(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0023589
(43) 공개일자 2016년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8242 (2013.01)
A01H 5/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0117522
(22) 출원일자 2015년08월20일
심사청구일자 2015년08월20일
(30) 우선권주장
1020140108553 2014년08월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
고재훈
경기도 수원시 영통구 영통로 154번길 51-16 306동 702호(망포동, 센트럴하이츠아파트)
전형우
경기 수원시 영통구 매영로415번길 51, 101호 (영통동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 12 항

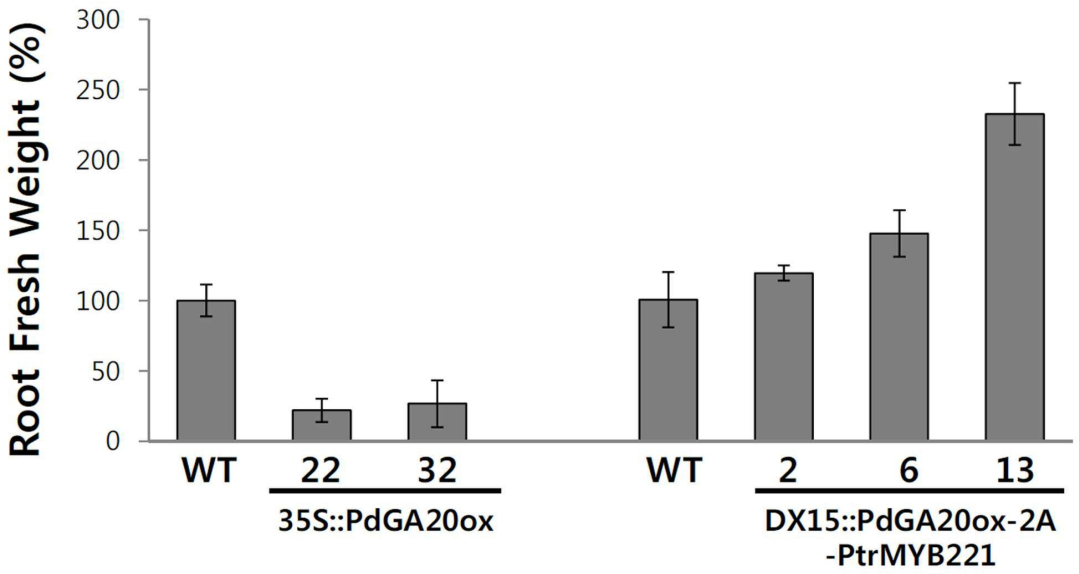
(54) 발명의 명칭 **바이오매스가 증가된 형질전환 식물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 DX15 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PdGA20ox(*Pinus densiflora* GA20-oxidase) 유전자가 도입된 형질전환 식물; 및 추가적으로 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB221 유전자가 도입된 형질전환 식물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 형질전환 식물을 제조하는 단계를 포함하는 바이오매스의

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도26



생산방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 형질전환 식물은 지베렐린 20-옥시다아제(Gibberellin 20-oxidase, GA20ox)의 모든 조직에서의 항상적인 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제됨과 동시에 형질전환하지 않은 대조구에 비해 바이오매스가 최대 300% 이상 증가하였고, 세포벽의 리그닌 함량이 감소되고, 셀룰로오스의 함량이 증가하는 질적인 변화가 일어났다. 이로써 본 발명의 형질전환 식물은 궁극적으로 펄프 및 제지 산업의 원료, 목재 산업 원료, 바이오에탄올의 원료를 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류
C12N 9/0071 (2013.01)

(72) 발명자
최영임
경기 수원시 영통구 청명로 132, 324동 601호 (영통동, 벽산삼익아파트)
조진성
경기도 수원시 권선구 탑동로 3번길 40 부림주택 301호
박응준
경기 수원시 권선구 온정로 39

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 S111214L080100
부처명 산림청
연구관리전문기관 산림청 산림정책과
연구사업명 임업기술연구개발사업
연구과제명 포플러 슈퍼클론 개발
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교
연구기간 2012.04.15 ~ 2017.04.14

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 구성되는 DX15 프로모터; 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된, 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 PdGA20ox(*Pinus densiflora* Gibberellin 20-oxidase) 유전자; 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된, 서열번호 16의 아미노산 서열을 코딩하는 PtrMYB221 유전자가 도입된 형질전환 식물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 형질전환 식물은 지베렐린 20-옥시다아제(Gibberellin 20-oxidase)의 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제되고, 바이오매스가 야생형에 비해 증가된 것인, 형질전환 식물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 PdGA20ox 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 것인, 형질전환 식물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 PtrMYB221 유전자는 서열번호 15의 염기서열로 구성되는 것인, 형질전환 식물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 형질전환 식물은 애기장대 또는 포플러인 것인, 형질전환 식물.

청구항 6

서열번호 1의 염기서열로 구성되는 DX15 프로모터; 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된, 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 PdGA20ox(*Pinus densiflora* Gibberellin 20-oxidase) 유전자; 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된, 서열번호 16의 아미노산 서열을 코딩하는 PtrMYB221 유전자를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 형질전환 식물을 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함하는 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 형질전환 식물은 지베렐린 20-옥시다아제(Gibberellin 20-oxidase)의 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제되고, 바이오매스가 야생형에 비해 증가된 것인, 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 형질전환 식물은 애기장대 또는 포플러인 것인, 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 10

서열번호 1의 염기서열로 구성되는 DX15 프로모터; 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된, 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 PdGA20ox(*Pinus densiflora* Gibberellin 20-oxidase) 유전자; 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된, 서열번호 16의 아미노산 서열을 코딩하는 PtrMYB221 유전자를 식물체에 도입하여 형질전환 식물을 제조하는 단계를 포함하는 바이오매스의 생산방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 형질전환 식물은 지베렐린 20-옥시다아제(Gibberellin 20-oxidase)의 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제되고, 바이오매스가 야생형에 비해 증가된 것인, 바이오매스의 생산방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 바이오매스는 야생형에 비해 세포벽의 리그닌 함량이 감소되고, 셀룰로오스의 함량이 증가된 것인, 바이오매스의 생산방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 DX15 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PdGA20ox(*Pinus densiflora* GA20-oxidase) 유전자가 도입된 형질전환 식물; 및 추가적으로 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB221 유전자가 도입된 형질전환 식물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 형질전환 식물을 제조하는 단계를 포함하는 바이오매스의 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 산업화 이후 전 세계적으로 화석연료의 편중된 사용으로 고유가 시대, 대기 환경오염 및 이산화탄소의 농도 증가, 이로 인한 지구적 기상변화 등의 심각한 위기가 고조되고 있다. 따라서 친환경적이고 재생가능한 바이오매스 에너지의 중요성이 부각되고 있다. 곡물에 존재하는 녹말이나 설탕을 분해하고 발효시켜 얻는 1세대 바이오연료의 생산은 농작물 가격상승, 식량난 및 경제난을 초래하는 등 부작용을 낳고 있다. 따라서 최근에는 비식용 작물인 억새, 포플러 등에 존재하는 목질계의 셀룰로오스를 이용한 2세대 바이오매스 에너지 연구가 활발히 연구되고 있다. 화석연료를 대체할 효율적인 바이오매스 에너지의 생산을 위해서는 바이오매스의 생산성과 셀룰로

오스의 함량을 획기적으로 증가시키는 방안이 절실히 요구된다.

[0003] 길이 생장인 일차생장을 하는 초본 식물과 달리, 목본 식물은 이차생장을 통해 부피생장을 하는데, 이차생장이란 형성층으로부터 도관/체관이 분화되면서 목부(이차도관) 형성이 계속적으로 축적되어 식물의 줄기와 뿌리의 둘레가 커지는 생장 과정이다. 이러한 이차생장을 통한 목본식물의 목부 형성은 매년 생성되는 총 육지 바이오매스의 90% 이상을 생산한다. 목부는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 그리고 리그닌으로 구성된 이차세포벽으로 이루어지며, 이들이 바이오매스 에너지 생산의 원료로 이용된다.

[0004] 목부형성에는 다양한 식물생장호르몬이 관여하고 있다. 그 중 하나인 지베렐린은 식물의 줄기 생장을 포함한 식물의 여러 발달 기작에 중요한 역할을 함이 알려져 있다. 지베렐린 20-옥시다아제(Gibberellin 20-oxidase, GA20ox) 단백질은 지베렐린 생합성 과정에서 활성 지베렐린을 합성하는 마지막 반응을 촉매 한다고 알려져 있다(Plant J., 17, 547-556, 1999). 또한 바이오매스 축적과 관련하여, 지베렐린이 결정적 역할을 하는 것이 실험을 통해 증명되었다. 지베렐린 생합성 유전자의 과발현에 의해 증가된 지베렐린 함량은 담배에서 높은 수준의 목부 목질화(lignification)와 포플러에서 리그닌 S/G 비율의 변화를 유도할 수 있었다(Plant Mol. Biol. 52, 893-903, 2003; Plant Physiol., 135, 254-265, 2004). 또한 혼성 사시나무(aspen)에서 GA20ox의 과발현은 바이오매스 양의 증가 및 목부 섬유 조직의 길이 생장과 더불어 생장속도의 증가를 가져왔다.

[0005] 지베렐린의 양적인 증가를 이용한 식물 바이오매스 생산성 증가를 위해 주로 애기장대나 포플러의 GA20ox 유전자를 CaMV 35S 프로모터를 사용하여 식물의 모든 조직에서 과발현시키는 형질전환체를 개발하였다. 그러나 보고된 모든 경우에 있어서, 식물의 줄기 신장은 촉진되었으나, 잎과 뿌리 발달이 현저히 저해되는 등의 부작용이 나타났다.

[0006] 이를 극복하기 위해, 본 발명자가 목본식물인 포플러에서 분리, 동정한 목부 조직 특이적인 프로모터(DX15)와 소나무(*Pinus densiflora*)에서 분리, 동정한 GA20ox(PdGA20ox) 유전자를 이용하여 제조된 형질전환 식물; 및 PtrMYB221 유전자가 추가로 도입된 형질전환 식물이 PdGA20ox의 과발현으로 인한 잎 또는 뿌리 생장 감소의 부작용이 억제되고, 바이오매스가 야생형에 비해 월등히 증가된 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 DX15 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PdGA20ox(*Pinus densiflora* GA20-oxidase) 유전자가 도입된 형질전환 식물 및; 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB221 유전자 추가적으로 도입된 형질전환 식물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 DX15 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PdGA20ox 유전자를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 형질전환 식물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 DX15 프로모터; 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PdGA20ox 유전자; 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB221 유전자를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 형질전환 식물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 DX15 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PdGA20ox 유전자를 식물체에 도입하여 형질전환 식물을 제조하는 단계를 포함하는 바이오매스의 생산방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 DX15 프로모터; 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PdGA20ox 유전자; 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB221 유전자를 식물체에 도입하여 형질전환 식물을 제조하는 단계를 포함하는 바이오매스의 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 DX15 프로모터 및 이에 작동가능하게 연결된 PdGA20ox(*Pinus densiflora* Gibberellin 20-oxidase) 유전자가 도입된 형질전환 식물을 제공한다. 또한, 본 발명의 형질전환 식물은 상기 DX15 프로모터에 작동가능하게 연결된, PtrMYB221 유전자를 추가로 도입할 수 있다.

[0013] 본 발명의 형질전환 식물은, 도입된 목부 조직 특이적인 프로모터 DX15와 PdGA20ox 유전자로 인해 지베렐린 20-옥시다아제(Gibberellin 20-oxidase, GA20ox)의 과발현으로 인한 잎 또는 뿌리 생장 감소의 부작용이 억제되면서, 바이오매스가 야생형에 비해 월등히 증가하는 장점을 가진다. 또한, 본 발명의 형질전환 식물은 PtrMYB221 유전자가 추가로 도입되어, 목부 특이적으로 PdGA20ox 및 PtrMYB221이 동시에 발현된 결과 야생형에 비해 월등히 증가한 바이오매스를 가지면서도, 지베렐린 20-옥시다아제의 과발현으로 인한 잎 또는 뿌리 생장 감소의 부작용이 발생하지 않거나, 현저히 억제되는 장점을 가진다.

[0014] 본 발명에서의 용어, '프로모터(promoter)'란, 일반적으로 전사를 개시하는 지점을 포함하는 암호화 부위의 상류 쪽에 위치하는 유전자 부위로, 흔히 유전자 발현을 조절하는 TATA 박스, CAAT 박스 부위, 외부 자극에 반응하여 유전자 발현에 영향을 주는 부위 및 위치와 방향에 상관없이 거의 모든 유전자의 발현을 촉진하는 인핸서 등으로 이루어져 있다. 또한, 이러한 프로모터 중에는 모든 조직에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터 및 시간 또는 위치 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터가 있으며, 구체적으로 본 발명에 따른 프로모터는 식물에서 목부조직 특이적으로 발현하는 DX15 프로모터이다.

[0015] 상기 DX15 프로모터는 본 발명자가 포플러에서 동정한 프로모터로서, 목부조직에 특이적임과 동시에 PdGA20ox 유전자의 발현을 크게 증가시킬 수 있다. 구체적으로 상기 DX15 프로모터는 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드일 수 있으며, 서열번호 1로 기재한 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 98% 이상의 유사성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명에서의 용어, '지베렐린(Gibberellin)'란, 식물에서 신장촉진작용, 종자발아촉진작용, 개화촉진작용, 착과(着果)의 증가작용 또는 열매의 생장촉진작용 등을 할 수 있는 식물 호르몬의 일종이다.

[0017] 본 발명에서의 용어, '지베렐린 20-옥시다아제(Gibberellin 20-oxidase, GA20ox)'란, 지베렐린의 생합성 단계에 관여하는 산화효소로서, 상기 효소의 발현이 식물체에서 증가되면 생합성되는 지베렐린이 증가될 수 있다. 구체적으로 본 발명에 따른 GA20ox는 본 발명자가 소나무(*Pinus densiflora*)에서 동정한 PdGA20ox(*Pinus densiflora* Gibberellin 20-oxidase)일 수 있다.

[0018] 상기 PdGA20ox는 구체적으로, 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 단백질일 수 있으나, 지베렐린 활성을 갖는 아미노산 서열은 제한 없이 포함될 수 있다.

[0019] 이에 따라 본 발명의 PdGA20ox 유전자는 유전 암호의 축퇴성(genetic code degenerancy)에 기인하여 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열 및 이의 변이체일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명에서 상기 "PtrMYB221"은 식물에서 리그닌의 생합성을 억제하는 역할을 하는 단백질 또는 유전자를 의미한다. 상기 PtrMYB221는 구체적으로, 서열번호 16의 아미노산 서열로 구성되는 단백질일 수 있으나, 리그닌의 생합성 억제 활성을 갖는 아미노산 서열은 제한 없이 포함될 수 있다.

[0021] 이에 따라 본 발명의 PtrMYB221 유전자는 유전 암호의 축퇴성(genetic code degenerancy)에 기인하여 상기 서열번호 16의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열 및 이의 변이체일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 15의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0022] 본 발명의 상기 각 단백질은 상기 각 서열번호로 기재한 아미노산 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 특히 바람직하게는 97% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서

열을 포함할 수 있다. 이러한 상동성을 갖는 서열로서 실질적으로 상기 각 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 단백질을 나타내는 아미노산 서열이라면 제한없이 포함한다. 또한 이러한 상동성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0023] 아울러, 본 발명의 상기 각 단백질을 코딩하는 유전자는 상기 각 서열번호로 기재한 아미노산을 코딩하는 염기서열뿐만 아니라, 상기 서열과 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기 서열로서 실질적으로 상기 각 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자 서열이라면 제한없이 포함한다. 또한 이러한 상동성을 갖는 염기서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 염기서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 용어, "상동성"이란, 단백질을 코딩하는 유전자의 염기서열이나 아미노산 서열의 유사한 정도를 의미하는데, 상동성이 충분히 높은 경우 해당 유전자의 발현 산물은 동일하거나 유사한 활성을 가질 수 있다.

[0025] 본 발명에서 용어, '형질전환'이란, DNA를 숙주에 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 구체적으로 본 발명에서는 상기에서 서술한 DX15 프로모터 및 PdGA20ox 유전자를 숙주에 도입하는 것을 의미할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 용어, '형질전환 식물'이란, 숙주로서 식물을 사용하여 상기 형질전환으로 인해 생성된 식물을 의미한다.

[0027] 본 발명에서 숙주세포로의 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떠한 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 식물에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이러한 방법에는 전기충격 핵산분자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘 침전, 염화칼슘 침전, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반, 아그로박테리아로 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트 리포멕타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나, 이로 제한되지 않으며, 아그로박테리아로 매개된 형질전환법이 바람직하다.

[0028] 또한, 구체적으로 본 발명에 따른 형질전환 식물은 상기 DX15 프로모터 및 PdGA20ox 유전자가 도입되어 바이오매스가 증가될 수 있는 식물이라면, 초본 및 목본 식물 모두 제한 없이 포함될 수 있다.

[0029] 또한, 구체적으로 초본 식물은 오리자 사티바(*Oryza sativa*; 벼), 제아 메이즈(*Zea mays*; 옥수수), 미스칸투스(*Miscanthus*) 종 또는 페니세툼 풀푸레움(*Pennisetum purpureum*) 등일 수 있으며, 목본 식물은 유칼립투스(*Eucalyptus*) 종(예를 들면 *E. alba, E. albens, E. amygdalina, E. aromaphloia, E. baileyana, E. balladoniensis, E. bicostata, E. botryoides, E. brachyandra, E. brassiana, E. brevistylis, E. brockwayi E. camaldulensis, E. ceracea, E. cloeziana, E. coccifera, E. cordata, E. cornuta, E. corticosa, E. crebra, E. croajingoleisis, E. curtisii, E. dalrympleana, E. deglupta, E. delegatensis, E. delicata, E. diversicolor, E. diversifolia, E. dives, E. dolichocarpa, E. dundasii, E. dunnii, E. elata, E. erythrocoiys, E. erythrophloia, E. eudesmoides, E. falcata, E. gamophylla, E. glaucina, E. globulus, E. globulus subsp. bicostata, E. globulus subsp. globulus, E. gongylocarpa, E. grandis, E. grandis×urophylla, E. guilfoylei, E. gunnii, E. hallii, E. houseana, E. jacksonii, E. lansdowneana, E. latisinensis, E. leucophloia, E. leucoxylon, E. lockyeri, E. lucasii, E. maidenii, E. marginata, E. megacarpa, E. melliodora, E. michaeliana, E. microcorys, E. microtheca, E. muelleriana, E. nitens, E. nitida, E. obliqua, E. obtusiflora, E. occidentalis, E. optima, E. ovata, E. pachyphylla, E. pauciflora, E. pellita, E. perriniana, E. petiolaris, E. pilularis, E. piperita, E. platyphylla, E. polyanthemos, E. populnea, E. preissiana, E. pseudoglobulus, E. pulchella, E. radiata, E. radiata subsp. radiata, E. regnans, E. risdoni, E. robertsonii E. rodwayi, E. rubida, E. rubiginosa, E. saligna, E. salmonophloia, E. scoparia, E. sieberi, E. spathulata, E. staeri E. stoatei, E. tenuipes, E. tenuiramis, E. tereticornis, E. tetragona, E. tetrodonta, E. tindaliae, E. torquata, E. umbra, E. urophylla, E. vernicosa, E. viminalis, E. wandoo, E. wetarensis, E. willisii, E. willisii subsp. falciformis, E. willisii subsp. willisii, E. woodwardii*), 포플러스(*Populus*) 종(예를 들면, *P. alba, P.*

alba×P. grandidentata, *P. alba×P. tremula*, *P. alba×P. tremula var. glandulosa*, *P. alba×P. tremuloides*, *P. balsamifera*, *P. balsamifera subsp. trichocarpa*, *P. balsamifera subsp. trichocarpa×P. deltoides*, *P. ciliata*, *P. deltoides*, *P. euphratica*, *P. euramericana*, *P. kitakamiensis*, *P. lasiocarpa*, *P. laurifolia*, *P. maximowiczii*, *P. maximowiczii×P. balsamfera subsp. trichocarpa*, *P. nigra*, *P. sieboldii×P. grandideiztata*, *P. suaveolens*, *P. szechuanica*, *P. tomentosa*, *P. tremula*, *P. tremula×P. tremuloides*, *P. tremuloides*, *P. wilsonii*, *P. canadensis*, *P. yunnanensis*), 침엽수(예를 들면, loblolly pine(*Pinus taeda*), slash pine(*Pinus elliotii*), ponderosa pine(*Pinus ponderosa*), lodgepole pine(*Pinus contorta*), Monterey pine(*Pinus radiata*); Douglas-fir(*Pseudotsuga menziesii*); Western hemlock(*Tsuga canadensis*); Sitka spruce(*Picea glauca)*; redwood(*Sequoia sempervirens*); silver fir(*Abies amabilis*); balsam fir(*Abies balsamea*)) 및 삼나무(예를 들면 Western red cedar(*Thuja plicata*), Alaska yellow-cedar(*Chamecyparis nootkatensis*))등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 또한, 구체적으로 초본 식물 중에서 애기장대일 수 있으며, 목본 식물 중에서 포플러일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에서의 용어, '애기장대(*Arabidopsis thaliana*)'란, 개화식물로서 십자화과(Brassicaceae)에 속하며 농업적인 중요성은 가지고 있지 않으나 현대 식물학에 있어 모델 식물로 널리 사용되고 있는 유전학과 분자생물학적 연구에 매우 중요한 식물이다. 본 발명에 따른 애기장대는 초본 식물의 대표 식물로서 사용될 수 있으며, 구체적으로 *Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia(Col-0)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에서의 용어, '포플러(poplar)'란, 쌍떡잎식물 버드나무목 버드나무과 사시나무속에 속하는 식물의 총칭이다. 구체적으로 본 발명에서 포플러는 목본 식물의 대표 식물로서 사용될 수 있으며, *Populus alba x P. tremula* var. *glandulosa*일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에서는 목부 특이적인 방법으로 전이유전자의 발현을 유도할 수 있는 바이나리 벡터(binary vector)를 설계하기 위해, 도 1a의 모식도처럼 pMDC32 벡터에서 2x 35S 프로모터를 *HindIII* 및 *KpnI*의 제한효소를 사용하여 DX15 프로모터(서열번호 1)로 교체하여 DX15-pMDC32 벡터를 제작하였다. 또한 기질로 소나무(*Pinus densiflora*) 줄기의 cDNAs 및 Gateway attB tails(Invitrogen, Carlsbad, CA) 프라이머를 사용하여 증폭된 PdGA20ox를 게이트웨이 클로닝(Gateway cloning)을 사용하여 DX15-pMDC32 벡터에서 DX15 프로모터 다음에 도입하여 DX15::PdGA20ox 컨스트럭트를 제작하였다. 이후 상기 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 C58에 도입하였고, 상기 균주를 이용하여 floral-dip method(Clough and Bent, 1998)와 *agrobacterium* mediated gene transformation method(Choi et al., 2005)에 따라 각각 애기장대(*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia (Col-0))와 포플러(*Populus alba x P. tremula* var. *glandulosa*)를 형질전환시켰다.

