



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0085458

(43) 공개일자 2015년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/113 (2010.01) *A01H 5/00* (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01) *A01P 21/00* (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0121375

(22) 출원일자 2014년09월12일

심사청구일자 2014년09월12일

(30) 우선권주장

1020140005283 2014년01월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

안지훈

서울특별시 강남구 남부순환로 2914, 3동 403호 (대치동, 개포우성아파트)

(74) 대리인

이처영, 장제환

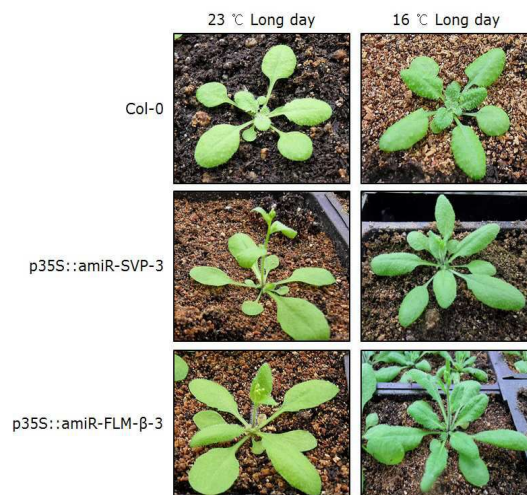
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 SVP-FLM- β 단백질 복합체의 형성 조절을 통한 식물의 개화시기 조절 방법

(57) 요약

본 발명은 SVP-FLM- β 단백질 복합체가 주위 온도의 작은 변화를 감지하는 식물 개화 조절인자임을 규명한 것에 기초하여, SVP-FLM- β 단백질 복합체 형성을 조절하여 식물의 개화시기를 조절하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 개화 조절용 FLM- β RNAi 및 SVP RNAi를 이용하여 FLM- β 와 SVP의 발현억제 또는 상호작용을 조절함으로써, 개화시기를 조절하여 갑작스런 기온 변화에 따른 작물 생산성 저하 및 생태계 변화를 막을 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013003397

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 창의적 연구 진흥 사업

연구과제명 식물 대기온도 센서 연구단

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2008.10.01 ~ 2017.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

SVP-FLM- β 단백질 복합체의 형성을 조절하는 것을 특징으로 하는 식물의 개화시기를 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 SVP-FLM- β 단백질 복합체의 형성을 증진시켜 식물의 개화시기를 지연시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 SVP-FLM- β 단백질 복합체의 형성을 억제시켜 식물의 개화시기를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 개화시기는 10℃-27℃ 범위의 대기온도에서 조절되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 SVP-FLM- β 단백질 복합체의 형성 증진은 SVP 및/또는 FLM- β 의 발현을 증가시키는 물질의 도입 또는 처리에 의한 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 SVP-FLM- β 단백질 복합체의 형성 억제는 SVP 및/또는 FLM- β 의 발현을 억제시키는 물질의 도입 또는 처리에 의한 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 SVP 및/또는 FLM- β 의 발현을 억제시키는 물질은 SVP RNAi 및/또는 FLM- β RNAi인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 SVP RNAi는 서열번호 1 내지 3 및 서열번호 31 내지 39로 구성되는 군에서 선택되는 염기서열에 대응하는 mRNA를 분해시키는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 SVP RNAi는 서열번호 7/8; 9/10; 11/12; 13/14; 15/16 및 17/18로 구성되는 군에서 선택

되는 miRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 FLM- β RNAi는 서열번호 4 내지 6 및 서열번호 40 내지 48로 구성되는 군에서 선택되는 염기서열에 대응하는 mRNA를 분해시키는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 FLM- β RNAi는 서열번호 19/20; 21/22; 23/24; 25/26; 27/28 및 29/30으로 구성되는 군에서 선택되는 miRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

SVP RNAi 및/또는 FLM- β RNAi가 도입되어 있는 개화시기가 촉진된 재조합 식물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 SVP RNAi는 서열번호 7/8; 9/10; 11/12; 13/14; 15/16 및 17/18로 구성되는 군에서 선택되는 miRNA에 의해 SVP 유전자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 재조합 식물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 FLM- β RNAi는 서열번호 19/20; 21/22; 23/24; 25/26; 27/28 및 29/30으로 구성되는 군에서 선택되는 miRNA에 의해 FLM- β 유전자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 재조합 식물.

청구항 15

다음 단계를 포함하는, 식물의 개화시기 촉진인자를 스크리닝하는 방법:

- (a) 식물체에 개화시기 촉진인자 후보물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 후보물질이 처리된 식물체에서 SVP-FLM- β 단백질 복합체의 형성을 SVP 및 FLM- β 의 발현수준으로 확인하는 단계; 및
- (c) SVP 및 FLM- β 의 발현수준이 대조군에 비해 감소하는 경우의 후보물질을 개화시기 촉진인자로 선택하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 SVP-FLM- β 단백질 복합체가 주위 온도의 작은 변화를 감지하는 식물 개화 조절인자임을 규명한 것에 기초하여, SVP-FLM- β 단백질 복합체 형성을 조절하여 식물의 개화시기를 조절하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

RNA 간섭(RNA interference: RNAi)는 매우 특이적이고, 효율적으로 유전자 발현을 억제할 수 있는

메카니즘으로, 이는 목적유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스와 이것과 상보적인 서열을 가지는 안티센스로 구성되는 이중가닥 RNA를 세포 등에 도입하여 목적유전자 mRNA의 분해를 유도함으로써 목적유전자의 발현을 억제한다. 선충에서 번역되지 않는 저분자의 RNA(non-coding RNA)가 발육단계에 있어서 유전자의 발현을 제어하는 것이 알려진 이후, 선충 계통에 많은 저분자 RNA가 존재하는 것이 발견되었다(Fire *et al.*, *Nature* 391:806-811, 1998). 이러한 저분자 RNA의 크기는 25nt 이하 정도로, 이를 miRNA(micro RNA)라고 하며, 선충에서는 200 종류 이상 존재한다. 식물에 있어서도 miRNA가 발견되었으며, 저분자 RNA(21 내지 25nt) 중 목적유전자의 배열과 완전히 일치하는 것을 소간섭 RNA(small interfering RNA 혹은 siRNA), 불완전한 일치를 나타내는 것을 마이크로 RNA(micro RNA 혹은 miRNA)라고 부른다. 이러한 저분자 RNA는 비번역(non-coding) RNA로부터 RNA 프로세싱 효소인 다이서(DICER)에 의한 절단에 의해 생기며, 절단 전의 RNA는 두 가닥 RNA(stem loop RNA)를 형성하고 있다. 그 후 목적 유전자 영역에 결합하여 RISC (RNA induced silencing complex) 등에 의해 발현제어가 일어난다. 식물에 있어서도 DICER 유사 단백질(Carpel factory/ Suspensor/ Short integument)이 존재하며, 최근에는 다양한 생물체에서 특정유전자의 발현을 녹아웃하는 도구로서 RNAi 방법을 많이 이용하고 있다.

[0003]

일반적으로 식물의 개화시기는 환경조건에 따라 영향을 받거나 유전적으로 이미 결정되어 있으며, 대부분의 식물은 개화가 적합한 시기에 일어나도록 개화시기를 조절할 수 있는 메커니즘을 가지고 있다. 이러한 조절 메커니즘은 식물체 내부적 발달신호 및 빛, 온도와 같은 외부 환경요인에 의해 영향을 받는다(Poething *et al.*, *Science*, 250:923-930, 1990). 식물은 고착성 생물체로 다양한 환경적 스트레스에 노출되어 있기 때문에 주위로부터 많은 영향을 받는다. 이러한 환경 스트레스 중 가장 큰 영향을 미치는 것이 온도이다. 동결온도와 같은 저온을 감지하여 온도범위에 내성을 지닌 식물들은 많이 알려져 있으며, 식물은 낮은 온도와 같은 온도 스트레스에 노출되면 그에 부합되는 메커니즘을 가진다. 최근 밝혀진 바에 따르면, 식물은 저온에 감응하는 어떤 구별되는 메커니즘을 가진다는 것을 알 수 있다(Sharm. P *et al.*, *Bioessay* 27:1048-59, 2005). 광범위한 온도변화에 대한 식물의 감응 메커니즘은 많이 알려져 있으며, 최근 주위온도의 미세한 변화가 저온에서 개화를 지연시키는 데 영향을 미친다는 보고가 있다(Fitter *et al.*, *Science* 296:1689-91, 2002; Cook *et al.*, *PNAS* 109:9000-5, 2012; Craufurd *et al.*, *J. Exp. Bot.* 60:2529-39, 2009).

[0004]

종래의 개화시기를 조절하는 방법인 4℃ 이하 또는 37℃ 이상에서 개화시기 조절 기작은, 10℃-27℃ 범위의 대기온도에서 미세한 온도 변화에 의한 개화시기 조절 기작과는 별개이며, 현재 주위 온도 변화에 따른 개화시기 조절에 대한 분자 메커니즘은 아직까지 완전히 규명되지 않았다.

[0005]

이에, 본 발명자들은 애기장대로부터 주위온도의 작은 변화를 감지하여 개화시기를 조절할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, SVP-FLM-β 단백질 복합체가 주위온도 변화를 인지하여 식물의 개화시기를 조절할 수 있는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

본 발명의 목적은 대기의 미세한 온도 변화에 따른 개화시기를 조절할 수 있는 개화시기 조절 인자 SVP-FLM-β 단백질 복합체의 형성을 억제시켜 식물의 개화시기를 조절하는 방법을 제공하는데 있다.

[0007]

본 발명의 다른 목적은 개화시기 조절인자인 SVP-FLM-β 단백질 복합체 형성을 억제하는 물질의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물에서 SVP-FLM-β 단백질 복합체의 형성을 조절하는 것을 특징으로 하는 식물의 개화시기를 조절하는 방법을 제공한다.

[0009]

본 발명은 또한, SVP RNAi 및/또는 FLM-β RNAi가 도입되어 있는 개화시기가 촉진된 재조합 식물 제공한다.

[0010]

본 발명은 또한, (a) 식물체에 개화 촉진인자 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보물질이 처리된 식물체에서 SVP-FLM-β 단백질 복합체의 형성을 SVP 및 FLM-β의 발현수준으로 확인하는 단계; 및 (c) SVP 및 FLM-β의

발현수준이 대조군에 비해 감소하는 경우 후보물질들 개화시기 촉진인자로 선택하는 단계를 포함하는 개화시기 촉진인자를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011]

본 발명의 개화 조절용 FLM- β RNAi 및 SVP RNAi를 이용하여 FLM- β 와 SVP의 발현억제 또는 상호작용을 조절함으로써, 개화시기를 조절하여 갑작스런 기온 변화에 따른 작물 생산성 저하 및 생태계 변화를 막을 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0012]

도 1A는 *svp-32*, *flm-3* 및 *flc-3* 돌연변이체, 이중 돌연변이체 및 삼중 돌연변이체의 온도에 따른 개화시기를 나타낸 것이다.

도 1B는 *svp-32*, *flm-3* 및 *flc-3* 돌연변이체에서의 *FT*, *SOC1* 및 *TSF* 유전자 발현을 나타낸 것이다.

도 1C는 *GVG:FLM- β* 및 *GVG:SVP* 식물체에 30 μ M 텍사메타손(DEX) 처리 8시간 후의 *FT*, *SOC1* 및 *TSF* 유전자 발현을 나타낸 것이다.

도 1D는 *svp-32*, *flm-3* 및 *flc-3* 돌연변이체, 이중 돌연변이체 및 삼중 돌연변이체의 잎의 수 비율(16/23)을 나타낸 것이다.

