

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0056587

(43) 공개일자 2022년05월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 1/06 (2006.01) A01H 6/46 (2018.01)

C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01H 1/06 (2021.01)

A01H 6/46 (2022.05)

(21) 출원번호 10-2020-0141298

(22) 출원일자 2020년10월28일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

윤진미

경기도 수원시 영통구 청명남로4번길 21-4 102호 (영통동)

안진홍

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 210동 1703호 (공세동, 탑실마을대주피오레2단지아파트)

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 9 항

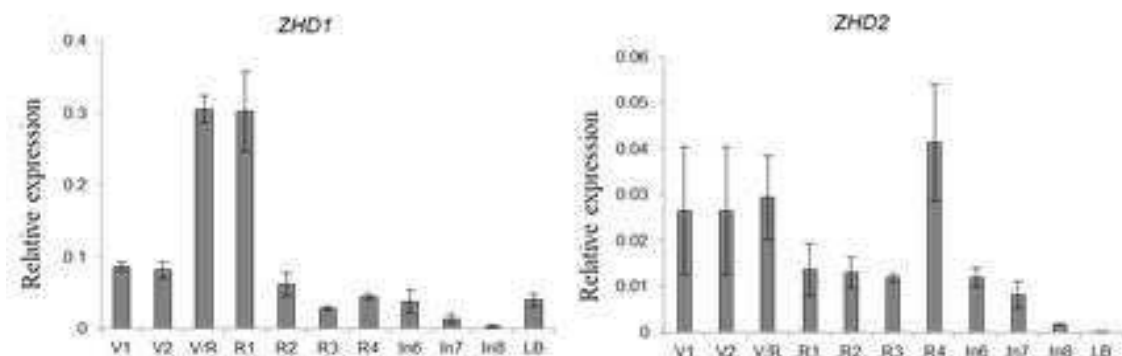
(54) 발명의 명칭 OsZHD1, OsZHD2 유전자의 이중돌연변이를 이용하여 개화를 조절하는 방법

(57) 요약

본 발명은 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이 유전자를 포함하는, 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체; 서열번호 3 또는 4 중 선택되는 어느 하나의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 5 내지 7 중 선택되는 어느 하나의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드를 포함하는,

(뒷면에 계속)

대표도 - 도3



유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체 제조용 벡터; 상기 벡터를 이용하여 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체를 제조하는 방법; 서열번호 8의 염기서열 및 서열번호 9의 염기서열로 구성된, LOC_0s09g29130 (OsZHD1) 및 LOC_0s08g37400 (OsZHD2) 유전자의 이중돌연변이 제조용 프라이머 세트; 및 LOC_0s09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자 및 LOC_0s08g37400 (OsZHD2) 변이 유전자를 이용하여 식물체의 유수발달을 지연시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 LOC_0s09g29130 (OsZHD1) 유전자 및 LOC_0s08g37400 (OsZHD2) 유전자의 이중돌연변이에 의한 개화시기 지연의 표현형을 가지는 형질전환 식물체에 관한 것으로, 식물체의 잎에서의 개화조절방법이 아닌 줄기생장점에서 유수발달로의 과정을 조절하여 개화시기를 조절할 수 있는 식물체를 얻을 수 있다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/415 (2013.01)

C12N 15/8205 (2013.01)

C12N 15/827 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395062815
과제번호	PJ013210012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명	생산성 증진 및 출수 시기 조절 벼 유전자 발굴 및 기능 검증
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345312405
과제번호	2018R1A6A3A11047894
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	벼의 줄기생장점에서 개화시기 조절 기작 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이 유전자를 포함하는, 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드의 222번째 염기서열이 결실 또는 A가 삽입된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것이고; 상기 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드의 240번째 염기서열이 결실 또는 A가 삽입되거나, 199번째 염기서열부터 260번째 염기서열까지가 결실된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자는 서열번호 3 또는 4의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이유전자는 서열번호 5 내지 7 중 선택되는 어느 하나의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 벼인 것인, 식물체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 유전자의 이중돌연변이체인 것인, 식물체.

청구항 6

서열번호 3 또는 4 중 선택되는 어느 하나의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오타이드 및 서열번호 5 내지 7 중 선택되는 어느 하나의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체 제조용 벡터.