[0034] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 DX15 프로모터, PdGA20ox 유전자 및 PtrMYB221 유전자가 도입된 형질전환(DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221) 식물을 제조하기 위하여, 바이러스에서 유래된 2A 펩티드 서열(QLLNFDLLKLAGDVESNPGP, 서열번호 13)을 코딩하면서, 포플러의 코돈 사용에 최적화되도록 염기서열(서열번호 14)을 만들었다. 이 서열로 두 개의 유전자를 연결하여 발현시키면 하나의 전사체가 만들어지지만, 도 18에 빨간색으로 표시된 G (glycine)와 P (proline)의 매우 비효율적인 펩티드 결합으로 인해 번역과정에서 두 개의 단백질로 나누어지게 된다. 정지 코돈이 제거된 PdGA20ox 유전자와 PtrMYB221 전체 유전자(서열번호 15)를 상기 2A 펩티드의 염기서열을 이용하여 연결시킨 융합 유전자를 제조하였고, 이를 실시예 2에 따라 DX15 프로모터에 연결하여 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 컨스트럭트(도 17)를 제작하였다. 이렇게 완성된 재조합 유전자를 pMDC32 벡터에 클로닝하여 애기장대와 포플러를 형질전환시켰다.

[0035] 구체적으로 본 발명에 따른 형질전환 식물은 GA20ox의 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제되고, 바이오매스가 야생형에 비해 증가되도록 상기 DX15 프로모터와 PdGA20ox를 코딩하는 유전자가 도입될 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서는 PdGA20ox의 모든 조직에서의 항상적 과발현(35S::PdGA20ox 포플러)으로 인한 잎과 뿌리 발달이 현저히 저해되는 등의 부작용을 확인한 결과, 35S::PdGA20ox 포플러는 야생형과 비교할 때 잎 면적

이 33 ~ 41% 감소하였고(도 14a), 잎 색깔은 옅은 녹색을 보였다(도 9a 및 14a). 그러나 DX15::PdGA20ox 포플러의 4개 라인은 35S::PdGA20ox 포플러와 비교할 때 더 진한 녹색을 보였고, 특히 라인 4는 가장 진한 녹색을 보였다(도 14a). 또한 DX15::PdGA20ox 잎은 야생형과 비교하여 최소 21%의 감소만을 보였고, 전반적으로 35S::PdGA20ox보다 잎 면적이 넓었다(도 14b). 이를 통해 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러는 PdGA20ox가 과발현되더라도 35S::PdGA20ox 포플러와 달리 잎 면적 감소의 부작용이 억제됨을 알 수 있었다.

[0037] 또한 뿌리의 분석 결과, 35S::PdGA20ox 라인은 야생형과 비교하여 뿌리 생중량이 73 ~ 78%의 감소를 보인 반면, DX15::PdGA20ox 라인은 40 ~ 67%의 감소만을 보였다(도 15). DX15::PdGA20ox 포플러 3의 뿌리 생중량은 35S::PdGA20ox 포플러 22의 뿌리 중량의 170%에 해당하였다(도 15b). 이를 통해 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러는 PdGA20ox가 과발현되더라도 35S::PdGA20ox 포플러와 달리 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제됨을 알 수 있었다.

[0038] 또한, 다른 일 실시예에서는 DX15::PdGA20ox 포플러의 바이오매스 증가를 확인하기 위해 줄기 직경 및 줄기 생중량을 측정한 결과, 본 발명의 형질전환 포플러는 야생형 포플러보다 바이오매스의 현저한 증가(200% 내지 300%)를 보임을 알 수 있었다(도 10b). 상기 결과를 통해, 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러는 PdGA20ox의 과발현(35S::PdGA20ox 포플러)으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제되고, 동시에 야생형 포플러에 비해 바이오매스가 매우 증가하는 효과가 있어, 바이오매스 관련 산업에 있어서 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0039] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에서는 DX15::PdGA20ox 애기장대의 바이오매스 증가를 확인하기 위해 줄기 직경 및 줄기 생중량(stem fresh weight)을 측정한 결과, 모든 형질전환 애기장대는 줄기 직경과 줄기 생중량이 증가하였는데(도 5a 및 5b), 이는 전사 단계의 발현 패턴(도 2b)과 일치하는 결과였다. 라인 1-4는 약 200%의 가장 큰 바이오매스 증가량을 보였으며, 라인 2-1, 3-3, 4-7은 각각 118%, 140%, 97%의 바이오매스 증가량을 보였고, 35S::PdGA20ox 애기장대(OX)도 이와 유사한 증가량을 보였다(도 5b). 이를 통해 본 발명의 PdGA20ox를 과발현시키는 경우 바이오매스가 증가하는 것을 확인하였으며, 이러한 증가는 일반적인 프로모터의 사용시뿐만 아니라, 본 발명의 목부 특이적 프로모터인 DX15 프로모터를 사용할 경우에도 나타남을 알 수 있었다.

[0040] 한편, 추가로 본 발명은 일 실시예에서는 본 발명의 DX15 프로모터의 공지의 목부 특이적 프로모터와의 목부 특이적인 발현 강도를 비교한 결과, 공지의 목부 특이적 프로모터는 목부의 목질발달부(DX)에서는 대체적으로 발현이 증가되었지만, 성숙목질부(MX)에서는 발현이 감소되었으며, 성숙목질부에서 발현이 증가하더라도 DX15 프로모터보다 전체 발현량이 훨씬 작은 것을 확인함으로써(도 16), 본 발명의 DX15 프로모터가 가장 목부 특이적이면서 동시에 전체 발현량이 가장 높음을 확인하였다.

[0041] 결론적으로, DX15 프로모터를 이용하여 PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 식물은 PdGA20ox를 목부 특이적이면서 동시에 강하게 발현하므로, 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용 억제 및 바이오매스의 증가에 공지의 프로모터를 사용한 식물보다 현저한 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0042] 구체적으로 본 발명에 따른 형질전환 식물은 GA20ox의 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제되고, 바이오매스가 야생형에 비해 증가되도록 상기 DX15 프로모터, PdGA20ox를 코딩하는 유전자 및 PtrMYB221를 코딩하는 유전자가 도입될 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에서는 형질전환(DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221) 애기장대에서 PdGA20ox 및 PtrMYB221 과발현으로 인한 효과를 확인하기 위해, 줄기 길이, 직경 및 생중량 (바이오매스)을 측정한 결과, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 애기장대는 야생형에 비하여 줄기가 길며(도 19), 줄기 직경이 넓음을 확인하였다(도 20a). 또한 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 애기장대는 야생형에 비하여 줄기 생중량이 약 200% 이상 증가하였음을 확인하였다(도 20b).

[0044] 아울러, 야생형(WT)과 각 형질전환 애기장대의 줄기조직에서 PdGA20ox-2A-PtrMYB221 전사체의 발현 패턴을 분석한 결과, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 애기장대에서 PdGA20ox-2A-PtrMYB221 전사체가 발현되며, 상기 전사체의 발현량이 증가할수록 줄기 생중량이 현저하게 증가하였음을 알 수 있었다(도 19c 및 20b).

[0045] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에서는 형질전환(DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221) 포플러에서 PdGA20ox 및 PtrMYB221의 목부 특이적 과발현으로 인한 효과를 확인하기 위해, 줄기의 길이, 직경 및 생중량을 측정한 결과, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 야생형에 비하여 줄기가 길며(도 21), 줄기 직경이 넓음을 확인하였다(도 22a). 또한 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 야생형 및 35S::PdGA20ox 포플러에 비하여 줄기 생중량

이 매우 증가함을 확인하였다(도 22b).

[0046] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에서는 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 35S::PdGA20ox 포플러와 다르게 PdGA20ox 과발현이 줄기 특이적임을 알 수 있었다(도 23).

[0047] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에서는 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 PdGA20ox가 과발현되더라도 35S::PdGA20ox 포플러와 달리 잎 면적 감소의 부작용이 및 뿌리 생중량 감소의 부작용이 나타나지 않음을 알 수 있었다(도 25 및 26).

[0048] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에서는 LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 화분에서 자란 포플러와 마찬가지로 야생형에 비하여 줄기가 길며(도 27a 및 28a), 줄기 직경이 굵은 것을 확인하였다(도 27b 및 28b).

[0049] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 LMO 시험포지에서 재배되더라도 PdGA20ox 과발현으로 인한 잎 생장 저해의 부작용이 없거나 또는 억제됨을 알 수 있었다(도 30 및 31).

[0050] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 DX15 프로모터 및 이에 작동가능하게 연결된 PdGA20ox 유전자를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 형질전환 식물의 제조방법을 제공한다.

[0051] 상기 DX15 프로모터, PdGA20ox 유전자 및 형질전환 식물에 대해서는 전술한 바와 같으며, 상기 방법에 의해 본 발명의 형질전환 식물을 제조할 수 있다.

[0052] 상기 제조방법에 의해 제조된 형질전환 식물은 GA20ox의 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제되고, 바이오매스가 야생형에 비해 증가될 수 있다.

[0053] 구체적으로 상기 제조방법은 상기 형질전환 식물을 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 형질전환식물의 재배는 널리 공지된 방법에 따라서 수행될 수 있고, 재배 온도, 재배 시간 및 배지의 pH 등의 조건은 적절하게 조절될 수 있다.

[0054] 사용되는 배지는 특정한 형질전환식물의 요구 조건을 적절하게 충족시켜야 한다. 배지의 형태로는 고체배지(solid medium), 액체배지(liquid medium), 이중배지(double layer medium)가 있으며, 이에 대한 성분으로는 물, 교질재료로서, 한천, 아가로스(agarose), 겔라이트(gelite) 등이 사용될 수 있다.

[0055] 무기 영양소로는 15개의 원소, 즉 C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, B, 및 Mo 등이 형태에 구애받지 않고 첨가되며, 유기 영양소로는 탄수화물, 식물생장 조절물질, 비타민 등이 첨가되고, 아미노산류로는 미오-이노시톨, 글라이신, L-글루타민 등이 첨가될 수 있다.

[0056] 탄소원으로는 글루코스, 프럭토스, 만노스, 리보오스, 자일로스, 수크로스, 멜리비오스, 셀로비오스, 락토오스, 아밀로스, 탄수화물, 라피노스, 소르비톨, 만니톨, 글리세롤1 등이 첨가될 수 있다.

[0057] 본 발명의 일 실시예에서는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia (Col-0))를 25℃의 생장실(14시간 빛/10시간 어둠)에서 토양에 재배하거나 또는 스크리닝을 위한 적당한 항생제 및 2% 수크로스를 포함한 half-strength MS 배지(Murashige and Skoog, Sigma)에서 재배하였다. 또한 본 발명에서 사용된 혼성 포플러(*Populus alba x P. tremula* var. *glandulosa*)도 상기 애기장대와 동일한 조건으로 재배하였다.

[0058] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 DX15 프로모터; 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된, 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 PdGA20ox 유전자; 및 상기프로모터에 작동가능하게 연결된, 서열번호 16의 아미노산 서열을 코딩하는 PtrMYB221 유전자를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 형질전환 식물의 제조방법을 제공한다.

[0059] 상기 DX15 프로모터, PdGA20ox 유전자, PtrMYB221 유전자 및 형질전환 식물에 대해서는 전술한 바와 같으며, 상기 방법에 의해 본 발명의 형질전환 식물을 제조할 수 있다.

[0060] 상기 제조방법에 의해 제조된 형질전환 식물은 GA20ox의 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제되고, 바이오매스가 야생형에 비해 증가될 수 있다.

[0061] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 DX15 프로모터 및 이에 작동가능하게 연결된 PdGA20ox 유전자를 식물체에 도입하여 형질전환 식물을 제조하는 단계를 포함하는 바이오매스의 생산방법을 제공한다. 또한, 본 발명의 생산방법은 상기 형질전환 식물을 제조하는 단계에서 DX15 프로모터에 작동가능하게 연결된, PtrMYB221 유전자를 추가로 도입할 수 있다.

[0062] 구체적으로, 상기 바이오매스는 야생형에 비해 글루코스 또는 자일로스 함량이 증가될 수 있으며, 상기 형질전환 식물은 전술한 바와 같이, GA20ox의 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제되고, 바이오매스가 야생형에 비해 증가될 수 있다.

[0063] 또한, 구체적으로, 상기 바이오매스는 야생형에 비해 세포벽의 리그닌 함량이 감소되고, 셀룰로오스의 함량이 증가될 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 바이오매스 관련 산업에 있어서 바이오매스의 양적 증가와 더불어 당성분과 같은 질적인 면도 중요하므로, 형질전환 포플러에서 세포벽 단당류의 조성을 측정한 결과, 본 발명의 DX15::PdGA20ox 애기장대 및 DX15::PdGA20ox 포플러에서 글루코스와 자일로스의 전체 함량이 야생형에 비해 크게 증가하였음을 확인하였다(도 8 및 도 13). 이를 통해 DX15::PdGA20ox 식물은 야생형 식물에 비해 바이오매스의 양적인 증가와 더불어 나아가 질적으로 바이오매스 연료로 사용되는 당성분의 증가를 가짐을 알 수 있었고, 이는 바이오매스 관련 산업에 있어서 유용하게 이용될 수 있음을 시사하였다.

[0065] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 펄프 및 제지 관련 산업에 있어서 가장 중요하게 여기는 섬유세포의 길이와 같은 특성을 조사하였다. 형질전환 식물에서 섬유세포의 길이를 측정한 결과, 본 발명의 DX15::PdGA20ox 애기장대에서 섬유세포의 길이가 야생형 식물에 비해 크게 증가하였음을 확인하였다(도 7a 및 도 7b). 이를 통해 DX15::PdGA20ox 식물은 야생형 식물에 비해 섬유세포 길이가 월등히 증가하였고, 이는 펄프 및 제지 관련 산업에 있어서 유용하게 이용될 수 있음을 시사하였다.

[0066] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 바이오에탄올 생산시 발효원인 셀룰로오스는 증가하고, 방해요소인 리그닌은 큰 폭으로 감소함을 확인한바, 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 형질전환 식물은 바이오연료 생산용 단벌기 에너지림 조성의 최적 수종으로 활용될 수 있음을 알 수 있었다(도 24).

발명의 효과

[0067] 본 발명에 따른 형질전환 식물은 지베렐린 20-옥시다아제(Gibberellin 20-oxidase, GA20ox)의 모든 조직에서의 항상적인 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제됨과 동시에 형질전환하지 않은 대조구에 비해 바이오매스가 최대 300% 이상 증가하였고, 세포벽의 리그닌 함량이 감소되고, 셀룰로오스의 함량이 증가하는 질적인 변화가 일어났다. 이로써 본 발명의 형질전환 식물은 궁극적으로 펄프 및 제지 산업의 원료, 목재 산업 원료, 바이오에탄올의 원료를 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 목부 특이적 발현을 위한 Gateway destination 벡터의 설계를 나타내는 도이다.

도 1a는 *HindIII(5')* 및 *KpnI(3')*를 사용하여 2x 35S 프로모터를 DX15 프로모터로 교체하는 것을 나타내는 모식도이다.

도 1b는 pMDC32 벡터에 *HindIII* 및 *KpnI*를 처리하여 신규 벡터를 검증한 결과를 나타내는 도이다. pMDC32 및 DX15-pMDC32의 분해된 절편의 크기는 각각 785 bp 및 944 bp(흰 화살)이었다. 제한효소를 처리하지 않은 순수한 벡터의 크기는 자연적인 초나선 형태로 인해 부정확하였다(레인 1: DNA 크기 마커, 레인 2: pMDC32(intact), 레인 3: pMDC32에 *HindIII* 및 *KpnI*를 처리(H+K), 레인 4: DX15-pMDC32(intact), 레인 5: DX15-pMDC32에 *HindIII* 및 *KpnI*를 처리(H+K)).

도 1c는 신규 벡터에서 DX15 프로모터의 염기서열을 분석한 결과를 보여주는 도이다.

도 2는 DX15 프로모터를 사용하여 PdGA20ox를 발현시킨 결과를 나타내는 도이다(DX15::PdGA20ox 식물: 1-4, 2-

1, 3-3, 4-7, 6-5, 35S::PdGA20ox 식물: OX).

도 2a는 35일생의 형질전환 애기장대(DX15::PdGA20ox 식물:3-3, 35S::PdGA20ox 식물: OX)의 줄기와 로제트(rosette) 잎에서 semi-quantitative RT-PCR을 사용하여 PdGA20ox 유전자의 줄기 특이적 발현을 확인한 도이다.

도 2b는 7일생의 애기장대 식물에서 전사단계에의 PdGA20ox의 발현 패턴을 확인한 도이다(Cycle = 26).

도 3은 DX15::PdGA20ox 애기장대 식물의 성장에 관한 표현형을 확인한 도이다.

도 3a는 half-strength MS 배지에서 재배된 7일생 T3 동형 묘목, 야생형 및 OX를 보여주는 도이다(막대=2 cm).

도 3b는 빛 조건에서 재배된 7일생 식물의 하배축 길이를 나타낸 도이다. 오차 막대는 표준편차를 의미하며, n=15이다.

도 3c는 암실 조건에서 재배된 7일생 식물의 하배축 길이를 나타낸 도이다. 오차 막대는 표준편차를 의미하며 n=15이다.

도 4는 DX15::PdGA20ox 애기장대의 줄기 신장에 관한 표현형을 확인한 도이다. 35일생의 성숙한 식물을 사용하여 분석하였고, 오차 막대는 표준편차를 의미하며 n=14이다.

도 4a는 DX15::PdGA20ox 애기장대의 생장을 야생형 및 OX와 비교한 도이다(막대=10 cm).

도 4b는 기본 줄기의 길이를 비교한 도이다.

도 4c는 시간 변화에 따른 줄기 신장을 보여주는 도이다.

도 5는 형질전환 애기장대의 줄기 직경(a) 및 줄기 생중량(stem fresh weight)의 증가(b)를 나타내는 도이다.(a: ground stem 위 1 mm에서 측정; b: 기본 줄기의 줄기 생중량; 35일생의 식물을 사용; 오차 막대는 표준편차를 의미; n=14)

도 6은 형질전환 애기장대에서 두꺼워진 세포벽의 조직학적 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 6a는 hand cross-sectioning에 기본 줄기의 밑부를 사용하고, 이를 톨루이딘 블루 O로 염색한 결과를 보여주는 도이다.

도 6b는 hand cross-sectioning에 기본 줄기의 밑부를 사용하고, 이를 플로로글루시놀-HCl로 염색한 결과를 보여주는 도이다.

도 6c는 유관속 섬유의 이차 레이어의 세포를 사용하여 세포벽 두께를 측정한 결과를 나타낸 도이다. 35일생의 식물을 사용하였고, 오차 막대는 표준편차를 의미하며, n=30이다.

도 7은 형질전환 애기장대에서 섬유 세포의 신장을 확인한 도이다.

도 7a는 섬유 세포의 줄기 침출법(maceration)의 결과를 나타낸 도이다. 35일생 식물의 줄기 밑부 0.5mm를 사용하였고, 막대는 200 μm의 크기를 나타낸다.

도 7b는 섬유 세포의 길이를 측정한 결과를 나타낸 도이다. 오차 막대는 표준편차를 의미하며, n=50이다.

도 8은 형질전환 애기장대에서 세포벽의 단당류 조성을 보여주는 도이다(Rha: 람노스, Ara: 아라비노스, Xyl: 자일로스, Man: 만노스, Gal: 갈락토스, Glu: 글루코스). 오차 막대는 3회 반복 실험의 표준편차를 의미한다.

도 9는 형질전환 포플러에서 DX15::PdGA20ox의 줄기 신장을 나타낸 도이다. 60일생의 식물을 사용하였다.

도 9a는 형질전환 포플러에서 DX15::PdGA20ox 라인 및 35S::PdGA20ox 라인의 성장을 야생형과 비교한 도이다(막대=10 cm).

도 9b는 semi-quantitative RT-PCR(30 사이클)을 사용하여 포플러에서 PdGA20ox 유전자의 전사적 단계의 발현 패턴 및 줄기 특이성을 보여주는 도이다.

도 9c는 기본 줄기의 길이를 보여주는 도이다. 오차 막대는 3회 반복 실험의 표준편차를 의미한다.

도 9d는 시간에 따른 줄기의 신장을 보여주는 도이다. 오차 막대는 3회 반복 실험의 표준편차를 의미한다.