도 2는 돌연변이체의 개화시기를 나타낸 것이다(RLN: rosette leaf number, CLN: cauline leaf number, TLN: total leaf number).

도 3A는 *in vitro* GST pull-down 분석에 의한 FLM- β 와 SVP 단백질의 상호작용을 나타낸다. SVP-GST는 쿠마시 염색으로 확인하였고, FLM- β 는 ^{35} S로 표지하여 확인한 것이다.

도 3B는 이분자형광상보법을 이용하여 양과표피에서의 SVP-nYFP와 FLM- β -cYFP 발현을 확인한 결과이다. 화살표는 핵이며, 스케일 바는 200 μ m이다.

도 3C는 상호 면역침강법을 이용한 FLM- β 와 SVP 단백질의 상호작용을 나타낸 것이다.

도 3D는 염색질 면역침강법을 이용하여 *FT*, *SOC1* 및 *TSF* 게놈 부위에 결합한 FLM을 확인한 결과이다. 16°C에서 *pFLM:gFLM:GFP flm-3* (흰색) 및 *pFLM:gFLM:GFP svp-32 flm-3* (검은색) 돌연변이체로 수행하였으며, GFP 및 cMyc 항체로 분석하였다.

도 4A는 각각 다른 온도의 야생형 Col에서 *SVP*(푸른색), *FLC*(보라색) 및 *FLM- β* (주황색)의 전사 수준을 나타낸 것이다.

도 4B는 온도에 따른 SVP의 안정성을 (-)MG132 및 (+)MG132 조건에서 확인하였다. 23°C로 배양한 *pSVP:SVP:HA svp-32* 식물에 사이클로헥시미드(CHX) 처리 하여 각각 다른 온도로 옮긴 후, SVP 단백질 양을 확인한 결과이다.

도 4C는 상호 면역침강법으로 분석한 온도에 따른 SVP-FLM- β 복합체 양을 나타낸 것이다. *SVP:HA* 및 *FLM- β -GFP*를 각각 다른 온도에서 애기장대의 엽육원형질체에 일시적으로 발현시킨 후, 항-HA 항체로 면역침강 시키고 GFP로 면역블롯을 수행하였다.

도 4C 및 3D는 *FT*, *SOC1* 및 *TSF* 게놈 부위에 결합한 SVP를 염색질 면역침강법을 이용하여 확인한 결과이다. *pSVP:SVP:HA svp-32*(푸른색), *pSVP:SVP:HA svp-32 flc-3*(보라색) 및 *pSVP:SVP:HA svp-32 flm-3*(주황색) 돌연변이체를 장일조건(도 3D)과 단일조건(도 3E)에서 온도를 변화시켜 측정하였다.

도 5는 7개의 miRNA 형질전환 식물체에서 SVP 및 FLM- β 유전자의 발현을 확인한 것이다.

도 6는 miRNA 형질전환 식물체의 개화시기를 비교한 사진이다.

도 7은 miRNA 형질전환 식물체들의 개화시기를 잎의 개수로 나타낸 결과이다(A: SVP miRNA 형질전환 식물체, B: FLM- β miRNA 형질전환 식물체).

도 8은 *FLM* 발현에 춘화 및 지베렐린 처리가 미치는 영향을 확인한 것이다. A, C는 돌연변이에서의 *FLM* 발현을 확인한 결과이며, B, D는 춘화 및 지베렐린 처리에 의한 *FLM* 발현을 확인한 결과이다.

도 9는 *GVG:FLM-β* 및 *GVG:SVP* 형질전환 식물체에 텍사메타손을 처리한 결과이다.

도 10은 클로닝, ChIP-qPCR, RT-qPCT 및 염기서열분석에 사용한 프라이머를 나타낸 것이다(서열번호 49-139).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0014] 본 발명에서는 식물의 주위온도 인지 및 변화에 대한 개화조절 기작을 결정하기 위해, 주위 온도 변화에 민감성을 가지는 개화시기 조절인자가 손실된 돌연변이체에서 개화촉진 유전자의 발현을 분석하고, 개화촉진 유전자인 FT(Flowering locus T), SOC1(Suppressor of Overexpression of Constans1) 및 TSF(Twin Sister of FT)의 발현을 증가 또는 억제시키는 개화시기 조절인자를 선별하였다. 선별된 개화시기 조절인자의 상호작용을 조사하기 위해 시험관 내 GST 풀다운 분석, 이분자형광상보법, 상호 면역침강법 및 염색질 면역침강법 등의 다양한 방법을 수행하였으며, 그 결과 FLM-β 단백질과 SVP 단백질이 서로 결합하여 단백질 복합체를 형성한다는 것을 확인하였다. 또한, 서로 다른 온도에서의 *SVP*, *FLM* 및 *FLC*의 발현을 조사하여, 이 세 유전자의 작용온도 범위가 다르다는 것을 확인하였다.
- [0015] 온도 변화에 의한 FLM-β의 발현 조절은 RNA 수준에서 일어났지만, SVP의 경우 단백질 수준에서 발현 조절이 일어나는 것을 밝히고, 온도 변화에 의한 FLM-β 전사체 및 SVP 단백질의 감소에 따라 SVP-FLM-β 복합체도 감소한 것을 확인하였다. 즉, SVP-FLM-β 단백질 복합체는 작은 온도 변화에 의해 그 복합체 형성을 조절하는 것을 알 수 있었다. 또한, SVP-FLM-β 단백질 복합체가 온도 특이적으로 *FT*, *SOC1* 및 *TSF* 등과 같은 하위 개화촉진 유전자에 결합하여 이들의 발현에 영향을 준다는 것을 확인함으로써, SVP-FLM-β 단백질 복합체가 미세 온도 변화를 감지하여 개화시기를 조절하는 것을 알 수 있었다.
- [0016] 이에, SVP-FLM-β 단백질 복합체 형성을 조절하여 개화시기를 조절하고자, RNAi를 이용하여 SVP 또는 FLM-β의 발현이 억제되면 상기 SVP-FLM-β 단백질 복합체 형성도 억제되고, 온도 감응성 감소와 그에 따른 개화가 촉진된다는 것을 확인하였다. 이로써, 갑작스런 온도변화에 따른 식물의 생산성 저하 또는 생태계 변화에 SVP-FLM-β 복합체의 형성을 이용한 가능성을 제시하였다.
- [0017] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 식물에서 SVP-FLM-β 단백질 복합체의 형성을 조절하는 것을 특징으로 하는 식물의 개화시기를 조절하는 방법에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 SVP-FLM-β 단백질 복합체의 형성을 증진시켜 식물의 개화시기를 지연시킬 수 있으며, 상기 SVP-FLM-β 단백질 복합체의 형성 증진은 SVP 및/또는 FLM-β의 발현을 증가시키는 물질의 도입 또는 처리에 의한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 SVP-FLM-β 단백질 복합체의 형성을 억제시켜 식물의 개화시기를 촉진시킬 수 있으며, 상기 SVP-FLM-β 단백질 복합체의 형성 억제는 SVP 및/또는 FLM-β의 발현을 억제시키는 물질의 도입 또는 처리에 의한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 개화시기는 10℃-27℃ 범위의 대기온도에서 조절되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 SVP 및/또는 FLM-β의 발현을 억제시키는 물질은 SVP RNAi 및/또는 FLM-β RNAi인 것이 바람직하며, 상기 RNAi는 siRNA 또는 miRNA인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 SVP RNAi는 서열번호 1 내지 3 및 서열번호 31 내지 39로 구성되는 군에서 선택되는 염기서열에 대응하는 mRNA를 분해시키는 것이 바람직하며, 상기 FLM-β RNAi는 서열번호 4 내지 6 및 서열번호 40 내지 48로 구성되는 군에서 선택되는 염기서열에 대응하는 mRNA를 분해시키는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서는 상기 SVP 및 FLM-β에 대한 인공 miRNA의 표적부위 외에 인공 miRNA 도입으로 인해 SVP 및 FLM-β의 발현감소가 예상되는 추가 지역을 선별하였다(표 2).
- [0023] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 SVP RNAi는 서열번호 7/8; 9/10; 11/12; 13/14; 15/16 및 17/18로 구성되는 군

에서 선택되는 miRNA인 것이 바람직하며, 상기 FLM- β RNAi는 서열번호 19/20; 21/22; 23/24; 25/26; 27/28 및 29/30로 구성되는 군에서 선택되는 miRNA인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명에서는 SVP 및 FLM- β 에 대한 인공 miRNA를 도입한 형질전환 식물체를 제작하여, SVP 및 FLM- β mRNA의 분해를 유도함으로써 SVP 및 FLM- β 의 발현을 억제하고, 상기 형질전환 식물체가 온도 감응성이 감소하여 개화가 촉진되는 것을 확인하였다.

[0025] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, SVP RNAi 및/또는 FLM- β RNAi가 도입되어 있는 개화시기가 촉진된 재조합 식물에 관한 것이다. 본 발명에서는 상기 SVP RNAi 및 FLM- β RNAi 형질전환 식물체의 세대 진전을 통한 각각의 순종라인 확보와 개화시기 표현형을 확인하고자 한다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 SVP RNAi는 서열번호 7/8; 9/10; 11/12; 13/14; 15/16 및 17/18로 구성되는 군에서 선택되는 miRNA에 의해 SVP 유전자의 발현을 억제하는 것이 바람직하며, 상기 FLM- β RNAi는 서열번호 19/20; 21/22; 23/24; 25/26; 27/28 및 29/30으로 구성되는 군에서 선택되는 miRNA에 의해 FLM- β 유전자의 발현을 억제하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에 따른 RNAi 벡터를 도입 또는 miRNA를 이용하여 상기 식물체를 형질전환시키는 방법으로서, 공지된 다양한 방법, 즉, 아그로박테리아-매개된 형질전환, 입자 총 충격(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication) 및 전기천공법(electroporation) 등이 알려져 있다. 이러한 방법들 중 가장 널리 사용되는 것은 아그로박테리움의 자연적인 형질전환 시스템(natural transformation system)을 이용하는 방법과 유전자 총을 이용하여 직접 DNA를 쏘아넣는 방법이다. 아그로박테리움은 Ti 또는 Ri 플라스미드를 갖고 있는데, 상기 플라스미드는 식물체에 외래 유전자로 형질전환시킬 수 있는 유전자들을 갖고 있다. 아그로박테리움 벡터 시스템 및 아그로박테리움을 통한 유전자 전이방법은 Moloney *et al.*, *Plant Cell Reports* 8:238(1989) 등과 같은 다수의 문헌에 기재되어 있다.

[0028] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0029] 용어 "벡터"란 적당한 숙주세포로 외래 유전자를 도입하여 그것이 발현될 수 있게 하는 수단으로서, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함하며, 바람직하게는 플라스미드 벡터이다. 현재 식물세포를 형질전환시키기 위하여 개발된 벡터 중에서 가장 많이 쓰이는 벡터는 이원체 벡터(binary vector)다. 이원체 벡터는 2개의 플라스미드로 구성되어 있는데, 하나는 아그로박테리움 감염에 필요한 유전자와 T-DNA를 전달하는데 필요한 유전자가 들어 있고, 다른 하나에는 목적 유전자가 삽입될 수 있는 T-DNA가 들어 있다. 후자는 대장균과 아그로박테리움에서 염색체와 독립적으로 복제될 수 있을 뿐 아니라, 항생제 저항성 유전자를 갖고 있으며, 식물세포로의 유전자 전이에 필수적인 T-DNA의 양끝 말단 부위 (left boarder (LB) 및 right boarder (RB))를 지니고 있도록 제조되었다. 당업계에는 다양한 이원체 벡터가 공지되어 있다.

