(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월10일
(11) 등록번호 10-2075477
(24) 등록일자 2020년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8261 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0110981
(22) 출원일자 2018년09월17일
심사청구일자 2018년09월17일
(56) 선행기술조사문헌
Genbank Accession number XM_024601064 (2016.03.01.)
Laura Ragni 등. International Journal of Plant Development Biology. Vol. 1, No. 1, 페이지 42-48 (2007.)

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
고재흥
경기도 수원시 영통구 영통로154번길 51-16 306동 702호 (망포동, 센트럴하이츠아파트)
배소영
경기도 수원시 영통구 영통동 1014-11번지 202호
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 최준호

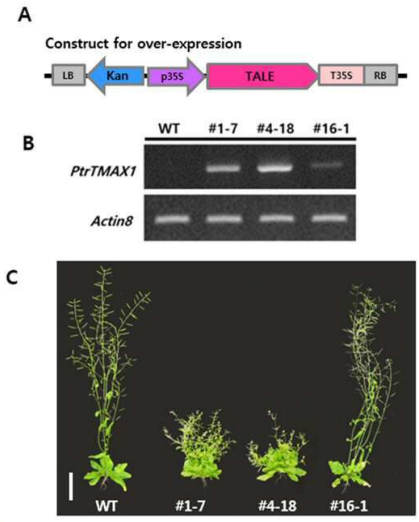
(54) 발명의 명칭 **식물의 측지 발달을 조절하는 유전자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 측지 발달이 촉진된 형질전환 식물 및 이의 제조방법; 및 *PtrTMAX1* 유전자를 포함하는, 식물 측지 발달 촉진용 발현 벡터 및 이를 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 측지 발달을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시킴으로써 식물의 측지 발달을 촉진하여 야생형보다 측지가 발달된 식물의 제조를 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 화훼 및 원예 분야에서 다양한 크기 및 모양을 갖는 기능성 작물 개발 용도로 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 15/67 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 405003604
부처명 산림청
연구관리전문기관 한국임업진흥원
연구사업명 임업기술연구개발
연구과제명 진화-발달학적 유전체 연구를 통한 유용 목부형성 유전자원 개발 연구
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교산학협력단
연구기간 2018.03.26 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

Potri.005G232000 유전자 또는 이에 의해 코딩되는 PtrTMAX1 단백질의 발현이 증가된, 측지 발달이 촉진된 형질전환 식물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 PtrTMAX1 단백질은 서열번호 1로 구성되는 것인, 형질전환 식물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 Potri.005G232000 유전자는 서열번호 2로 구성되는 것인, 형질전환 식물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 발현 증가는 Potri.005G232000 유전자가 도입되어 증가된 것인, 형질전환 식물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 도입되는 Potri.005G232000 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인, 형질전환 식물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 프로모터는 35S 프로모터인 것인, 형질전환 식물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 식물은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 또는 포플러(*Populus trichocarpa*)인 것인, 형질전환 식물.

청구항 9

Potri.005G232000 유전자 또는 이에 의해 코딩되는 PtrTMAX1 단백질의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 측지 발달이 촉진된 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 형질전환 식물을 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 11

Potri.005G232000 유전자를 포함하는, 측지 발달 촉진용 발현 벡터.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 Potri.005G232000 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인, 발현 벡터.

청구항 13

제11항 또는 제12항의 발현벡터를 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는, 측지 발달을 촉진하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 측지 발달이 촉진된 형질전환 식물 및 이의 제조방법; 및 *PtrTMAX1* 유전자를 포함하는, 식물 측지 발달 촉진용 발현 벡터 및 이를 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 측지 발달을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 2013년 조사에 의하면 전세계 화훼산업 분야의 시장 규모는 연간 약 50조원 정도이며, 경제 발전에 따라 꾸준히 성장해 왔다. 화훼산업을 선도하는 네덜란드의 화훼 생산 규모는 연간 약 5조원에 달하여 전세계 화훼산업의 상당 부분을 차지하고 있다. 네덜란드의 수도 암스테르담 부근의 알스미어 화훼 경매장은 세계 최대 규모로서 하루에 세계 꽃 거래량의 80%인 2000만 송이의 꽃과 200만 개의 화분이 거래된다. 또한 네덜란드는 전 세계에서 수입한 꽃들을 개량하여 신품종을 개발하고 높은 로열티를 벌어들이는 것으로도 유명하다.

[0004] 국내 화훼 시장 규모는 1988년 서울 올림픽을 계기로 1990년대 중반까지 연간 약 19~58%씩 급성장하였고, 1997년 IMF로 인하여 잠시 주춤하였으나 그 후에도 꾸준히 성장하여 2008년에는 약 1조 105억원에 이르렀다. 화훼농가의 수도 1980년 불과 2733호로 집계되었던 것이 2012년 기준 9450호로 집계되어 32년만에 약 5배로 증가하였다. 1991년에는 양재동에 2만 1000평 규모의 한국농수산 식품유통공사 aT 화훼공판장이 문을 열었고, 그 외에 서울고속버스터미널 꽃 도매상가, 구파발 화훼 단지, 종묘 상가 등 곳곳에 화훼 단지가 조성되어 있다. 이와 같이 국내 화훼 산업이 외형상 크게 성장하였으나, 기후 변화로 인한 피해, 유가 상승으로 인한 생산 비용 증가, 및 해외에 지불하는 품종에 대한 로열티 증가 등으로 인하여 수익성이 떨어지는 실정이다.

[0005] 따라서 경쟁력이 높은 신품종의 개발이 시급한 상황인데, 이러한 상황에 대한 해법이 될 수 있는 것이 바로 측지 발달의 조절을 통한 신품종 화훼/원예/작물/목본 식물의 개발이다. 예를 들면, 꽃을 만드는 측지 발달을 촉진함으로써 더 많은 꽃을 가진 화훼식물을 개발 가능할 뿐 아니라 열매/종자생산을 증가시킴으로써 생산성을 현저히 증가된 원예/농작물을 개발할 수 있다. 또한 측지 발달 변형을 목본식물에 활용함으로써 다양한 형태를 가진 정원수 개발, 특히 교목의 관목화가 가능하다. 나아가 측지가 다량 형성됨으로써 바이오매스가 증가된 바이오에너지 원료목 생산도 가능하다.

[0006] 현재까지는 식물의 측지 발생을 촉진하기 위해 주로 적심(순자르기)을 통해 줄기의 정단생장점을 제거하거나 왜화제를 이용하는 방법이 이용되어 왔다. 이 중 왜화제를 이용하는 방법이 가장 용이하여 여러 작물에 적용되고 있다. 한국등록특허 제10-0126545호에서는 불소치환 아브시스산 유도체를 포함하는 왜화제를 개발하였으나, 이는 화학물질로 환경오염이 야기될 수 있다는 단점이 있다. 따라서 환경오염이나 생리장해의 위험이 없는 식물측지 발달 및 형태형성 변화 방법의 개발이 필요하다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 포플러 나무에서 측지 발달을 조절하는 전사조절인자인 TMAX1를 발견하였고, 상기 유전자 및 이의 상동 유전자를 과발현시킴으로서 식물체의 측지 발달을 촉진된 식물을 제조할 수 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 측지 발달이 촉진된 형질전환 식물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 측지 발달이 촉진된 형질전환 식물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 *PtrTMAX1* 유전자를 포함하는, 측지 발달 촉진용 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 측지 발달 촉진용 발현벡터를 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는, 측지 발달을 촉진하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 측지 발달이 촉진된 형질전환 식물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 용어 "PtrTMAX1"란, 포플러의 TALE (Three-Amino-acid-Loop-Extension) 전사조절인자 패밀리 중 하나인 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 의미하며, 본 발명에서는 상기 유전자의 발현을 증가시킨 형질전환 식물의 경우, 야생형 식물과 비교하여 측지 발달이 촉진되는 특성을 발견하였는 바, 상기 유전자를 *PtrTMAX1*(TOO MANY AXILLARY SHOOTS1)로 명명하였다. 또한, 상기 PtrTMAX1 단백질을 코딩하는 유전자는 *Potri.005G232000* 유전자이며, 본 발명에서 *PtrTMAX1*는 *Potri.005G232000*와 혼용된다.

[0018] 본 발명에서 PtrTMAX1의 구체적인 단백질의 아미노산 서열 또는 염기서열 정보는 NCBI에 공지되어 있다. 구체적으로 PtrTMAX1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 PtrTMAX1 단백질은 상기 서열번호 1과 적어도 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 이러한 상동성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 발명의 PtrTMAX1 단백질로 사용될 수 있음은 자명하다.

[0019] 또한, 코돈 축퇴성 (codon degeneracy)에 의해 상기 서열번호 1로 구성된 아미노산 서열을 가지는 단백질 또는 이와 상동성을 가지는 단백질로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다. 또는 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보서열과 엄격한 조건 하에 하이드리드화하여, 서열번호 1로 구성된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 동일/유사한 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0020] 상기 "상동성"은 두 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 모이어티(moiety) 사이의 동일성의 퍼센트를 말한다. 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 동일하거나 유사한 활성을 가지는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 하나의 모이어티로부터 다른 하나의 모이어티까지의 서열 간 상동성은 알려진 당해 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0을 이용하거나, 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et

al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley& Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있다.