도 10은 형질전환 포플러에서 DX15::PdGA20ox의 바이오매스 증가 및 줄기 직경의 변화를 보여주는 도이다. 60일

생의 식물을 사용하였고, 오차 막대는 3회 반복 실험의 표준편차를 의미한다.

도 10a는 형질전환 포플러에서 야생형과 비교했을 때 줄기 직경이 증가한 것을 보여주는 도이다.

도 10b는 형질전환 포플러에서 줄기 생중량의 증가를 보여주는 도이다.

도 11은 DX15::PdGA20ox 포플러의 목질부 증가를 보여주는 도이다. 60일생 묘목의 11번째 절간의 단면을 0.5% 톨루이딘 블루 O 및 플로로글루시놀-HCl로 5분 동안 염색하여 조직학적 분석을 하였다(막대=400 μm).

도 12는 형질전환 포플러에서 목질부 특성을 보여주는 도이다. 60일생 식물의 11번째 절간을 사용하였고, 오차 막대는 표준편차를 의미하고, n > 8이다.

도 12a는 형질전환 포플러에서 목질부 두께의 증가를 보여주는 도이다.

도 12b는 목질부 세포 파일(cell pile)의 수가 목질부 두께와 마찬가지로 증가하였음을 보여주는 도이다.

도 12c는 목질부 세포벽 두께가 야생형에 비해 감소되었음을 보여주는 도이다.

도 13은 형질전환 포플러에서 세포벽의 단당류 조성의 변화를 보여주는 도이다(Rha: 람노스, Ara: 아라비노스, Xyl: 자일로스, Man: 만노스, Gal: 갈락토스, Glu: 글루코스).

도 14는 DX15::PdGA20ox의 PdGA20ox의 과발현으로 인한 잎 면적 감소의 부작용 억제 효과를 보여주는 도이다. 60일생의 식물을 사용하였고, 오차 막대는 3회 반복 실험의 표준편차를 의미한다.

도 14a는 10번째, 11번째 및 12번째 마디의 잎을 분석한 결과를 보여주는 도이다.

도 14b는 DX15::PdGA20ox의 잎 면적이 35S::PdGA20ox 보다 더 넓음을 보여주는 도이다.

도 15는 DX15::PdGA20ox의 PdGA20ox의 과발현으로 인한 뿌리 중량 감소의 부작용 억제 효과를 보여주는 도이다. 60일생의 식물을 사용하였고, 오차 막대는 3회 반복 실험의 표준편차를 의미한다.

도 15a는 DX15::PdGA20ox의 뿌리는 35S::PdGA20ox와 비교하여 야생형과 유사한 형태를 가짐을 보여주는 도이다.

도 15b는 DX15::PdGA20ox의 뿌리 생중량이 35S::PdGA20ox와 비교하여 매우 높음을 보여주는 도이다.

도 16은 형질전환 포플러에서 조직별로 여러 프로모터 활성을 유전자 발현 양(a) 및 유전자 발현 표준화(b)를 통해 비교한 도이다(6dL: 6일 자란 유식물, SL:정단분열조직, YL: 어린잎, ML: 성숙잎, BP: 수피, DP: 체관부, Ca: 형성층, DX: 목질발달부, MX: 성숙목질부).

도 17은 형질전환 식물(DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221)의 제조에 사용된 재조합 유전자 구조 모식도를 나타낸 도이다.

도 18은 2A 펩티드의 아미노산 서열 및 염기서열을 나타낸 도이다. 빨간색으로 표시된 G (glycine)와 P (proline)는 비효율적인 펩티드 결합을 하는 아미노산을 의미한다.

도 19는 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 애기장대의 줄기 신장에 관한 표현형을 확인한 도이다. 숫자는 각 독립적인 T3 동형접합 라인 (homozygous line) 번호를 나타낸다.

도 19a는 화분에서 50일 동안 자란 애기장대의 모습을 나타낸 사진이다.

도 19b는 줄기의 생장을 정량화한 그래프이다. 오차막대는 표준편차를 의미하며, n=14이다.

도 19c는 야생형(WT)과 각 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 애기장대에서 PdGA20ox-2A-PtrMYB221 전사체의 발현 변화를 확인한 도이다.

도 20은 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 애기장대의 생장 증가를 확인한 도이다. 숫자는 각 독립적인 T3 동형접합 라인 (homozygous line) 번호를 나타낸다.

도 20a는 화분에서 50일 동안 자란 애기장대의 줄기 직경을 정량화한 그래프이다. 오차막대는 표준편차를 의미하며, n=14이다.

도 20b는 애기장대의 줄기 생중량 (바이오매스)을 정량화한 그래프이다. 오차막대는 표준편차를 의미하며, n=14이다.

도 21은 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 줄기 신장에 관한 표현형을 확인한 도이다. 숫자는 각 독립적인

T3 동형접합 라인 (homozygous line) 번호를 나타낸다. WT는 야생형 포플러이고, 숫자는 각 독립적인 라인 번호를 나타낸다.

도 21a는 화분에서 60일 동안 자란 포플러의 모습을 나타낸 사진이다.

도 21b는 포플러의 줄기 생장을 정량화한 그래프이다. 오차막대는 표준편차를 의미하며, n=3 이다.

도 22는 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 생장 증가를 확인한 도이다. 오차막대는 표준편차를 의미하며, n=3이다

도 22a는 화분에서 60일 동안 자란 포플러의 줄기 직경을 정량화한 그래프이다.

도 22b는 포플러의 줄기 생중량 (바이오매스)을 정량화한 그래프이다.

도 23은 형질전환 포플러의 줄기와 잎에서 PdGA20ox 유전자의 발현 수준을 분석한 도이다.

도 23a는 야생형(WT)과 각 형질전환 포플러(35S::PdGA20ox, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221)의 줄기와 잎에서 PdGA20ox 유전자 발현 패턴을 확인한 도이다.

도 23b는 야생형(WT)과 각 형질전환 포플러(35S::PdGA20ox, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221)의 줄기에서 PdGA20ox 유전자의 발현을 비교한 그래프이다. 오차막대는 표준편차를 의미하며, n=3이다.

도 24는 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 목질부 성분을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 25는 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 잎 생장을 분석한 도이다.

도 25a는 화분에서 60일 동안 자란 포플러의 10번째, 11번째 및 12번째 마디의 잎을 보여주는 사진이다.

도 25b는 포플러의 10번째, 11번째 및 12번째 마디의 잎 면적의 평균값을 나타낸 그래프이다. 오차막대는 표준편차를 의미하며, n=3이다

도 26는 화분에서 60일 동안 자란, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 뿌리의 생중량을 측정한 그래프이다. 오차막대는 표준편차를 의미하며, n=3이다.

도 27는 봄부터 늦여름까지 최고 생육기 3개월간 야외 LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 줄기 생장을 분석한 도이다. 오차막대는 표준편차를 의미한다. WT (n=8), 35S::PdGA20ox 포플러 (#22, n=6; #32, n=6), DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러 (#2, n=6; #6, n=6; #13, n=4)

도 27a는 포플러의 줄기 길이를 정량화한 그래프이다.

도 27b는 포플러의 줄기 직경을 정량화한 그래프이다.

도 28은 봄부터 늦여름까지 최고 생육기 3개월간 야외 LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 줄기 생장 변화를 분석한 도이다. WT (n=8), 35S::PdGA20ox 포플러 (#22, n=6; #32, n=6), DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러 (#2, n=6; #6, n=6; #13, n=4)

도 28a는 줄기의 길이 생장을 날짜 별로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 28b는 줄기의 직경 (부피) 생장을 날짜 별로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 29은 봄부터 늦여름까지 최고 생육기 3개월간 야외 LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 잎 생장(잎 면적)을 분석한 도이다.

도 29a는 포플러의 10 ~ 18번째 마디의 잎 중 가장 큰 잎의 모습을 나타낸 사진이다.

도 29b는 포플러의 10 ~ 18번째 잎 중 가장 큰 잎 3장의 평균 면적 (3개체 반복)을 나타낸 그래프이다. 오차막대는 표준편차를 의미하며, n=9이다.

도 30은 봄부터 늦여름까지 최고 생육기 3개월간 야외 LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 잎 생장(엽록소 함량)을 분석한 도이다.

도 30a는 포플러의 10 ~ 12번째 마디의 잎을 나타낸 사진이다.

도 30b는 포플러의 10 ~ 12번째 마디의 잎의 클로로필 함량을 나타낸 그래프이다. 오차막대는 표준편차를 의미하며, n=3이다.

도 31는 LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 동아(winter bud) 형성을 초가을 (9월 21일)부터 10월20일까지 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. WT(n=8), 35S::PdGA20ox 포플러 (#22, n=5; #32, n=5), DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러 (#2, n=6; #6, n=6; #13, n=6)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0070] **실시예 1. 본 발명에서 사용된 식물과 생장 조건**

[0071] 본 발명에서 사용된 애기장대(Arabidopsis thaliana, ecotype Columbia (Col-0))는 25℃의 생장실(14시간 빛/10시간 어둠)에서 토양에 재배되거나 또는 스크리닝을 위한 적당한 항생제 및 2% 수크로스를 포함한 half-strength MS 배지(Murashige and Skoog, Sigma)에서 재배되었다. 또한 본 발명에서 사용된 혼성 포플러(*Populus alba x P. tremula* var. *glandulosa*)도 상기 애기장대와 동일한 조건으로 재배되었다.

[0072] **실시예 2. 벡터 설계와 식물 형질전환**

[0073] 목부 특이적인 방법으로 전이유전자의 발현을 유도할 수 있는 바이나리 벡터(binary vector)를 설계하기 위해, 하기와 같이 pMDC32 벡터(Plant Physoiol., 133, 462-469, 2003)를 변형하였다. 도 1a의 모식도처럼 pMDC32 벡터에서 2x 35S 프로모터를 *HindIII* 및 *KpnI*의 제한효소를 사용하여 DX15 프로모터(서열번호 1)로 교체하여 DX15-pMDC32 벡터를 제작하였고, *HindIII* 및 *KpnI*를 처리하여 신규 벡터를 검증하였다(도 1b). 또한 DX15-pMDC32 벡터에서 DX15 프로모터의 염기서열을 분석하여 2x 35S 프로모터가 DX15 프로모터로 교체되었음을 확인하였다(도 1c).

[0074] 기질로 소나무(*Pinus densiflora*) 줄기의 cDNAs 및 Gateway attB tails(Invitrogen, Carlsbad, CA) 프라이머를 사용하여 PdGA20ox의 전체 cDNA(서열번호 2)를 PCR로 증폭하였다. 증폭된 PdGA20ox 유전자를 게이트웨이 클로닝(Gateway cloning)을 사용하여 DX15-pMDC32 벡터에서 DX15 프로모터 다음에 도입하여 DX15::PdGA20ox 컨스트럭트를 제작하였다.

[0075] 식물의 모든 조직에서 PdGA20ox를 과발현시키기 위해 pBI121 벡터(EMBO J., 6, 3901-3907, 1987)에서 35S 프로모터 다음에 PdGA20ox 유전자를 도입하여 35S::PdGA20ox 컨스트럭트를 제작하였다(비교예).

[0076] 이후 상기 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 C58에 도입하였고, 상기 균주를 이용하여 floral-dip method(Clough and Bent, 1998)와 *agrobacterium* mediated gene transformation method(Choi et al., 2005)에 따라 각각 애기장대와 포플러를 형질전환시켰다. 본 발명에서 사용된 컨스트럭트(construct)는 DNA 시퀀싱으로 확인되었고, 사용된 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0077]

Gene Name	Gene I.D.	Primers	Sequence(5'→3')	Restriction site
DX15 프로모터	Potri.009G012200	FW	GGGAAGCTTTTGTATCCGGAGGACATATTTGTT(서열번호 4)	*HindIII*
		RV	TTTGGTACCAGCTAGGAGTGCTGTTTTGTTGCA(서열번호 5)	*KpnI*
PdGA20ox	KC461180.1[a]	FW	aaaagcaggctATGGGTACTTCGACTGTGAGT(서열번호 6)	-

		RV	agaaagctgggtTTATGGCTGGTTTCTTGAGG(서열번호 7)	-
		RV-p2A	*GACGTCACCTGCAAGCTTAAGAAGGTCGAAGTTAAGAAGCTGT*GGCTGGTTTCTTGAGGTGAA(서열번호 8)	-
AtActin8	AT1G49240	FW	ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA(서열번호 9)	-
		RV	TCCGAGTTTGAAGAGGCTAC(서열번호 10)	-
PagActin2		FW	GCCATCTCTCATCGGAATGGAA(서열번호 11)	-
		RV	AGGGCAGTGATTTCCTTGCTCA(서열번호 12)	-

[0078] 상기 표 1에서 제한 효소와 Gateway AttB1, AttB2 사이트는 각각 밑줄과 소문자로 표시하였고, 포워드와 리버스 프라이머를 위한 부분적인 2A 염기서열은 이탤릭체로 표시하였다. a는 GenBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) accession number이다.

[0079] **실시예 3. 분석 방법**

[0080] 실시예 3-1. 조직학적 분석

[0081] 애기장대와 포플러 줄기 단면을 2% 플로로글루시놀/염산(phloroglucinol/HCl) 또는 0.05% 톨루이딘블루 O(toluidine blue O)로 염색하였다.

[0082] 실시예 3-2. RNA 추출 및 RT-PCR

[0083] 트리졸(Trizol) 시약을 사용하여 설명서에 따라 전체 RNA를 추출하였다. 식물 조직을 LN_2를 사용하여 고운 가루로 갈아서 트리졸 시약과 혼합하여 클로로폼을 처리하였다. RNA를 분리하기 위해 상기 혼합물에 이소프로판올을 처리하였다. 20 ㎕ 반응액에 Superscript III 역전사효소(Invitrogen)를 사용하여 분리한 전체 RNA 1 microgram을 역전사하였고, 2배 희석하였다. 그 다음 1 ㎕ 반응물을 기질로 RT-PCR을 수행하였다.

[0084] 실시예 3-3. 섬유 길이 분석

[0085] 섬유 길이 측정을 위해, 식물 줄기를 Franklin's method(Franklin, 1945)에 따라 불렸다. 식물 줄기의 손질된 조각을 30% 과산화수소와 빙초산 용액에 실온에서 하룻밤 동안 불렸다. 그 다음날 시료를 증류수로 3회 세척하였고, 탄산수소나트륨으로 중화한 후 증류수로 세척하였다. 볼텍싱(vortexing)과 셰이킹(shaking)으로 섬유 조직을 각각 분리하여 현미경으로 관찰하였다.

[0086] 실시예 3-4. 알코올 불용성 세포벽 잔사(AIR) 추출 및 세포벽의 단당류 조성 분석

[0087] 35일생 애기장대의 줄기 윗부분의 10 cm를 LN_2와 막자사발을 이용하여 고운 가루로 만들었다. 상기 시료에 70% 에탄올을 처리하고 주기적으로 볼텍싱을 하면서 70 ℃에서 20분 동안 배양하였다. 원심분리기로 불용성 세포벽을 분리한 후, 3회 이상 반복하여 세척을 하였고, 그 중 2회는 100% 에탄올로 세척하였다. 마지막으로 100% 아세톤을 사용하여 세포벽을 다시 세척한 후, 70 ℃에서 진공건조하였다.

[0088] AIRs 5 mg을 72% 황산으로 실온에서 30분 동안 전가수분해하였다. 0.4 mg/ml의 이노시톨 용액을 내부 표준물질

(internal standards)로 사용하였다. 황산을 6%로 희석하고 표준물질을 첨가하여, 시료를 105 ℃에서 2시간 동안 배양하였다. 실온에서 냉각하고, 25% 암모니아 용액 0.6 ml을 첨가한 후, 상기 혼합물 1.5 ml을 유리 피펫으로 덜어냈다. 12,000 rpm에서 3분 동안 스핀 다운한 후, 상층액 300 ㎕를 새로운 유리병에 옮겼다. 상기 용액과 수소화붕소 나트륨 2 ml의 혼합물을 42 ℃에서 30분 마다 주기적으로 돌려주면서 90분 동안 배양하였다. 그 후 무수 아세트산 4 ml과 메틸이미다졸 0.4 ml을 첨가하였다. 실온에서 30분 동안 배양한 후, 상기 용액을 분별깔대기로 옮기고, 무수아세트산을 탈염수 20 ml로 분해한 후, 디클로로메탄 8 ml을 첨가하였다. 용액의 아래층을 물로 3번 세척한 후, 상층액을 모았다. 그 후 용액은 50 ℃에서 16시간 동안 완벽하게 건조되었다. 건조된 덩어리를 디클로로메탄 50 ㎕로 용해시킨 후, 가스크로마토그래피(HP 4890)에 1 ㎕를 주입하였다.

[0089] **실시예 4. 형질전환 애기장대의 분석 결과**

[0090] 실시예 4-1. 형질전환 애기장대에서 DX15 프로모터로 인한 PdGA20ox의 줄기 특이적 과발현 확인

[0091] 본 발명의 DX15::PdGA20ox 애기장대에서 DX15 프로모터로 인해 PdGA20ox가 줄기 특이적으로 과발현되는지 확인하기 위해 줄기와 잎에서 PdGA20ox의 발현을 semi-quantitative RT-PCR을 사용하여 확인하였다(도 2).

[0092] 먼저, PdGA20ox를 과발현하도록 형질전환된 애기장대(35S::PdGA20ox 또는 DX15::PdGA20ox) 2 종류를 제조하였다. DX15::PdGA20ox 형질전환 애기장대 10개 중 본 실험을 위해 1-4, 2-1, 3-3 및 4-7를 선별하였고, 35S::PdGA20ox 애기장대의 경우 한 종류의 대표적인 라인(OX)을 사용하였다.

[0093]

[0094] 상기 형질전환 애기장대에서 semi-quantitative RT-PCR을 통해, DX15::PdGA20ox 애기장대(3-3)의 경우 줄기와 달리 잎에서 PdGA20ox가 발현되지 않음을 알 수 있었고, 반면에 35S::PdGA20ox 애기장대(OX)의 경우 줄기와 잎 모두에서 강하게 PdGA20ox 유전자가 과발현됨을 확인하였다(도 2a).

[0095] 또한, 대부분의 DX15::PdGA20ox 애기장대는 35S::PdGA20ox 애기장대와 비슷한 PdGA20ox 유전자 발현 수준을 보임을 확인하였다(도 2b).

[0096] 이를 통해 본 발명의 DX15::PdGA20ox 애기장대는 35S::PdGA20ox 애기장대와 유사하게 PdGA20ox를 과발현시키면서, 동시에 상기 과발현이 줄기 특이적임을 알 수 있었다.

[0097] 실시예 4-2. 형질전환 애기장대 식물의 분석 결과

[0098] 지베렐린은 줄기 및 하배축 세포의 신장에 중요한 양성 조절자로 알려져 있는바, PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 애기장대에서 하배축 길이를 7일생 식물을 통해 확인하였다.

[0099] 그 결과, DX15::PdGA20ox 및 OX 애기장대의 7일생 식물 모두 야생형(WT)보다 더 긴 하배축 길이를 가짐을 확인하였다(도 3a 및 b). 또한 빛 조건에서 모든 형질전환 애기장대 라인의 배축은 야생형보다 약 27% 더 길어진 반면(도 3b), 암실 조건의 경우 어떤 변화도 없었다(도 3c).

[0100] 즉, PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 애기장대는 프로모터에 상관없이 야생형에 비해 PdGA20ox가 과발현되어 지베렐린의 생합성이 증가함으로써 하배축 길이의 신장이 일어남을 확인할 수 있었다.

[0101] 실시예 4-3. 형질전환 애기장대의 줄기 신장 분석 결과

[0102] 형질전환 애기장대에서 PdGA20ox 과발현으로 인한 효과를 확인하기 위해, 줄기 길이, 줄기 신장 속도 및 추대(bolting) 시간을 측정하였다.

[0103] 줄기 길이를 측정한 결과, 상기 어린 식물 단계에서 하배축 신장을 확인한 것과 마찬가지로, 모든 DX15::PdGA20ox 애기장대는 야생형보다 긴 줄기를 가지고 있음을 확인하였다(도 4b). 또한 대부분의 DX15::PdGA20ox 애기장대는 35S::PdGA20ox 애기장대와 유사한 줄기 길이를 가지고 있음을 확인함으로써, PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 애기장대는 프로모터에 상관없이 야생형에 비해 PdGA20ox가 과발현되어 줄기 길이가 길어짐을 알 수 있었다.

[0104] 또한 줄기 신장 속도를 측정한 결과, 가장 긴 줄기를 가진 본 발명의 1-4의 신장 속도(18.2 ㎜/일)가 OX(17.7 ㎜/일)보다 더 빨랐고, 대부분의 형질전환 애기장대는 야생형의 신장속도 11.3 ㎜/일보다 훨씬 더 빨랐다(도 4c). 이를 통해 본 발명의 DX15::PdGA20ox 애기장대는 야생형 및 35S::PdGA20ox 애기장대보다 빠른 신장 속도로 인해 바이오매스를 생산하는데 걸리는 시간을 단축할 수 있음을 알 수 있었다.

[0105] 하기 표 2에서 알 수 있듯이, DX15::PdGA20ox 애기장대(1-4)와 35S::PdGA20ox 애기장대(OX)는 각각 8개 및 7.8개의 로제트 잎(RL)을 가질 때 추대를 시작하였고, 이에 비해 야생형은 11개의 로제트 잎을 가질 때 추대를 시작하였으며, 잎자루의 길이도 줄기 길이와 유사한 신장 경향을 보였다(표 2). 이를 통해 도 4a와 같은 표현형은 신장 속도뿐만 아니라 추대 시간이 빨라졌기 때문임을 알 수 있었다.