[0030] 용어 식물(체)는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 수 있는 식물세포, 식물조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다. 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물체는 쌍자엽 식물일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 쌍자엽 식물은 애기장대인 것이 바람직하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 방법에 의해 개화가 조절될 수 있는 식물체로는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류; 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 툴페스큐, 페레니얼라이그라스 등을 포함하는 사료작물류가 포함된다.

[0031] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 식물체에 개화 촉진인자 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보물질이 처리된 식물체에서 SVP-FLM- β 단백질 복합체의 형성을 SVP 및 FLM- β 의 발현수준으로 확인하는 단계; 및 (c) SVP 및 FLM- β 의 발현수준이 대조군에 비해 감소하는 경우 후보물질을 개화 촉진인자로 선택하는 단계를 포함하는 개화시기 촉진인자를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[0032] **[실시예]**

[0033] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0034] **식물재료 및 성장조건**

[0035] 본 발명에 사용된 모든 돌연변이는 컬럼비아(Col)background로 하며, 별도로 언급하지 않는다. 야생형 종자는 애기장대 생물학 자원센터(ABRC)로부터 획득하였다. *35S:CO*, *35S:GI*, *gi-2*, *gFLM:GUS*, *gSVP:GUS*, *co-9*, *flc-3*, *flm-1(WS)*, *flm-3*, *fca-9*, *flk-1*, *fpa-2*, *ft-10*, *fve-4*, *fy-1(Ler)*, *gi-3(Ler)*, *ld-1*, *soc1-2*, *svp-32* 및 *tsf1-1*은 이전에 공지된 방법으로 얻었다(Michaels *et al.*, *Plant Cell* 11:949-956, 1999; Balasubramanian *et al.*, *PLoS Genet* 2:e106, 2006; Scortecci *et al.*, *Plant J.* 26:229-236, 2001; Lee *et al.*, *Genes Dev.* 21:397-402, 2007; Baurle *et al.*, *Science* 318:109-112, 2007; Lim *et al.*, *Plant Cell* 16:731-740, 2004, Lee *et al.*, *Plant Cell* 6:75-93, 1994; Simpson *et al.*, *Cell* 113:777-787, 2003; Schomburg *et al.*, *Plant Cell* 13:1427-1436, 2001; Kim *et al.*, *Nat. Genet.* 36:167-171, 2004; Ausin *et al.*, *Nat. Genet.* 36:162-166; Lee *et al.*, *Genes Dev.* 14:2366-2376, 2000; Tamaguchi *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 46:1175-1189; Yoo *et al.*, *Plant Physiol.* 139:770-778, 2005). 이중 돌연변이체의 homozygosity는 genotyping PCR을 통해 확인하였다. 야생형, 돌연변이체 및 형질전환 식물은 빛이 $120\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 강도로 제공되는, 장일조건(LD) [16시간(light)/8시간(dark)] 또는 단일 조건(SD)[9시간(light)/15시간(dark)]으로 27°C, 23°C, 16°C, 10°C 및 5°C 온도에서 토양 또는 MS 배지에서 성장시켰다. 개화시기는 총 잎의 합계로 측정하였다.

[0036] 춘화처리하는 종자를 4°C로 4주간 보관한 후, 23°C 장일조건으로 토양 또는 MS 배지에서 성장시켰다. 지베렐린 처리는 23°C 단일조건으로 토양 또는 MS 배지에서 성장시킨 후, 발아하면 100 µM GA₃ 용액을 개화할 때까지 매주 뿌려주었다. 온도 이동 실험은 23°C에서 6일간 재배한 식물을 10°C, 16°C 또는 27°C로 옮겨 2일간 재배하였다(도 8).

[0037] **형질전환 식물**

[0038] *pSVP:SVP:HA*는 *SVP*의 ORF를 PCR로 증폭하여, 약 2.5kb *SVP* 프로모터가 들어있는 pCHF3 벡터에 클로닝 하여 제작하였다. *GVG:FLM-β* 및 *GVG:SVP*는 각각 유전자의 ORF를 PCR로 증폭하여, pTA7002 벡터에 클로닝 하였다. pTA7002 벡터는 텍사메타손으로 *GVG(GAL4-VP16-GR)*을 유도하여 표적유전자를 발현시키기 위해 사용하였다(Aoyama *et al.*, *Plant J.* 11:605-612, 1997). *35S:SVP:HA*는 *pSVP:SVP:HA*의 *SVP:HA* 부위를 PCR로 증폭하여 pCHF3 벡터에 클로닝하였다. Floral dip 방법을 변형하여 식물을 형질전환하였다(도 9).

[0039] **Genomic FLM 서열분석**

[0040] Genomic DNA 추출은 Plant DNA extraction kit(GeneAid, Korea)를 사용하였다. *FLM-β* 및 *FLM-δ* 전사물을 구별하기 위해, 1.5kb 게놈조각(인트론 1부터 엑손 4까지)을 Pfu fusion polymerase(MEB, MA)를 사용하여 PCR을 수행한 후, 염기서열분석을 하였다. 야생형의 *FLM* 염기서열 GenBank accession 번호는 다음과 같다: KF49688(*Ler*), KF496889(*An-1*), KF49690(*JI-3*), KF496891(*KZ-9*), KF49692(*Tsu-0*), KF496893(*Rubeshnoe-1*), KF49694(*En-1*), KF496895(*Li-5*), KF49696(*Bla-2*), KF496897(*Sei-0*), KF49698(*Mh-0*) 및 KF496899(*Gr-3*).

[0041] **실시예 1: 개화시기 조절인자가 손실된 돌연변이체의 개화시기 확인 및 개화촉진 유전자에 대한 발현 분석**

[0042] **1-1 : 돌연변이체의 개화시기 확인**

[0043] 식물의 주위 온도 인지 및 변화에 대한 신호전달 메커니즘을 결정하기 위한 첫단계로서, 주위 온도 변화에 민감성을 가지는 개화시기 조절 인자가 손실된 돌연변이체를 선정하였다. 하루 동안의 온도범위인 5°C-27°C에서

flm, *flc* 및 *svp* 돌연변이체의 개화시기를 확인하였다(도 1A).

[0044] 그 결과, 야생형 애기장대는 저온에서 개화가 지연되었으나, *svp-32* 돌연변이체는 모든 온도범위에서 개화가 되었으며(도 1A), *flm-3*은 10℃ 이하를 제외한 범위의 온도에서 개화가 되었고, *flc-3*은 16℃ 이하에서만 개화가 지연되었다. 이것은 SVP가 가장 넓은 온도 범위(5℃-27℃)에 작용한다는 것과 MADS box 단백질인 FLM, FLC 및 SVP가 서로 다른 온도에서 작용한다는 것을 나타낸다.

[0045] 또한, *svp* 돌연변이를 포함하는 이중 돌연변이와 삼중 돌연변이들도 5℃-27℃ 온도 범위에서 개화가 되어, SVP가 다른 두 유전자에 비해 개화시기 조절에 미치는 영향이 가장 큰 것을 확인하였다(도 2).

[0046] 1-2 : 돌연변이체의 개화촉진 유전자 발현 분석

[0047] 실시간 정량 PCR 분석을 위해 RNA를 애기장대로부터 RNA Purification Reagent(Invitrogen, USA)를 사용하여 분리하였다. RNA는 Nanodrop ND-200 분광 광도계(Nanodrop Technologies)로 측정하여 A260/A230>2.0 및 A260/A230>1.8의 RNA를 사용하였다. DNA 오염을 제거하기 위해, RNA 샘플에 DNaseI(NEB, USA)를 37℃에서 60분간 처리하였다. 1-2μg RNA는 cDNA를 합성하는데 사용하였으며, 실시간 정량 PCR 분석은 Roche SYBR Green Master mixture(Roche Applied Science, USA)를 사용하여 LightCycler 480(Roche Applied Science, USA)로 수행하였다. 레퍼런스 유전자로는 PP2AA3 및 SAND family 단백질을 사용하였다. 또한, *GVG:FLM-β* 및 *GVG:SVP* 식물에서 텍사메타손으로 GVG(GAL4-VP16-GR)을 유도하여 표적유전자를 발현시킨 후, 개화촉진 유전자의 발현을 분석하였다.

[0048] 그 결과, 주위 온도 변화에 민감성을 가지는 개화시기 조절인자가 손실된 돌연변이체에서의 개화촉진 유전자(*FT*, *TSF* 및 *SOC1*) 발현은 *svp-32*는 모든 온도범위인 10℃-27℃에서 높게 발현되었으며, *flm-3*은 16℃-27℃에서 높게 나타났고, *flc-3*은 23℃-27℃에서 높게 나타났다(도 1B). 또한, 텍사메타손이 처리된 식물에서는 개화촉진 유전자의 발현 감소를 확인할 수 있었다.

[0049] **실시예 2: 개화조절 인자 간의 상호작용 분석**

[0050] 본 실시예에서는 FLM-β 단백질과 SVP 단백질의 상호작용을 조사하였다.

[0051] 2-1: 효모 투-하이브리드 분석

[0052] 효모 투-하이브리드 분석은 *FLC*, *FLM-β* 및 *SVP*의 ORF를 PCR로 증폭하여 pGADT7 또는 pGBKT7 벡터(Clontech, USA)에 클로닝하여, 이전 기술한 방법으로 수행하였다(Lee *et al.*, *Plant Sci.* 185-6:97-104, 2012).

[0053] 그 결과, SD/-Trp/-Leu 배지 및 SD/-Trp/-Leu/-His/X-gal 배지에서 FLM-β와 SVP 단백질의 결합을 확인하였다.

[0054] 2-2: 시험관 내 GST pull-down 분석

[0055] 시험관 내 GST pull-down 분석을 수행하기 위해, *SVP* ORF를 pGEX-5x-1 벡터(Amersham Pharmacia Biotech, USA)에 클로닝한 후, 20℃에서 IPTG로 SVP-GST 융합 단백질의 생산을 *E. coli* BL21(DE3)에서 유도하였다. 수용성 GST 융합 단백질은 글루타치온 세파로즈 비드(GE Healthcare, USA)에 고정시켰다. *FLM-β* ORF를 pGEM 벡터에 클로닝한 후, TNT T7 Quick Coupled 전사/번역 시스템(Promega, USA)을 사용하여 ³⁵S와 함께 시험관 내 번역을 수행하였다. 번역산물은 글루타치온 세파로즈 비드에 고정되어 있는 GST 융합 단백질과 반응시켰다.

[0056] 그 결과, FLM-β와 SVP 단백질의 상호작용을 확인하였다(도 3A).

[0057] 2-3: 이분자형광상보 분석

[0058] 이분자형광상보 분석을 위해, *FLM-β* 및 *SVP* 단백질을 코딩하는 유전자를 pUC-SPYNE/pSPYNE-35S 및 pUC-SPYCE/pSPYCE-35S 벡터에 클로닝하였다(Walter *et al.*, *Plant J.* 40:428-438, 2004). SVP-nYFP 및 FLM-β-cYFP 융합 단백질을 DNA particle delivery system(PDS-1000/He; Bio-Rad, USA)을 사용하여 양과 상피세포에 전달하

었다. MS 배지에서 23℃ 및 16℃로 16-24시간 동안 어두운 상태로 배양 후, 세포를 confocal 현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

[0059] 그 결과, 양파의 핵에서 함께 발현되는 YFP(황색 형광 단백질)의 N 말단에 융합된 SVP와 YFP의 C 말단에 융합된 FLM-β가 23℃ 및 16℃에서 관찰되었다(도 3B).

