aatgccttgt tcaggctctg gaagaacaa ctggtgatag ctaaagatgc tcgccggttg	3360
gatgtattgt gtcacggat ttttttagt cataagattc ttgtctccac ggagaagtac	3420
ttggttttgc atgaaattgt tgacacagcg atgaagaaac tggaggctga ggttggctct	3480
atatctggag ttgcaaatat gggctgtgga attgtgagcc ggcttgctgt tggctgtgaa	3540
gttcagaaac tttgtgctcg agcaatagaa accatggagt ctctgttttg tggatctct	3600
tctaacttgc aatttcaacg taagtttcca cgtgtttcac gttagaccac atacatacaa	3660
atagtgttga attctcatgc atatgtgcat ttccaggttc acggatgata ccatcaaact	3720
tcgtaaaagt tgaagctata acccaaacat ctgtcactgt agttttggat ttgggtccta	3780
tacttgtcca agatgtaaca tgccttaattg tatggcacag agtggcagcc acaggctcgt	3840
tctcatcaag tccaactggc atcatacttg caccattaaa aacgttagtg gtcactcaac	3900
ttgtgccagc tacaagctat atattcaagg tagttgcctt cagtaactac aaggagtttg	3960
gatcgtggga agccaaaatg aagacaagct gtcagaagga agttgatctg aagggtttga	4020
tgccaggtgg gctctgggcta gacaaaaca atgggagccc aaaggcaaac agtgggtggc	4080
agtctgatcc ttcttcagaa ggtgtggact caaataataa cactgcggtg tatgctgac	4140
tcaataaatc accagaaagt gattttgaat attgtgaaaa tcctgagata cttgattcag	4200
acaaagcaag tcatcacccc aatgaacctc caaacaactc acagagtatg ccgatggctg	4260
tagctagggt tacggaggta tctggattgg aggaagctcc tggactctca gcatcagctt	4320

tggacgagga gcccaattca gcagttcaaa cacaattact tagagaatcc tcaaattcaa 4380

tggagcagaa ccagagaagc gaagttcctg gatcacagga tgcatcaaat gtcctgctg 4440

gaaatgaggt ggtgattgtt ccacctgat attctggctc tattccacca actgcaccta 4500

gatatatgga aaatggtaag gataatcagt ggaggagctt gaaagcaaaa cctggtgata 4560

acatccttca aaatggctct tccaagcctg aaaggggaacc agggaattct tcaaataaaa 4620

gaacatcagg taaatgtgag gaaatcggcc acaaggatgg atgccagaa gcatcttatg 4680

agtactgtgt taagggtgct aggtggctgg aatgtgaggg ttacattgag accaacttca 4740

gagtgaagtt tctgacttgg tatagccttc gtgctacccc tcatgacagg aagatagtca 4800

gcgtctacgt aaacactctt attgatgac ctgttagcct ttctggccag ctgtctgaca 4860

ctttctctga ggccatctac agcaaaaggc caccttctgt tcgctccggt ttctgcatgg 4920

aactttggca ttaaagagag gggagctcgt accgttctct ttgtagggga gcatattttg 4980

gtcccatctt ttcgtagcag atcgttgcat tgattcttca ttggaaattt cattgaagcg 5040

gttaacttat acaatctgtt cattgctcta ctttatttgc tatgacagta ggtttaattt 5100

atccagcaac ttatttctgt tttttcactt aggagtccat agtttacagt tctgttatec 5160

gtaccgcat gttggtacag agcatcaaga gctgtgctct tttggtcagc tttaggaaca 5220

ttctgaaatt gccacaagtg tgtgggtacc tgaagctctg ttgctagctg ctgtgagagg 5280

gagggatgat tctcaggatg taccgggaaa cattgggatg aagcaggctt cgtgtcgaca 5340

ctgacgaatc cgagctaacc atgccttgct aggataaatg atgatgtggt gctgtatctg 5400

gggttgaaag aaatgcaaat gtgctgctga cttctatggg gaatgggagg agtcctgatg 5460

tttttcttt tcttaagaca atagatgcaa aatgtctgca ctaatgttat gttcggttta 5520

gaccttgct tttactgtct cctactgcac tttcttgct tctagttcta ccgtttgaga 5580

agttaaattt atgtgcacat gcaaaaaggt ttggacctt 5619

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of 3A-10852

<400> 5

gtgccatctt gaatgtgctc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of 3A-10852

<400> 6

ggcgagcatc tttagctatc 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of 1B-21530

<400> 7

gccgagcaat acttgactgt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of 1B-21530

<400> 8

tccttctgac agcttgtctt 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer of NGUS1

<400> 9

aacgctgac aattccacag 20

<210> 10

<211

> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of LOC_Os02g05840

<400> 10

atggatccac ccta 14

<210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer of LOC_Os02g05840
 <400> 11
 atgccaaagt tccatgcag 19
 <210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer of Ubiquitine-5
 <400> 12
 aaccagctga ggcccaaga 19
 <210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer of Ubiquitine-5
 <400> 13
 acgattgatt taaccagtcc atga 24
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer of LOC_Os02g05840-1
 <400> 14
 cgcttctgcc acaatttagc 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer of LOC_Os02g05840-2

<400>	15	
tggttggtgct gaagttcaga		20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer of LOC_0s02g05840-3	
<400>	16	
tggactcaaa taataacact		20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer of LOC_0s02g05840-4	
<400>	17	
ccattctttc gtagcagatc		20
<210>	18	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer of Tnos R	
<400>	18	
ccatctcata aataacgtca tgc		23
<210>	19	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer of pUbi F3	
<400>	19	
cagctatatg tggatttttt tagc		24
<210>	20	
<211>		
	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foward primer of LOC_Os02g05840 EN+EX

<400> 20

actgtgttaa gggtgtcagg

20

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of LOC_Os02g05840 EN

<400> 21

atcaatgcaa cgatctgcta c

21

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of LOC_Os02g05840 EX

<400> 22

atgccaaagt tccatgcag

19