[0106] 상기 결과를 종합하며, PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 애기장대는 프로모터에 상관없이 야생형에 비해 PdGA20ox가 과발현되어 줄기 길이가 길어지고, 줄기신장 속도 및 추대 시간이 빨라짐을 알 수 있었다. 나아가 본 발명의 DX15::PdGA20ox 애기장대는 야생형 및 35S::PdGA20ox 애기장대보다 빠른 신장 속도로 인해 바이오매스를 생산하는데 걸리는 시간을 단축할 수 있음을 알 수 있었다.

표 2

[0107]

	Bolting time		Petiole Length (mm)
	RL #	Days after planting	
WT (Col-0)	11.00 ± 0.27	28.6 ± 0.51	13.43 ± 0.26
DX15::PdGA20ox #1-4	8.00 ± 0.35	20.9 ± 0.22	16.71 ± 0.29
DX15::PdGA20ox #2-1	8.57 ± 0.30	22.1 ± 0.43	16.57 ± 0.24
DX15::PdGA20ox #3-3	8.36 ± 0.19	22.9 ± 0.45	16.73 ± 0.26
DX15::PdGA20ox #4-7	8.62 ± 0.37	24.8 ± 0.74	16.77 ± 0.33
35S::PdGA20ox	7.79 ± 0.29	22.3 ± 0.45	18.07 ± 0.21

[0108] n=14

[0109] 실시예 4-4. 형질전환 애기장대의 바이오매스 분석 결과

[0110] 본 발명의 DX15::PdGA20ox 애기장대의 바이오매스 증가를 확인하기 위해 줄기 직경 및 줄기 생중량(stem fresh weight)을 측정하였다(도 5).

[0111] 모든 형질전환 애기장대는 줄기 직경과 줄기 생중량이 증가하였는데(도 5a 및 5b), 이는 전사 단계의 발현 패턴과 일치하는 결과였다. 1-4는 약 200%의 가장 큰 바이오매스 증가량을 보였으며, 2-1, 3-3, 4-7은 각각 118%,

140%, 97%의 바이오매스 증가량을 보였고, OX도 이와 유사한 증가량을 보였다(도 5b).

[0112] 이를 통해 본 발명의 PdGA20ox를 과발현시키는 경우 바이오매스가 증가하는 것을 확인하였으며, 이러한 증가는 일반적인 프로모터의 사용시뿐만 아니라, 본 발명의 목부 특이적 프로모터인 DX15 프로모터를 사용할 경우에도 나타남을 알 수 있었다.

[0113] 실시예 4-5. 형질전환된 애기장대의 이차 세포벽 두께 및 섬유 세포 신장 분석 결과

[0114] 나무 형성 동안 목부 조직 섬유의 개수 또는 길이는 지베렐린에 영향을 받는다고 알려져 있는바(Ann. Bot., 30, 539-548., 1966), 형질전환된 애기장대에서 줄기 단면의 조직학적 분석을 통해 이차 세포벽 두께 및 줄기 침출법(maceration)을 통해 섬유 세포 신장을 측정하였다.

[0115] 그 결과, 형질전환 애기장대는 모두 이차 세포벽 두께가 증가하였음을 확인하였다(도 6). 상기 세포벽 두께 결과는 줄기 직경 결과(도 5a)와 정확히 일치하지 않지만, PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 애기장대는 프로모터에 상관없이 야생형에 비해 PdGA20ox가 과발현되어 이차 세포벽 두께가 증가함을 알 수 있었다.

[0116] 또한, 줄기 침출법(maceration)을 통해 형질전환 애기장대의 섬유 세포가 매우 신장한 것을 확인하였다(도 7a). 줄기 신장이 가장 큰 DX15::PdGA20ox 애기장대(1-4)의 섬유 길이는 야생형에 비해 약 93% 증가하였고, 35S::PdGA20ox 애기장대(OX)와 유사하였다(도 7b). 이러한 경향은 전사 단계의 유전자 발현 패턴, 줄기 신장 및 배축 신장과 일치하였다. 이를 통해, PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 애기장대는 프로모터에 상관없이 야생형에 비해 PdGA20ox가 과발현되어 섬유 세포가 신장됨을 알 수 있었다.

[0117] 실시예 4-6. 형질전환 애기장대에서 세포벽 단당류 조성 분석 결과

[0118] 바이오매스 관련 산업에 있어서 바이오매스의 양적 증가와 더불어 당성분과 같은 질적인 면도 중요하므로, 형질전환 애기장대에서 세포벽 단당류의 조성을 측정하였다(도 8).

[0119] 그 결과, 글루코스와 자일로스의 전체 함량이 크게 증가하였음을 확인하였다. 특히 세포벽의 전체 조성 중 글루코스 비율이 PdGA20ox 유전자의 발현 패턴과 일치하는 증가를 보였다. 자일로스 함량 또한 글루코스 만큼은 아니지만, 야생형에 비해 증가하였다(도 8).

[0120] 이를 통해 PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 애기장대는 프로모터에 상관없이 야생형에 비해 PdGA20ox가 과발현되어 바이오매스의 양적 증가와 더불어 질적으로 바이오매스 연료로 사용되는 당성분이 증가함을 알 수 있었고, 이는 바이오매스 관련 산업에 있어서 유용하게 이용될 수 있음을 시사하였다.

[0121] **실시예 5. 형질전환 포플러의 분석 결과**

[0122] 실시예 5-1. 형질전환 포플러에서 DX15 프로모터로 인한 PdGA20ox의 줄기 특이적 과발현 확인

[0123] 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러에서 DX15 프로모터로 인해 PdGA20ox가 줄기 특이적으로 과발현되는지 확인하기 위해 줄기와 잎에서 PdGA20ox의 발현을 semi-quantitative RT-PCR을 사용하여 확인하였다(도 9b).

[0124] 먼저, DX15::PdGA20ox 라인 4개(3, 4, 7 및 13)와 35S::PdGA20ox 라인 2개(22 및 32)를 제조하였다. 상기 형질전환 포플러에서 semi-quantitative RT-PCR을 통해, DX15::PdGA20ox 포플러의 경우 줄기와 달리 잎에서 PdGA20ox가 발현되지 않음을 알 수 있었고, 반면에 35S::PdGA20ox 포플러의 경우 줄기와 잎 모두에서 강하게

PdGA20ox가 과발현됨을 확인하였다(도 9b).

[0125] 이를 통해 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러는 35S::PdGA20ox 포플러와 달리 줄기 특이적으로 PdGA20ox를 과발현시킴을 알 수 있었다.

[0126] 실시예 5-2. 형질전환 포플러의 줄기 신장 분석 결과

[0127] 형질전환 포플러에서 PdGA20ox 과발현으로 인한 효과를 확인하기 위해, 줄기 길이(도 9c), 줄기 신장 속도(도 9d) 및 절간과 잎자루의 길이(표 3)를 측정하였다.

[0128] 도 9a 및 도 9b에서 형질전환 애기장대와 유사하게 포플러에서도 35S 및 DX15 프로모터에 의한 PdGA20ox 과발현에 따라 줄기 신장이 크게 증가함을 확인하여, PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 포플러는 프로모터에 상관없이 야생형에 비해 PdGA20ox가 과발현됨을 알 수 있었다.

[0129] 또한, 줄기 신장 속도를 측정한 결과, 가장 긴 줄기를 가진 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러 13의 신장 속도(1.36 cm/일)는 35S::PdGA20ox 포플러 32(1.44 cm/일)와 유사하였고, 형질전환 포플러는 야생형의 신장속도 0.61 cm/일보다 훨씬 빨랐다(도 9d).

[0130] 이를 통해 PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 포플러는 프로모터에 상관없이 야생형에 비해 PdGA20ox가 과발현되어 빠른 줄기 신장 속도를 가지므로 바이오매스 관련 산업에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0131] 또한, 표 3에서 알 수 있듯이, 절간과 잎자루의 길이도 줄기 신장에 따라 신장되었고, 전체 절간의 개수도 증가하였다(표 3). 결과적으로 PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 포플러는 프로모터에 상관없이 야생형에 비해 PdGA20ox가 과발현되어 절간과 잎자루의 길이도 신장됨을 알 수 있었다.

표 3

[0132]

	Internode Length[a] (cm)	Petiole Length[b] (cm)	Shoot Fresh Weight (g)	Number of Inernodes
WT	1.3 ± 0.1	3.0 ± 0.1	22.0 ± 0.9	27.3 ± 0.3
35S::PdGA20ox #22	3.4 ± 0.1	3.9 ± 0.2	16.3 ± 2.0	29.0 ± 1.7
35S::PdGA20ox #32	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.1	19.7 ± 3.4	32.0 ± 3.2
DX15::PdGA20ox #3	3.0 ± 0.1	3.2 ± 0.1	24.2 ± 1.3	33.0 ± 1.5
DX15::PdGA20ox #4	3.5 ± 0.1	4.0 ± 0.1	23.8 ± 1.5	33.0 ± 0.6
DX15::PdGA20ox #7	3.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1	22.7 ± 0.9	30.0 ± 0.0
DX15::PdGA20ox #13	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	23.2 ± 2.5	32.0 ± 1.5

[0133] a: 10번째, 11번째 및 12번째 절간의 길이

[0134] b: 10번째, 11번째 및 12번째 잎자루의 길이

[0135] n=3

[0136] 실시예 5-3. 형질전환 포플러의 바이오매스 및 목질부 변화 분석 결과

[0137] 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러의 바이오매스 증가를 확인하기 위해 줄기 직경 및 줄기 생중량을 측정하였다(도 10).

[0138] 먼저, 줄기 직경 측정 결과, DX15::PdGA20ox 포플러는 야생형 및 35S::PdGA20ox 포플러보다 줄기 직경이 넓음을 확인하였다(도 10a). 이는 목본식물인 형질전환 포플러의 특징으로, 본 발명의 형질전환 포플러가 상대적으로 줄기가 두꺼워 PdGA20ox의 과발현으로 인한 부작용이 억제될 수 있음을 알 수 있었다.

[0139] 또한, 줄기 생중량 측정 결과, DX15::PdGA20ox 포플러는 60일 동안 야생형에 비해 줄기 생중량이 약 2배 내지 3배 증가하였다(도 10b). 결과적으로 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러는 야생형 포플러보다 바이오매스의 현저한 증가(200% 내지 300%)를 보임을 알 수 있었다.

[0140] 상기 결과를 종합하면, DX15::PdGA20ox 포플러는 야생형 포플러에 비해 바이오매스가 현저하게 증가함과 동시에 줄기가 두꺼워 PdGA20ox의 과발현으로 인한 부작용이 억제될 수 있음을 알 수 있었다.

[0141] 실시예 5-4. 형질전환 포플러의 목부 변화 분석 결과

[0142] 형질전환된 포플러에서 PdGA20ox 과발현으로 인한 효과를 확인하기 위해, 조직학적 분석을 통해 줄기 단면(도 11) 및 목부 변화(도 12)를 측정하였다.

[0143] 형질전환 포플러의 줄기 단면을 확인한 결과, 야생형과 동일한 생장 단계(11번째 절간)를 비교하였을 때, 형질전환된 모든 라인에서 목부가 증가하였다(도 11).

[0144] 또한, 목부 변화를 확인한 결과, 35S::PdGA20ox 22 및 32의 목부 넓이는 각각 30% 및 33%만이 증가한 반면, DX15::PdGA20ox 라인은 야생형에 비해 최대 69% 증가하였다(도 12a). 이러한 목부의 증가는 목부 세포 파일(xylem cell pile)의 수가 증가했기 때문이다(도 12b). 이로부터 GA20ox 과발현이 세포의 크기가 아니라 세포 분열을 촉진하는 것을 알 수 있었다. 애기장대와 대조적으로 목질 조직 섬유의 세포벽 두께는 야생형에 비해 감소하였다(도 12c).

[0145] 상기 결과를 통해 DX15::PdGA20ox 포플러는 야생형 및 35S::PdGA20ox 포플러에 비해 목부 및 목부 세포 파일의 수가 증가함을 알 수 있었다.

[0146] 실시예 5-5. 형질전환 포플러에서 세포벽 단당류 조성 분석 결과

[0147] 바이오매스 관련 산업에 있어서 바이오매스의 양적 증가와 더불어 당성분과 같은 질적인 면도 중요하므로, 형질전환 포플러에서 세포벽 단당류의 조성을 측정하였다(도 13).

[0148] 그 결과, 자일로스 및 글루코스 함량은 형질전환 포플러에서 애기장대와 마찬가지로 크게 증가함을 확인하였다. 이를 통해 DX15::PdGA20ox 포플러는 야생형 및 35S::PdGA20ox 포플러에 비해 바이오매스의 양적인 증가와 더불어 야생형에 비해 질적으로 바이오매스 연료로 사용되는 당성분의 증가를 가짐을 알 수 있었고, 이는 바이오매스 관련 산업에 있어서 유용하게 이용될 수 있음을 시사하였다.

[0149] **실시예 6. 형질전환 포플러의 PdGA20ox 과발현으로 인한 부작용 개선 효과**

[0150] 지베렐린의 양적인 증가를 이용한 식물 바이오매스를 증가시키는 방법은 식물의 줄기 신장은 촉진되나, 잎과 뿌리 발달이 현저히 저해되는 등의 부작용이 나타나므로, 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러의 잎과 뿌리를 분석하

여 상기 부작용의 여부를 측정하였다(도 14 및 도 15).

[0151] 먼저 잎의 분석 결과, 35S::PdGA20ox 포플러는 야생형과 비교할 때 잎 면적이 33 ~ 41% 감소하였고(도 14a), 잎 색깔은 옅은 녹색을 보였다(도 9a 및 14a). 그러나 DX15::PdGA20ox 포플러의 4개 라인은 35S::PdGA20ox 포플러와 비교할 때 더 진한 녹색을 보였고, 특히 라인 4는 가장 진한 녹색을 보였다(도 14a). 또한 DX15::PdGA20ox 잎은 야생형과 비교하여 최소 21%의 감소만을 보였고, 전반적으로 35S::PdGA20ox보다 잎 면적이 넓었다(도 14b).

[0152] 이를 통해 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러는 PdGA20ox가 과발현되더라도 35S::PdGA20ox 포플러와 달리 잎 면적 감소의 부작용이 억제됨을 알 수 있었다.

[0153] 또한 뿌리의 분석 결과, 35S::PdGA20ox 포플러에서 뿌리의 생장은 PdGA20ox 과발현에 크게 영향을 받았다. 35S::PdGA20ox 라인은 야생형과 비교하여 뿌리 생중량이 73 ~ 78%의 감소를 보인 반면, DX15::PdGA20ox 라인은 40 ~ 67%의 감소만을 보였다(도 15). DX15::PdGA20ox 포플러 3의 뿌리 생중량은 35S::PdGA20ox 포플러 22의 뿌리 중량의 170%에 해당하였다(도 15b).

[0154] 이를 통해 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러는 PdGA20ox가 과발현되더라도 35S::PdGA20ox 포플러와 달리 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제됨을 알 수 있었다.

[0155] 상기 결과를 통해, 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러는 PdGA20ox의 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 억제되고, 동시에 야생형 포플러에 비해 바이오매스가 매우 증가하는 효과가 있어, 바이오매스 관련 산업에 있어서 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0156] **실시예 7. DX15 프로모터의 다른 목부 특이적 프로모터와의 비교**

[0157] 상기 실시예들을 통하여 본 발명의 DX15 프로모터가 목부 특이적인 성질로 인하여, PdGA20ox를 과발현시킬 때, 단순 과발현에 의한 효과뿐만 아니라, 과발현에 의해 나타날 수 있는 부작용을 억제할 수 있음을 확인하였는바, 본 실시예에서는 본 발명의 DX15 프로모터를 다른 공지의 목부 특이적 프로모터와 비교하였다. 구체적으로 DX15 프로모터와 공지의 목부 특이적 프로모터와의 목부 특이적인 발현 강도를 비교하였다(도 16).

[0158] 그 결과, 공지의 목부 특이적 프로모터는 목부의 목질발달부(DX)에서는 대체적으로 발현이 증가되었지만, 성숙목질부(MX)에서는 발현이 감소되었다. 또한 성숙목질부에서 발현이 증가하더라도 DX15 프로모터보다 전체 발현량이 훨씬 작은 것을 확인하였다.

[0159] 이를 통해, 본 발명의 DX15 프로모터가 가장 목부 특이적이면서 동시에 전체 발현량이 가장 높음을 알 수 있었다.

[0160] 결론적으로, DX15 프로모터를 이용하여 PdGA20ox를 과발현시킨 형질전환 식물은 PdGA20ox를 목부 특이적이면서 동시에 강하게 발현하므로, 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용 억제 및 바이오매스의 증가에 공지의 프로모터를 사용한 식물보다 현저한 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0161] **실시예 8. DX15 프로모터, PdGA20ox 유전자 및 PtrMYB221 유전자가 도입된 형질전환(DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221) 식물의 제조**

[0162] DX15 프로모터, PdGA20ox 유전자 및 PtrMYB221 유전자가 도입된 형질전환(DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221) 식물을 제조하기 위하여, 바이러스 2A 시스템을 이용하였다. 바이러스에서 유래된 2A 펩티드 서열

(QLLNFDLLKLAGDVESNPGP, 서열번호 13)을 코딩하면서, 포플러의 코돈 사용에 최적화되도록 염기서열(서열번호 14)을 만들었다. 이 서열로 두 개의 유전자를 연결하여 발현시키면 하나의 전사체가 만들어지지만, 도 18에 빨간색으로 표시된 G (glycine)와 P (proline)의 매우 비효율적인 펩티드 결합으로 인해 번역과정에서 두 개의 단백질로 나누어지게 된다.

[0163] 정지 코돈이 제거된 PdGA20OX 유전자와 PtrMYB221 전체 유전자(서열번호 15)를 상기 2A 펩티드의 염기서열을 이용하여 연결시킨 융합 유전자를 제조하였고, 이를 실시예 2에 따라 DX15 프로모터에 연결하여 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 컨스트럭트(도 17)를 제작하였다. 이렇게 완성된 재조합 유전자를 pMDC32 벡터에 클로닝하여 애기장대와 포플러를 형질전환시켰다.

[0164] 본 발명에서 사용된 컨스트럭트(construct)는 DNA 시퀀싱으로 확인되었고, 사용된 프라이머는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0165]

Gene Name	Gene I.D.	Primers	Sequence(5'→3')
PtrMYB221	Potri.004G174400	FW	aaaaagcaggctATGGGAAGGTCTCCTTGCTGT (서열번호 17)
		FW-p2A	*CTTCTTAAGCTTGCAGGTGACGTCGAGTCAAACCCAGGTCCA*ATGGGAAGGTCTCCTTGC (서열번호 18)
		RV	agaaagctgggtTCATTTCATCTCCAAACCTCTATAA (서열번호 19)

[0166] 상기 표 4에서 Gateway AttB1, AttB2 사이트는 소문자로 표시하였고, 포워드와 리버스 프라이머를 위한 부분적인 2A 염기서열은 이탤릭체로 표시하였다.

[0167] **실시예 9. DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 애기장대의 분석 결과**

[0168] DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 애기장대에서 PdGA20ox 및 PtrMYB221의 목부 특이적 과발현으로 인한 효과를 확인하기 위해, 줄기 길이, 직경 및 생중량 (바이오매스)을 측정하였다.

[0169] 그 결과, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 애기장대는 야생형에 비하여 줄기가 길며(도 19), 줄기 직경이 넓음을 확인하였다(도 20a). 또한 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 애기장대는 야생형에 비하여 줄기 생중량이 약 200% 이상 증가하였음을 확인하였다(도 20b).

[0170] 아울러, 야생형(WT)과 각 형질전환 애기장대의 줄기조직에서 PdGA20ox-2A-PtrMYB221 전사체의 발현 패턴을 semi-quantitative RT-PCR (26 사이클)을 이용하여 분석하였다.

[0171] 그 결과, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 애기장대에서 PdGA20ox-2A-PtrMYB221 전사체가 발현되며, 상기 전사체의 발현량이 증가할수록 줄기 생중량이 현저하게 증가하였음을 알 수 있었다(도 19c 및 20b).

[0172] **실시예 10. DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 분석 결과**

[0173] 실시예 10-1. DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 줄기 생장 분석 결과

[0174] 형질전환(DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221) 포플러에서 PdGA20ox 및 PtrMYB221의 목부 특이적 과발현으로 인한 효

과를 확인하기 위해, 줄기의 길이, 직경 및 생중량을 분석하였다.

[0175] 그 결과, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 야생형에 비하여 줄기가 길며(도 21), 줄기 직경이 넓음을 확인하였다(도 22a). 또한 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 야생형 및 35S::PdGA20ox 포플러에 비하여 줄기 생중량이 매우 증가함을 확인하였다(도 22b).

[0176] 또한, 표 5에서 알 수 있듯이, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 절간과 잎자루의 길이도 줄기 신장에 따라 신장되었고, 전체 절간의 개수도 증가하였다. 또한, 절간과 잎자루의 길이도 신장됨을 알 수 있었다.

표 5

	Internode Length[a] (cm)	Petiole Length[b] (cm)	Shoot Fresh Weight (g)	Number of Internodes
WT	1.3 ± 0.2	3.0 ± 0.3	22.0 ± 1.5	27.3 ± 0.6
35S::PdGA20ox #22	3.4 ± 0.4	3.9 ± 0.5	16.3 ± 3.4	29.0 ± 3.0
35S::PdGA20ox #32	3.6 ± 0.6	3.7 ± 0.4	19.7 ± 5.9	32.0 ± 3.6
WT	1.0 ± 0.1	2.9 ± 0.4	22.7 ± 3.4	25.3 ± 1.2
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 #2	2.4 ± 0.2	3.1 ± 0.3	30.7 ± 1.0	31.0 ± 2.6
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 #6	1.7 ± 0.3	2.9 ± 0.2	25.0 ± 2.3	27.7 ± 1.5
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 #13	2.2 ± 0.3	2.8 ± 0.2	26.8 ± 3.2	27.3 ± 1.5

a: 10번째, 11번째 및 12번째 절간
b: 10번째, 11번째 및 12번째 엽병

[0177]

[0178] 실시예 10-2. DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러에서 DX15 프로모터로 인한 PdGA20ox의 줄기 특이적 과발현 확인

[0179] 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러에서 DX15 프로모터로 인해 PdGA20ox가 줄기 특이적으로 과발현되는지 확인하기 위해 줄기와 잎에서 PdGA20ox의 발현을 semi-quantitative RT-PCR을 사용하여 확인하였다

[0180] 그 결과, 35S::PdGA20ox 포플러의 경우 줄기와 잎 모두에서 강하게 PdGA20ox 유전자가 과발현되지만, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 경우 줄기와 달리 잎에서 PdGA20ox가 발현되지 않음을 알 수 있었다(도 23a). 또한, 35S::PdGA20ox 포플러는 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러보다 줄기에서 PdGA20ox 유전자의 발현 수준이 매우 높음을 알 수 있었다(도 23b).