[0060] 2-4: 상호 면역침전법 분석

[0061] 담배잎에서의 상호 면역침전법 분석은 이전에 공지된 방법에 따라 수행하였으며(Voinnet *et al.*, *Plant J.* 33:949-956, 2003), 애기장대 원형질에서의 상호면역침전법 분석도 이전에 기술한 방법에 따라 수행하였다(Lee *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 53:1802-1814, 2012). 35S:SVP:HA 및 35S:FLM-β:GFP 플라스미드 DNA는 애기장대 엽육 원형질체에서 일시적으로 발현시켜, 6시간 후에 100 μM 사이클로헥시미드(CHX)를 처리한 다음 27℃, 23℃, 16℃ 및 10℃에서 14시간 동안 배양하였다. 13,000 x g로 4℃에서 15분간 원심분리하여 추출한 단백질을 상층액에 항-HA 항체(Sigma, H9658)를 반응시켰다. A/G PLUS-Agarose bead(Santa Cruz, sc-2003)와 혼합하여 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 후, 분석하였다.

[0062] 그 결과, 담배 잎에서 FLM-β와 SVP의 상호작용을 다시 한번 확인하였고(도 3C), 이로써, FLM-β와 SVP가 결합하여 주위 온도 변화에 따른 개화를 조절한다는 것을 확인하였다.

[0063] 2-5: 염색질면역침강(ChIP) 분석

[0064] FLM 단백질과 SVP 단백질의 *FT*, *TSF* 및 *SOC1* 유전자의 게놈부위 결합을 분석을 수행하였다. 다양한 온도 및 빛의 조건으로 토양 또는 MS 배지에서 배양한 *pFLM:gFLM:GFP*, *pSVP:gSVP:HA* 및 *35S:SVP:HA*의 세포는 포름알데하이드로 고정시켰다. 핵산 추출 및 면역침강 분석은 이전에 공지된 방법에 따랐으며(Kim *et al.*, *Plant Physiol.* 159:461-478, 2012)), 소니케이션으로 크로마틴을 절단하고 GFP 및 cMyc 항체로 분석하였다.

[0065] 그 결과, *flm-3*, *svp-32* 돌연변이체 및 이중 돌연변이체에서 *FT*, *TSF* 및 *SOC1* 유전자의 게놈부위에 결합하는 FLM-β 및 SVP 단백질 양이 감소하였다(도 3D). 이로써, FLM-β와 SVP가 결합하여 주위 온도 변화에 따른 개화를 조절한다는 것을 확인하였다.

[0066] **실시예 3: FLM-β와 SVP의 발현 분석**

[0067] 야생형의 *SVP*, *FLC* 및 *FLM-β* 발현 측정을 위해, 각각의 온도에서 전사 수준을 RT-qPCR로 분석하였다. 또한, SVP 단백질의 안정성 분석은 *pSVP:SVP:HA svp-32* 식물을 23℃로 MS 배지에서 장일조건 또는 단일조건으로 성장시킨 후, 100 μM CHX를 30분간 처리하여 각각의 온도(27℃, 23℃, 16℃ 및 10℃)로 옮겨 10 μM MG132 프로테아좀 저해제 존재하에 배양하였다. 높은 온도에서 안정한 FT는 대조군 단백질로 사용하였다.

[0068] 그 결과, *FLM-β* 및 *FLC*의 전사체는 온도가 증가함에 따라 감소하였으나, *SVP*는 온도가 증가하여도 전사량의 변화는 없었다(도 4A). 그러나, SVP 단백질은 고온에서는 감소함을 확인하였으며(도 4B), 고온에서 12시간 내에 분해되고, 프로테아좀 저해제인 MG132에 의해 분해가 저해되었다(도 4B). 또한, 이와 더불어 온도 변화에 의한 FLM-β 전사체 및 SVP 단백질의 감소에 따라 SVP-FLM-β 복합체도 감소한 것을 확인하였다(도 4C).

[0069] **실시예 4: SVP 단백질의 개화촉진 유전자 게놈부위 결합 분석**

[0070] *pSVP:SVP:HA svp-32*, *pSVP:SVP:HA svp-32 flc-3* 및 *pSVP:SVP:HA svp-32 flm-3* 돌연변이에서 염색질 면역침강법 분석으로 SVP 단백질과 *FT*, *TSF* 및 *SOC1* 유전자의 게놈부위 결합을 분석하였다(도 4D,E).

[0071] 그 결과, SVP의 개화촉진 유전자 게놈에의 결합은 장일조건 저온이동(10℃)에서 높게 나타났으나, *flm* 변이체는 SVP 단백질이 결합하지 못하였으며, *flc* 변이체는 SVP 단백질과의 결합이 평균 24.7% 감소하였다. 단일조건 저온이동에서는 SVP 단백질의 결합이 3배 정도 증가한 것을 확인하였다(도 4E). 또한, *FLM*이 활성을 잃으면 SVP 단백질과 표적유전자와의 결합을 저해하며, 이는 SVP-FLM-β 복합체가 10℃-27℃ 온도 범위에서 주위온도 변화를 감지하여 개화를 조절하는 주요매개체임을 나타낸다.

[0072]

실시예 5: Artificial miRNA 형질전환 식물체 제작

[0073]

본 실시예에서는, 목적유전자인 SVP 및 FLM-β의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스와 이것과 상보적인 서열을 가지는 안티센스로 구성되는 이중가닥 RNA를 식물체에 도입하여 목적유전자의 표적부위 mRNA의 분해를 유도함으로써 목적유전자인 SVP 및 FLM-β의 발현을 억제하였다.

[0074]

pRS300 벡터를 주형(template)로 하여, SVP 및 FLM-β 유전자의 표적 부위 572bp를 각각의 프라이머(표 1)를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 572bp 증폭 산물들은 pBluescriptSKII(+) 벡터내로 클로닝하고, 시퀀싱으로 염기서열을 확인하였다. 이후, 클로닝된 인서트(inserts)는 KpnI/BamHI 제한효소로 절단한 후에, 식물 형질전환 벡터인 pCHF3에 다시 클로닝하였다.

[0075]

p35S::amiR-SVP 또는 p35S::amiR-FLM-β을 발현하는 형질전환 애기장대를 제조하기 위해, 상기 제작된 각각의 벡터들을 가지는 아그로박테리움 튜메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) GV3101 균주를 100mg/L 스펙티노마이신(Spectinomycin)이 첨가된 YEB 배지에서 3일 동안 28℃에서 배양하였다. 이 후, p35S::amiR-SVP 또는 p35S::amiR-FLM-β에 대해, floral dip 방법으로 야생형 애기장대(ecotype Columbia)를 형질전환시켰다. 모든 형질전환 식물체들은 100mg/L 카나마이신(Kanamycin)을 함유하는 MS 배지에서 선별되었고, 빛이 $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 강도로 제공되는, 장일조건(LD)[16시간(light)/8시간(dark)]의 광주기하에서 23℃ 및 16℃로 배양하여, 인공 miRNA 형질전환 식물체를 제작하였다.

표 1

[0076]

Artificial miRNA 형질전환 식물체 제작에 사용된 Target region 및 프라이머

Constructs	Target regions (5'→ 3')	Primers (5'→ 3')
p35S::amiR-SVP-1	TTGTGTAAGTTTCTGCCTATG (서열번호 1)	TATAGGCAGAACTTACACAG (서열번호 7)
		CTGTGTAAGTTTCTGCCTATA (서열번호 8)
		CTATGTAAGTTTCTGCCTATT (서열번호 9)
		AATAGGCTGAAACTTACATAG (서열번호 10)
p35S::amiR-SVP-2	TCGTCGGAGTCTATTACTAAC (서열번호 2)	TTTAGTAATAGACTCCGACGA (서열번호 11)
		TCGTCGGAGTCTATTACTAAA (서열번호 12)
		TCATCGGAGTCTAATACTAAT (서열번호 13)
		ATTAGTATTAGACTCCGATGA (서열번호 14)
p35S::amiR-SVP-3	CAGTGATCAGCCCGAATGAG (서열번호 3)	TTCAATCGGGCGTGATCACTT (서열번호 15)
		AAGTGATCAGCCCGAATGAA (서열번호 16)
		AAATGATCAGCCCGAATGAT (서열번호 17)
		ATCAATCGGGCGTGATCATTT (서열번호 18)
p35S::amiR-FLM-β-1	AAGCCTGATTCATAATTAAGA (서열번호 4)	TCCTAATTATGAATCAGGCGT (서열번호 19)
		ACGCCTGATTCATAATTAAGA (서열번호 20)
		ACACCTGATTCATTATTAAGT (서열번호 21)
		ACTTAATAATGAATCAGGTGT (서열번호 22)
p35S::amiR-FLM-β-2	ATGATGGAGTATATCGAGTCC (서열번호 5)	TGACTCGATATACTGCGTCAT (서열번호 23)
		ATGACGCAGTATATCGAGTCA (서열번호 24)
		ATAACGCAGTATAACGAGTCT (서열번호 25)
		AGACTCGTTATACTGCGTTAT (서열번호 26)
p35S::amiR-FLM-β-3	CTGCTCTGTCCGTAAGTAGAG (서열번호 6)	TTCTACTTACGGATAGCGCAG (서열번호 27)
		CTGCGCTATCCGTAAGTAGAA (서열번호 28)
		TACGCTATCCGTTAGTAGAT (서열번호 29)
		ATCTACTAACGGATAGCGTAG (서열번호 30)

[0077]

실시예 6: miRNA 형질전환 식물체의 개화시기 분석

[0078]

실시예 5에서 제작된 miRNA 형질전환 식물체에서 SVP 및 FLM-β 유전자의 발현을 RT-qPCR로 분석하였다. RT-qPCR 분석을 위해, 트리졸 시약(Trizol reagent)을 사용하여 형질전환 식물체의 총 RNA를 추출한 후, First-Strand cDNA 합성 키트(Thermo Scientific, USA)와 oligo-dT 프라이머를 이용하여 역전사 반응을 실시하였다. 합성된

First-Strand cDNA는 하우스키핑 유전자인 PP2A A3와 SAND, 그리고 SVP 및 FLM-β에 대한 RT-qPCR 분석시, 유전자 특이적인 프라이머와 함께 사용되었다.

그 결과, 각각의 형질전환 식물체에서 SVP 및 FLM-β 유전자의 발현 감소를 확인할 수 있었다(도 5).

상기 p35S::amiR-SVP와 p35S::amiR-FLM-β 발현하는 형질전환 식물체의 개화시기를 각각 23℃ 및 16℃의 장일 조건에서 측정하였다.

그 결과, p35S::amiR-SVP-1에 해당하는 형질전환 식물체의 경우 개화시기가 야생형과 유사하였으나, 그 외에 p35S::amiR-SVP-2/-3과 p35S::amiR-FLM-β-1/-2/-3 형질전환 식물체에서는 야생형에 비해 개화시기가 빨라지고 온도에 둔감한 표현형을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 6 및 7).