청구항 7

제6항의 벡터를 이용하여 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체를 제조하는 방법.

청구항 8

서열번호 8의 염기서열 및 서열번호 9의 염기서열로 구성된, LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 유전자의 이중돌연변이 제조용 프라이머 세트.

청구항 9

LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이유전자를 이용하여 식물체의 유수발달을 지연시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이 유전자를 포함하는, 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체; 서열번호 3 또는 4 중 선택되는 어느 하나의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 5 내지 7 중 선택되는 어느 하나의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체 제조용 벡터; 상기 벡터를 이용하여 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체를 제조하는 방법; 서열번호 8의 염기서열 및 서열번호 9의 염기서열로 구성된, LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 유전자의 이중돌연변이 제조용 프라이머 세트; 및 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이유전자를 이용하여 식물체의 유수발달을 지연시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본 발명은 기존의 연구가 많이 진행된 잎에서의 개화 조절 방법이 아닌, 줄기생장점에서 유수발달로의 과정을 조절하여 개화 시기를 조절하는 방법에 관한 것이다. 개화 시기는 잎에서 개화호르몬을 만드는 단계와 이 신호물질이 줄기생장점으로 이동하여 생식생장을 촉진하는 단계에서 결정된다. 잎에서 만들어진 개화호르몬인 Hd3a와 RFT1 단백질은 관다발을 통해 줄기생장점으로 이동하여 생식생장 세포로 변하게 하며 변화된 세포들의 급속한 분화 발달을 촉진한다. 이러한 역할은 개화호르몬이 14-3-3 단백질을 통해 FD에 결합하여 복합체를 형성한 후 하위 전사인자들을 조절하는 것으로 보고되어 있지만, 이 과정 중 생장을 촉진하는 인자가 어떤 것이 있는지 알려져 있는 것이 거의 없다.

[0003] 기존연구로 호메오박스 유전자들이 줄기생장점과 뿌리 분열조직에서 주로 발현되는 것을 연구된 바 있고, 과발현체는 뿌리의 분열 조직 활성도가 증가하여 결뿌리의 발달이 증가되는 것이 보고된 바 있으나(한국 등록특허공보 제10-1977484), 이러한 일련의 결과로 이 호메오박스 유전자가 분열조직의 활성도를 조절하는 기능을 하는 것으로 유추하고 있을 뿐, 이 과발현체는 발달 변이 표현형 이외에 개화시기가 촉진되는 표현형을 보인다. 반면, 상기 유전자의 발현이 저하된 변이체는 아무런 표현형을 보이지 않아 유수발달 지연과 관련된 유전자에 관한 연구가 필요한 실정이다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 CRISPR/Cas9 system을 이용한 OsZHD1/OsZHD2 이중 돌연변이된 형질전환 벼에서 개화가 지연되는 표현형을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이 유전자를 포함하는, 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 하나의 목적은 서열번호 3 또는 4 중 선택되는 어느 하나의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 5 내지 7 중 선택되는 어느 하나의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체 제조용 벡터를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 벡터를 이용하여 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 서열번호 8의 염기서열 및 서열번호 9의 염기서열로 구성된, LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 유전자의 이중돌연변이 제조용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이유전자를 이용하여 식물체의 유수발달을 지연시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이 유전자를 포함하는, 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체를 제공한다.

[0015] 상기 형질전환 식물체의 상기 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드의 222번째 염기서열이 결실 또는 A가 삽입된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것이고; 상기 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드의 240번째 염기서열이 결실 또는 A가 삽입되거나, 199번째 염기서열부터 260번째 염기서열까지가 결실된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다.

[0016] 상기 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자는 서열번호 3 또는 4의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이유전자는 서열번호 5 내지 7 중 선택되는 어느 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 형질전환 식물체는 일 구체예로, 서열번호 3 및 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 서열번호 3 및 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 서열번호 3 및 서열번호 7의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 형질전환 식물체는 일 구체예로 서열번호 4 및 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 서열번호 4 및 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 서열번호 4 및 서열번호 7의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 형질전환 식물체는 버릴 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니다.