[0181] 이를 통해, 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 35S::PdGA20ox 포플러와 다르게 PdGA20ox 과발현이 줄기 특이적임을 알 수 있었다.

[0182] 실시예 10-3. DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 목질부 성분 분석 결과

[0183] DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 목질부를 구성하는 성분을 Van Soest 기법을 이용하여 분석하였다.

[0184] 그 결과, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 야생형에 비해 리그닌이 큰 폭으로 감소하고(약 40%), 셀룰로오스는 반대로 상당히 증가함(약 20%)을 확인하였다(도 24). 목질계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산시 발효원으로 사용되는 셀룰로오스/헤미셀룰로오스를 목질에서 분리할 때 리그닌 성분이 가장 큰 방해요소로 작용하여 목질의 전처리, 분해 과정에 가장 많은 비용이 들게 된다.

[0185] 그러나, 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 바이오에탄올 생산시 발효원인 셀룰로오스는 증가하

고, 방해요소인 리그닌은 큰 폭으로 감소함을 확인한바, 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 형질전환 식물은 바이오연료 생산용 단벌기 에너지림 조성의 최적 수종으로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0186] 실시예 10-4. DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 PdGA20ox 과발현으로 인한 부작용 개선 효과

[0187] 지베렐린의 양적인 증가를 이용한 식물 바이오매스를 증가시키는 방법은 식물의 줄기 신장은 촉진되나, 잎과 뿌리 발달이 현저히 저해되는 등의 부작용이 나타나므로, 본 발명의 DX15::PdGA20ox 포플러의 잎과 뿌리를 분석하여 상기 부작용의 여부를 측정하였다.

[0188] 그 결과, 35S::PdGA20ox 포플러는 야생형과 비교할 때 잎 면적이 감소하지만, 이와 달리 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 야생형과 유사한 잎 면적을 가지며, 전반적으로 35S::PdGA20ox 포플러보다 잎 면적이 넓었다(도 25).

[0189] 이를 통해, 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 PdGA20ox가 과발현되더라도 35S::PdGA20ox 포플러와 달리 잎 면적 감소의 부작용이 없음을 알 수 있었다.

[0190] 또한 뿌리의 분석 결과, 35S::PdGA20ox 포플러에서 뿌리의 생장은 PdGA20ox 과발현에 크게 영향을 받았다. 35S::PdGA20ox 포플러는 야생형과 비교하여 뿌리 생중량이 매우 현저하게 감소되었지만, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 야생형과 유사하거나 야생형보다 더 높은 뿌리 생중량을 가짐을 확인하였다(도 26).

[0191] 이를 통해, 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 PdGA20ox가 과발현되더라도 35S::PdGA20ox 포플러와 달리 뿌리 생중량 감소의 부작용이 나타나지 않음을 알 수 있었다.

[0192] 상기 결과를 통해, 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 PdGA20ox의 과발현으로 인한 잎 면적 감소 또는 뿌리 생중량 감소의 부작용이 나타나지 않고, 동시에 야생형 포플러 및 35S::PdGA20ox 포플러에 비해 바이오매스가 매우 증가하는 효과가 있어, 바이오매스 관련 산업에 있어서 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0193] **실시예 11. LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 분석 결과**

[0194] 실시예 11-1. LMO 시험포지에서 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러 재배

[0195] LMO 시험포지는 국립산림과학원 산림유전자원부(수원시 권선구 소재) 구내에 환경부 LMO 법률에 따라 조성하였고, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러를 야생형(WT)과 함께 30cm x 60cm 간격으로 식재하여 재배하였다.

[0196] 실시예 11-2. LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러 분석 결과

[0197] LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러에서 줄기의 길이, 직경 및 생중량을 분석하였다.

[0198] 그 결과, LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러도 화분에서 자란 포플러와 마찬가지로 야생형에 비하여 줄기가 긴 것을 확인하였다(도 27a 및 28a). 또한, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 야생형 및 35S::PdGA20ox 포플러에 비하여 줄기 직경이 굵은 것을 확인하였다(도 27b 및 28b).

[0199] 실시예 11-3. LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러의 PdGA20ox 과발현으로 인한 부작용

개선 효과 확인

[0200] LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러에서 지베렐린의 양적인 증가로 인한, 잎 발달이 저해되는 부작용의 발생 여부 확인하기 위해, 잎 면적, 엽록소 함량 및 동아(winter bud) 형성을 측정하였다.

[0201] 그 결과, LMO 시험포지에서 자란 포플러는 화분에서 자란 포플러와 유사한 경향을 보임을 확인하였다. LMO 시험포지에서 자란 35S::PdGA20ox 포플러는 야생형과 비교할 때 잎 면적이 감소하지만, 이와 달리 LMO 시험포지에서 자란 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 야생형과 유사한 잎 면적을 가지며, 전반적으로 35S::PdGA20ox 포플러보다 잎 면적이 넓었다(도 29).

[0202] 또한, LMO 시험포지에서 자란 35S::PdGA20ox 포플러는 야생형과 비교할 때 잎 색깔이 더 옅은 녹색을 띄고 엽록소 함량이 낮지만, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 야생형과 유사한 잎 색깔 및 엽록소 함량을 가짐을 확인하였다(도 30).

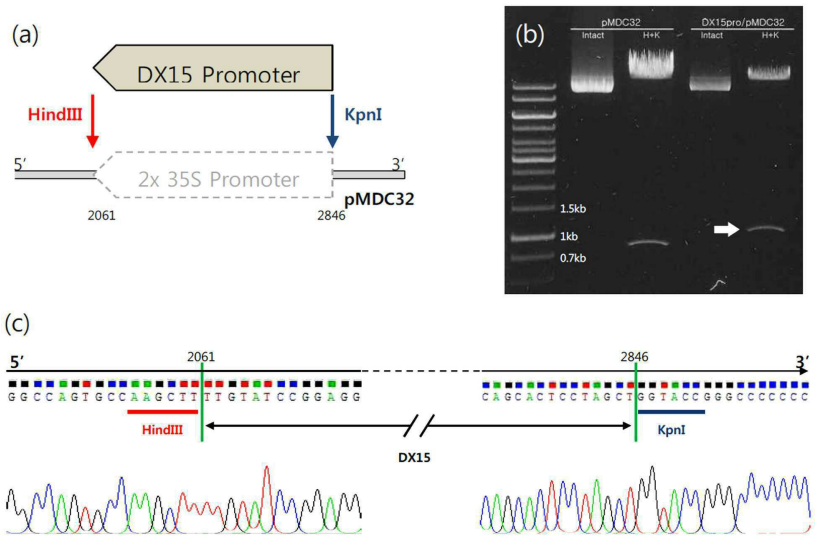
[0203] 또한, LMO 시험포지에서 자란 35S::PdGA20ox 포플러는 야생형과 비교할 때 동아가 매우 늦게 형성되지만, DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 야생형과 유사한 시기에 동아가 형성됨을 확인하였다(도 31).

[0204] 이를 통해, 본 발명의 DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 포플러는 LMO 시험포지에서 재배되더라도 PdGA20ox 과발현으로 인한 잎 생장 저해의 부작용이 없음을 알 수 있었다.

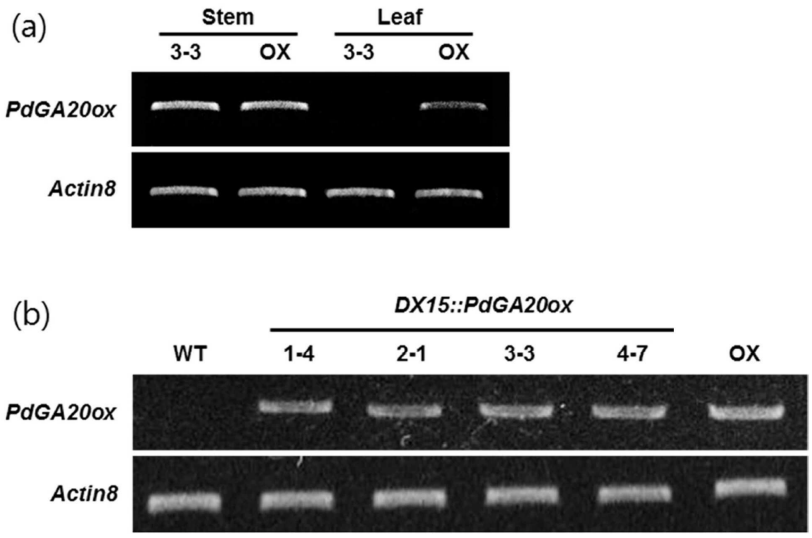
[0205] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

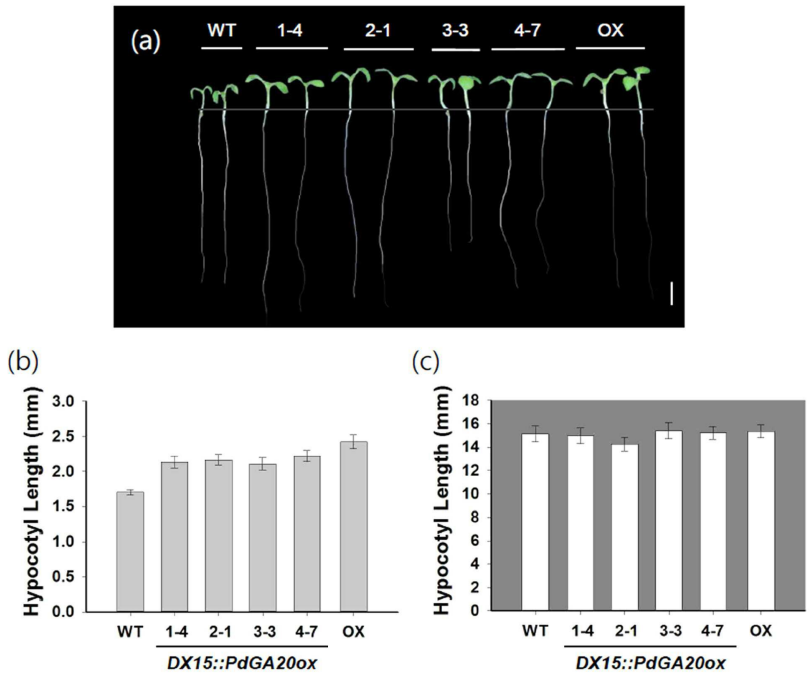
도면1



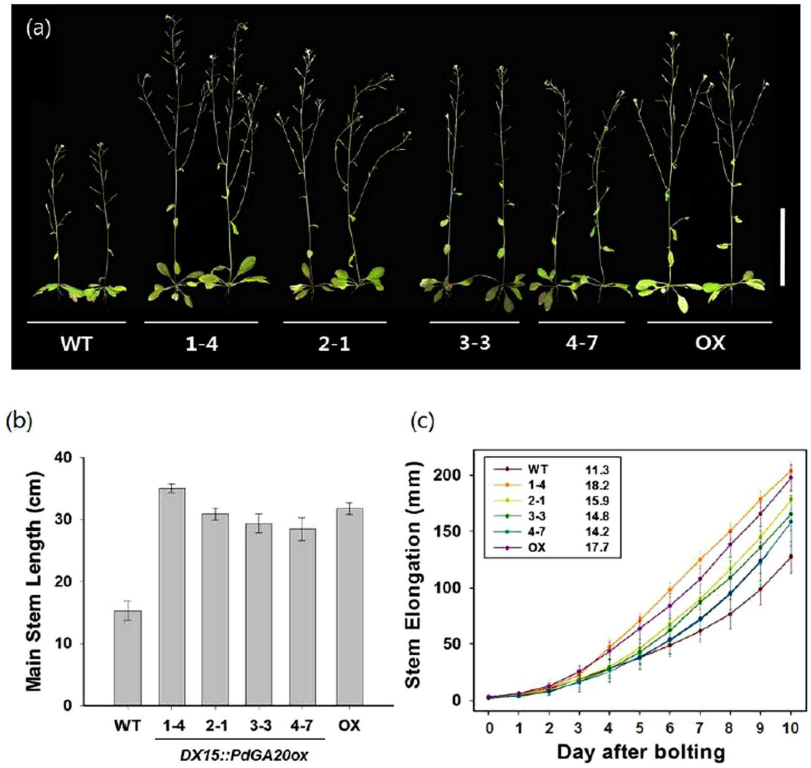
도면2


(a)
Stem
Leaf
3-3
OX
3-3
OX
PdGA20ox
Actin8
(b)
DX15::PdGA20ox
WT
1-4
2-1
3-3
4-7
OX
PdGA20ox
Actin8

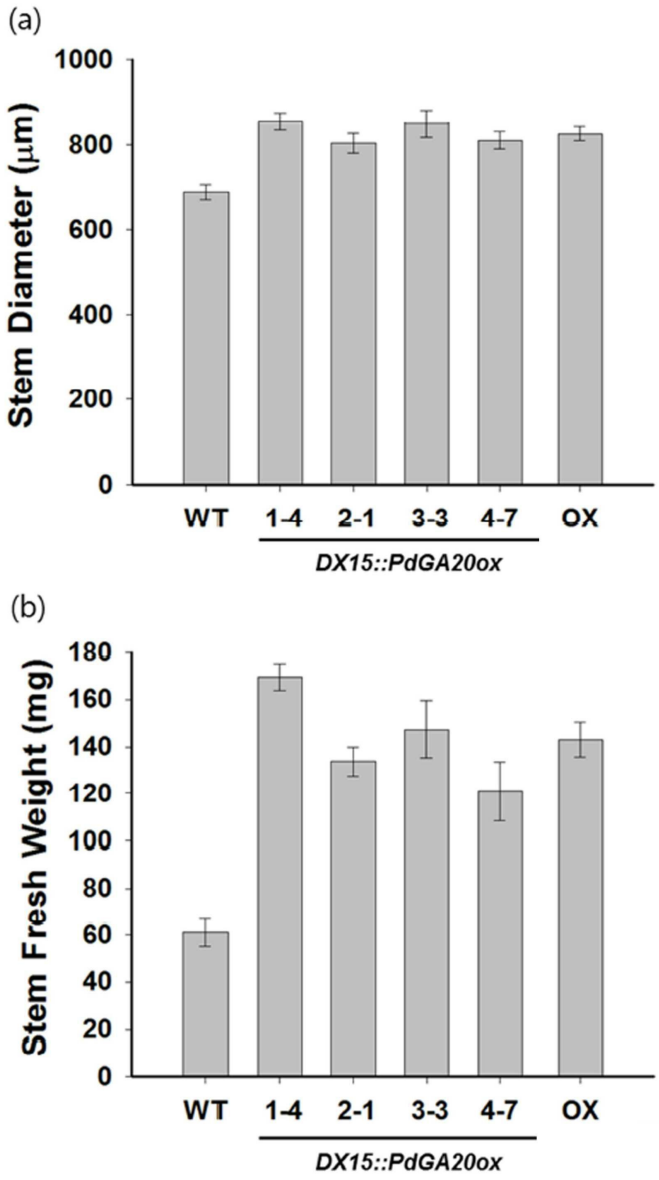
도면3


(a)
WT
1-4
2-1
3-3
4-7
OX
(b)
Hypocotyl Length (mm)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
WT
1-4
2-1
3-3
4-7
OX
DX15::PdGA20ox
(c)
Hypocotyl Length (mm)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
WT
1-4
2-1
3-3
4-7
OX
DX15::PdGA20ox

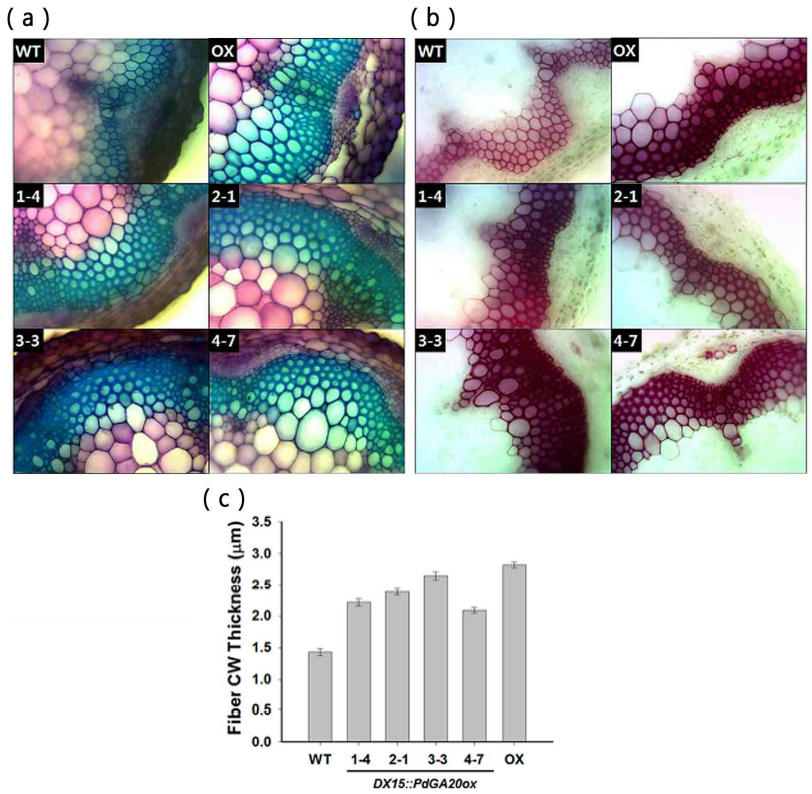
도면4


(a)
WT
1-4
2-1
3-3
4-7
OX
(b)
Main Stem Length (cm)
40
30
20
10
0
WT
1-4
2-1
3-3
4-7
OX
DX15::PdGA20ox
(c)
Stem Elongation (mm)
200
150
100
50
0
WT 11.3
1-4 18.2
2-1 15.9
3-3 14.8
4-7 14.2
OX 17.7
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Day after bolting

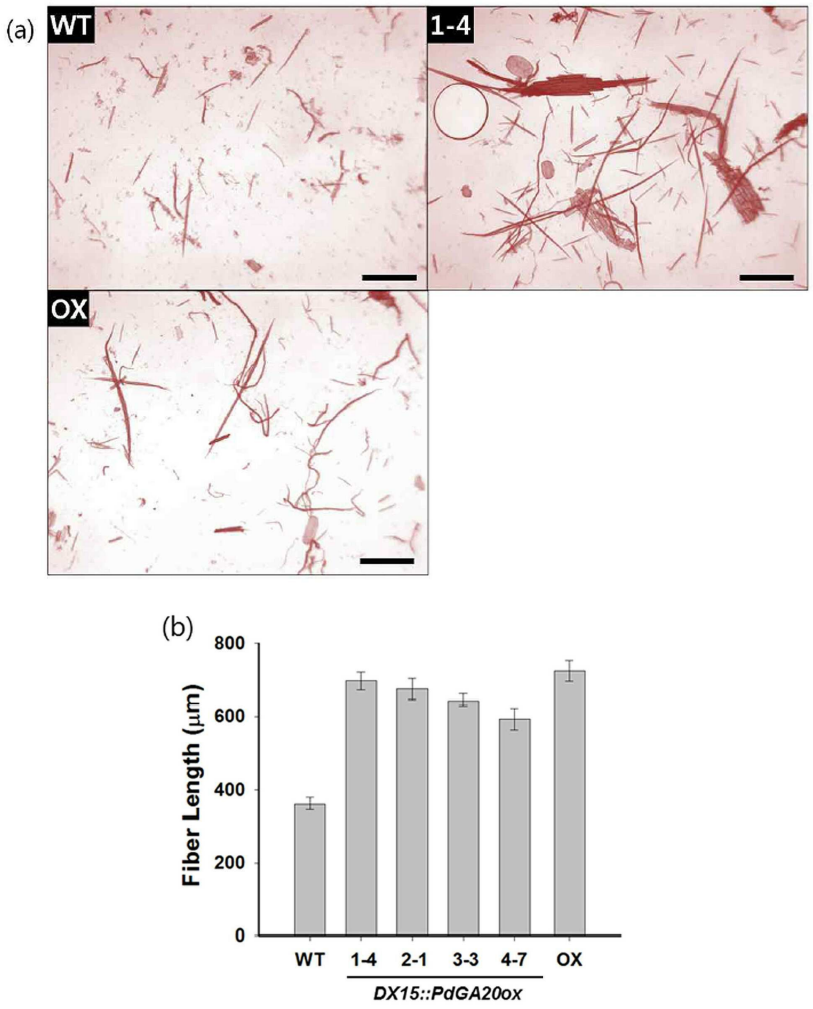
도면5


(a)
Stem Diameter (μm)
1000
800
600
400
200
0
WT
1-4
2-1
3-3
4-7
OX
DX15::PdGA20ox
(b)
Stem Fresh Weight (mg)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
WT
1-4
2-1
3-3
4-7
OX
DX15::PdGA20ox