또한, 본 발명의 마이크로 RNA 표적부위 외에 추가로 분석하고자 하는 SVP 및 FLM-β 유전자의 표적 부위를 확인하였다(표 2)

표 2

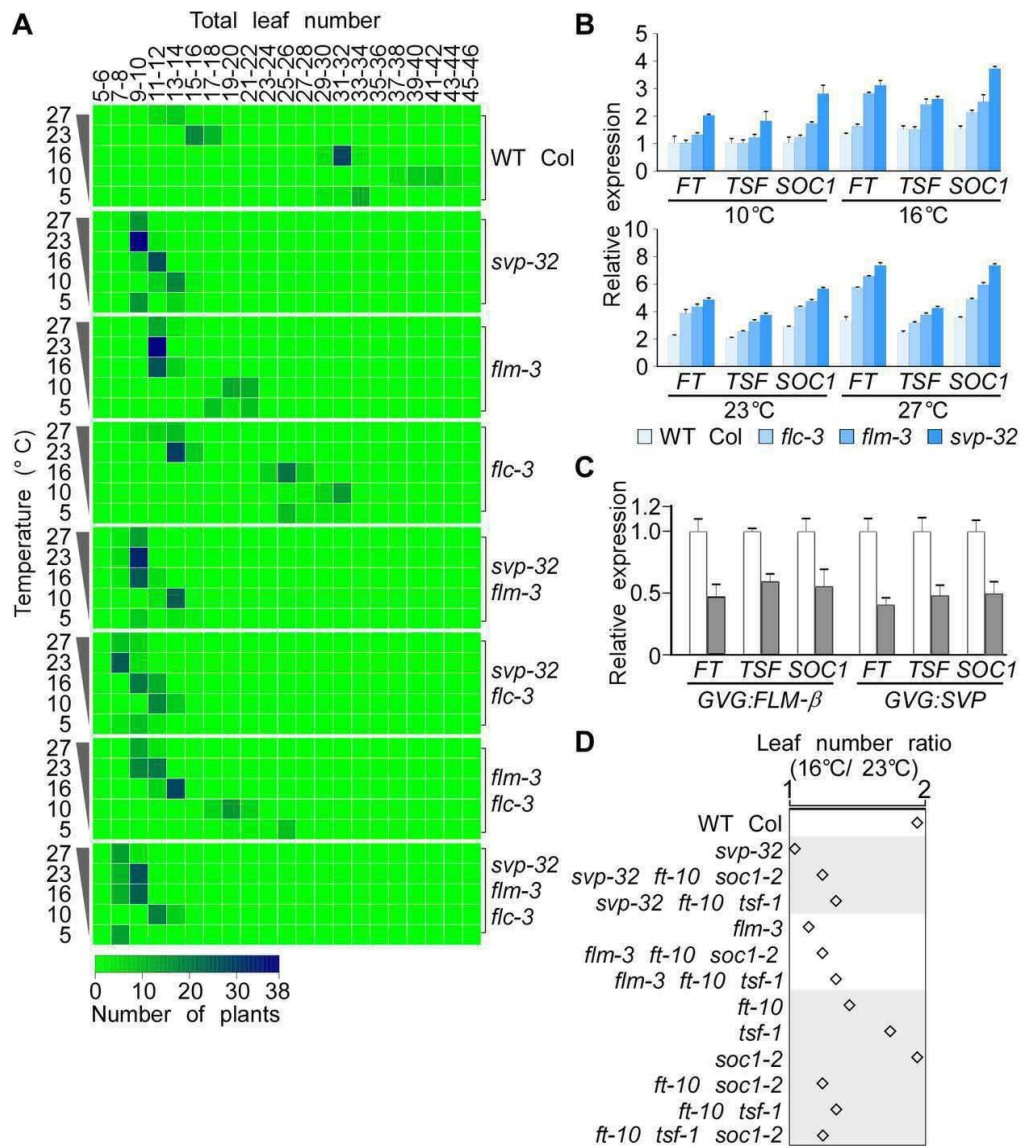
SVP 및 FLM의 artificial miRNA에 대해 발현감소가 예상되는 SVP와 FLM-β의 추가지역

Gene	Target regions (5'→ 3')	Gene	Target regions (5'→ 3')
SVP	CTGCATTTCTGGTTAGTAACG (서열번호 31)	FLM-β	GAGTATATCGAGTCCCTTAAA (서열번호 40)
	ACGCTTGTACCGATAAACTT (서열번호 32)		AAGCTCGACAACCTTCGATTTC (서열번호 41)
	AAGAGACAATGTCTAAGTAGT (서열번호 33)		GTGTCTGAATGTACGGATTGG (서열번호 42)
	TAGGCTCGGCTTACCGTATGG (서열번호 34)		ATGGGAAAGAATACGTTGCTG (서열번호 43)
	AAGTCCTAGAGAGGCATAACT (서열번호 35)		TAGGGCATAACCCCTTATCGGA (서열번호 44)
	GAGCGACTTGGCATGCAAATA (서열번호 36)		TTGTGTCTGAATGTACGGATT (서열번호 45)
	CAGCAAGGAACGCAACTAACG (서열번호 37)		TTGTACCTCCTTCGGAGACAA (서열번호 46)
	TCGGCTTACCGTATGGTGGTT (서열번호 38)		ACGGCTGAGTTTTCACCTTAA (서열번호 47)
	TCGGAGAACGCTGCTGTGTAC (서열번호 39)		GAGCTAGGAAGGCAGAACTGA (서열번호 48)