[0020] 상기 형질전환 식물체는 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 유전자의 이중돌연변이 체인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 하나의 양태는 서열번호 3 또는 4 중 선택되는 어느 하나의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 5 내지 7 중 선택되는 어느 하나의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체 제조용 벡터를 제공한다.

[0023] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 벡터를 이용하여 유수발달 지연 표현형을 가지는 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 서열번호 8의 염기서열 및 서열번호 9의 염기서열로 구성된, LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 유전자의 이중돌연변이 제조용 프라이머 세트를 제공한다.

[0025] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 변이 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 변이유전자를 이용하여 식물체의 유수발달을 지연시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0027] 본 발명은 LOC_Os09g29130 (OsZHD1) 유전자 및 LOC_Os08g37400 (OsZHD2) 유전자의 이중돌연변이에 의한 개화시기 지연의 표현형을 가지는 형질전환 식물체에 관한 것으로, 식물체의 잎에서의 개화조절방법이 아닌 줄기생장점에서 유수발달로의 과정을 조절하여 개화시기를 조절할 수 있는 식물체를 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 벼의 OsZHD2 유전자의 activation tagging line 및 과발현체에서 개화가 촉진되는 표현형을 관찰한 것이다.
- 도 2는 OsZHD2와 상동성이 높은 OsZHD1 유전자의 이중돌연변이 제작 시 나타나는 표현형을 나타낸 것이다.
- 도 3은 OsZHD1, OsZHD2 두 유전자에서 발현을 줄기생장점이 유수로 발달할 때까지 발달 단계별로 관찰한 결과이다.
- 도 4는 OsZHD1/OsZHD2 이중 돌연변이의 줄기생장점이 개화 전이 후 유수발달이 되는 과정을 나타낸 것이다.
- 도 5는 oszhd1oszhd2 이중 돌연변이에서 개화전이 후 꽃 기관 발달에 관여하는 marker 유전자들의 발현을 관찰한 결과이다.
- 도 6은 OsZHD1/OsZHD2 이중 돌연변이의 변이 위치에 대한 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0032] 실시예 1. OsZHD1/OsZHD2 유전자의 이중 돌연변이체 제작

- [0034] 과발현시 발현이 뿌리 분열조직이 활성화 되어 뿌리발달을 증가시키는 OsZHD2 (LOC_Os08g37400) 유전자에 대하여 조사한 결과, 80% 이상 상동성을 가지는 OsZHD1 (LOC_Os09g29130) 유전자의 존재를 확인하였다.
- [0035] 도 1의 결과와 같이 벼의 OsZHD2 유전자의 activation tagging line 및 과발현체에서 개화가 촉진되는 표현형을 관찰한 결과, 개화시기가 12일 정도 빨라졌으나, 잎에서의 개화전이에서는 큰 차이를 확인할 수 없었다.
- [0036] 즉, 상기 두 유전자의 단독 돌연변이들은 모두 표현형이 없음이 확인되었으나, 상기 두 유전자의 이중 돌연변이를 이용하여 표현형을 관찰하고자 하였다.
- [0037] 상기 두 유전자 이중 돌연변이에 의해 나타나는 표현형을 관찰하기 위해 CRISPR/Cas9 system을 이용하여 형질전환체를 제작하였다. 이 과정에서 pRGEB32 CRISPR/Cas9 vector를 사용하였으며, gRNA target 부위를 OsZHD1, OsZHD2 공통으로 가지는 부위 중 선발하여 primer를 제작하였다. 프라이머는 아래 표 1과 같다.

표 1

Name	Sequence (5'-3')	서열번호
ZHD1 ZHD2 double CRISPR_F	GGCAACTCGCCGCGAGCCGTCCA	서열번호 8
ZHD1 ZHD2 double CRISPR_R	AAACTGGACGGCTGCGGCAGT	서열번호 9

- [0039] 상기 프라이머에 의해 제작된 OsZHD1/OsZHD2 유전자의 이중 돌연변이는 도 6에 도시하였다.