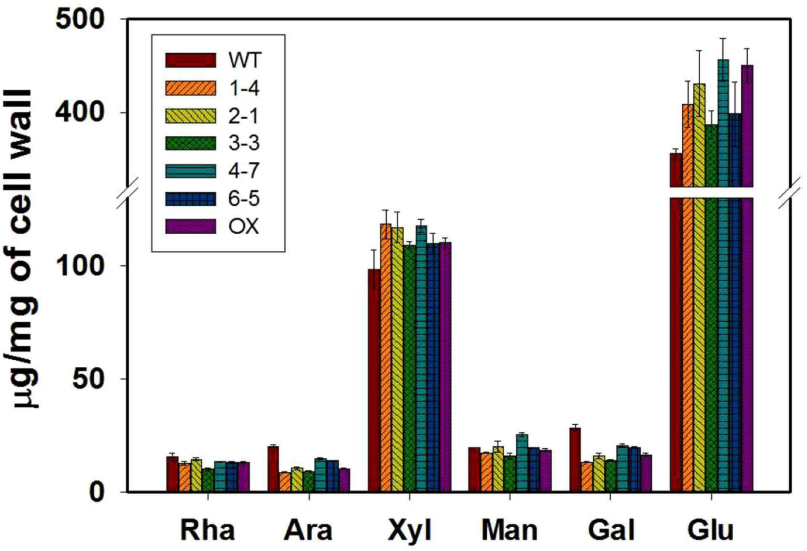
도면6


(a)
(b)
WT
OX
1-4
2-1
3-3
4-7
(c)
Fiber CW Thickness (μm)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
WT
1-4
2-1
3-3
4-7
OX
DX15::PdGA20ox

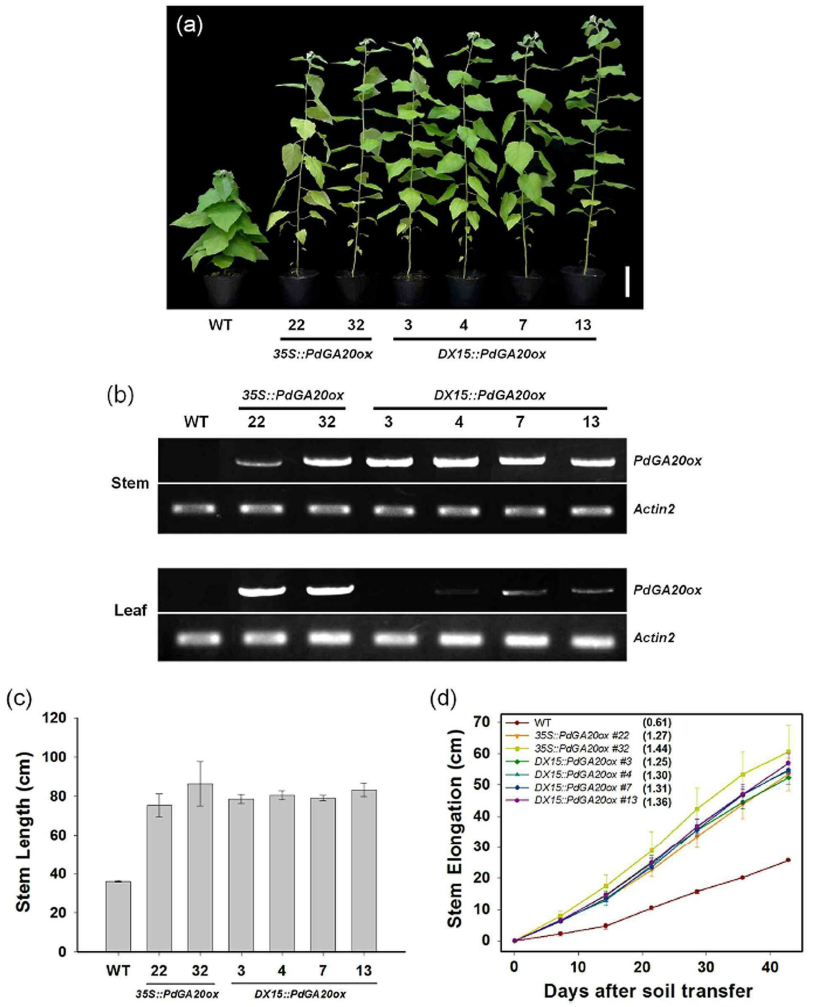
도면7


(a)
WT
1-4
OX
(b)
Fiber Length (μm)
800
600
400
200
0
WT
1-4
2-1
3-3
4-7
OX
DX15::PdGA20ox

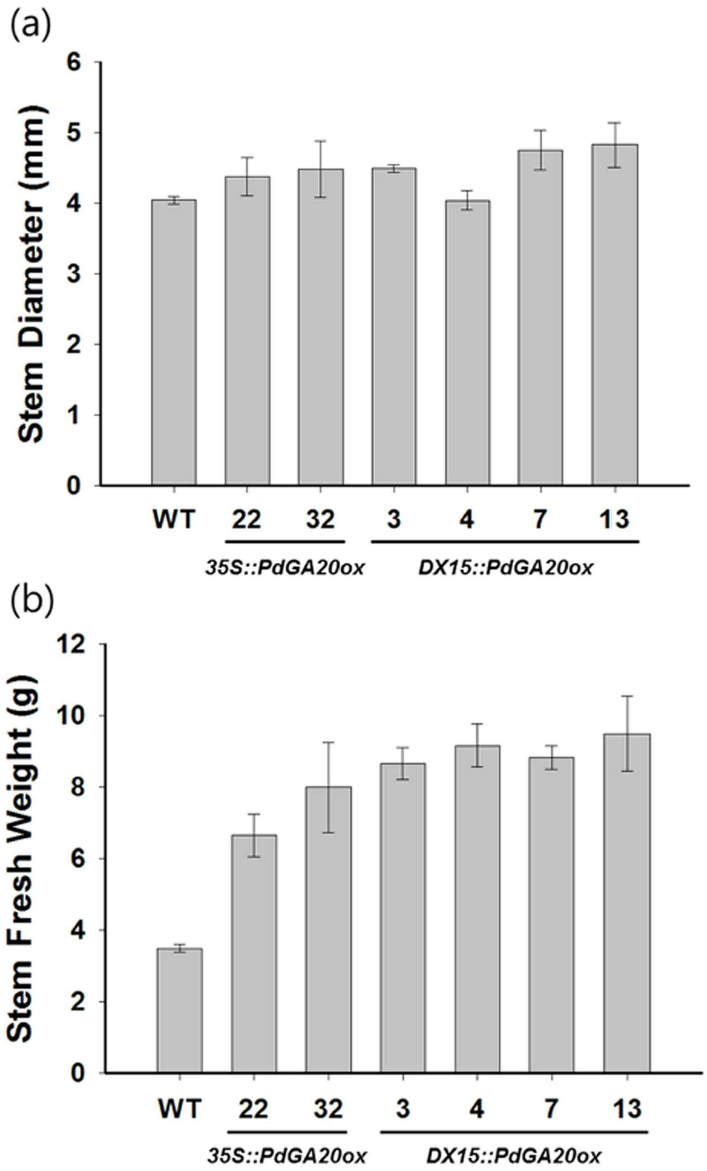
도면8


μg/mg of cell wall
500
400
100
50
0
WT
1-4
2-1
3-3
4-7
6-5
OX
Rha
Ara
Xyl
Man
Gal
Glu

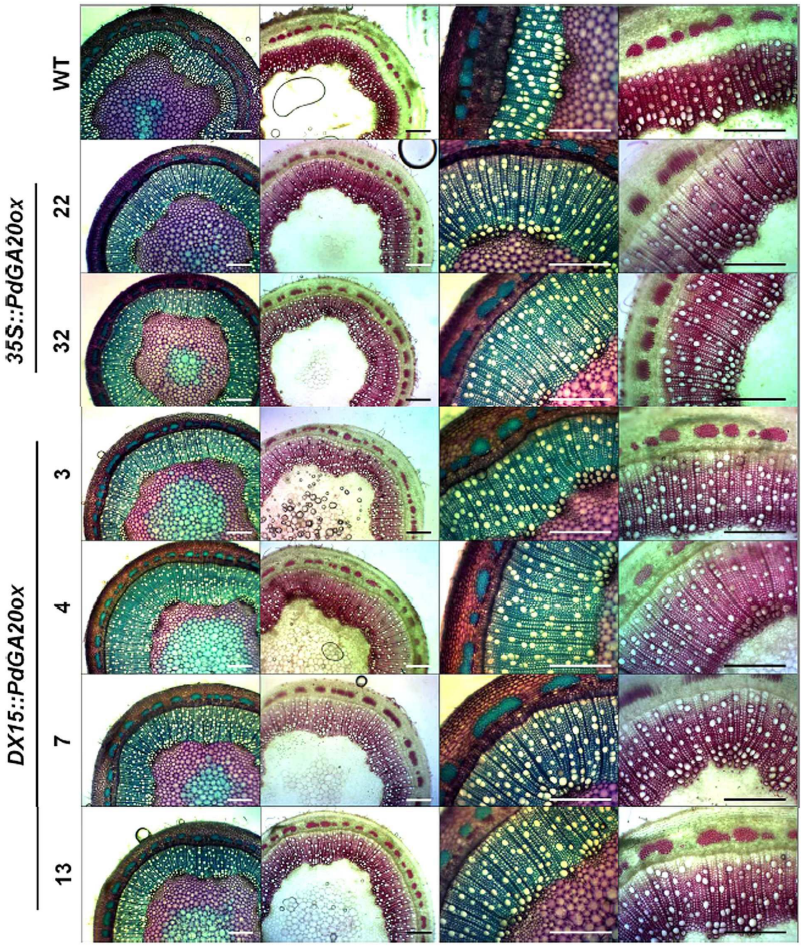
도면9


(a)
WT
22
32
3
4
7
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox
(b)
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox
WT
22
32
3
4
7
13
Stem
PdGA20ox
Actin2
Leaf
PdGA20ox
Actin2
(c)
Stem Length (cm)
120
100
80
60
40
20
0
WT
22
32
3
4
7
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox
(d)
Stem Elongation (cm)
70
60
50
40
30
20
10
0
WT (0.61)
35S::PdGA20ox #22 (1.27)
35S::PdGA20ox #32 (1.44)
DX15::PdGA20ox #3 (1.25)
DX15::PdGA20ox #4 (1.30)
DX15::PdGA20ox #7 (1.31)
DX15::PdGA20ox #13 (1.36)
0
10
20
30
40
Days after soil transfer

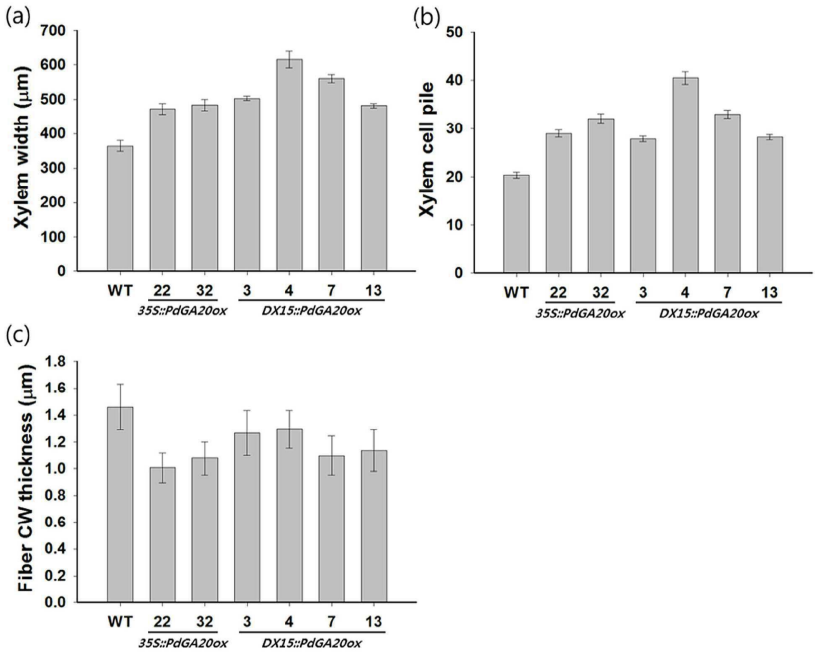
도면10


(a)
Stem Diameter (mm)
0
1
2
3
4
5
6
WT
22
32
3
4
7
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox
(b)
Stem Fresh Weight (g)
0
2
4
6
8
10
12
WT
22
32
3
4
7
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox

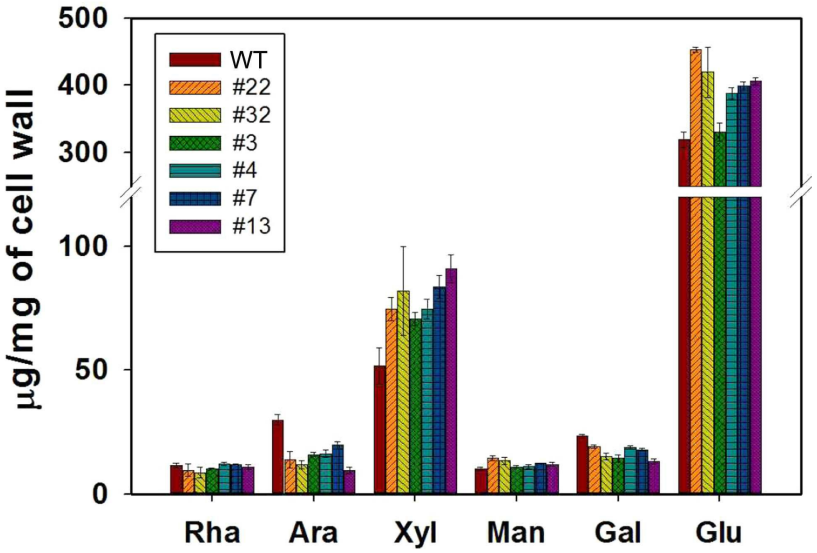
도면11


WT
35S::PdGA20ox
22
32
DX15::PdGA20ox
3
4
7
13

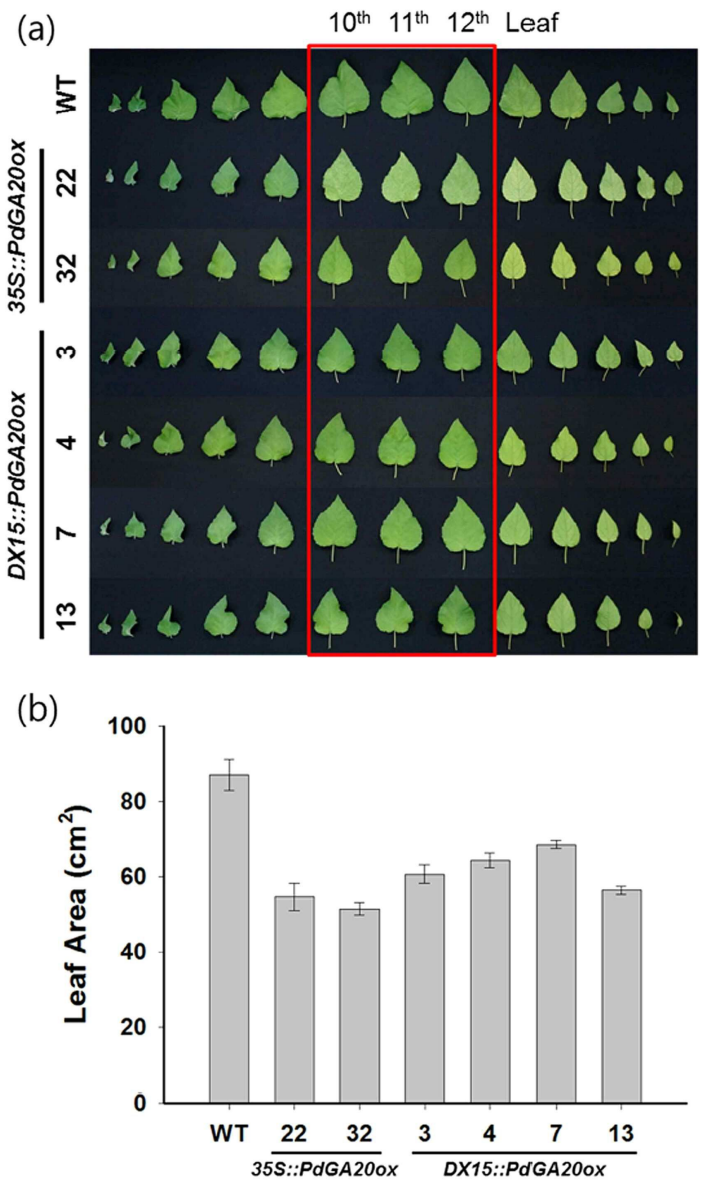
도면12


(a)
Xylem width (μm)
0
100
200
300
400
500
600
700
WT
22
32
3
4
7
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox
(b)
Xylem cell pile
0
10
20
30
40
50
(c)
Fiber CW thickness (μm)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8

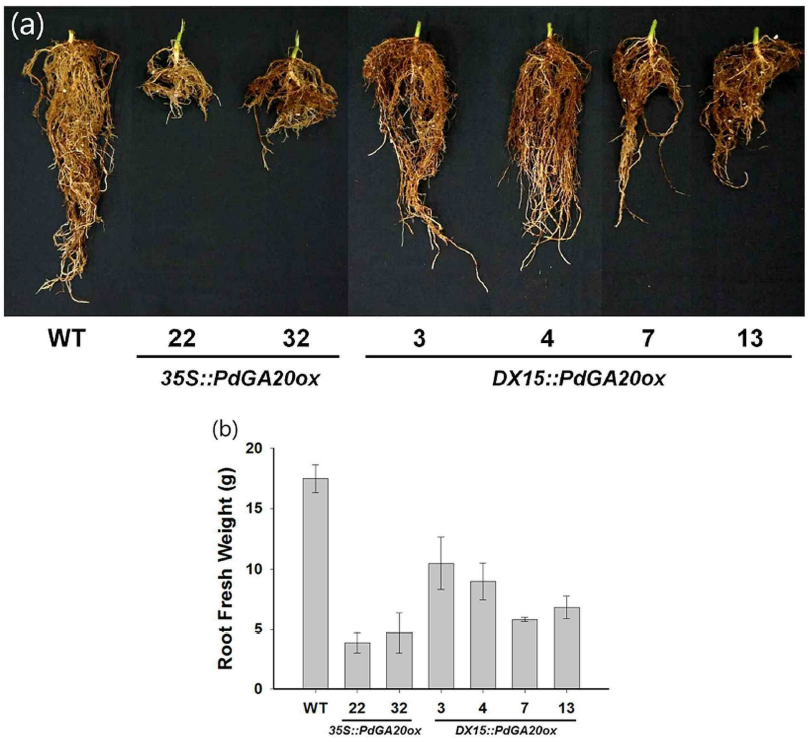
도면13


500
400
300
100
50
0
μg/mg of cell wall
WT
#22
#32
#3
#4
#7
#13
Rha
Ara
Xyl
Man
Gal
Glu

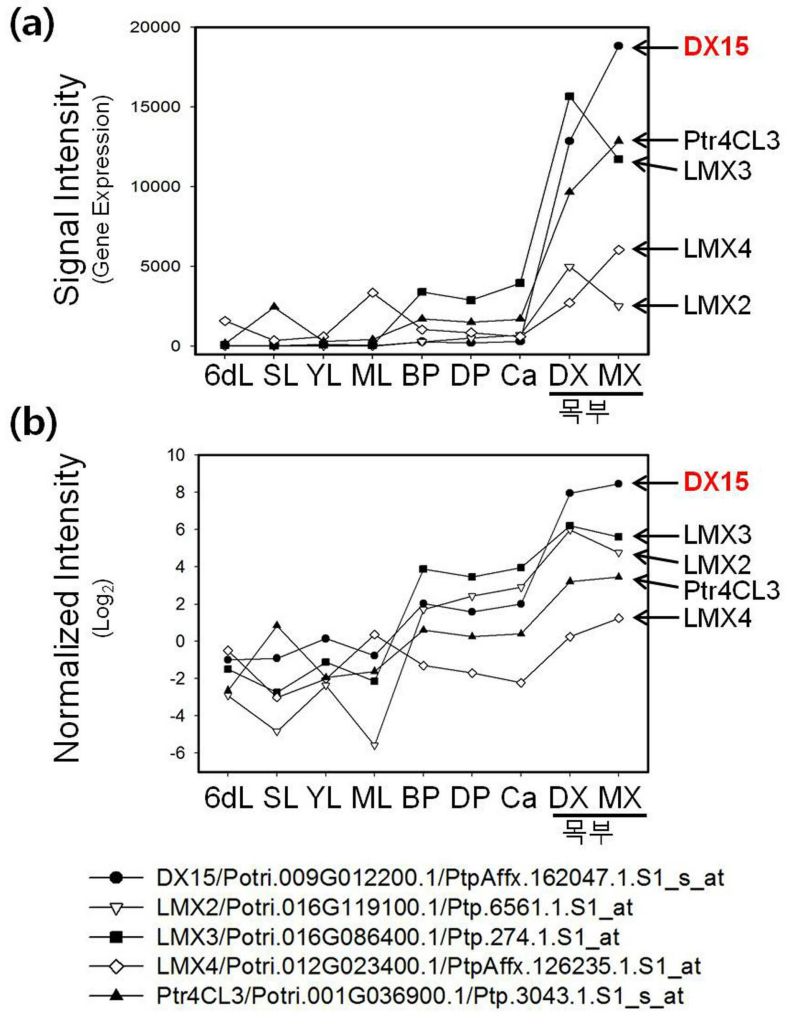
도면14


(a)
10th 11th 12th Leaf
WT
22
32
3
4
7
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox
(b)
Leaf Area (cm2)
100
80
60
40
20
0
WT
22
32
3
4
7
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox

