(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0010367
(43) 공개일자 2015년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 15/82* (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
*A01H 5/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0085312
(22) 출원일자 2013년07월19일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
**충남대학교산학협력단**
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
**허윤강**
서울특별시 마포구 창전로 26 서강GS아파트 105동 101호
**이정여**
대전 동구 충무로 265, 303호 (신흥동, 성정빌라)
(74) 대리인
**특허법인다나**

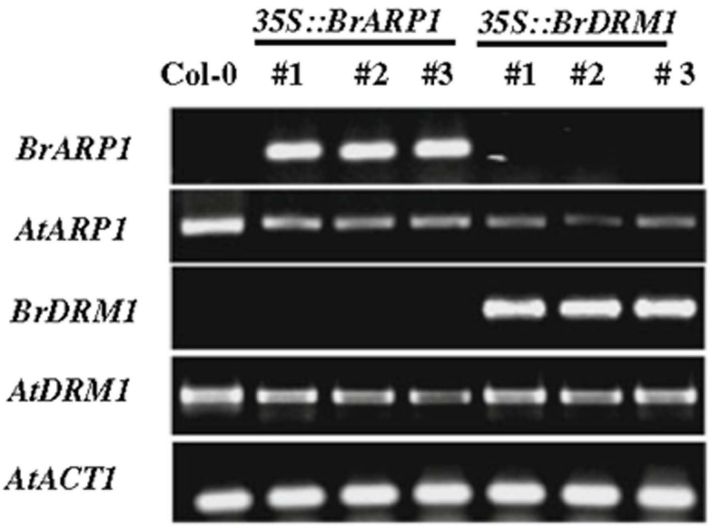
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **배추의 옥신 억제 유전자 및 이의 용도**

## (57) 요 약

본 발명은 배추 유래의 *BrARP1* 유전자 및 *BrDRM1* 유전자의 식물 생장 억제에 관한 것으로, 상기 *BrARP1* 유전자 및 *BrDRM1* 유전자가 각각 또는 함께 과발현되는 형질전환 식물체의 생장이 중지 또는 억제하므로 상기 형질전환체를 불리한 환경 및 스트레스에 강한 작물로 이용할 수 있다.

*대 표 도* - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ008118
부처명 농림수산식품부
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21사업
연구과제명 배추기능유전체와 염기서열 정보를 활용한 유용유전자의 대량 발굴
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교
연구기간 2011.05.01 ~ 2014.12.31

## *특허청구의 범위*

**청구항 1**

비생물적 스트레스 상황에서 서열번호 1의 *BrARP1* 유전자 및/또는 서열번호 2의 *BrDRM1* 유전자를 과발현하는 식물 생장 억제용 벡터.

**청구항 2**

상기 벡터는 비생물적 스트레스에 의해 유도되는 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 식물 생장 억제용 벡터.

**청구항 3**

제 1항의 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체.

**청구항 4**

제 3항에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 비생물적 스트레스 상황에서 *BrARP1* 및/또는 *BrDRM1* 유전자가 과발현되어 식물의 생장이 억제되는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

**청구항 5**

제 4항에 있어서, 상기 비생물적 스트레스는 저온, 고온 또는 삼투압 스트레스인 형질전환 식물체.

**청구항 6**

1) 서열번호 1의 *BrARP1* 유전자 또는 서열번호 2의 *BrDRM1* 유전자를 포함하는 벡터를 제작하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 유전자를 도입한 벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되는 식물체의 제조 방법.

**청구항 7**

제 6항에 있어서, 상기 단계 1)의 벡터는 비생물적 스트레스에 의해 유도되는 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되는 식물체의 제조 방법.

**청구항 8**

1) 서열번호 1의 *BrARP1* 유전자를 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

2) 서열번호 2의 *BrDRM1* 유전자를 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

3) 상기 단계 1)의 벡터를 식물체에 형질전환하는 단계;

4) 상기 단계 3)의 벡터로 형질전환된 식물체에 단계 2)의 벡터를 형질전환하는 단계; 및

5) *BrARP1* 유전자 및 *BrDRM1* 유전자를 모두 과발현하는 형질전환 식물체를 선별하는 단계를 포함하는 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되는 식물체의 제조 방법.

**청구항 9**

제 8항에 있어서, 상기 단계 1) 또는 2)의 벡터는 비생물적 스트레스에 의해 유도되는 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되는 식물체의 제조 방법.