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

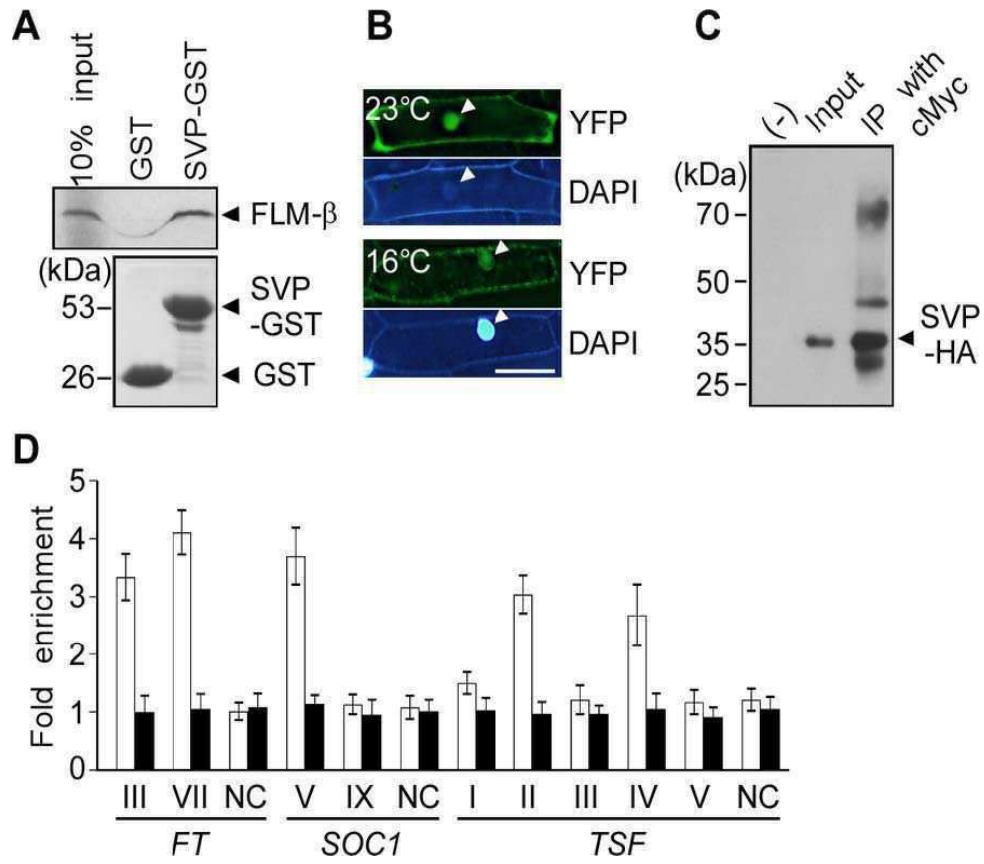
도면1



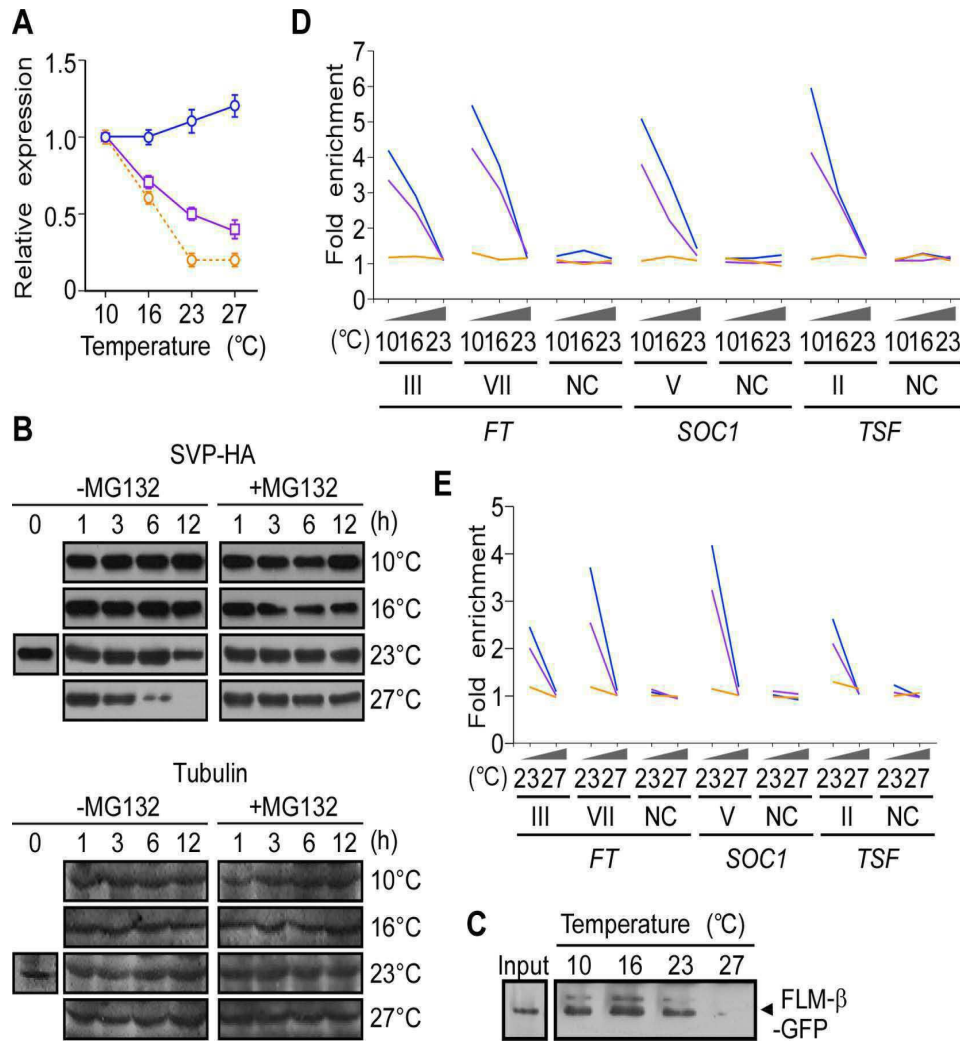
도면2

Genotype	RLN	CLN	TLN	TLN StDev	TLN range	n
Experiment 1 (27°C, long days)						
Col (wild-type)	10.2	3.0	13.2	±1.9	11-17	15
<i>syp-32</i>	7.8	1.6	9.4	±0.7	8-10	18
<i>flm-3</i>	8.7	3.1	11.8	±0.8	11-13	16
<i>flc-3</i>	9.9	2.4	12.3	±1.6	10-14	20
Experiment 2 (23°C, long days)						
Col (wild-type)	13.3	3.4	16.7	±0.9	15-19	30
<i>syp-32</i>	7.8	2.0	9.8	±0.5	9-10	42
<i>flm-3</i>	8.6	2.9	11.5	±0.5	11-12	38
<i>flc-3</i>	10.9	2.6	13.5	±1.1	12-16	37
Experiment 3 (16°C, long days)						
Col (wild-type)	25.6	5.8	31.4	±1.0	30-34	35
<i>syp-32</i>	8.6	2.5	11.1	±0.7	10-12	34
<i>flm-3</i>	9.4	2.5	11.9	±0.9	11-14	33
<i>flc-3</i>	20.5	4.8	25.3	±1.4	23-28	35
Experiment 4 (10°C, long days)						
Col (wild-type)	33.2	7.8	41.0	±2.6	38-46	26
<i>syp-32</i>	10.4	2.7	13.1	±0.9	12-15	27
<i>flm-3</i>	15.6	4.5	20.1	±1.2	17-22	27
<i>flc-3</i>	25.0	5.6	30.6	±1.5	28-32	26
Experiment 5 (5°C, long days)						
Col (wild-type)	26.2	6.2	32.4	±1.5	30-34	18
<i>syp-32</i>	8.6	1.9	10.5	±2.2	9-14	22
<i>flm-3</i>	15.4	4.0	19.4	±1.8	17-21	21
<i>flc-3</i>	22.0	5.7	27.7	±2.1	26-31	19
Experiment 6 (23°C, long days)						
Col (wild-type)	11.9	2.9	14.8	±0.9	13-16	26
<i>syp-32</i>	6.5	2.6	9.1	±0.9	8-10	25
<i>flm-3</i>	10.1	2.0	12.1	±0.9	11-13	26
<i>tsf-1</i>	12.0	5.0	17.0	±2.0	15-19	24
<i>soc1-2</i>	20.6	4.5	25.1	±1.2	23-27	26
<i>ft-10</i>	33.4	11.2	44.6	±3.4	41-48	25
<i>ft-10 soc1-2</i>	49.9	10.6	60.5	±3.6	56-65	25
<i>ft-10 tsf-1</i>	52.4	9.6	62.0	±2.5	59-65	26
<i>syp-32 ft-10 soc1-2</i>	47.6	10.6	58.2	±1.8	56-60	26
<i>flm-3 ft-10 soc1-2</i>	46.7	10.7	57.4	±2.0	55-60	27
<i>syp-32 ft-10 tsf-1</i>	28.1	7.9	36.0	±1.8	34-38	15
<i>flm-3 ft-10 tsf-1</i>	32.1	9.9	42.0	±2.7	39-45	17
<i>ft-10 soc1-2 tsf-1</i>	63.9	18.5	82.4	±6.8	75-90	8
Experiment 7 (16°C, long days)						
Col (wild-type)	22.2	5.9	28.1	±2.4	25-31	16
<i>syp-32</i>	7.0	2.4	9.4	±1.0	8-11	15
<i>flm-3</i>	10.5	2.7	13.2	±0.6	12-14	17
<i>tsf-1</i>	24.0	5.7	29.7	±1.9	27-32	18
<i>soc1-2</i>	39.8	7.4	47.2	±2.7	44-50	19
<i>ft-10</i>	52.3	9.8	62.1	±2.2	59-65	13
<i>ft-10 soc1-2</i>	59.3	13.1	72.4	±4.7	67-78	12
<i>ft-10 tsf-1</i>	64.8	15.1	79.9	±4.6	75-85	13
<i>syp-32 ft-10 soc1-2</i>	59.1	11.3	70.4	±3.2	67-74	15
<i>flm-3 ft-10 soc1-2</i>	58.3	9.1	67.4	±3.7	63-72	14
<i>syp-32 ft-10 tsf-1</i>	35.0	10.7	45.7	±4.7	41-51	15
<i>flm-3 ft-10 tsf-1</i>	41.3	14.0	55.3	±4.6	50-60	16
<i>ft-10 soc1-2 tsf-1</i>	78.1	23.3	101.4	±4.1	97-106	9