[0021] 또한, *PtrTMAX1* 유전자는 서열번호 2의 염기서열 또는 서열번호 2와 적어도 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0022] 또한, 본 발명의 측지 발달이 촉진된 형질전환 식물은 PtrTMAX1 단백질의 상동단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어 "상동단백질"이란 같은 단백질에서 파생된 여러 단백질들을 의미하는 것으로서, 아미노산 배열의 유사성과 3차원 구조의 유사성을 통해 상동 단백질인지 알 수 있다. 본 발명의 목적상 55% 이상의 동일성, 또는 75% 이상의 유사성을 갖는 단백질은 상기 상동 단백질의 범주에 속할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 상기 상동 단백질은 애기 장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 상동 단백질은 AT1G75430일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 *AtTMAX1*은 서열번호 3의 아미노산 서열로 표현되는 것일 수 있고, 또는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자로부터 코딩되는 것일 수 있으나, 식물 측지 발달을 유도할 수 있는 활성을 갖는다면 특정 서열에 제한되지 않고 본 발명의 상동 단백질 범주에 속할 수 있다.본 발명에서는 구체적으로 PtrTMAX1의 상동 단백질로서, 애기장대에서 유래한 *AtTMAX1* 유전자(AT1G75430)를 과발현시킨 형질전환 식물에서도, 측지 발달이 촉진된 동일한 표현형이 확인되었다(실험예 5). 이를 통해, PtrTMAX1 및 이의 상동 단백질이 식물의 측지 발달을 유도할 수 있음을 확인하였다. 본 발명의 AtTMAX1는 PtrTMAX1의 단백질 아미노산 서열과 비교시, 58%의 동일성(identity), 76%의 유사성(similarity)을 가지는 것을 확인하였으며, 해당 상동성 범위를 갖는 상동 단백질은 본 발명의 범주에 속할 수 있다.

[0026] 본 발명의 용어 "발현 증가"란, PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 도입되어 발현되거나, 식물체가 가진 내재적 발현 또는 변형 전 발현에 비하여 발현이 증가된 것을 의미한다. 상기 단백질의 "도입"은, 식물체가 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성이 자연적 혹은 인위적으로 나타나게 되는 것을 의미한다. 예를 들어, 상기 발현 증가는 외래의 PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 도입하여 발현을 증가시키는 것; 또는 내재적 PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 것을 모두 포함할 수 있다. 구체적으로, 본원에서 발현 증가 방법으로는,

[0027] 1) 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가,

[0028] 2) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형,

[0029] 3) 상기 단백질의 발현이 증가되도록 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형, 또는

[0030] 4) 이의 조합에 의해 발현이 증가되도록 변형하는 방법 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 상기 1) 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 대상 식물체의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 또한 카피수 증가의 한 양태로, 단백질의 활성을 나타낼 수 있는 폴리뉴클레오티드를 대상 식물체 내로 도입하여 수행될 수 있다. 상기 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 대상 식물체 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 단백질의 발현이 증가될 수 있다.

[0032] 다음으로, 2) 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 하는 발현조절 서열의 변형시킬 수 있다. 상기 발현조절 서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.

[0033] 구체적으로, 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 이종 프로모터가 연결될 수 있다. 본 발명에서는 상기 프로모터로서 35S 프로모터를 사용할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 아울러, 3) 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.

[0035] 마지막으로, 4) 상기 1) 내지 3)의 조합에 의해 발현이 증가되도록 변형하는 방법은, 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가, 이의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형, 염색체 상의 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 중 하나 이상의 방법을 함께 적용하여 수행될 수 있다.

[0036] 상기 폴리뉴클레오티드는 기능을 할 수 있는 폴리뉴클레오티드 집합체인 경우 유전자로 기재될 수 있다. 본원에서 폴리뉴클레오티드와 유전자는 혼용될 수 있으며, 폴리뉴클레오티드 서열과 뉴클레오티드 서열은 혼용될 수 있다.

[0037] 본 발명은 *PtrTMAX1* 유전자를 도입하여 PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시킴으로써 식물 생장이 억제된 형질전환 식물을 제조하였다. 또한 상기 *PtrTMAX1* 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 상태로 도입될 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 상기 "프로모터"란, 전사조절인자들이 결합 할 수 있는 DNA 염기서열을 의미하는데, 상기 프로모터는 전사조절인자를 매개로 하여 RNA 중합효소와 결합함으로써, 그의 하류에 위치한 개방 해독틀(ORF)의 전사를 유도할 수 있다. 구체적으로 35S 프로모터를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 또한, 본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 용어, "측지 발달 촉진"은 야생형(표준형)에 비해 식물의 측지 발달이 촉진된 것을 의미한다. 따라서, 측지 발달이 촉진된 식물은 식물체의 꽃대가 증가하고, 길이 생장이 억제된 표현형을 나타낼 수 있고, 구체적으로 본 발명에서는 측지 발달이 촉진된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 용어 "형질전환"이란, DNA를 숙주에 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 구체적으로 본 발명에서는 상기에서 서술한 *PtrTMAX1* 유전자를 숙주에 도입하는 것을 의미 할 수 있다.

[0043] 본 발명의 용어 "형질전환 식물"이란, 숙주로서 식물을 사용하여 상기 형질전환으로 인해 생성된 식물을 의미한다.

[0044] 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 핵산분자 전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘 침전, 염화칼슘 침전, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반, 아그로박테리아로 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나, 이로 제한되지 않으며, 아그로박테리아로 매개된 형질전환법이 바람직하다.

[0045] 본 발명의 목적상, 상기 형질전환 식물은 측지 발달이 촉진될 수 있어, *PtrTMAX1* 유전자의 과발현에 의하여 측지 발달이 촉진된 표현형을 가질 수 있는 한, 초본 및 목본 식물 모두가 제한 없이 포함할 수 있다.

[0046] 일 예로서, 초본 식물로는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 오리자 사티바(*Oryza sativa*; 벼), 제아 메이즈(*Zea mays*; 옥수수), 미스칸투스(*Miscanthus*)종 또는 페니세툼 풀푸레움(*Pennisetum purpureum*) 등을 포함할 수 있고, 목본 식물로는 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. grandisXurophylla, 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. albaXP. grandidentata, P. albaXP. tremula, P. albaXP. tremulavar. glandulosa, P. albaXP. tremuloides, P. balsamifera, P. balsamiferasubsp. trichocarpa, P. balsamifera subsp. trichocarpaXP. deltoides, P. ciliata, P. deltoides, P. euphratica, P. euramericana, P. kitakamiensis, P. lasiocarpa, P. laurifolia, P. maximowiczii, P. maximowicziiXP. balsamferasubsp. trichocarpa, P. nigra, P. sieboldiiXP. grandideiztata, P. suaveolens, P. szechuanica, P. tomentosa, P. tremula, P. tremulaXP. 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(*Abiesamabilis*); balsam fir(*Abies balsamea*)) 및 삼나무(예를 들면 Western redcedar(*Thuja plicata*), Alaska yellow-cedar(*Chamecyparis nootkatensis*)) 등을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0047] 다른 예로서, 상기 초본 식물로는 애기장대가 될 수 있고, 목본 식물로는 포플러가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명의 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 발명에서 상기 애기장대는 초본 식물의 대표 식물로서 사용될 수 있으며, 구체적으로 *Arabidopsis thaliana, ecotype Columbia*(Col-0) 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0049] 본 발명의 용어 "포플러(*Populus trichocarpa*)"란, 쌍떡잎식물 버드나무목 버드나무과 사시나무속에 속하는 식물의 총칭이다. 본 발명에서 상기 포플러는 목본 식물의 대표식물로서 사용될 수 있으며, *Poplus alba x P. tremula var. glandulosa,* clone BH 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 식물에서 PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 측지 발달이 촉진된 형질전환 식물의 제조방법을 제공한다. 상기 제조방법에 사용되는 프로모터, *PtrTMAX1* 유전자, 측지 발달 촉진, 형질전환 식물 등은 전술한 바와 같고, 상기 방법에 의해 본 발명의 형질전환 식물을 제조할 수 있다.

[0052] 또한, 상기 제조방법에 의하여 제조된 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.

[0053] 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.

[0054] 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.

[0055] 탄소원으로는 글루코스, 프럭토스, 만노스, 리보오스, 자일로스, 수크로스, 멜리비오스, 셀로비오스, 락토오스, 아밀로스, 탄수화물, 라피노스, 소르비톨, 만니톨, 글리세롤 등이 첨가될 수 있다.

[0057] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 *PtrTMAX1* 유전자를 포함하는, 측지 발달 촉진용 발현 벡터를 제공한다. 상기 PtrTMAX1, 식물 측지 발달 촉진 등은 전술한 바와 같다.

[0058] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 의미한다. 상기 발현벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 컨스트럭트가 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 본 발명에서는 35S 프로모터와 작동가능하게 연결된 서열번호 2

의 *PtrTMAX1* 유전자를 pK2GW7 벡터에 도입하여 제작된 발현벡터를 이용하여 측지 발달이 촉진되는 형질전환 식물을 제작하였다. 또한 본 발명에서 상기 *PtrTMAX1* 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 상태로 벡터에 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 측지 발달 촉진용 발현 벡터를 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는, 측지 발달을 촉진하는 방법을 제공한다.

[0061] 구체적으로, 본 발명의 식물체의 측지 발달을 촉진하는 방법은 상기 발현벡터를 측지 발달이 촉진될 수 있는 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함한다. 이때. 상기 방법에 사용되는 프로모터, *PtrTMAX1* 유전자, 측지 발달 촉진 등은 상술한 바와 동일하고, 상기 방법에 의해 측지 발달을 촉진할 수 있는 임의의 식물체에서 측지 발달을 촉진시킬 수 있다.