**청구항 10**

1) 서열번호 2의 *BrDRM1* 유전자를 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

2) 서열번호 1의 *BrARP1* 유전자를 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

3) 상기 단계 1)의 벡터를 식물체에 형질전환하는 단계;

4) 상기 단계 3)의 벡터로 형질전환된 식물체에 단계 2)의 벡터를 형질전환하는 단계; 및

5) *BrARP1* 유전자 및 *BrDRM1* 유전자를 모두 과발현하는 형질전환 식물체를 선별하는 단계를 포함하는 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되는 식물체의 제조 방법.

**청구항 11**

제 10항에 있어서, 상기 단계 1) 또는 2)의 벡터는 비생물적 스트레스에 의해 유도되는 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되는 식물체의 제조 방법.

# *명 세 서*

## *기 술 분 야*

[0001] 배추로부터 분리한 *BrARP1* 유전자 및 *BrDRM1* 유전자의 식물 생장 억제 효과에 관한 것이다.

## *배 경 기 술*

[0002] 옥신(auxin)은 일반적인 생장-자극하는 식물호르몬(phytohormone)이며, 정아우성(apical dominance), 굴성 반응(tropic response), 곁뿌리 형성, 관의 분화, 씨눈 형성, 어린 싹의 신장과 같은 식물의 여러 발달과 생장 과정을 조절한다 (Davies PJ (1995) Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology, 2nd edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht). 이 과정들은 옥신이 활성화되거나 억제된 많은 유전자들의 발현으로 인한 변화와 관련 있을지 모른다. 옥신-활성화된 유전자는 옥신 반응인자(auxin response factor: *ARFs*) 뿐만 아니라 *GH3, SAUR*과 *Aux/IAA* 계열을 포함한다 옥신-억제된 단백질(auxin-repressed protein 1: *ARP*) 유전자는 휴지-관련 단백질과 글리신-풍부 단백질 1을 포함한다. *ARP* 유전자는 *DRM*(dormancy-associated protein 1) 유전자와 밀접하게 관련되어 있으며 이 둘은 *ARP/DRM* 유전자 패밀리를 형성한다 (Stafstrom JP, Ripley BD, Devitt ML, Drake B (1998) Dormancyassociated gene expression in pea axillary buds. Planta 205(4): 547-552). 그 동안 대부분의 분자 연구는 옥신 신호에 의한 상향-조절과 같은 기본적인 "반응 유전자(response genes)"에 중점을 둔 반면, 옥신에 의한 하향-조절되는 유전자에 대해서는 알려진 바가 적다.

[0003] 몇몇의 옥신-억제된 슈퍼패밀리 유전자, 가령 *ARP1*과 휴지-연관된 단백질 유전자 1(dormancy-associated protein gene 1; *DRM1*)이 연구를 위해 쌍자엽 식물과 외자엽 식물로부터 분리되었다. 딸기 *ARP* 유전자(*SAR5*)의 발현은 보통 열매 발달이 이루어지는 동안 억제되었고 이 단계는 내생적인 옥신에 의해 조절된다. 완두콩 *DRM1*(*PsDRM1*), 애기장대 *DRM1*과 *ARP1*(*AtDRM1, AtARP1*), 수수 *DRM1*(*SbDRM1*)과 같은 몇몇 휴지-연관된 유전자는 휴지 상태인 곁눈 내에서 발현되었으며 이 발현은 순자르기(decapitation), 옥신, 빛에 의해 억제된다. *RpARP* (콩, 아까시 나무, 아카시아 나무에서 옥신-억제된 유전자)의 발현은 배축(hypocotyls) 신장과 옥신 이용 모두에 반비례 관계가 있다 (Park S, Han KH (2003) An auxin-repressed gene (RpARP) from black locust (Robinia pseudoacacia) is posttranscriptionally regulated and negatively associated with shoot elongation. Tree Physiol 23(12):815-823). 담배 *ARP1*(*ARP11;1*)은 화분 성숙기에 많이 발현되지만 화분 발아

시기 동안에는 급속히 감소한다. 비생물적 스트레스는 고추와 애기장대에서 옥신 억제된 유전자들의 발현을 상향-조절한다. 비록 이러한 이전의 연구들은 *ARP1*과 *DRM1*이 생장의 휴지와 정지를 유지한다는 것을 제시했지만, 유전자도입과 돌연변이 식물에서 그 기능들은 알려져 있지 않다.