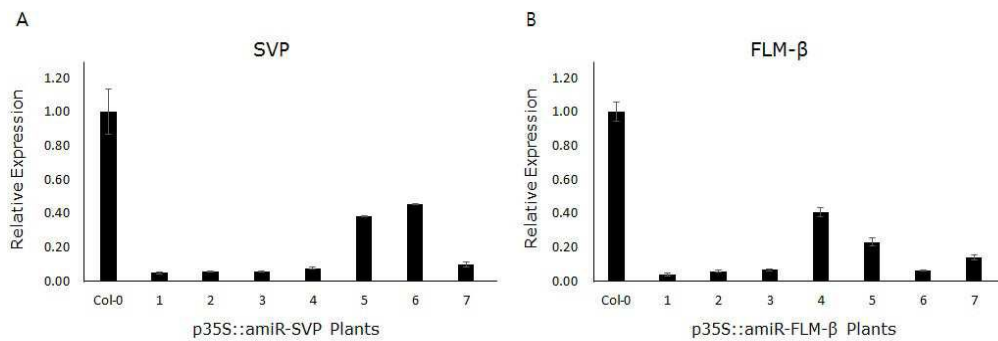
도면3



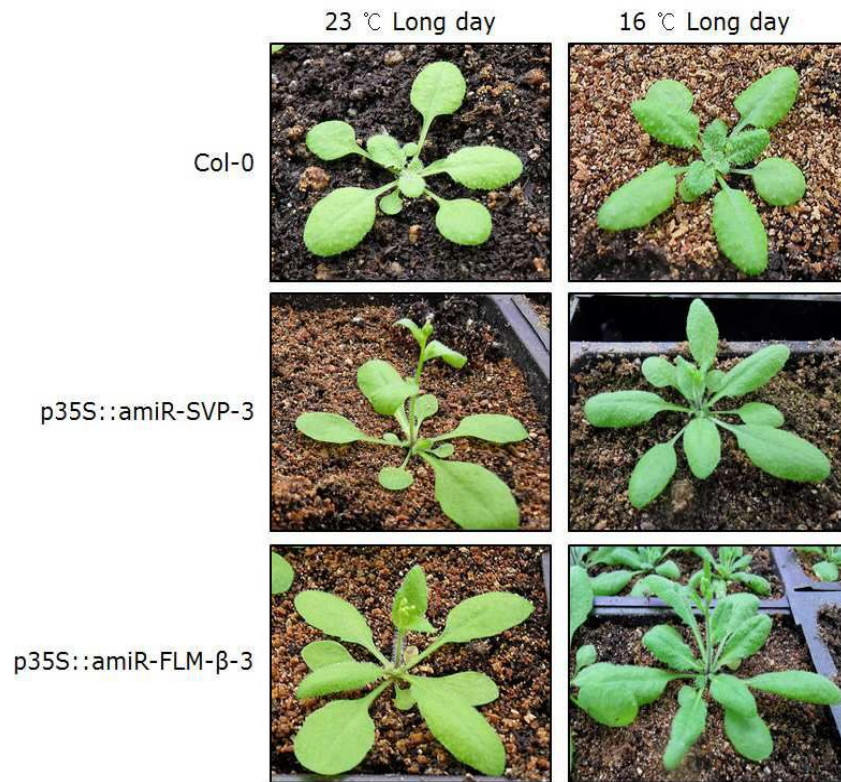
도면4



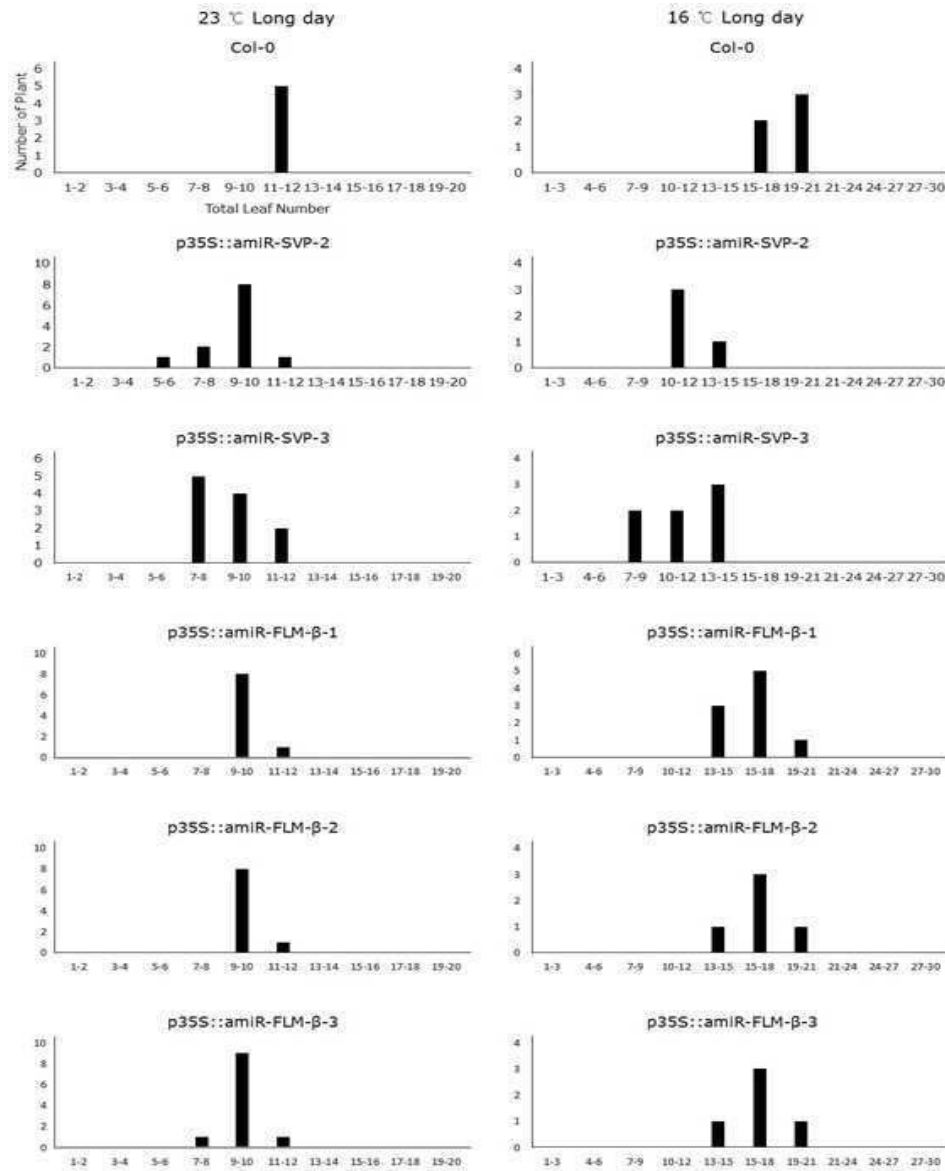
도면5



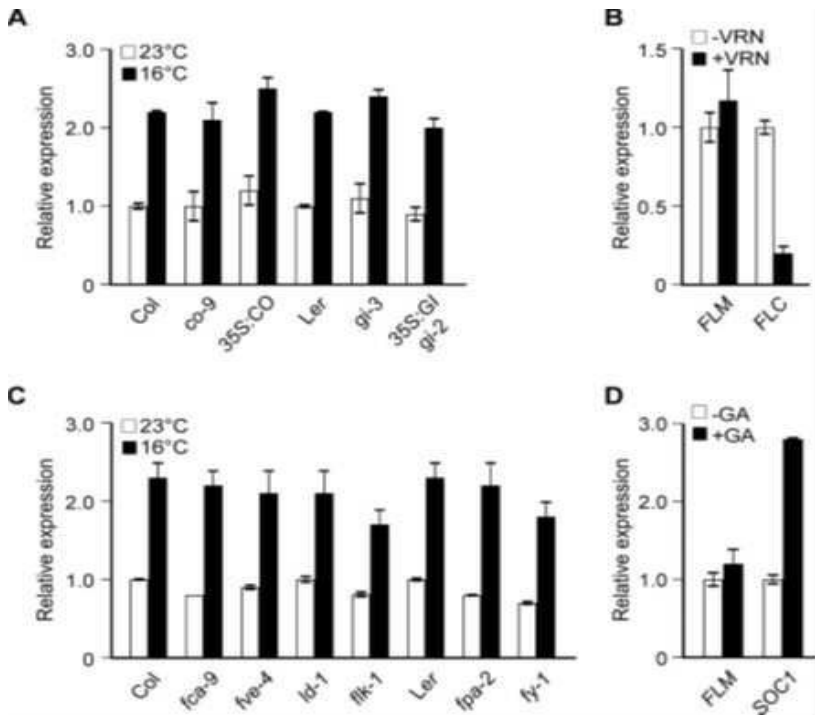
도면6



도면7



도면8



도면9



도면10a

Gene	Primer	Purpose [†]	Sequence (5' to 3') [*]	Direction
<i>ANNAT1</i>	JH9547	qPCR	CGAGAGAGCTATCTTGTGTGGAC	Sense
	JH9548	qPCR	TGTCCTTGTGCAAGCAACTTCC	Anti-sense
<i>ATD119</i>	JH9551	qPCR	CATCGGGTTGTGCTGTCACATAG	Sense
	JH9552	qPCR	TAAGAGAACAACAGGGCATACC G	Anti-sense
<i>AT1G133 20</i>	JH6505	qPCR	GCGGTTGTGGAGAACATGATACG	Sense
	JH6506		GAACCAAACACAATTCGTTGCTG	Anti-sense
<i>AT2G283 90</i>	JH7588	qPCR	TTGATCCACTTGCAGACAAGGC	Sense
	JH7589		TACCCTTTGGCACACCTGATTG	Anti-sense
<i>CBF3</i>	JH7760	qPCR	TTGAGATGCCGAGTTTGTGGC	Sense
	JH7761		ATTCCACTGTACGGACGGAAGC	Anti-sense
<i>COR15a</i>	JH7758	qPCR	ACCTCAACGAGGCCACAAAGAAA G	Sense
	JH7759		CGCTTCTCACCATCTGCTAATGC	Anti-sense
<i>FLM</i>	JH6340	qPCR	TGGTCTAACGGGTGAAAGCAAGT G	Sense
	JH6341		TTCAAGCTTGCTTTGGACTG	Anti-sense
	JH7648	qPCR	TGTTCAAGCCGGAGAAACCT	Sense
	JH7649		CCATCATCAGTTCTGCCTTCC	Anti-sense
	JH7654	qPCR	CAGCAAGCTTGAAGAACCAAA	Sense
	JH7655		GCCTAGAATATGGCCTTTATCGAA	Anti-sense
	JH7656	qPCR	TTGATCGTTATGAAATACAACATG C	Sense
	JH7657		GCAGTCTCAAGTTGTTCTCCA	Anti-sense
	JH7684	qPCR	CTATGACTCTTCCTCCGGTGAC	Sense
	JH7685		GTGGAAGATAATTCTGAATTTTT CTTCAAGAT	Anti-sense
	JH9540	qPCR	CATGCTGATGAACTTAGAGCCTTA GATC	Sense
	JH9541	qPCR	CAGCAACGTATTCTTTCCCAT	Anti-sense
	JH9542	qPCR	GATAGAAGCGCTGTTCAAGC	Sense
	JH4710	Y2H	catatgATGGGAAGAAGAAAAATCGA GATC	Sense
	JH4711		ggatccATTGAGCAGCGGGAGAGTCT CCGG	Anti-sense
	JH7413	GVG	CTCGAGATGGGAAGAAGAAAAAT CGAGATC	Sense

도면10b

	JH7414		ACTAGTCTAATTGAGCAGCGGGAG AGTCTC	Anti-sense
	JH3280	Transgene	ctcgagATGGGAAGAAGAAAAATC	Sense
	JH3281		gacgtcttATTGAGCAGCGGGAGAG	Anti-sense
	JH5304	Localization YFP	actagtATGGGAAGAAGAAAAATCGA GA	Sense
	JH5305		ctgcagATTGAGCAGCGGGAGAGTC	Anti-sense
	JH8967	GFP	TCTAGAATGGGAAGAAGAAAAAT CGAG	Sense
	JH8968		GGATCCCATTTGAGCAGCGGGAGA GTCTC	Anti-sense
	JH2275	Sequencing	TGACAATATTGGCTGCGAAGT	Sense
	JH3476	Sequencing	CGTCTTATGCGTCTTACTAATTGTT CA	Sense
	JH3477	Sequencing	TGAAACTCTGATCATCTGGTGCTC T	Anti-sense
	JH7657	Sequencing	GCAGTCTCAAGTTGTTCTCTCCA	Anti-sense
FLC	JH3778	qPCR	GCCAAGAAGACCGAACTCAT	Sense
	JH3779		TTTGTCAGCAGGTGACATC	Anti-sense
	JH5936	Y2H	gccatggATGGTCTCATTCTCCG	Sense
	JH5937		cgtcgacTTGTTCAATCTTTTTCAT	Anti-sense
	JH8965	GFP	TCTAGAATGGGAAGAAAAAACT AGAA	Sense
	JH8966		GGATCCCATTAAGTAGTGGGAGA GTCAC	Anti-sense
FT	JH6488	qPCR	AGGCCTTCTCAGGTTCAAAACAAG C	Sense
	JH6489		TGCCAAAGGTTGTTCCAGTTGTAG C	Anti-sense
	JH6815	ChIP-qPCR-I	GGCTATGGTTATAAGTTTCATCTTT GA	Sense
	JH6816		AATACTAACCATCCATTTGCACGA	Anti-sense
	JH6823	ChIP-qPCR-II	AGTTGAGATTGGTGGAGAAGACCT TGATTTGGGTATCATAAAGTAAAA	Sense
	JH6824		CCA	Anti-sense
	JH6829	ChIP-qPCR-III	TTCAGGTTTTACTCCATCATAACGG	Sense
	JH6830		TGTGATGATGTTTTTGGTCAGAGA	Anti-sense
	JH6165	qPCR	ATAGGAACATGCTCAATCGAGGA GCTG	Sense
SOC1				

도면10c

	JH6166		TTTCTTGAAGAACAAGGTAACCCA ATG	Anti-sense
	JH6848	ChIP- qPCR-I	TGGGAGGGAAAAAGATGTGT	Sense
	JH6849		TGGTAATGGTGTGTTGTGAAACC	Anti-sense
	JH6853	ChIP- qPCR-II	CAAATCATCCATAGAAAGAGAGA GAGA	Sense
	JH6854		CAAGATGATATACTAGCGGAAAT AAAA	Anti-sense
	JH6857	ChIP- qPCR-III	CATGAAAGCGAAGTTTGGTCA	Sense
	JH6858		GACAACAAGAGAGAAGCAGCTTT AGA	Anti-sense
SVP	JH3776	qPCR	GAAGAGAACGAGCGACTTGG	Sense
	JH3777		GAGCTCTCGGAGTCAACAGG	Anti-sense
	JH4601	Y2H	gaattcATGGCGAGAGAAAAGATT	Sense
	JH2246		CTCGAGTCCCTTTTCTGAAGTTCG CTG	Anti-sense
	JH7411	GVG	ctcgagATGGCGAGAGAAAAGATT AGATC	Sense
	JH7412		actagtCTAACCACCATACGGTAAGC CGAG	Anti-sense
	JH2934	Transgen e	ggatcccATGGCGAGAGAAAAGATT ggatccgcACCACCATACGGTAAGCC	Sense
	JH2935		G	Anti-sense
	JH8963	Localizati on YFP	tctagaATGGCGAGAGAAAAGATTCA G	Sense
	JH8964		ggatccCACCACCATACGGTAAGCCG AG	Anti-sense
	JH2486	GST	ggatcctaATGGCGAGAGAAAAGATT	Sense
	JH2487		ctcgagCTAACCACCATACGGTAAGC C	Anti-sense
TSA1	JH9549	qPCR	AGCGATTCAACCGCGGACAATAA C	Sense
	JH9550	qPCR	AAGGCTCTCTGTAGCAGCTTCG	Anti-sense
TSF	JH6171	qPCR	CTCGGGAATTCATCGTATTG	Sense
	JH6172		CCCTCTGGCAGTTGAAGTAA	Anti-sense
	JH6444	ChIP- qPCR-I	CGTCCACGTATGTTTTCGT	Sense
	JH6833		TTCCCCAAGTTTGGAAGACAA	Anti-sense
	JH6834	ChIP- qPCR-II	ACTTCTGTTACCTTGTGTCTATTG TT	Sense
	JH6835		AAGGACACTACATTACACCGATTA	Anti-sense

도면10d

		TG	
JH6836	ChIP-qPCR-III	TGATATACGTACGTTGAACGAGTT	Sense
		G	
JH6837		GACCACAAGAGGATCTCTACGACT	Anti-sense
		T	
JH6838	ChIP-qPCR-IV	TTGGAGATGTTCTTGATCCTTTCA	Sense
		ACGAAAGAGTGAGCTACGAGGAA	
JH6839		C	Anti-sense
JH6840	ChIP-qPCR-V	ACGTTTTCAAGAGACGGTTAACTT	Sense
		GAAAAGTGATAACACACATTAAG	
JH6841		ACGA	Anti-sense
JH6453	ChIP-qPCR-VI	ACAAAATAGTCTCGCGGTGT	Sense
		TGAAGTATTTAAGCATCTATGTCA	
JH6454		ATG	Anti-sense
VCS	JH9553 qPCR	TGGCCATTACAGAGAGTGACG	Sense
	JH9554 qPCR	CCATCTAGGCTAACACTGGCCAAC	Anti-sense

Lowercase letters denote synthetic restriction enzyme sites.

[†]ChIP: chromatin immunoprecipitation.