발명의 효과

[0063] 본 발명은 PtrTMAX1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시킴으로써 식물의 측지 발달을 촉진하여 야생형보다 측지가 발달된 식물의 제조를 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 화훼 및 원예 분야에서 다양한 크기 및 모양을 갖는 기능성 작물 개발 용도로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1의 A는 PtrTMAX1이 클로닝된 pK2GW7 벡터의 모식도를 나타낸 것이고, B 및 C는 3세대 상동접합형 35S::*PtrTMAX1* 애기장대 형질전환체의 1-7, 4-18, 16-1 계통 및 대조구(WT)에서의 *PtrTMAX1* 유전자의 발현량 및 표현형을 비교한 것이다.

도 2의 A는 측지 및 로제트 잎 수를 나타낸 그래프이고, B는 측지가 발달된 부분을 나타낸 것이고(빨간 화살표가 측지 발생 부위를 나타냄), C는 측지, 2차 가지 및 3차 가지의 수를 나타낸 그래프이다.

도 3의 A는 주요 줄기의 표현형을 나타낸 도면이고, B는 주요 줄기 및 뿌리의 횡단면을 나타낸 도면이다.

도 4는 A 및 B는 WUS의 발현량을 정량적 RT-PCR 및 RNA-서열분석으로 나타낸 도면이고, C는 transient activation assay 분석 결과를 나타낸 도면이며, D는 GUS 염색 결과를 나타낸 도면이다.

도 5의 A는 효모단백질 잡종 어세이를 통해 단백질 상호 작용을 분석한 도면이고, B는 transient activation assay 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 6의 A는 포플러의 다양한 조직에서의 *PtrTMAX1* 발현 부위를 나타낸 도면이고, B는 ProTMAX1::GUS 형질전환 애기장대에서 어린 생장시기별 *PtrTMAX1* 유전자의 발현을 분석한 도면이고, C는 성숙한 ProPtrTMAX1::GUS 형질전환 애기장대에서의 *PtrTMAX1* 유전자의 발현을 분석한 도면이며, D는 ProPtrTMAX1::GUS 형질전환 포플러에서의 *PtrTMAX1* 유전자의 발현을 분석한 도면이다.

도 7은 A 및 B는 3세대 상동접합형 35S::AtTMAX1 애기장대 형질전환체 3-10, 4-11, 9-4, 11-2 계통 및 대조구(WT)에서 *AtTMAX1* 유전자의 발현량 및 식물체의 표현형을 나타낸 도면이고, C, D 및 E는 상기 식물체들의 측지 수, 가지 수 및 WUS 발현량을 나타낸 도면이다.

도 8은 A는 35S::PtrTMAX1 포플러 나무 형질전환체 11, 27 계통 및 대조구(BH)에서의 *PtrTMAX1* 유전자의 발현량 및 식물체 표현형을 나타낸 도면이고, B는 상기 식물체들의 측지 발생 부위를 확대하여 나타낸 도면이고, C는 상기 식물체들의 크기 및 측지 수를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0068] **실시예 1: 식물 재료 및 성장 조건**

[0070] 본 발명에서는 야생형 또는 형질전환체로서 애기장대(*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia(Col-0))를 사용하였다. 상기 애기장대는 포트 당 5 내지 7개씩 토양에서 재배했고, 23±2℃ 및 14시간의 빛(조도, 150 μmol*m^{-2}*sec^{-1}) 조건의 생장실 또는 1%(w/v) 수크로스 및 스크리닝을 위한 적절한 항생제를 함유한 0.8%(w/v) 한천을 포함하는 half-strength MS 배지(Murashige and Skoog, Sigma)에서 재배했다. 본 발명의 실시예에서는 하이브

리드 포플라(*Poplus alba* x *P. tremula var. glandulosa*, clone BH)를 야생형 포플라로 사용했다. 식물은 토양에 순응시키고, 통제된 조건의 생장실에서 재배했다.

[0072] **실시예 2: 게놈 DNA 추출 및 DNA 시퀀싱**

[0074] 게놈 DNA는 3주된 애기장대의 잎으로부터 Edward 버퍼(200mM Tris pH 7.5, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS)를 이용하여 추출하였다. 추출된 게놈 DNA 1㎕를 PCR (10㎕ 반응)을 위한 주형으로 사용 하였고, pK2GW7 벡터 특이적 프라이머와 함께 PCR을 수행하였다. 상기 PCR 반응으로부터 제조된 PCR 산물은 1% 아가로스 겔에 전기영동시키고, 젤 추출 키트 (GeneAll ExpinTM Gel SV, Seoul, Korea)를 이용하여 추출한 후 시퀀싱하였다 (Macrogen http://dna. macrogen.com/kor/). 포플라 게놈 DNA는 포플라가 순응 1주 후에 잎으로부터 DNA 추출 버퍼를 이용하여 직접 추출했다.

[0076] **실시예 3: 벡터 제작 및 형질전환 식물의 제조**

[0078] *PtrTMAX1*(potri.005G232000.1)를 암호화하는 전장 게놈 DNA는 포플라에서 PCR을 이용하여 증폭하였고, 이를 Gateway 클로닝 시스템을 이용하여 pK2GW7 벡터의 35S 프로모터 다운스트림에 삽입하여 35S::*PtrTMAX1* 컨스트럭트를 제작하였다. 벡터 내의 상기 컨스트럭트는 *Agrobacterium tumefaciens* strain C58에 도입했고, 이는 floral-dip 방법을 이용하여 애기장대를 형질전환시키고, leaf disk transformation-regeneration 방법에 의해 포플라를 형질전환시켰다. 포플라 잎으로부터 유도된 형질전환된 캘러스는 1.0mg/L 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2, 4-D), 0.1mg/L 벤질 아미노푸린, 0.01mg/L 1-나프틸 아세트산(naphthylacetic acid: NAA), 500 mg/L 세포탁심, 및 50 mg/L 카나마이신을 함유하는 MS 배지에서 선별하였다. 1.0 mg/L 제아틴, 0.1 mg/L 벤질 아데닌, 및 0.01 mg/L NAA을 함유하는 목본 배지에서 배양된 캘러스로부터 싹이 발생되었다. 상기 모든 배양은 25±2℃ 및 16시간의 빛 (조도, 150 $\mu mol*m^{-2}*sec^{-1}$) 조건에서 수행되었다.

[0080] **실시예 4: 횡단면(Cross section) 제작**

[0082] 80일된 애기장대의 줄기 및 뿌리를 약 1주일 동안 FAA(포름알데히드-아세트산-에탄올) 고정액에 담가둔 후 횡단면을 만들었다. 그 후, 모든 측지 싹 및 로제트 잎을 제거한 후, 주된 줄기 및 뿌리를 분리하였다. 그 다음, 줄기 및 뿌리 사이의 대략 5mm의 중간 영역을 제외하였다. 도수절편은 줄기의 가장 아래 부분과 뿌리의 가장 윗부분에서 수행했다.

[0084] **실시예 5: RNA 추출 및 반-정량적 RT-PCT, 정량적 RT-PCR**

[0086] 애기장대 잎의 전체 RNA는 TRIZOL 시약(Ambion, CA, USA)을 이용하여 약간 변형된 방법에 따라 추출하였다. 포플라 잎의 전체 RNA 추출은 RNAPrep Pure Tissue Purification kit (TIANGEN biotech Co., Beijing, China)을 이용하여 수행하였다. 20㎕ 반응에서 Superscript II 역전사 효소 (Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 0.5 또는 1㎍의 total RNA를 역전사시켰다. RT-PCR은 cDNA 생성물을 2배 희석한 후, 1㎕로 수행하였다. 증폭된 DNA 단편은 1% 아가로스 젤을 이용하여 분리하였다. 정량적 실시간 PCT(qRT-PCR)은 CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 및 iQ™ SYBR® Supermix (Bio-Rad)을 이용하여 수행하였다. 포플라 *ACTIN2* 유전자를 대조군으로 사용하였고, $2^{-\Delta\Delta}$ Ct 방법(Pfaffl2001)을 이용하여 상대적 발현 수준을 계산하였다. 실시예에서 사용한 모든 프라이머는 Primer3 software (http://fokker.wi.mit.edu)를 이용하여 설계하였다.

[0088] **실시예 6: 일시적 활성화 어세이(Transient activation assay)**

[0090] 애기장대 잎의 원형질체의 준비, 리포터 및 이펙터 컨스트럭트의 일시적 트랜스펙션은 [*Plant J*. 60, 649-665]에 기술된 방법으로 수행하였다. 이펙터 컨스트럭트를 제조하기 위해, pTrGUS 벡터에서 GUS를 제거한 후 *PtrTMAX1*의 전장 cDNA를 CaMV 35S 프로모터 및 노파린 합성효소 터미네이터 사이에 연결시켰다. 리포터 컨스트럭트는 pTrGUS 벡터로부터 35S 프로모터를 제거한 후, GUS 리포터 유전자 앞에 프로모터 단편(AtWUSpro)을 배치하여 제작하였다. 플라스미드 DNA는 Plasmid Plus Maxi kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 이용하여 준비하였고, 트랜스펙션을 위해 5㎍의 리포터 플라스미드 및 5㎍의 이펙터 플라스미드를 사용하였다. GUS 활성 표준화를 위한 내부 대조군으로 사용하기 위해, 1㎍의 PtrNAN 플라스미드를 첨가하였다. 그 다음, 11㎕ 플라스미드 혼합물(15㎍) 및 원형질체 100㎕를 [*Nat Protoc.*, 2, 1565-1572]에 개시된 방법에 따라 2ml microcentrifuge 튜브로 옮겼다.