[0041] 실시예 2. OsZHD1/OsZHD2 이중 돌연변이 형질전환체의 표현형 확인

- [0043] OsZHD1/OsZHD2 이중 돌연변이 CRISPR/Cas9 식물체를 제작하기 위하여, 해당 primer (F/R)를 95℃에서 denature 시킨 다음, 12시간 동안 상온에서 annealing 하였다. 벼에서 CRISPR/Cas9 형질전환체를 제작할 수 있는 pRGEB32 vector의 gRNA 앞 부분에 존재하는 BSA I enzyme site를 이용하여 절단하고, 이 부위에 annealing 해 놓은 target 부위를 ligation 하였다. ligation 된 DNA는 Kanamysine 저항성 LB plate에 도말하여 나타나는 colony를 선발하였다. Cell culture 후 miniprep으로 얻은 DNA는 U3 promoter부위에 있는 primer로 sequencing 하여

최종적으로 target 부위가 cloning 된 DNA를 선별하였다. 최종적으로 선별한 DNA는 아그로박테리움 투마파시엔스(Agrobacterium tumefaciens LB4404)에 형질전환하였다.

[0044] 구체적으로, 아그로박테리움 컴피턴트 세포(competent cell)와 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 방치하였다. 이어서, 액체질소에 1분 동안 넣은 후, 37℃ 오븐에 5분 동안 방치하는 과정을 3회 반복하였으며, 1 ml의 YEP 액체 배지를 넣은 다음 5시간 동안 28℃ 세이킹 인큐베이터에 방치하였다. 이어서, 카나마이신 저항성 YEP 고체 배지에 도말하고 생성되는 콜로니를 카나마이신 항생제가 포함된 YEP 액체 배지에서 배양하였고, DNA를 추출하여 제한효소로 절단한 후, 사이즈를 확인함으로써 아그로박테리움에 상기 DNA가 도입되었음을 확인하였다. 전술한 방법으로 제작한 형질전환 아그로박테리움을 이용하여 당업계에 알려진 방법으로 oszhd1 oszhd2 이중 돌연변이 두 라인을 선별하고 최종적으로, 이들의 표현형을 관찰하였다(도 2 내지 5).

[0045] 그 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, OsZHD1/OsZHD2 이중돌연변이 형질전환 벼에서 개화시기가 5-7일 늦어졌으며, 잎에서의 개화전이는 유의하게 나지 않음을 확인할 수 있었다.

[0046] 또한, 도 4와 같이 OsZHD1/OsZHD2 이중돌연변이 형질전환 벼에서 WT(야생형) 식물체에 비해 개화 전이 후 유수 발달 단계가 지연이 되고 있음을 확인할 수 있었다.

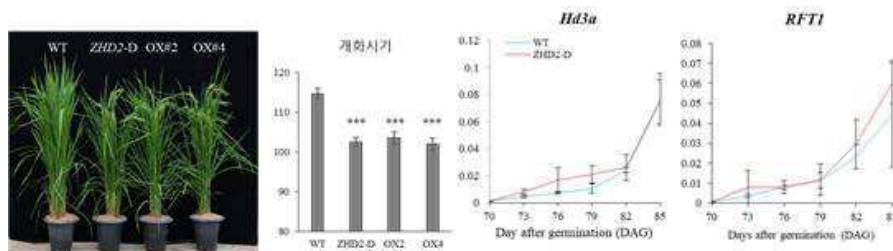
[0047] 또한, 도 5에서 볼 수 있듯이, 꽃 기관 발달에 관여하는 marker 유전자들의 발현이 이중 돌연변이에서 점차 지연되고 있음을 관찰할 수 있었다.

[0048] 즉, OsZHD1/OsZHD2 이중 돌연변이 형질전환 벼에서 개화시기 지연, 개화 전이 후 유수발달 단계의 지연, 꽃 기관 발달 지연을 확인할 수 있었으며, 이로서 OsZHD1/OsZHD2 이중 돌연변이를 통해 줄기생장점에서 유수발달로의 과정을 조절하여 개화시기의 조절이 가능함을 확인할 수 있었다.