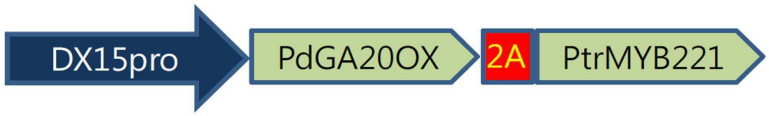
도면15


(a)
WT
22
32
3
4
7
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox
(b)
Root Fresh Weight (g)
20
15
10
5
0
WT
22
32
3
4
7
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox

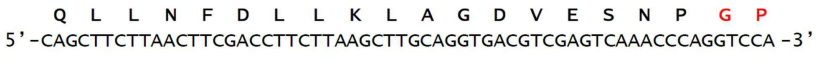
도면16



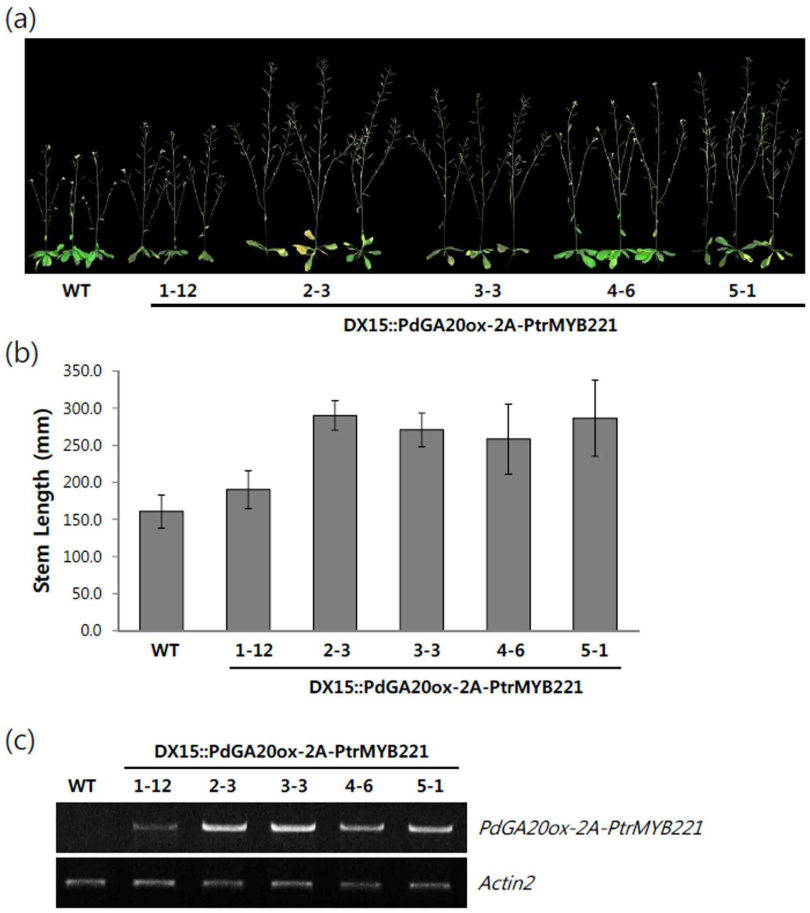
도면17



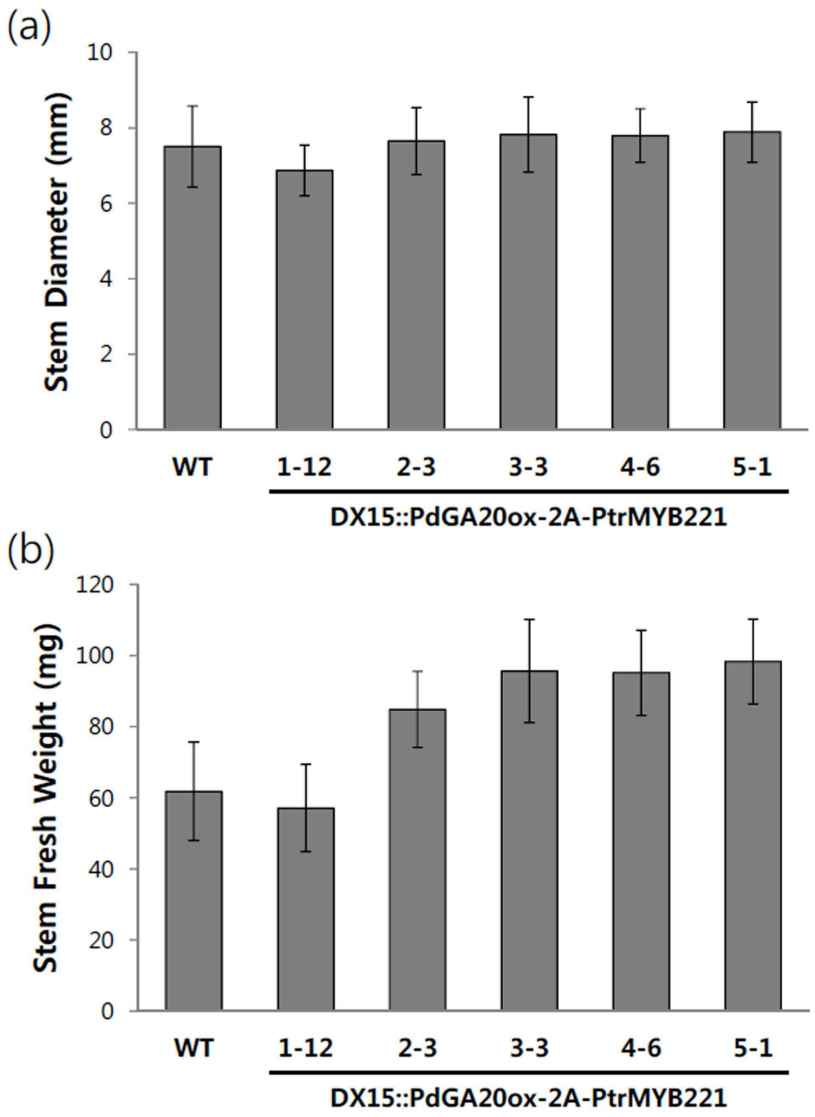
도면18



도면19

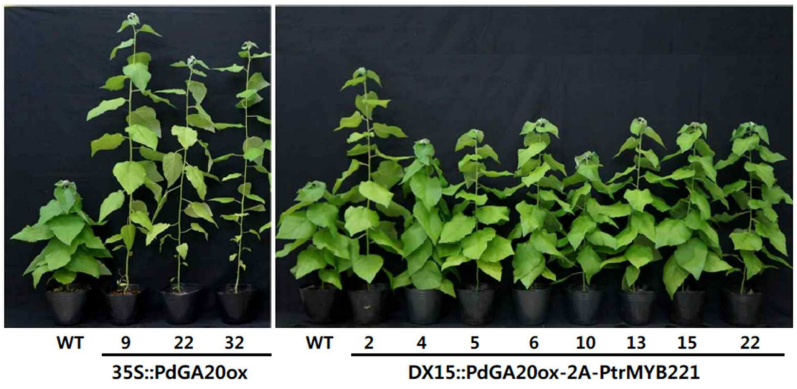

(a)
WT
1-12
2-3
3-3
4-6
5-1
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221
(b)
Stem Length (mm)
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
WT
1-12
2-3
3-3
4-6
5-1
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221
(c)
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221
WT
1-12
2-3
3-3
4-6
5-1
PdGA20ox-2A-PtrMYB221
Actin2

도면20

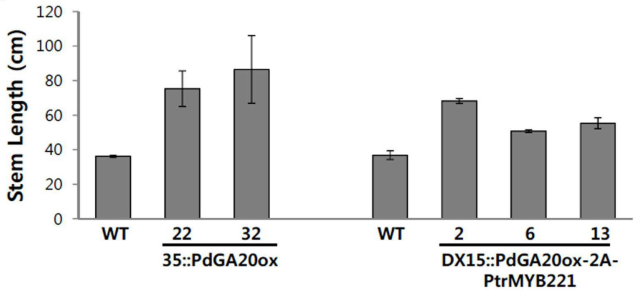

(a)
Stem Diameter (mm)
10
8
6
4
2
0
WT
1-12
2-3
3-3
4-6
5-1
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221
(b)
Stem Fresh Weight (mg)
120
100
80
60
40
20
0
WT
1-12
2-3
3-3
4-6
5-1
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221

도면21

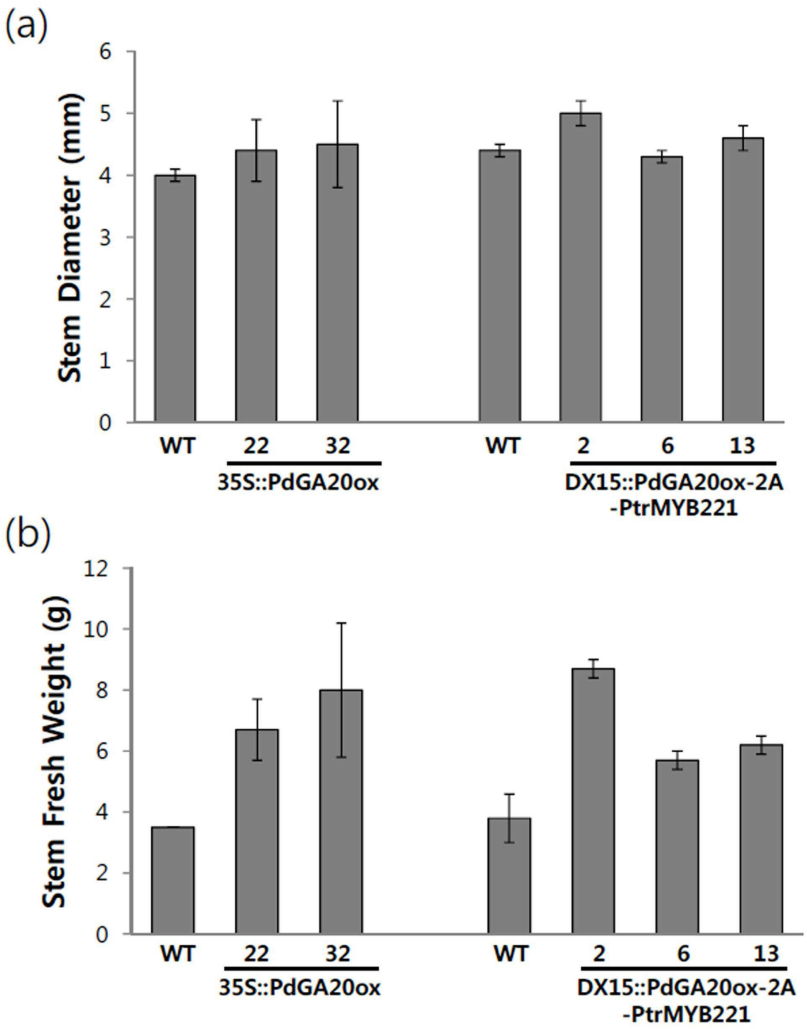
(a)


WT 9 22 32
35S::PdGA20ox
WT 2 4 5 6 10 13 15 22
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221

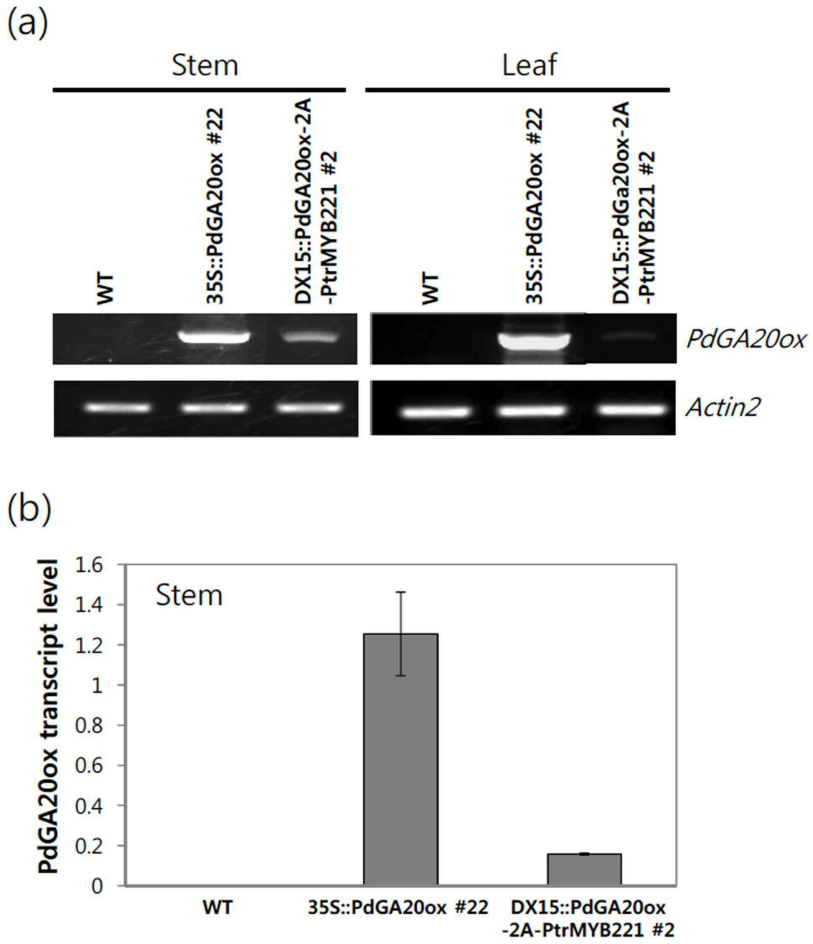
(b)


Stem Length (cm)
120
100
80
60
40
20
0
WT 22 32
35::PdGA20ox
WT 2 6 13
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221

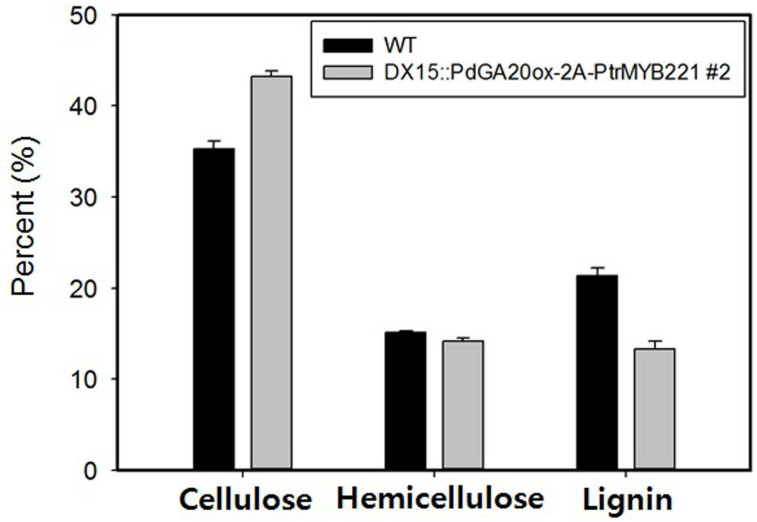
도면22


(a)
Stem Diameter (mm)
0
1
2
3
4
5
6
WT
22
32
35S::PdGA20ox
WT
2
6
13
DX15::PdGA20ox-2A
-PtrMYB221
(b)
Stem Fresh Weight (g)
0
2
4
6
8
10
12
WT
22
32
35S::PdGA20ox
WT
2
6
13
DX15::PdGA20ox-2A
-PtrMYB221

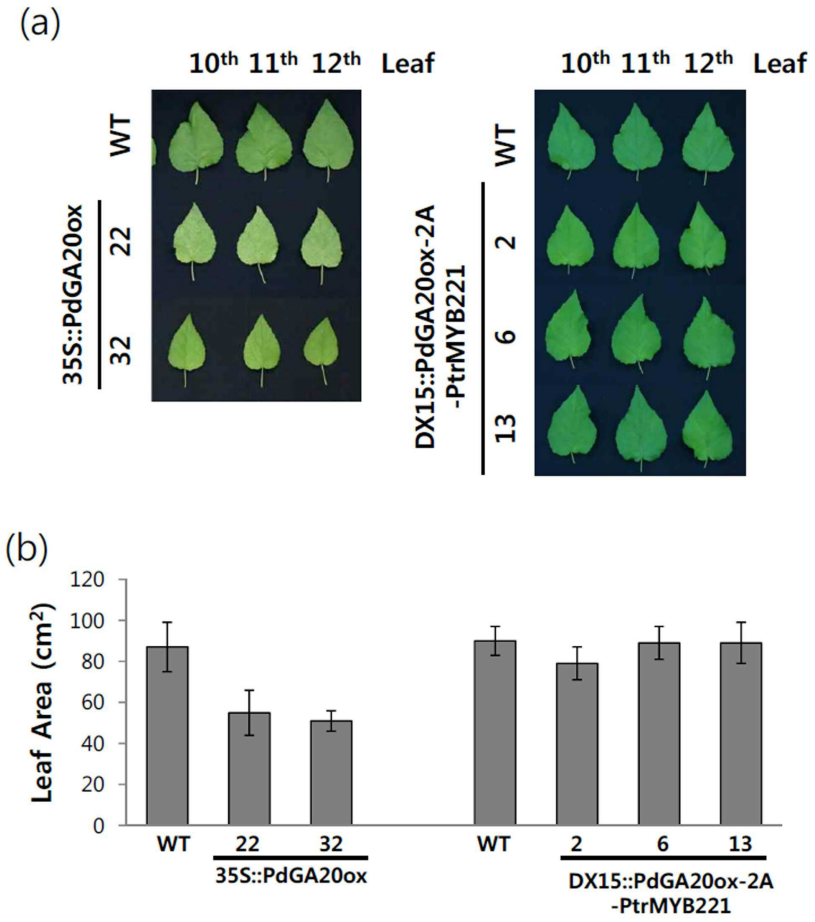
도면23


(a)
Stem
Leaf
WT
35S::PdGA20ox #22
DX15::PdGA20ox-2A -PtrMYB221 #2
WT
35S::PdGA20ox #22
DX15::PdGA20ox-2A -PtrMYB221 #2
PdGA20ox
Actin2
(b)
PdGA20ox transcript level
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Stem
WT
35S::PdGA20ox #22
DX15::PdGA20ox -2A-PtrMYB221 #2

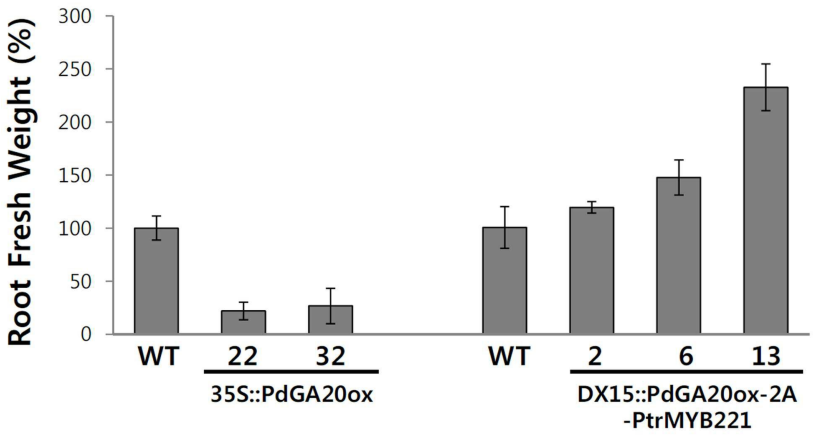
도면24


50
40
30
20
10
0
Percent (%)
WT
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 #2
Cellulose
Hemicellulose
Lignin

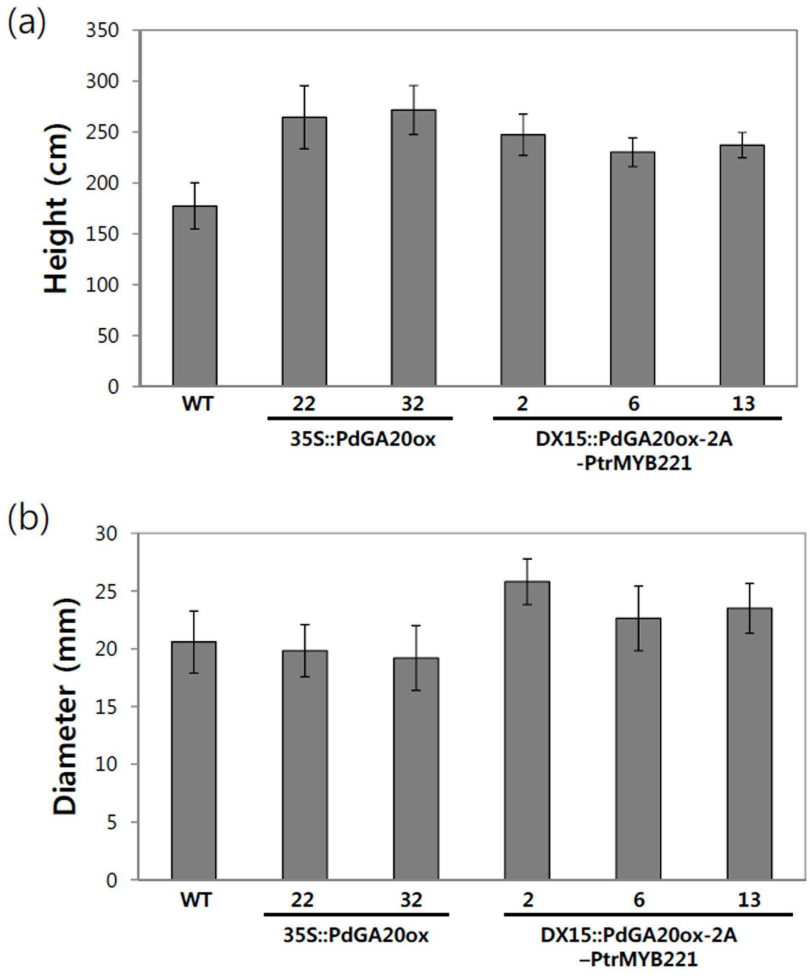
도면25


(a)
10th 11th 12th Leaf
10th 11th 12th Leaf
WT
35S::PdGA20ox
22
32
DX15::PdGA20ox-2A
-PtrMYB221
WT
2
6
13
(b)
Leaf Area (cm²)
120
100
80
60
40
20
0
WT
22
32
35S::PdGA20ox
WT
2
6
13
DX15::PdGA20ox-2A
-PtrMYB221