[0091] β-글루쿠로니다아제(β-Glucuronidase) 및 NAN 효소 어세이는 [*Plant J*, 32, 391-400]에 개시된 방법에 따라

수행하였다. NAN 및 GUS 활성은 각각 MUN (Sigma-Aldrich Co.) 및 MUG(Sigma-Aldrich Co.)을 기질로 사용하여 Hoefer TK 100 형광계(여기 파장: 355 nm, 방출 파장: 460)에서 MU 표준에 대해 측정하였다. GUS 및 NAN 활성의 비율은 상대적인 GUS/NAN 단위로 계산하였다. 상기 실험들은 3반복 실험으로 수행하였다.

[0093] **실시예 7: 효모단백질 잡종 어세이(Yeast two hybrid)**

[0095] *PtrTMAX1*-OX 애기장대 형질전환체의 cDNA로부터 *PtrTMAX1* cDNA를 증폭하였고, PCR 정제 방법을 이용하여 정제하였다. 상기 *PtrTMAX1* cDNA 주형은 UAS 결합 도메인에 올바른 C-말단 융합을 위해 N-말단에 추가적인 2개의 핵산을 갖도록 만들기 위한 특이적인 프라이머에 의해 제조되었다. 또한, 호메오도메인 및 unanimous 활성화 부위가 없는 C 말단이 제거된 *PtrTMAX1* cDNA 주형인, *PtrTMAX1*-△C을 제조하였다. *STM*은 애기장대 야생형 및 포플러 clone BH의 cDNA로부터 클로닝되고 C-말단 융합을 위한 특이적 프라이머로 증폭하였다. 상기의 모든 주형은 Gateway 클로닝 방법에 의해 pGBKT7 또는 pGADT7로 삽입하였다. 상기 각각의 벡터는 전기 천공법을 이용하여 효모 균주 AH109에 형질전환 되었다. 미끼(bait) 및 먹이(prey)를 갖는 효모는 10 mM 3-아미노-1,2,4'-트리아졸(3-AT)를 함유하는 선택 배지에서 선별하였다.

[0097] **실시예 8: GUS 염색**

[0099] 조직은 염색 전에 4℃에서 30분 동안 90% 아세톤에 보관하였다. 그 다음, 상기 조직을 50 mM 인산 나트륨으로 한번 헹구고, 5 mM 페리시안화 칼륨(potassium ferricyanide)을 함유한 GUS 염색 용액에 담갔다. 다음으로, 상기 샘플은 30분 이상 진공으로 보관하고, 37℃에서 12시간 내지 24시간 동안 인큐베이션하였다. 관찰 전에, 상기 샘플을 24시간 이산 70% 에탄올에 담궈서 녹색을 제거하였다.

[0101] **실시예 9: RNA 시퀀싱 분석**

[0103] RNA는 10일 간격으로 토양에 파종한 후, 30일부터 50일까지의 경정분열조직(shoot apical meristem: SAM)을 포함하는 야생형 및 PtrTALE12-OX의 로제트 잎 측면 조직으로부터 TRIZOL 방법으로 추출하였다. 각 샘플은 Macrogen에서 시퀀싱하였다. 시퀀싱 결과, 원시 fastq 파일을 수득하였고, 이를 20 품질 점수 이하 기준으로 데이터를 나눴다. 상기 정리된 데이터를 Trinity를 이용한 de novo 시퀀싱으로 분석하였다. 마지막으로, 유의 발현 유전자(differentially expressed genes) 결과는 추가적인 배수 변화 계산에 이용했다.

[0105] **실험예 1: *PtrTMAX1* 유전자(Potri.005G232000)의 과발현에 의한 측지 형성이 증가된 표현형 유도 확인**

[0107] *PtrTMAX1* 유전자(Potri.005G232000)가 식물체의 측지 형성을 유도하는지 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0108] 구체적으로, 포플러(*Populus trichocarpa*)로부터 클로닝한 *PtrTMAX1*을 카나마이신 내성 영역을 갖는 pK2GW7 벡터에 삽입하여 PtrTMAX1 컨스트럭트를 제작하였다(도 1A). 상기 컨스트럭트를 이용하여 유도한 *PtrTMAX1* 과발현 상태를 *PtrTMAX1*-OX 또는 35S::*PtrTMAX1*라고 명명했다. 이를 이용하여 16개 계통의 T1 세대를 제작하였고, 이 중 난장이 특성을 가지면서 많은 측지가 있는 3개의 계통(#1, #4, #15)을 발견했다. 이들 중 #15의 동형접합체는 종자를 만들 수 없었으므로, 야생형과 유사한 정도의 약한 측지 형성 표현형을 나타내는 #16을 선택했다. 결국, *PtrTMAX1*-OX, #1-7, #4-18 및 #16-1의 3개의 T3 동형접합체 계통을 수득하였다.

[0109] 다음으로, 상기 3개 계통의 RT-PCR 결과를 확인한 결과, 측지 형성 표현형과 *PtrTMAX1* 발현량 수준이 일치하였다(도 1B). 구체적으로, #4-18에서 *PtrTMAX1* 발현량이 가장 강하게 나타났고, 그 다음으로 #1-7의 *PtrTMAX1* 발현량이 강하게 나타났으며, #16-1이 가장 약한 *PtrTMAX1* 발현량을 나타냈으며, 측지 형성 표현형 또한 상기 RT-PCR 결과의 경향성과 일치하였다(도 1C). 또한, 상기 2개의 강한 표현형을 갖는 계통인 #1-7 및 #4-18은 덤불 같고 난쟁이 표현형을 보였다. 상기 3개 계통을 더 자세히 관찰하면, 야생형의 경우 60일이 되었을 때 3개의 측지만이 있었지만, 상기 2개의 강한 표현형을 갖는 계통은 8개 내지 12개의 측지가 형성되었다. 로제트 잎 또한 측지 수와 유사한 경향성을 보이는 것을 알 수 있다(도 2A 및 B). 또한, 가지가 발생하는 영역을 측지, 2차 분지 및 3차 분지로 세분화하여 가지의 수를 계수하였을 때, *PtrTMAX1*-OX에서 발생하는 전체적인 가지 수는 야생형보다 많았지만, 야생형 및 *PtrTMAX1*-OX에서 상기 3영역의 가지는 동일한 패턴으로 발생하는 것을 확인할 수 있었다(도 2C). 따라서, 이를 토대로 이것은 *PtrTMAX1*-OX의 독특한 덤불 형태의 표현형의 주요 요인은 측지의 수라는 것을 알 수 있다.

[0110] 또한, *PtrTMAX1*-OX의 또 다른 특징으로서 2~3센티미터 이상 자랄 수 없는 매우 짧은 주요 줄기(main stem)를 나타내며, 이는 많은 측지를 발생하게 하는 하나의 원인일 수 있다(도 3A). 따라서, 짧은 주요 줄기에서 해부학적 차이가 있는 지 확인하기 위해 횡단면을 관찰하였다. 그 결과, # 1-7 및 # 4-18의 주요 줄기는 목질 섬유 세포

의 양이 감소된 것을 확인하였다(도 3B). 이는 *PtrTMAX1*-OX는 긴 길이를 지탱할 필요가 없어 목질 섬유 세포의 수가 감소된 것으로 보인다.

[0112] **실험예 2: *PtrTMAX1* 유전자(Potri.005G232000)의 과발현에 의한 *WUSCHEL* 과발현 유도 확인**

[0114] 일반적으로, *WUSCHEL*(*WUS*)은 로제트 지역의 측지 발달에 필요하다고 알려져 있는 바, 상기 3개의 동형접합체 계통에서의 *WUS*의 발현 수준을 확인하기 위해, 정량적 PCR 및 RNA 시퀀싱을 수행하였다.

[0115] 그 결과, 상기 3개의 동형접합체 계통에서 *WUS*의 발현 수준은 35S::*PtrTMAX1* 애기장대 형질전환체의 표현형에 비례적으로 증가함을 확인하였다(도 4A 및 B).

[0117] 또한, Transient Activation Assay를 이용하여 in vitro에서의 *WUS* 발현 수준을 확인하였다. 구체적으로, *PtrTMAX1*는 이펙터로서 pTrOX 벡터에 삽입하고, 애기장대 *WUSCHEL*(*AtWUS*) 프로모터는 리포터로서 pTrGUS 벡터에서 삽입되었다. 상기 2개의 벡터 모두 야생형 로제트 입으로부터 추출한 원형질체에 형질전환시키고, 25℃에서 밤새 배양하였다.

[0118] 상기 실험 결과, *PtrTMAX1* 및 *AtWUS* 프로모터의 GUS 신호는 6시간째에 명확하게 나타났음을 확인하였는 바(도 4C), 이를 토대로 매우 이른 시기부터 *TMAX1*이 *WUS*의 전사과정을 양성적으로 조절함을 알 수 있다.

[0120] 또한, *PtrTMAX1*의 과발현에 의한 *WUS*의 상향조절을 생체 내에서 GUS 염색으로 확인하였다. proWUS::GUS 및 proWUS::GUS X *PtrTMAX1*-OX의 F1를 비교한 결과, 교배된 F1 모종에서 증가된 청색신호가 나타났다(도 4D). 상기 신호는 오직 *WUS*가 발현된 조직에서만 나타났기 때문에, 이를 토대로 *WUS*는 PtrTALE12의 직접적인 표적이 아님을 의미한다.