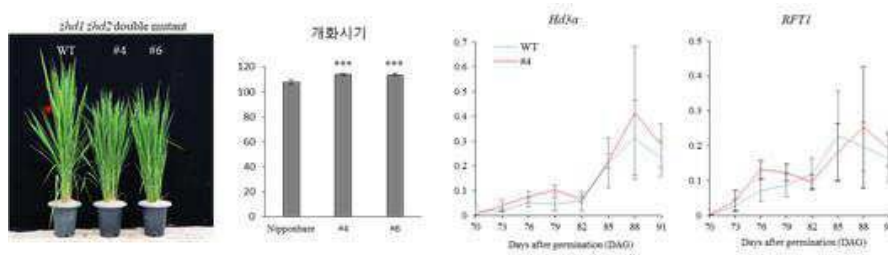
[0050] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

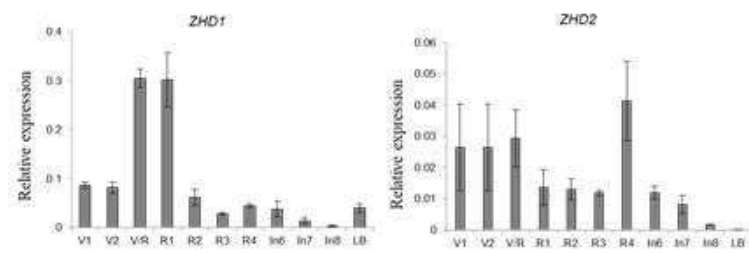
도면1



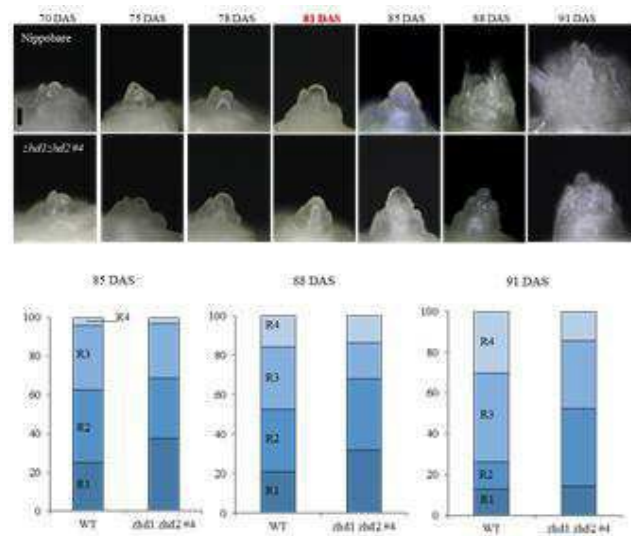
도면2



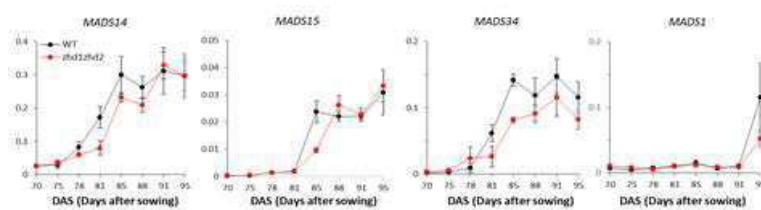
도면3



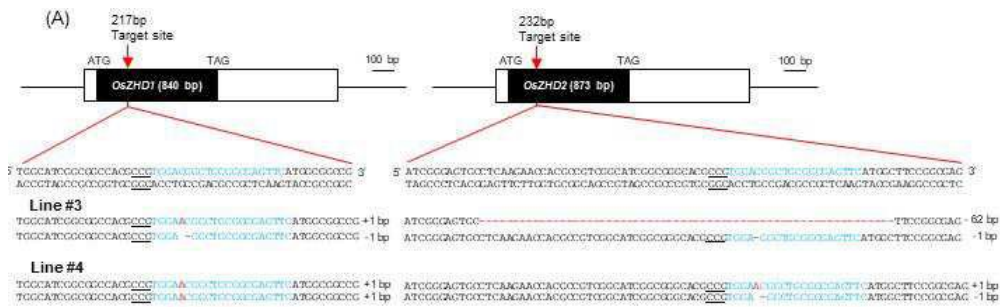
도면4



도면5



도면6



서열목록

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

<120> A method for controlling inflorescence development using *OsZHD1* and *OsZHD2*