서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Controlling Flowering Time by Regulating of
SVP-FLM-beta Protein Complex Formation
- <130> P14-B283
- <150> 2014-0005283
- <151> 2014-01-15
- <160> 139
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> p35S::amiR-SVP-1
- <400> 1
- ttgtgtaagt ttctgcctat g
- <210> 2
- <211> 21
- <212>

21

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p35S::amiR-SVP-2

<400> 2

tcgtcggagt ctattactaa c 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p35S::amiR-SVP-3

<400> 3

cagtgatcac gcccgaaatga g 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p35S::amiR-FLM-1

<400> 4

aagcctgatt cataattaag a 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p35S::amiR-FLM-2

<400> 5

atgatggagt atatcgagtc c 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p35S::amiR-FLM-3

<400> 6

ctgctctgtc cgtaagtaga g 21

<210> 7

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SVP-1
 <400> 7
 tataggcaga aacttacaca g 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SVP-2
 <400> 8
 ctgtgtaagt ttctgcctat a 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SVP-3
 <400> 9
 ctatgtaagt ttcagcctat t 21

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SVP-4
 <400> 10
 aataggctga aacttacata g 21

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SVP-5
 <400> 11

tttagtaata gactccgacg a	21
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SVP-6	
<400> 12	
tcgtcggagt ctattactaa a	21
<210> 13	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SVP-7	
<400> 13	
tcatcggagt ctaataactaa t	21
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SVP-8	
<400> 14	
attagtatta gactccgatg a	21
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SVP-9	
<400> 15	
ttcattcggg cgtgatcact t	21
<210> 16	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SVP-10	

<400>	16	
aagtgatcac gccggaatga a		21
<210>	17	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SVP-11	
<400>	17	
aaatgatcac gccggaatga t		21
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SVP-12	
<400>	18	
atcattccgg cgtgatcatt t		21
<210>	19	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FLM-1	
<400>	19	
tcttaattat gaatcaggcg t		21
<210>	20	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FLM-2	
<400>	20	
acgcctgatt cataattaag a		21
<210>	21	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLM-3

<400> 21

acacctgatt cattattaag t

21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLM-4

<400> 22

acttaataat gaatcaggtg t

21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLM-5

<400> 23

tgactcgata tactgcgtca t

21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLM-6

<400> 24

atgacgcagt atatcgagtc a

21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLM-7

<400> 25

ataacgcagt ataacgagtc t

21

<210> 26

<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FLM-8	
<400>	26	
	agactcgtta tactgcgtta t	21
<210>	27	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FLM-9	
<400>	27	
	ttctacttac ggatagcgca g	21
<210>	28	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FLM-10	
<400>	28	
	ctgcgctatc cgtaagtaga a	21
<210>	29	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FLM-11	
<400>	29	
	ctacgctatc cgttagtaga t	21
<210>	30	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FLM-12	
<400>	30	
	atctactaac ggatagcgta g	21

<210> 31
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SVP31
 <400> 31
 ctgcatttct ggtagtaac g 21

<210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SVP32
 <400> 32
 acgcttgtca ccgataaaact t 21

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SVP33
 <400> 33
 aagagacaat gtctaagtag t 21

<210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SVP34
 <400> 34
 taggctcggc ttaccgtatg g 21

<210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SVP35

<400>	35	
aagtcctaga gaggcataac t		21
<210>	36	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SVP36	
<400>	36	
gagcgacttg gcatgcaaat a		21
<210>	37	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SVP37	
<400>	37	
cagcaaggaa cgcaactaac g		21
<210>	38	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SVP38	
<400>	38	
tcggcttacc gtatggtggt t		21
<210>	39	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SVP39	
<400>	39	
tcggagaacg ctgctgtgta c		21
<210>	40	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> FLM40

<400> 40

gagtatatcg agtcccttaa a

21

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLM41

<400> 41

aagctcgaca actttcgatt c

21

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLM42

<400> 42

gtgtctgaat gtacggattg g

21

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLM43

<400> 43

atgggaaaga atacgttgct g

21

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLM44

<400> 44

tagggcataa cccttatcgg a

21

<210> 45

<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FLM45
 <400> 45
 ttgtgtctga atgtacggat t 21
 <210> 46
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FLM46
 <400> 46
 ttgtacctcc ttcggagaca a 21

 <210> 47
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FLM47
 <400> 47
 acggctgagt tttcacctta a 21
 <210> 48
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FLM48
 <400> 48
 gagctaggaa ggcagaactg a 21
 <210> 49
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH9547
 <400> 49
 cgagagagct atcttgttgt ggac 24

<210>	50	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH9548	
<400>	50	
	tgtccttggtg caagcaactt cc	22
<210>	51	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH9551	
<400>	51	
	catcgggttg tgctgtcaca tag	23
<210>	52	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH9552	
<400>	52	
	taagagaaca aacagggcat accg	24
<210>	53	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6505	
<400>	53	
	gcggttggtg agaacatgat acg	23
<210>	54	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6506	
<400>	54	

gaaccaaaca caattcgttg ctg	23
<210> 55	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH7588	
<400> 55	
ttgatccact tgcagacaag gc	22
<210> 56	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH7589	
<400> 56	
taccctttgg cacacctgat tg	22
<210> 57	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH7760	
<400> 57	
ttgagatgcc gagtttgttg gc	22
<210> 58	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH7761	
<400> 58	
attccactgt acggacggaa gc	22
<210> 59	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> JH7758
 <400> 59
 acctcaacga ggccacaaag aaag 24
 <210> 60
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH7759
 <400> 60
 cgctttctca ccatctgcta atgc 24
 <210> 61
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH6340
 <400> 61
 tggctcaacg ggtgaaagca agtg 24

 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH6341
 <400> 62
 ttcaagcttg ctttggactg 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH7648
 <400> 63
 tgttcaagcc ggagaaacct 20
 <210> 64
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JH7649

<400> 64

ccatcatcag ttctgccttc c

21

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JH7654

<400> 65

cagcaagctt gaagaaccaa a

21

<210> 66

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JH7655

<400> 66

gcctagaata tggcctttat cgaa

24

<210> 67

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JH7656

<400> 67

ttgatcggtta tgaaatacaa catgc

25

<210> 68

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JH7657

<400> 68

gcagttctcaa gttgttcctc ca

22

<210> 69

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH7684
 <400> 69
 ctatgactct tcctccggtg ac 22
 <210> 70
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH7685
 <400> 70
 gtggaagata attctgaatt ttttcttcaa gat 33

 <210> 71
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH9540
 <400> 71
 catgctgatg aacttagagc cttagatc 28
 <210> 72
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH9541
 <400> 72
 cagcaacgta ttctttccca t 21
 <210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH9542
 <400> 73

gatagaagcg ctgttcaagc	20
<210> 74	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH4710	
<400> 74	
catatgatgg gaagaagaaa aatcgagatc	30
<210> 75	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH4711	
<400> 75	
ggatccattg agcagcggga gagtctccgg	30
<210> 76	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH7413	
<400> 76	
ctcgagatgg gaagaagaaa aatcgagatc	30
<210> 77	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH7414	
<400> 77	
actagtctaa ttgagcagcg ggagagtctc	30
<210> 78	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	JH3280	
<400>	78	
ctcgagatgg	gaagaagaaa aatc	24
<210>	79	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH3281	
<400>	79	
gacgtcttat	tgagcagcgg gagag	25
<210>	80	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH5304	
<400>	80	
actagtatgg	gaagaagaaa aatcgaga	28
<210>	81	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH5305	
<400>	81	
ctgcagattg	agcagcggga gagtc	25
<210>	82	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH8967	
<400>	82	
tctagaatgg	gaagaagaaa aatcgag	27
<210>	83	
<211>	28	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH8968	
<400>	83	
	ggatccatt gagcagcggg agagtctc	28
<210>	84	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH2275	
<400>	84	
	tgacaatatt ggctgcgaag t	21
<210>	85	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH3476	
<400>	85	
	cgtcttatgc gtcttactaa ttgttca	27
<210>	86	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH3477	
<400>	86	
	tgaaactctg atcatctggt gctct	25
<210>	87	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH7657	
<400>	87	
	gcagtctcaa gttgttcctc ca	22
<210>	88	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH3778
 <400> 88
 gccagaaga ccgaactcat 20

<210> 89
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH3779
 <400> 89
 ttgtgtccagc aggtgacatc 20

<210> 90
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH5936
 <400> 90
 gccatggatg gtctcattct ccg 23

<210> 91
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH5937
 <400> 91
 cgtcgacttg ttcaatcttt ttcac 25

<210> 92
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH8965
 <400> 92

tctagaatgg gaagaaaaaa actagaa	27
<210> 93	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH8966	
<400> 93	
ggatccatt aagtagtggg agagtcac	28
<210> 94	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH6488	
<400> 94	
aggccttctc aggttcaaaa caagc	25
<210> 95	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH6489	
<400> 95	
tgccaaagggt tgttcagtt gtagc	25
<210> 96	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH6815	
<400> 96	
ggctatgggtt ataagtttca tctttga	27
<210> 97	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> JH6816	

<400>	97	
aatactaacc atccatttgc acga		24
<210>	98	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6823	
<400>	98	
agttgagatt ggtggagaag acct		24
<210>	99	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6824	
<400>	99	
tgatttgggt atcataaagt aaaacca		27
<210>	100	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6829	
<400>	100	
ttcaggtttt actccatcat acgg		24
<210>	101	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6830	
<400>	101	
tgtgatgatg tttttggtca gaga		24
<210>	102	
<211>	27	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6165	
<400>	102	
	ataggaacat gctcaatcga ggagctg	27
<210>	103	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6166	
<400>	103	
	tttcttgaag aacaaggtaa cccaatg	27
<210>	104	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6848	
<400>	104	
	tgggagggaa aaagatgtgt	20
<210>	105	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6849	
<400>	105	
	tggtaatggt gtttgtgaaa cc	22
<210>	106	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6853	
<400>	106	
	caaatcatcc atagaaagag agagaga	27
<210>	107	

<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6854	
<400>	107	
caagatgata tactagcgga aataaaa		27
<210>	108	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6857	
<400>	108	
catgaaagcg aagtttggtc a		21
<210>	109	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6858	
<400>	109	
gacaacaaga gagaagcagc tttaga		26
<210>	110	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH3776	
<400>	110	
gaagagaacg agcgacttgg		20
<210>	111	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH3777	
<400>	111	
gagctctcgg agtcaacagg		20

<210> 112
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH4601
 <400> 112
 gaattcatgg cgagagaaaa gatt 24

<210> 113
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH2246
 <400> 113
 ctcgagtccc ttttctgaa gttcgtg 28

<210> 114
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH7411
 <400> 114
 ctcgagatgg cgagagaaaa gattcagatc 30

<210> 115
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH7412
 <400> 115
 actagtctaa ccaccatagc gtaagccgag 30

<210> 116
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JH2934

<400>	116	
ggatcccatg gcgagagaaa agattc		26
<210>	117	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH2935	
<400>	117	
ggatccgcac caccatacgg taagccg		27
<210>	118	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH8963	
<400>	118	
tctagaatgg cgagagaaaa gattcag		27
<210>	119	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH8964	
<400>	119	
ggatcccacc accatacggg aagccgag		28
<210>	120	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH2486	
<400>	120	
ggatcctaag ggcgagagaa aagatt		26
<210>	121	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223>	JH2487	
<400>	121	
ctcgagctaa ccaccatacg gtaagcc		27
<210>	122	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH9549	
<400>	122	
agcgattcaa ccgcggacaa taac		24
<210>	123	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH9550	
<400>	123	
aaggctctct gtagcagctt cg		22
<210>	124	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6171	
<400>	124	
ctcgggaatt catcgtattg		20
<210>	125	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6172	
<400>	125	
ccctctggca gttgaagtaa		20
<210>	126	
<211>	20	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6444	
<400>	126	
	cgtcccacgt atgttttcgt	20
<210>	127	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6833	
<400>	127	
	ttccccaagt ttggaagaca a	21
<210>	128	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6834	
<400>	128	
	acttctgtta ccttgtgtct atttggt	27
<210>	129	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6835	
<400>	129	
	aaggacacta cattacaccg attatg	26
<210>	130	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6836	
<400>	130	
	tgatatacgt acgttgaacg agttg	25

<210>	131	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6837	
<400>	131	
	gaccacaaga ggatctctac gactt	25
<210>	132	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6838	
<400>	132	
	ttggagatgt tcttgatcct ttca	24
<210>	133	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6839	
<400>	133	
	acgaaagagt gagctacgag gaac	24
<210>	134	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6840	
<400>	134	
	acgttttcaa gagacggtta actt	24
<210>	135	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	JH6841	
<400>	135	

gaaaagtgat aacacacatt aagacga

27

<210> 136

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JH6453

<400> 136

acaaaatagt ctcgcggtgt

20

<210> 137

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JH6454

<400> 137

tgaagtattt aagcatctat gtcaatg

27

<210> 138

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JH9553

<400> 138

tggccattca cagagagtga cg

22

<210> 139

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JH9554

<400> 139

ccatctaggc taacactggc caac

24