[0122] **실험예 3: *PtrTMAX1*와 *STM*의 상호작용 및 *WUS*와의 연관성 확인**

[0124] 효모단백질잡종 어세이(yeast two hybrid assay)를 이용하여, 포플러 TALE 패밀리의 KNOX 군의 유전자와 상호작용하는 것으로 알려진 BELL-like 군에 속하는 *PtrTMAX1*의 상호작용 파트너를 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0125] 먼저, *STM*은 측지 분열조직 형성을 시작하는 핵심 요소로서의 기능을 한다고 알려져 있는 바, 먼저 *PtrTMAX1*가 *STM*과 상호작용하는지 확인하였다. 구체적으로, Gateway 클로닝에 의해, *PtrTMAX1*를 pGBKT7 벡터에 클로닝하고, 애기장대에서 유래된 *STM*(*AtSTM*) 및 포플러, BH로부터 유래된 STM(*PagSTM*)를 둘 다 pGADT7 벡터에 클로닝하였다. 또한, TALE 패밀리의 BELL 군의 C-말단은 자기-활성화 도메인을 갖는 것으로 알려져 있는 바, 미끼(Bait)로서 C-말단이 제거된 *PtrTMAX1* 컨스트럭트를 제작하였다. 먹이(Prey)가 없다면, *PtrTMAX1* 전장 단백질은 효모가 선택배지에서 생존할 수 있게 하므로, 이는 *PtrTMAX1*의 자기-활성화를 설명할 수 있다. 그러나, *PtrTMAX1*_△C만을 갖는 효모는 먹이(Prey) 없이 선택배지에서 생존할 수 없었다. 다만, *STM*/pGBKT7를 첨가한 후에는, 상기 효모는 단백질 수준에서 STM과 상호작용한 PtrTMAX1를 나타내면서 생존할 수 있었다(도 5A). *AtKNAT3*는 내부 대조군으로 사용하였다.

[0127] 다음으로, STM과의 상호 작용이 PtrTMAX1에 의한 *WUSCHEL*의 상향 조절에 영향을 미치는지 확인하기 위해, 이펙터로서 *AtSTM*/pTrOX를 첨가한 Transient Activation Assay를 수행하였다. 그 결과, *AtSTM*를 첨가하는 것은 PtrTMAX1만이 이펙터인 경우와 비교하여 GUS 발현을 향상시키지 않았다(도 5B). 따라서, STM과의 상호 작용은 PtrTMAX1에 의한 *WUS*의 과발현과 관련이 없으며, 이는 전사인자의 핵 내 위치 또는 다른 기능과 관련이 있을 수 있음을 알 수 있다.

[0129] **실험예 4: 포플러에서 *PtrTMAX1* 유전자의 발현 위치 확인**

[0131] 포플러에서 *PtrTMAX1* 유전자가 어떤 조직에서 발현하는 지 확인하기 위해 여러 조직의 RNA-시퀀싱 데이터를 분석한 결과 *PtrTMAX1* 유전자는 주로 잎과 휴먼눈에서 발현됨을 확인하였다(도 6A).

[0132] 또한, pro*PtrTMAX1*::GUS가 형질전환된 애기장대에서 어린 생장시기별 *PtrTMAX1* 유전자의 발현을 분석한 결과, SAM 및 잎원기에 GUS 염색된 것을 확인하였는 바, *PtrTMAX1* 유전자는 정단분열조직에서 발현이 강한 것을 알 수 있다(도 6B).

[0134] 성숙한 식물의 경우, pro*PtrTMAX1*::GUS의 T2세대는 새로운 측지가 나타나는 로제트 잎 겨드랑이 및 줄기 잎 겨드랑이, 잎맥 및 정단분열조직에서 청색 신호가 나타난 것을 확인하였는 바(도 6C), 상기 부위에서 *PtrTMAX1* 유전자가 발현되는 것을 알 수 있으며, *ProTMAX1*::GUS 형질전환 포플러 나무에서도 상기 애기장대와 유사한 발현 양상을 확인하였다(도 6D).

[0136] **실험예 5: *PtrTMAX1* 유전자(Potri.005G232000)의 애기장대 상동유전자인 *AtTMAX1*(AT1G75430)의 과발현에 의한 측지 형성이 증가된 표현형 유도 확인**

[0138] *PtrTMAX1* 유전자(Potri.005G232000)의 애기장대 상동유전자인 *AtTMAX1*(AT1G75430)를 과발현시킨 경우에도 측지 형성이 증가되는지 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0139] 구체적으로, *PtrTMAX1* 유전자의 가장 가까운 동족체인 *BLH11* 유전자를 *AtTMAX1*로 명명하였다.

[0140] 상기 AtTMAX1은 PtrTMAX1의 단백질 아미노산 서열과 비교시, 58% 동일성 (identity), 76%의 유사성 (similarity)을 갖는다.

[0141] 상기 유전자를 pB2GW7 벡터에 클로닝하여 *AtTMAX1* 컨스트럭트를 제작하였고, 이를 이용하여 19개의 T1 계통을 수득하였다. 이들 중 많은 특지를 갖는 표현을을 나타내는 4개의 계통(#3, #4, #9 및 #11)은 선별하였다. 따라서, 상기 선별된 계통의 T3 동형접합체를 스크리닝하여 RT-PCR에 의해 *AtTMAX1*의 과발현이 확인된 계통(#3-10, #4-11, #9-4 및 #11-2)을 선별하여 이를 관찰하였다.

[0142] 그 결과, #4-11 계통은 가장 강한 난장이 표현형을 나타냈고, 정단 우성 또한 망가져 있었으며, 측지가 과도하게 형성된 표현형을 나타냈다(도 7A 및 B).

[0143] 다음으로, 상기 4개의 계통의 측지 수 및 전체 가지 수를 계수한 결과, 도 7A의 RT-PCR을 통해 확인한 *AtTMAX1* 발현량의 경향성과 일치하였으며(도 7C 및 D), 또한, 정량적 RT-PCT을 이용하여 *WUS* 발현 수준을 확인한 결과, 측지 형성 표현형이 가장 강하게 나타난 #4-11 계통에서 *WUS* 발현량이 가장 상향 조절된 것을 알 수 있었다(도 7E).

[0144] 상기 결과를 토대로, 애기장대의 *BHL11* 유전자는 *PtrTMAX1* 유전자의 상동 유전자임을 알 수 있다.

[0146] **실험예 6: *PtrTMAX1* 유전자(Potri.005G232000)가 과발현된 포플러에서 측지 형성이 증가된 표현형 유도 확인**

[0148] 상기의 실험예를 통해 측지 형성을 유도하는 것으로 확인한 *PtrTMAX1* 유전자가 포플러에서도 측지 형성을 유도하는지 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0149] 구체적으로, *PtrTMAX1*을 카나마이신 내성 영역을 갖는 pK2GW7 벡터에 삽입하여 제작한 PtrTMAX1 컨스트럭트를 이용하여 포플라(*Poplus alba x P.tremula var. Glandulosa*, Clone BH)를 형질 전환시켜, *PtrTMAX1* 유전자가 과발현된 35S:: *PtrTMAX1* 포플라 형질전환체를 제작하였다. 다음으로, RT-PCR을 이용하여 상기 제작된 형질전환체 계통 중 *PtrTMAX1* 유전자가 과발현된 계통(#11 및 #27)을 선별하였고, 상기 선별된 계통을 60일 동안 재배했다(도 8A).

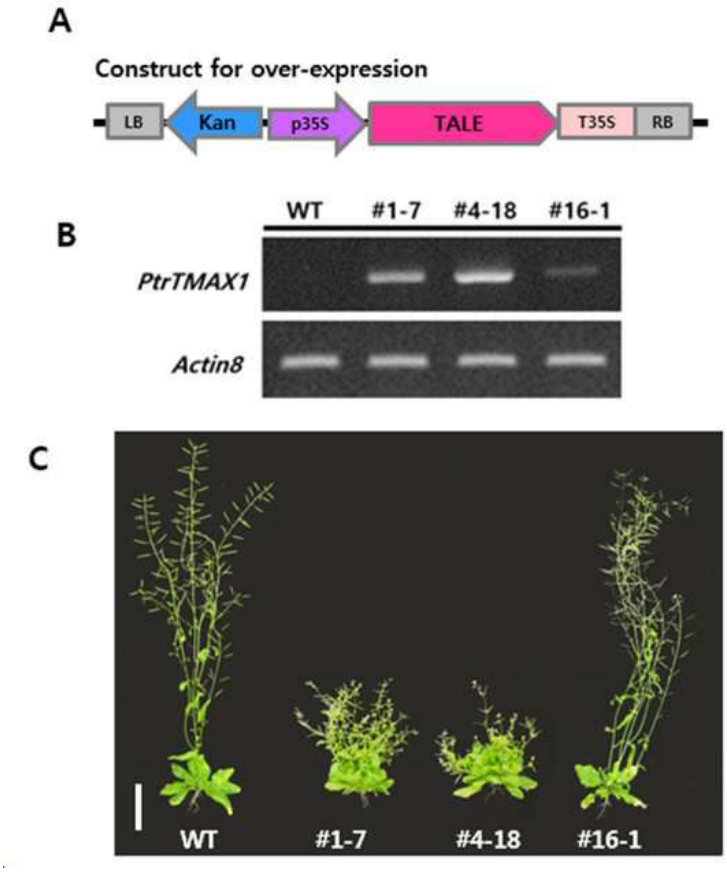
[0150] 상기 재배한 포플러 형질전환체 및 대조군을 관찰한 결과, 대조군(BH)과 비교하여, 잎 겨드랑이에서 나온 측지 수가 상당히 증가한 것을 확인하였다. 또한, #11은 위에서 15번째 노드에서 측지 형성이 시작되었고, #27은 19번째 노드에서 측지 형성이 시작되었으나, BH는 2달간 재배했음에도 20번째 노드에서도 측지 형성이 시작되지 않았음을 확인하였다(도 8B). 또한, #11은 대조군보다 측지 수는 많았으나, 길이는 더 짧았고(도 8C), 이는 *PtrTMAX1*-OX 애기장대 형질전환체의 난장이 표현형과 일치함을 알 수 있다.