<130> KPA201363-KR

<160> 9

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 840

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> *OsZHD1* (LOC_Os09g29130) CDS sequence

<400> 1

```

atggacttcg atgacatga cgacggcgac gaggagatgc cgccgatgcc ggtgagctcg      60
agctacgaga ctccgccgca gcatggcctt gccggcggtg ggatggcgcc caagcctcct      120

ggtagattg gcagccgtgt gaaggcccc agctgcggtg gcggcaggta ccgcgagtgc      180
ctcaagaacc acgcggttgg catcgccggc cagccgtgg acggtgcgg cgagttcatg      240
gcggccggcg aggagggcac catcgacgcg ctccgctgcg ccgctgcaa ctgccaccgc      300
aacttcacc ggaaggagtc cgagtcgctt gccggcgagg gctcgccctt ctccccggcc      360
gccgtcgtcc cctacggcgc cagccgcac caccagtctt cccgtacta ccgacccct      420
gccggttacc tccaccacca ccagaccac atggccgcgg cagccgcggc cgccgccgcc      480
gcagccggcg gctaccgcga gcggccctc gcgtccctt ccacctccca cageggccgc      540

gacgacggcg acgacctgtc cgggatggtg gggcccatgt cggcggtggg gccgctcagc      600
ggcatgtccc tcggcgccgg cccgtccggc tccggtccg gcaagaagcg gttccgcacc      660

```

aagttcaccc aggagcagaa ggacaagatg ctggcggttcg ccgagcgcgt cgggtggcgc 720
atccagaagc acgacgaggc cgccgtgcag cagttctgtg acgaggtcgg cgtcaagcgc 780
cacgtgctca aggtgtggat gcacaacaac aagcacaccc tgggcaagaa gctgccatga 840
840

<210> 2
<211> 873
<212> DNA

<213> Unknown
<220><223> OsZHD2 (LOC_Os08g37400) CDS sequence
<400> 2

atggatttcg acgaccatga cgagggtgac ggcgacgagg agatgcctcc gatgcctctg 60
agctcgggct acgacgcgcc gatgcagccc gggcttggag gtggcgggtg cggggtgccc 120
aagccgggag gtggagtcgg cggcggcggt ggtggtggtg gtggtggtg aggaggaggg 180
gcgaggtatc gggagtgcct caagaaccac gccgtcggca tcggcgggca cgccgtggac 240
ggctgcggcg agttcatggc ttccggcgag gagggctcca tcgacgcgt cgcgtgcgcc 300
gcctgcggct gccaccgtaa cttccaccgc aaggagtcgg agtccccac gggcgtcggg 360

ccggccgagc cttccgcgt gtccccgcc gccatctcgg cctacggcgc ctgcgccac 420
caccagttct cccctacta ccgcaccccg gcagggtacc tccaccacca gcagcaccag 480
atggcggcgg cgccggcgcc cgccgcagcg gccgcagcgg gcggctaccc gcagcggccc 540
ctgcgcgtgc cgtccacctc ccactcggga cgcgacgagg gcgacgacat gtccgggatg 600
gtcggcccca tggatgattg ccccatggtc ggcatgtccc tcggctccgc cggccctcc 660
ggctccggct ccggcaagaa gcggttcgc acaaagtta cgcaggagca gaaggacaag 720
atgctgcct tcgcggagcg gctcgggtgg cgcattcaga agcacgacga ggccgccgtg 780

cagcagttct gcgaggaggt ctgcgtcaag cgccatgtcc tcaaggtttg gatgcacaac 840
aacaagcaca ccctgggcaa gaaggcgcca tag 873

<210> 3
<211> 841
<212> DNA
<213> Unknown

<220><223> OsZHD1 (LOC_Os09g29130) variant sequence
<400> 3

atggacttcg atgaccatga cgacggcgac gaggagatgc cgccgatgcc ggtgagctcg 60

agctacgaga ctccgccgca gcatggcctt gccggcgggtg ggatggcgcc caagcctcct 120
 ggtgagattg gcagccgtgt gaagggccccc agctgcgggtg gcggcaggta ccgcgagtgc 180