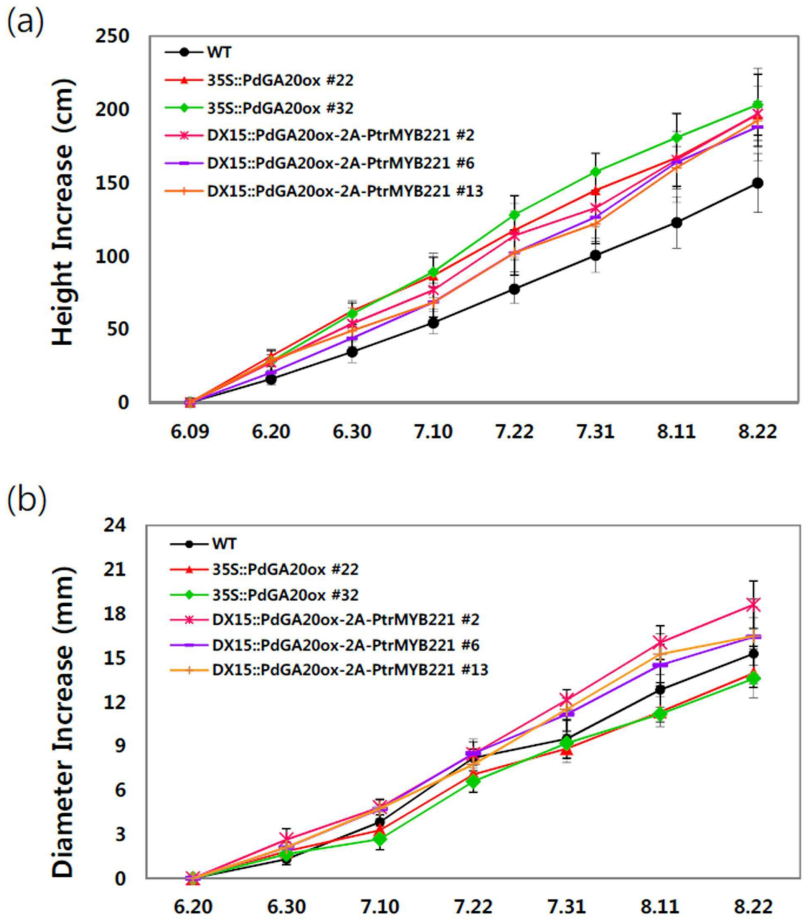
도면26


Root Fresh Weight (%)
300
250
200
150
100
50
0
WT
22
32
35S::PdGA20ox
WT
2
6
13
DX15::PdGA20ox-2A
-PtrMYB221

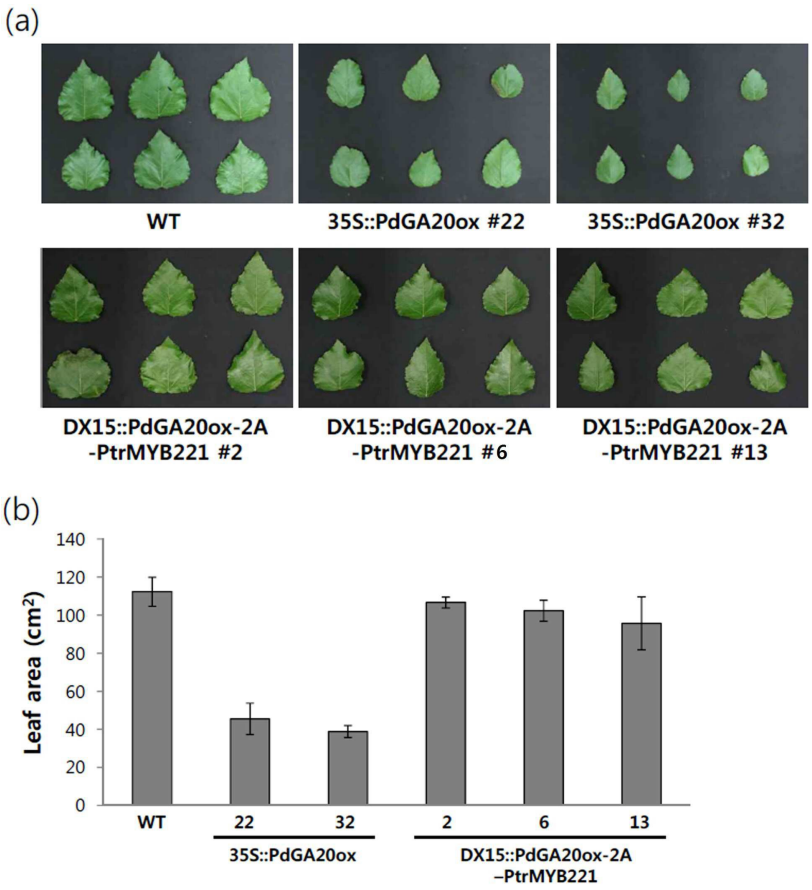
도면27


(a)
Height (cm)
350
300
250
200
150
100
50
0
WT
22
32
2
6
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox-2A
-PtrMYB221
(b)
Diameter (mm)
30
25
20
15
10
5
0
WT
22
32
2
6
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox-2A
-PtrMYB221

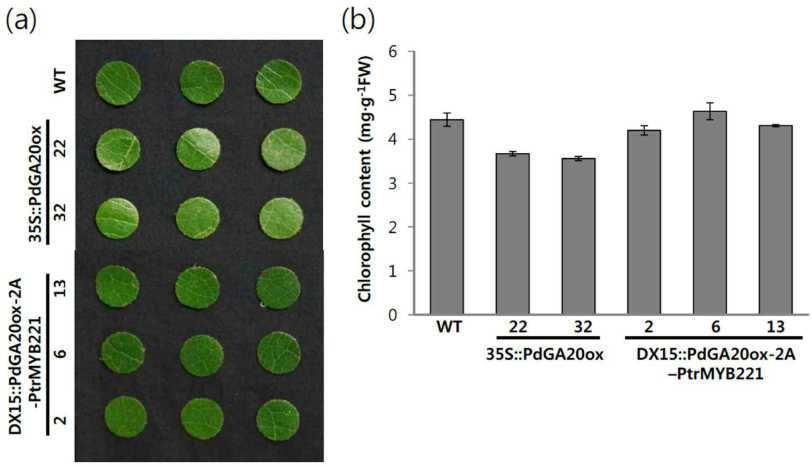
도면28


(a)
Height Increase (cm)
250
200
150
100
50
0
WT
35S::PdGA20ox #22
35S::PdGA20ox #32
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 #2
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 #6
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 #13
6.09
6.20
6.30
7.10
7.22
7.31
8.11
8.22
(b)
Diameter Increase (mm)
24
21
18
15
12
9
6
3
0
WT
35S::PdGA20ox #22
35S::PdGA20ox #32
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 #2
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 #6
DX15::PdGA20ox-2A-PtrMYB221 #13
6.20
6.30
7.10
7.22
7.31
8.11
8.22

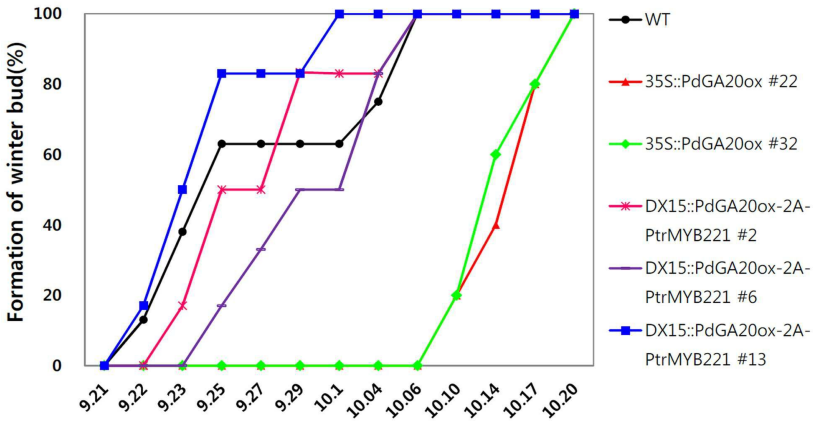
도면29


(a)
WT
35S::PdGA20ox #22
35S::PdGA20ox #32
DX15::PdGA20ox-2A -PtrMYB221 #2
DX15::PdGA20ox-2A -PtrMYB221 #6
DX15::PdGA20ox-2A -PtrMYB221 #13
(b)
Leaf area (cm²)
140
120
100
80
60
40
20
0
WT
22
32
2
6
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox-2A –PtrMYB221

도면30


(a)
WT
35S::PdGA20ox
22
32
DX15::PdGA20ox-2A -PtrMYB221
13
6
2
(b)
Chlorophyll content (mg·g⁻¹FW)
6
5
4
3
2
1
0
WT
22
32
2
6
13
35S::PdGA20ox
DX15::PdGA20ox-2A –PtrMYB221

도면31



서 열 목 록

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

<120> Transgenic plants for increasing biomass production and method for producing the same

<130> KPA140514-KR-P2

<150> KR 10-2014-0108553

<151> 2014-08-20

<160> 19

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1025

<212> DNA

<213> Populus maximowiczii x nigra

<400> 1

ttccccctttt tggttcaatg ccttttattc ttccaaaatt atttcatatt ttgtatccgg 60

aggacatatt tgtttcaaaa ggtgtcagaa aatcaaagcc cattgaaaat atataaacat 120

atatagatat aaaaactcaa gggttcattc caaaatataa gaacaaactg attgaattaa 180

tttgttattt taagaacact gtctatatgt ttatatagtg ggaggtagtg ttttttaaat 240

catatactaa cttattataa aaataaatca taaaaaagga acctcaagca tcccctggta 300

agctcgtatg taggaatact cggagatcaa atgtccgaat gtcaaatgtt aaggcaagtg 360

aaatatccct gacttttag caagcaaatt gttgagtagc taaaatgaat tattttaata 420

tttttaaatc attttaatat attaatatta aaaaaaatta aatatttttt ttaatacatt 480

ttcaataaca aacactttaa aatataatct ttgtcacact cttaaacagt aacagcagaa 540

agcatatgtg agtgatatag ctatagttgc tgtttgacac ggacaatctc catctaaatt 600

catgaataat aaagttttgc ctacacaccc acttgaaatc tcctcctagt tttcctgatt 660

tgccatgcta actacaagaa caagatgcta gctagtatct tgttctgtct ctcgctctct 720

ctctatctct ccagttgata gttgatagtt gatagttgat agctgatacc ctcccacctt 780

tcccagaaag atgattgagg aactagtcac tgtgttcgtg taactaatac tgttcatggc 840

acctaacttg atcctctctt caccagacca ctataaaaac cctatctgtc ctcctcataa 900

tcatatcact acacccaaca cttctgcaag cacaactcca ttcaagaaca tcaagagtat 960

aggccgccgc tgcaacaaaa cagcactcct agctacttca agatgaggcc acaatctttc 1020

atctt 1025

<210> 2

<211> 1107

<212> DNA

<213> Pinus densiflora

<400> 2

atgggtactt cgactgtgag tgggccaaac gtgccagtgt tgttcgatgc tagtattctg 60

caacgagagg agaagatgcc tgaggtattt gtttggcccc aagtggatcg accctccaca 120

gatttggcgt tgaagggaag ggagacagag gtgccattgc cgattatcga tttgggcgga 180

ttctggaaaa atgatgaaaa ggcaaccaaa gaagcgtcag acgttatagg gaaagcctgt 240

gtggaacatg gtttctttca ggtcatcaac catcaagtct ctccagacct cctcactgct 300

gctcatcaac acatcagttt gtttttttagt ttgagtttag tggaaaaacg aagggctcaa 360

aggaagcttg gcgagagctg tggatatgcc agtagtttta cggatcgctt tgcaaataaa 420

ctaccatgga aggagacact gtctttcgag cacagtccct cttcagacgt tcgtgactat 480

tttgtcaaag ctatgggtga agattttcaa gacgctggaa atgtattcaa agagtactgt 540

gaagcaatgg aatgcttggc tcttggattg atggagttgt tgggaatgag cctcggaata 600

gggcgtctgc atcttcggaa atttttttgaa ggtggcaact caataatgag gttgaactat 660

tatcctcctt gtgcgcagcc aaatctgaca cttgggactg gtccccattg cgatccgaca 720

tcccttactc tccttcatct ggacgaagtg ggaggtctgg agattttcat aaataataag 780

tggcattctg tgcgacccaa cactgatgcc ttcgttgtca acatcggaga caccttttatg 840

gcactgtcca atggtaaata caagagctgc ctccacagag cagtggtgaa caagacaaca 900

cctcgcaaat cactggcatt tttcctgaac ccaccatatg acaaaattgt acgacctcca 960

gatgatcttt tggattctga tcatcctcga aaatatccag atttcacgtg gcctgtgttc 1020

ttggagttca ctcagaaaca ctacagatca gacatgaata ctcttgcagc ttttcagaaa 1080

tggttcacct caagaaacca gccataa 1107

<210> 3

<211> 368

<212> PRT

<213> Pinus densiflora

<400> 3

Met Gly Thr Ser Thr Val Ser Gly Pro Asn Val Pro Val Leu Phe Asp
1 5 10 15

Ala Ser Ile Leu Gln Arg Glu Glu Lys Met Pro Glu Val Phe Val Trp
20 25 30

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

Thr Glu Val Pro Leu Pro Ile Ile Asp Leu Gly Gly Phe Trp Lys Asn
50 55 60

Asp Glu Lys Ala Thr Lys Glu Ala Ser Asp Val Ile Gly Lys Ala Cys
65 70 75 80

Val Glu His Gly Phe Phe Gln Val Ile Asn His Gln Val Ser Pro Asp
85 90 95

Leu Leu Thr Ala Ala His Gln His Ile Ser Leu Phe Phe Ser Leu Ser
100 105 110

Leu Val Glu Lys Arg Arg Ala Gln Arg Lys Leu Gly Glu Ser Cys Gly
115 120 125

Tyr Ala Ser Ser Phe Thr Asp Arg Phe Ala Asn Lys Leu Pro Trp Lys
130 135 140

Glu Thr Leu Ser Phe Glu His Ser Pro Ser Ser Asp Val Arg Asp Tyr
145 150 155 160

Phe Val Lys Ala Met Gly Glu Asp Phe Gln Asp Ala Gly Asn Val Phe
165 170 175

Lys Glu Tyr Cys Glu Ala Met Glu Cys Leu Ala Leu Gly Leu Met Glu
180 185 190

Leu Leu Gly Met Ser Leu Gly Ile Gly Arg Leu His Leu Arg Lys Phe
195 200 205

Phe Glu Gly Gly Asn Ser Ile Met Arg Leu Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys
210 215 220

Ala Gln Pro Asn Leu Thr Leu Gly Thr Gly Pro His Cys Asp Pro Thr
225 230 235 240

Ser Leu Thr Leu Leu His Leu Asp Glu Val Gly Gly Leu Glu Ile Phe
245 250 255

Ile Asn Asn Lys Trp His Ser Val Arg Pro Asn Thr Asp Ala Phe Val

260 265 270

Val Asn Ile Gly Asp Thr Phe Met Ala Leu Ser Asn Gly Lys Tyr Lys
275 280 285

Ser Cys Leu His Arg Ala Val Val Asn Lys Thr Thr Pro Arg Lys Ser
290 295 300

Leu Ala Phe Phe Leu Asn Pro Pro Tyr Asp Lys Ile Val Arg Pro Pro
305 310 315 320

Asp Asp Leu Leu Asp Ser Asp His Pro Arg Lys Tyr Pro Asp Phe Thr
325 330 335

Trp Pro Val Phe Leu Glu Phe Thr Gln Lys His Tyr Arg Ser Asp Met

340 345 350

Asn Thr Leu Ala Ala Phe Gln Lys Trp Phe Thr Ser Arg Asn Gln Pro
355 360 365

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DX15 promoter_forward primer

<400> 4

gggaagcttt tgtatccgga ggacatattt gtt 33

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DX15 promoter_reverse primer

<400> 5

tttggtacca gctaggagtg ctgttttgtt gca 33

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PdGA20ox_forward primer

<400> 6

aaaagcaggc tatgggtact tcgactgtga gt 32

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PdGA20ox_reverse primer

<400> 7

agaaagctgg gtttatggct ggtttcttga gg 32

<210> 8

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PdGA20ox_RV-p2A

<400> 8

gacgtcacct gcaagcttaa gaaggtcgaa gttaagaagc tgtggctggt ttcttgaggt 60

gaa 63

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtActin8_forward primer

<400> 9

atgaagatta aggtcgtggc a 21

<210> 10

<211> 20

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtActin8_reverse primer

<400> 10

tccgagtttg aagaggctac 20

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PagActin2_forward primer

<400> 11

gccatctctc atcggaatgg aa 22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PagActin2_reverse primer

<400> 12

agggcagtga tttccttgct ca 22

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A peptide

<400> 13

Gln Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 14

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A peptide

<400> 14

cagcttctta acttcgacct tcttaagctt gcaggtgacg tcgagtcaaa cccaggtcca 60

60

<210> 15

<211> 807

<212> DNA

<213> Populus trichocarpa

<400> 15

atgggaaggt ctccttgctg tgaaaaagct catacaaaca aaggcgcatg gactaaggaa 60

gaagatgatc gccttattgc ttacattaga acccacggtg aaggttgctg gcgttcactt 120

cctaaagctg ctggccttct aagatgcggc aagagctgca gacttcgttg gatcaactat 180

ttaagacctg accttaaacg tggcaatttt actgaagaag aagatgagct cattatcaaa 240

ctccatagtc tcctcggcaa caaatggtca cttatagccg gaaggttacc agggagaaca 300

gataatgaga taaagaatta ttggaacaca catataagaa ggaagctctt gaatagaggc 360

atagatcctg cgactcatag gccactcaat gaaccagccc aagaagcttc aacaacaata 420

tctttcagca ctactacctc agttaaagaa gagtcgttga gttctgttaa agaggaaagt 480

aataaggaga agataattag cgcagctgct tttatatgca aagaagagaa aaccccagtt 540

caagaaaggt gtccagactt gaatcttgaa cttagaatta gccttccttg ccaaaaccag 600

cctgatcgtc accaggcatt caaaactgga ggaagtacaa gtctttgttt tgcttgcagc 660

ttggggctac aaaacagcaa ggactgcagt tgcagtgtca ttgtgggtac tattggaagc 720

agcagtagtg ctggctccaa aactggctat gacttcttag ggatgaaaag tggtgtgttg 780

gattatagag gtttggagat gaaatga 807

<210> 16

<211> 268

<212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<400> 16

Met Gly Arg Ser Pro Cys Cys Glu Lys Ala His Thr Asn Lys Gly Ala

1 5 10 15

Trp Thr Lys Glu Glu Asp Asp Arg Leu Ile Ala Tyr Ile Arg Thr His
20 25 30
Gly Glu Gly Cys Trp Arg Ser Leu Pro Lys Ala Ala Gly Leu Leu Arg
35 40 45

Cys Gly Lys Ser Cys Arg Leu Arg Trp Ile Asn Tyr Leu Arg Pro Asp
50 55 60
Leu Lys Arg Gly Asn Phe Thr Glu Glu Glu Asp Glu Leu Ile Ile Lys
65 70 75 80
Leu His Ser Leu Leu Gly Asn Lys Trp Ser Leu Ile Ala Gly Arg Leu
85 90 95
Pro Gly Arg Thr Asp Asn Glu Ile Lys Asn Tyr Trp Asn Thr His Ile
100 105 110
Arg Arg Lys Leu Leu Asn Arg Gly Ile Asp Pro Ala Thr His Arg Pro
115 120 125
Leu Asn Glu Pro Ala Gln Glu Ala Ser Thr Thr Ile Ser Phe Ser Thr
130 135 140
Thr Thr Ser Val Lys Glu Glu Ser Leu Ser Ser Val Lys Glu Glu Ser
145 150 155 160
Asn Lys Glu Lys Ile Ile Ser Ala Ala Ala Phe Ile Cys Lys Glu Glu
165 170 175
Lys Thr Pro Val Gln Glu Arg Cys Pro Asp Leu Asn Leu Glu Leu Arg
180 185 190

Ile Ser Leu Pro Cys Gln Asn Gln Pro Asp Arg His Gln Ala Phe Lys
195 200 205
Thr Gly Gly Ser Thr Ser Leu Cys Phe Ala Cys Ser Leu Gly Leu Gln
210 215 220
Asn Ser Lys Asp Cys Ser Cys Ser Val Ile Val Gly Thr Ile Gly Ser
225 230 235 240
Ser Ser Ser Ala Gly Ser Lys Thr Gly Tyr Asp Phe Leu Gly Met Lys
245 250 255
Ser Gly Val Leu Asp Tyr Arg Gly Leu Glu Met Lys

260 265

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PtrMYB221_forward primer

<400> 17

aaaaagcagg ctatgggaag gtctccttgc tgt 33

<210> 18

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PtrMYB221_FW-p2A primer

<400> 18

cttcttaagc ttgcaggtga cgtcgagtca aacccaggtc caatgggaag gtctccttgc 60

60

<210> 19

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PtrMYB221_reverse primer

<400> 19

agaaagctgg gttcatttca tctccaaacc tctataa 37