[0151] 본 발명자들은 상기 실험예로부터 PtrTMAX1 및 이의 상동 단백질인 AtTMAX1의 과발현에 의해 측지 발달이 촉진된 형질전환 식물을 생산할 수 있음을 확인하였다.

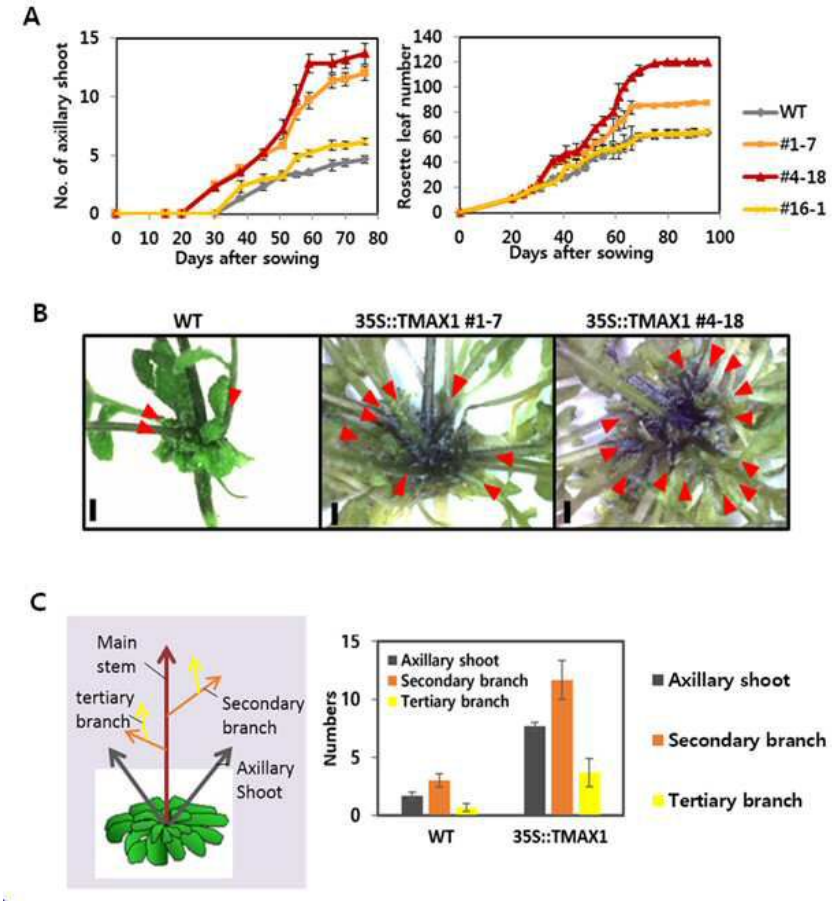
[0153] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

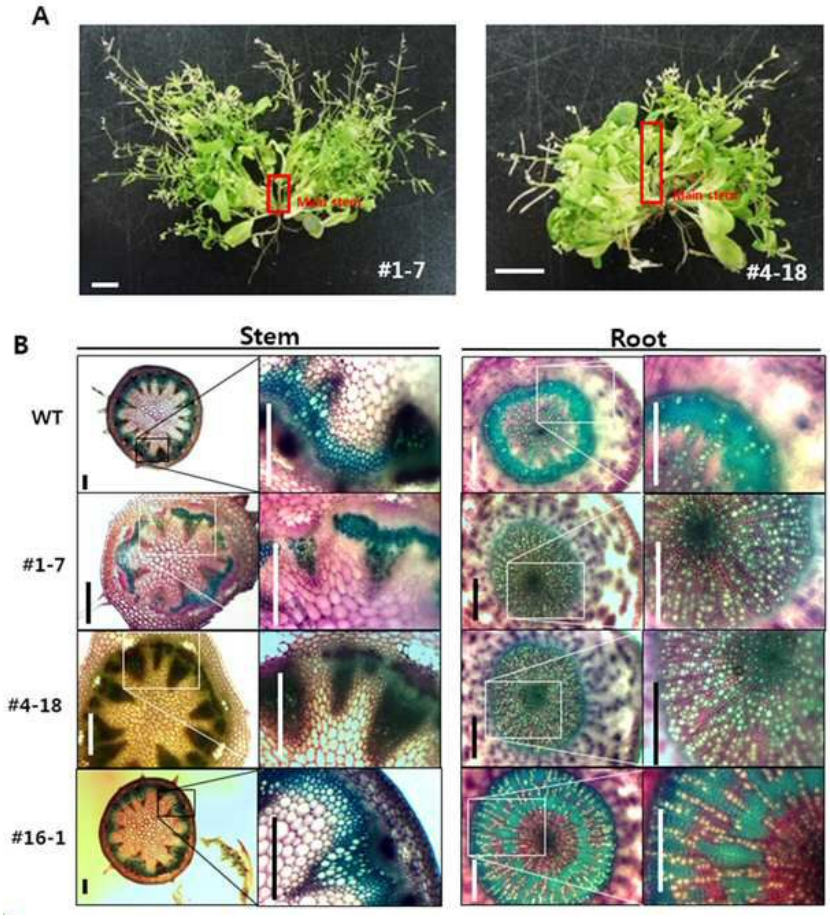
도면1


A
Construct for over-expression
LB
Kan
p35S
TALE
T35S
RB
B
WT
#1-7
#4-18
#16-1
PtrTMAX1
Actin8
C
WT
#1-7
#4-18
#16-1

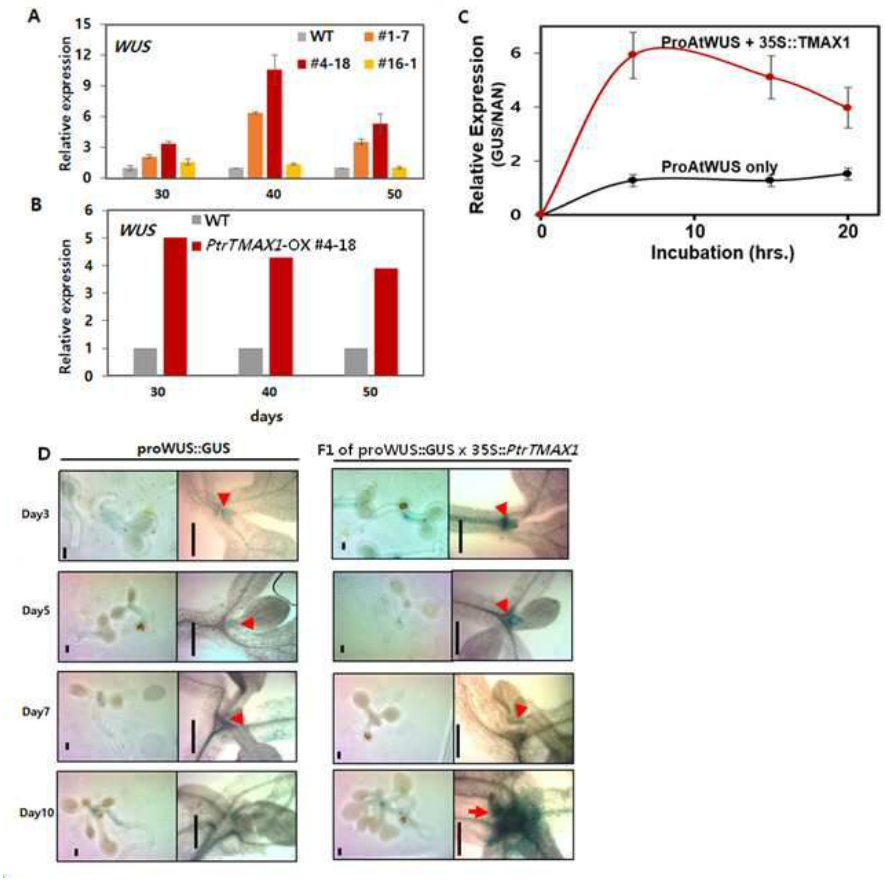
도면2


A
No. of axillary shoot
Days after sowing
Rosette leaf number
Days after sowing
WT
#1-7
#4-18
#16-1
B
WT
35S::TMAX1 #1-7
35S::TMAX1 #4-18
C
Main stem
tertiary branch
Secondary branch
Axillary Shoot
Numbers
Axillary shoot
Secondary branch
Tertiary branch
WT
35S::TMAX1