ctcaagaacc acgcggttgg catcggcggc cagccgtgg aacggctgcg gcgagttcat 240
 ggccggccggc gaggaggga ccatcgacgc gctccgtgc gcccggtgca actgccaccg 300
 caacttccac cggaaggagt ccgagtcgct tgccggcgag ggctcgccct tctccccggc 360
 cgccgtcgtc cctacggcg ccacgccgca ccaccagttc tccccgtact accgcacccc 420
 tgccggttac ctccaccacc accagcacca catggccgcg gcagcccgcg ccgccgccgc 480
 cgccagccggc ggctacccgc agcggccccct cgcgtccccg tccacctccc acagcgcccg 540
 cgacgacggc gacgacctgt ccgggatggt ggggcccatg tcggcggtgg ggccgctcag 600

cggcattgcc ctccggcccg gcccgctcgg ctccggctcc ggcaagaagc ggttccgcac 660
 caagttcacc caggagcaga aggacaagat gctggcgctt gccgagcgcg tcgggtggcg 720
 catccagaag cagcagcagg ccgccgtgca gcagttctgt gacgaggtcg gcgtcaagcg 780
 ccacgtgctc aaggtgtgga tgcacaacaa caagcacacc ctgggcaaga agctgccatg 840
 a 841

<210> 4
 <211> 839
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> OsZHD1 (LOC_Os09g29130) variant sequence

<400> 4

atggacttcg atgaccatga cgacggcgac gaggagatgc cgccgatgcc ggtgagctcg 60
 agctacgaga ctccgccgca gcatggcctt gccggcgggtg ggatggcgcc caagcctcct 120
 ggtgagattg gcagccgtgt gaagggccccc agctgcgggtg gcggcaggta ccgcgagtgc 180
 ctcaagaacc acgcggttgg catcggcggc cagccgtgg aggtcgcggc gaggttcatgg 240
 cgccggcgga ggagggcacc atcgacgcgc tccgtcgcgc cgcgtgcaac tgccaccgca 300
 acttcaccg gaaggagtc gagtcgcttg ccggcgaggg ctcgcccttc tccccggccg 360
 ccgtcgtccc ctacggcgcc acgccgcacc accagttctc cccgtactac cgcacccctg 420

ccggttacct ccaccaccac cagcaccaca tggcccgggc agcccgggcc gccgccggcg 480
 cagccggcgg ctaccgcag cggccccctc cgtccccgc cactccac agcggccgcg 540
 acgacggcga cgacctgcc gggatggtgg ggcccatgtc ggcggtgggg ccgctcagcg 600
 gcatgtccct cggcgccggc ccgtccggct ccggctccgg caagaagcgg ttccgcacca 660

agttcaccca ggagcagaag gacaagatgc tggcgttcgc cgagcgcgtc gggtaggcgca 720
tccagaagca cgacagggcc gccgtgcagc agttctgtga cgaggtcggc gtcaagcgcc 780
acgtgtctaa ggtgtggatg cacaacaaca agcacacct gggcaagaag ctgcatga 839

<210> 5

<211> 874

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> OsZHD2 (LOC_Os08g37400) variant sequence

<400> 5

atggatttcg acgaccatga cgagggtgac ggcgacgagg agatgcctcc gatgcctctg 60
agctcgggct acgacgcgcc gatgcagccc gggcttggag gtggcgggtg cgggggtgcc 120
aagccgggag gtggagtcgg cggcggcggg ggtggtggtg gtggtggtg aggaggaggg 180
gcgaggtatc gggagtgctt caagaaccac gccgtcggca tcggcgggca ccccgtggaa 240
cggctcgggc gatttcattg ctcccgccga ggagggtctc atcgacgcgc tccgtgcgc 300

cgctgcggc tgccaccgta acttcaccg caaggagtcg gattcccca cgggcgtcgg 360
gccggccgag cttccgccg tgtcccccgc cgccatctcg gcctacggcg cctcgccga 420
ccaccagttc tccccctact accgcacccc ggcagggtac ctcaccacc agcagcacca 480
gatggcggcc gggcggcggg ccgcggccgc cgccgcagcg ggcggctacc cgcagcggcc 540
cctcgctg cgtccacct cccactcggg acgcgacgag ggcgacgaca tgtccgggat 600
ggtcggcccc atggtgattg gcccattgtt cggcatgtcc ctgggtccg ccggcccctc 660
cggctccggc tccggcaaga agcggttccg cacaagtgc acgcaggagc agaaggacaa 720

gatgtcggc ttgcgggagc ggctcgggtg ggcgcatccag aagcacgacg aggccgccgt 780
gcagcagttc tgcgaggagg tctgcgtcaa gcgccatgtc ctcaagttt ggatgcacaa 840
caacaagcac accctgggca agaaggcgcc atag 874