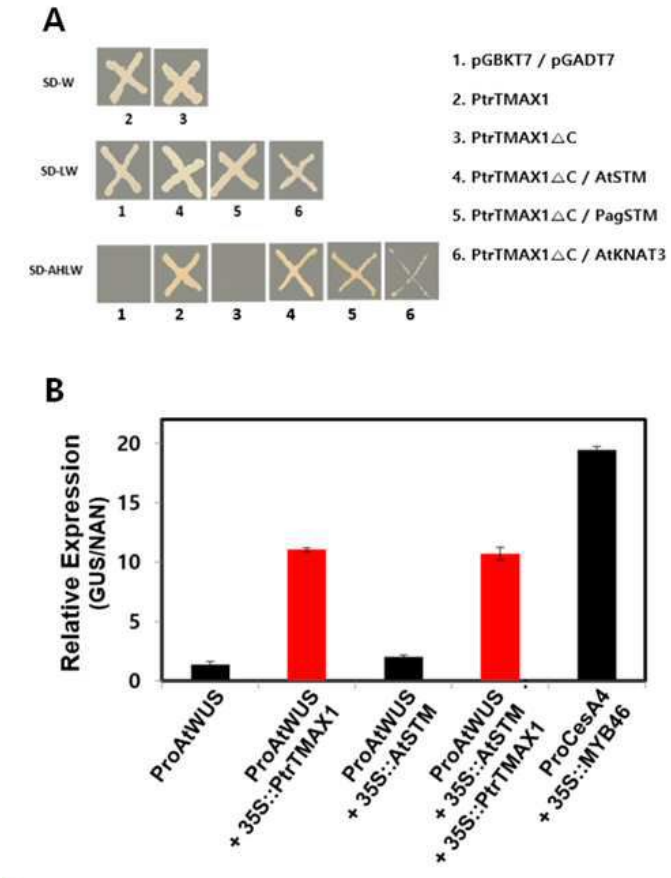
도면3



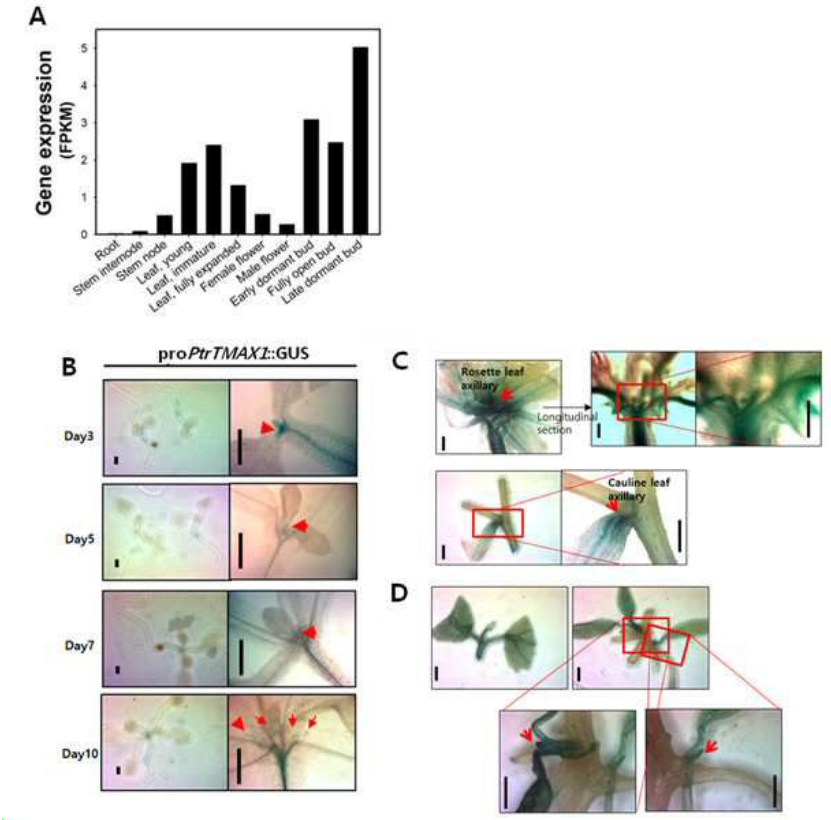
도면4


A
WUS
WT
#1-7
#4-18
#16-1
Relative expression
B
WUS
WT
PtrTMAX1-OX #4-18
Relative expression
days
C
ProAtWUS + 35S::TMAX1
ProAtWUS only
Relative Expression (GUS/NAN)
Incubation (hrs.)
D
proWUS::GUS
F1 of proWUS::GUS x 35S::PtrTMAX1
Day3
Day5
Day7
Day10

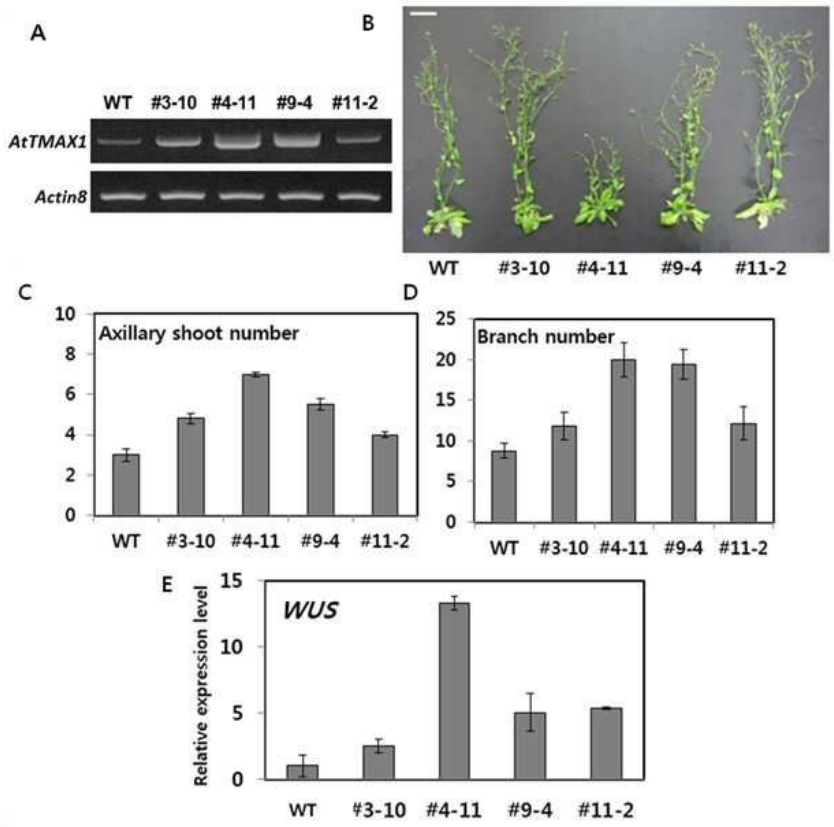
도면5


A
SD-W
SD-LW
SD-AHLW
1. pGBKT7 / pGADT7
2. PtrTMAX1
3. PtrTMAX1△C
4. PtrTMAX1△C / AtSTM
5. PtrTMAX1△C / PagSTM
6. PtrTMAX1△C / AtKNAT3
B
Relative Expression (GUS/NAN)
20
15
10
5
0
ProAtWUS
ProAtWUS + 35S::PtrTMAX1
ProAtWUS + 35S::AtSTM
ProAtWUS + 35S::AtSTM + 35S::PtrTMAX1
ProCesA4 + 35S::MYB46

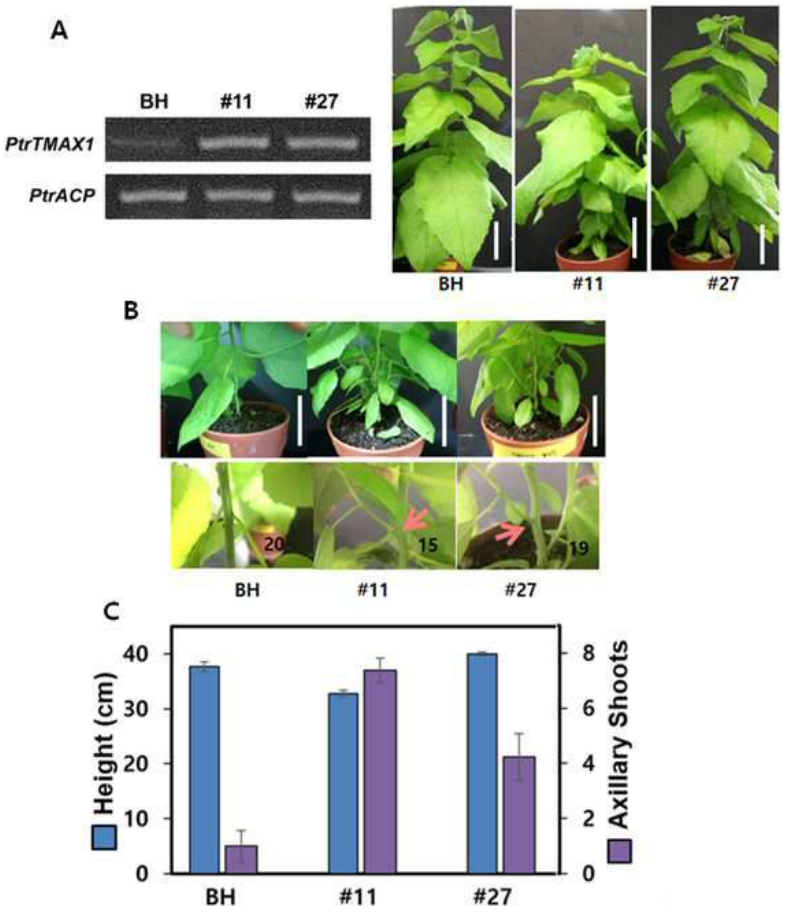
도면6


A
Gene expression (FPKM)
Root
Stem internode
Stem node
Leaf, young
Leaf, immature
Leaf, fully expanded
Female flower
Male flower
Early dormant bud
Fully open bud
Late dormant bud
B
proPtrTMAX1::GUS
Day3
Day5
Day7
Day10
C
Rosette leaf axillary
Longitudinal section
Cauline leaf axillary
D

도면7


A
WT
#3-10
#4-11
#9-4
#11-2
AtTMAX1
Actin8
B
C
Axillary shoot number
D
Branch number
E
Relative expression level
WUS

도면8



서 열 목 록

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

<120> A gene that regulate the axillary shoot development of plant and uses thereof

<130> KPA180762-KR

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PtrTMAX1

<400> 1

Met Val Ser Gln Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Ser Met Leu His

1 5 10 15

Gln Phe Ile Phe Ser Asp Ser Ile Thr Ser Gln Asn Gln Phe Gln Asn

20 25 30

Gln Asn Phe Asp Ala Leu Val Gly Ser Asn Thr Phe Pro Gln Ser His

35 40 45

Gly Val Leu Pro Ser Ile Gln Ser Leu Glu Glu Arg Met Ser Arg Ser

50 55 60

Ile Asp Leu Val Gln Ala Pro Ser Val Ala Gln Glu Ser Glu Ile Ser

65 70 75 80

His Thr Arg His Leu Met Ser Leu Leu Gly Ala Ala Asn Glu Thr Asn

85 90 95

Arg Gln Ala Gln Arg Leu Ser Leu Ser Leu Gly Ser His Met Leu Val

100 105 110

Pro Gln Val Gln Tyr Arg Gln Arg Ser Phe Asn Ser Asp Leu Met Ser

115 120 125

Pro Ser Tyr Leu Ile Pro Arg Glu Glu Glu Ala Arg Glu Ala Cys Asn

130 135 140

Pro Gly Gly Glu Gln Ala Asn Asn Asp Tyr Ser Leu Ile Gly Ser Gly

145 150 155 160

Phe Pro Ser Ser Pro Ala Ser Leu Ser Arg Arg Ser Thr Thr Ala Tyr

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ala Gln Ser Leu Leu Glu Glu Thr Val His Val Ser Cys Lys Ala

195 200 205

Val Glu Ile Ser Asn Glu Lys Tyr Val Arg Arg Leu Ile Arg Cys Arg

210 215 220

Gly Ser Leu Gly Leu Ser Ser Glu Leu Lys Ala Glu Leu Trp Gly Asn

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Ile Ala Leu Leu Glu Glu Val Glu Gly Arg Tyr Glu Lys Tyr Tyr

260 265 270

His Gln Met Glu Glu Val Val Ser Ser Phe Glu Glu Met Ala Gly Leu

275 280 285

Gly Ala Ala Lys Ser Tyr Thr Ala Leu Ala Leu Gln Ala Met Ser Lys

290 295 300

His Phe Cys Asn Leu Arg Asp Ala Ile Val Ser Gln Ile Asn Glu Thr

305 310 315 320

Arg Arg Lys Phe Ser Gln Asp Leu Pro Arg Thr Ser Ser Gly Leu Ser

325 330 335

Pro Leu Ser Phe Phe Asp Lys Glu Thr Lys His Asn Arg Met Ser Leu

340 345 350

Gln Gln Leu Gly Met Thr Gln Ser Gln Arg Gln Ala Trp Arg Pro Ile

355 360 365

Arg Gly Leu Pro Glu Thr Ser Val Ala Ile Leu Arg Ser Trp Leu Phe

370 375 380

Glu His Phe Leu His Pro Tyr Pro Asn Glu Ser Glu Lys Leu Met Leu

385 390 395 400

Ala Ser Gln Thr Gly Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Asn Trp Phe Ile

405 410 415

Asn Ala Arg Val Arg Leu Trp Lys Pro Met Ile Glu Glu Met Tyr Lys

420 425 430

Val Glu Phe Ala Asp Ser Ser Glu Asp Ser Asn Pro Leu Pro Gly Ser

435 440 445

Ser Phe Ile Thr Arg Glu Gly Val Thr Asp His Ser Glu Asp ***

450 455 460

<210> 2

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PtrTMAX1

<400> 2

atggtttcac aagattcatc ttcaaattca gcttctagca tgctacacca attcattttc 60

tcggactcca ttactagcca aaaccaattt caaaaccaga attttgatgc tttagttggc 120

agtaacacat ttcctcagtc tcatggtgtg ttgcctagca tacagtctct tgaggaaaga 180

atgtctaggt cgatagacct tgtacaagct ccctcagtag cgcaagaatc cgagattagc 240

cacacaagac acttaatgag tcttcttgga gcggcaaatg agaccaatcg tcaagctcaa 300

aggctatcac tgtctcttgg ttctcacatg cttgttcctc aagttcagta caggcagaga 360

tcctttaact cggatctcat gagtcctagt tacttaattc ctagagaaga agaagcaagg 420

gaagcttgta atcctggagg tgaacaagca aacaacgact attctctcat tggtagtgga 480

tttccatcat caccagcctc gttaagtaga cgttctacta ctgcttacgg aacagaatct 540

tttgctgttg ctatagagaa ttcaaggtat ttaaagcctg ctcagtccct actagaagaa 600

accgtgcatg taagttgcaa ggcagttgaa attagcaatg aaaaatatgt ccgaaggtta 660

attcgttgta gaggatctct tggactttct tctgaattaa aagcagaact gtggggaaat 720

gggcttgtgc aagctgagaa acacgaagtc cagcttaaaa ttgcaaagct tatagcattg 780

ttggaggagg ttgagggaag atacgagaaa tactaccatc aaatggaaga agtggtatca 840

tcatttgagg agatggcagg tttaggagct gccaaatctt acacagctct agcgctccaa 900

gccatgtcca agcacttctg caacttaaga gatgccatag tgtcccagat caatgagaca 960

agaagaaaat tctctcaaga tttaccaaga accagctcag gattgtcacc acttagcttt 1020

tttgataaag agaccaaaca taatcggatg tctcttcaac agcttggaat gacgcaaagc 1080

caaaggcaag catggagacc catcagagga ttgccagaga cttctgtagc catccttcgc 1140

tcttggcttt ttgaacactt cttgcatccg tatccaaatg aatctgagaa gctaatgtta 1200

gcatcgcaga caggcttgac aaagaatcaa gtctcaaact ggttcataaa tgctcgagtc 1260

cggctatgga agcctatgat agaagaaatg tacaaagtgg agttcgcaga ttcttctgaa 1320

gactcgaacc ccttacctgg cagttctttc ataacaaggg aaggtgtaac agatcattca 1380

gaggactga 1389

<210> 3

<211> 291

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtTMAX1

<400> 3

Met Glu Asp Phe Arg Val Arg His Glu Cys Ser Ser Leu Arg Gly Thr

1 5 10 15

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

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

145 150 155 160
Ile Ser His Gln Asp Val Pro Lys Ile Ile Ser Ser Gly Leu Ser Gln
165 170 175
Leu Ser Leu Phe Asp Gly Asn Thr Thr Ser Ser Ser Leu Gln Arg Leu
180 185 190
Gly Leu Val Gln Gly Pro Gln Arg His Ala Trp Lys Pro Ile Arg Gly
195 200 205
Leu Pro Glu Thr Ser Val Ala Ile Leu Arg Ala Trp Leu Phe Gln His
210 215 220

Phe Leu His Pro Tyr Pro Asn Glu Ala Glu Lys Leu Val Leu Ala Ser
225 230 235 240
Gln Thr Gly Leu Ser Lys Asn Gln Val Ser Asn Trp Phe Ile Asn Ala
245 250 255
Arg Val Arg Leu Trp Lys Pro Met Ile Glu Glu Met Tyr Arg Glu Glu
260 265 270

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

275 280 285

Ser Asn ***

290

<210> 4

<211> 873

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtTMAX1

<400> 4

atggaggatt ttagggtaag acatgagtgt tcatctctcc gtggtacttt gttggattca 60

agatatgcta aggcagtgca atgccttgta gaagaagtta tcgatatagg tggtagagag 120

gttgagcttt gcaacaacat tctaatcaat cagctgtttc caggaaggag aagacccggt 180

tttgctttgt cttccgaaat caaatccgaa ctttgcagtt ctggtttcat gtctttgcct 240

gagaatcatg agattcatat caaaatcaca aagcttctca gtttgttgca acaggtagaa 300

gaaagatttg agcagtactg caatcaactg gagcaagtga tttcatcatt tgaggaaata 360

gcaggagaag gatcatctaa agtgtacacc ggtttagctc tccaagccat gactcgacat 420

ttcggtagtc ttgaagaagc aataatctct cagctaaact ctgttcgtcg gagattcatc 480

atttctcatc aagatgttcc caagatcatc agctctggct tatcacagct cagcttgttc 540

gatgggaaca ccacttcatc atcacttcag cgacttggtt tggttcaagg accacagaga 600

catgcttgga aacccatcag aggcttgcct gagacttccg ttgcaattct ccgagcttgg 660

ctctttcaac atttcttgca cccttatccg aatgaagcag agaagctggt gttggcgtct 720

caaacaggac tttcgaagaa ccaagtatca aattggttta taaatgctcg agttcgactc 780

tggaaaccga tgatagaaga gatgtataga gaggaatttg gagattcctt agatgaatca 840

atgcaaagag aagccaatga tgattcaaac taa 873