<210> 6

<211> 872

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> OsZHD2 (LOC_Os08g37400) variant sequence

<400> 6

atggatttcg acgaccatga cgagggtgac ggcgacgagg agatgcctcc gatgcctctg 60

agctcgggct acgacgcgcc gatgcagccc gggcttggag gtggcgggtg cggggtgccc 120

aagccgggag gtggagtctg cggcggcggt ggtggtggtg gtggtggtg aggaggaggg 180

gcgaggtatc gggagtgcct caagaaccac gccgtcggca tcggcgggca cggcgtggag 240

gctgcggcga gticatggtt tccggcgagg agggctccat cgacgcgtc cgtgcgccg 300

cctgcggctg ccaccgtaac ttccaccgca aggagtggga gtccccacg ggcgtcgggc 360

cggccgagcc ttccgccgtg tccccgccg ccatctcggc ctacggcgcc tcgccgcacc 420

accagttctc cccctactac cgcaccccg cagggtacct ccaccaccag cagcaccaga 480

tggcggccgc ggcggcgccc gcggccgcgc ccgcagcggg cggctaccg cagcggcccc 540

tcgcgtgcc gtccacctcc cactcgggac gcgacgagg cgacgacatg tccgggatgg 600

tcggcccat ggtgattggc cccatggtcg gcatgtccct cggctccgc ggcctccg 660

gtcgcggctc cggcaagaag cggttccgca caaagttcac gcaggagcag aaggacaaga 720

tgctgcctt cgcggagcgg ctccgggtggc gcatccagaa gcacgacgag gccgccgtgc 780

agcagttctg cgaggaggtc tgcgtcaagc gccatgtcct caaggtttgg atgcacaaca 840

acaagcacac cctgggcaag aaggcgccat ag 872

<210> 7

<211> 811

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> OsZHD2 (LOC_Os08g37400) variant sequence

<400> 7

atggatttcg acgaccatga cgagggtgac ggcgacgagg agatgcctcc gatgcctctg 60

agctcgggct acgacgcgcc gatgcagccc gggcttggag gtggcgggtg cggggtgccc 120

aagccgggag gtggagtctg cggcggcggt ggtggtggtg gtggtggtg aggaggaggg 180

gcgaggtatc gggagtgcct ccggcgagga gggtccatc gacgcgtcc gctgcgccgc 240

ctgcggctgc caccgtaact tccaccgcaa ggagtccgag tccccacgg gcgtcgggccc 300

ggccgagcct tcgccgtgt ccccgccgc catctcgcc tacggcgct cggcgacca 360

ccagttctcc cctactacc gcaccccggc aggggtacct caccaccagc agcaccagat 420

ggcggccgcg gcggcgccgc cggccgccgc cgcagcgggc ggctaccgc agcggcccct 480

cgcgtgccg tccacctccc actcgggacg cgacgagggc gacgacatgt ccgggatggt 540

cggcccatg gtgattggc ccatggtcgg catgtccctc ggctccgcg gccctccgg 600

ctccggtcc ggcaagaagc ggttccgcac aaagttcac caggagcaga aggacaagat 660

gctcgcccttc gcggagcggc tcgggtggcg catccagaag cagcagagg cgcgcgtgca	720
gcagttctgc gaggaggtct gcgtcaagcg ccatgtcttc aaggtttgga tgcacaacaa	780
caagcacacc ctgggcaaga aggcgccata g	811
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZHD1 ZHD2 double CRISPR forward primer	
<400> 8	
ggcaactcgc cgcagccgtc ca	22
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZHD1 ZHD2 double CRISPR reverse primer	
<400> 9	
aaactggacg gctgcggcga gt	22