[0004] 식물은 불리한 환경과 스트레스에 노출되었을 때, 그들은 흔히 생장을 부분적 혹은 완전히 억제하는 것으로 대응한다. 이러한 반응은 생존, 스트레스 해결을 위해 여러 자원을 재분배하는 식물을 가능하게 하기 위한 적응전략으로 간주된다 (Xiong L, Zhu JK (2001) Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. Physiol Plant 112(2): 152-166).

[0005] 이에, 본 발명자들은 동아시아에서 중요한 농산물인 배추(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)가 *ARP1* 및 *DRM1*를 둘 다 가지는 것을 확인하였으며, 이를 각각 *BrARP1* 및 *BrDRM1*으로 지정하였다. 또한, 다양한 생장과 스트레스 조건에서 배추의 *BrARP1* 및 *BrDRM1*의 종합적인 발현 패턴을 확인하였으며, 유전자의 동시 과발현 또는 유전자-제거(낙아웃)한 이후의 형질전환 애기장대 식물체를 분석함으로써 식물의 생장을 억제하는 기능을 확인하였다.

[0006]

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0007] 본 발명의 목적은 비생물적 스트레스 상황에서 서열번호 1의 *BrARP1* 유전자 및/또는 서열번호 2의 *BrDRM1* 유전자를 과발현하는 식물 생장 억제용 벡터를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[0009] 아울러, 본 발명의 또 다른 목적은 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되는 식물체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

### *과제의 해결 수단*

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 비생물적 스트레스 상황에서 서열번호 1의 *BrARP1* 유전자 및/또는 서열번호 2의 *BrDRM1* 유전자를 과발현하는 식물 생장 억제용 벡터를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0012] 아울러, 본 발명은 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되는 식물체의 제조 방법을 제공한다.

### *발명의 효과*

[0013] 본 발명의 배추에서 비생물적 스트레스에 의해 과발현된 서열번호 1의 *BrARP1* 유전자 및/또는 서열번호 2의 *BrDRM1* 유전자를 과발현하는 벡터로 형질전환된 식물체의 생장이 억제되었으므로, 상기 두 유전자를 이용하면 비생물적 스트레스 환경에 처했을 때 식물의 불필요한 생장이 억제되어 비생물적 스트레스에 의한 농작물의 피해를 막을 수 있다.

### *도면의 간단한 설명*

[0014] 도 1A는 배추와 애기장대 *ARP1*와 *DRM1*의 아미노산 서열을 비교한 도이다;

검은색: 일치하는 아미노산 서열; 및

회색: 유사한 염기서열.

도 1B는 *BrARP1* 와 *BrDRM1*의 세포내의 위치를 나타낸 현미경 사진이다;

Bright field: 광학 현미경사진 (명시야);

Chlorophyll: 엽록소를 나타낸 빨강 형광 의색(pseudo color) 사용;

GFP: 녹색 형광 의색 사용; 및

비교막대: 10 ㎛.

도 2는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 다른 조직들에서 *BrARP1*, *BrDRM1* 및 *BrRPL27*의 발현을 확인한 그래프이다;

Floral bud Ⅰ:< 1 mm의 꽃눈;

Floral bud Ⅱ: 1 내지 3 mm의 꽃눈; 및

Floral bud Ⅲ: > 3 mm의 꽃눈.

도 3은 배추의 뿌리, 배축, 자엽 내의 옥신-억제 슈퍼패밀리 유전자(*BrARP1*, *BrDRM1* 및 *BrRPL27*의 발달 별, 단계-의존적 발현을 나타낸 도이다;

A: 발아(DAG) 후 2, 3, 6, 8, 11, 13 및 15일이 지난 각 단계의 10개의 어린 식물체의 자엽으로부터 추출된 전체 RNA; 및

B: 위부터 아래까지 5 mm 분절로 절개된 뿌리 및 배축 관련 mRNA 발현 수준.

도 4는 다양한 비생물적 스트레스 상태에서 배추 잎 내 *BrARP1*, *BrDRM1*, *BrRPL27*의 발현을 나타내는 도이다;

Light chilling: 저온 스트레스;

Heat shock: 고온 스트레스; 및

Salt: 염 스트레스.

도 5A는 형질전환 애기장대, 낙아웃 애기장대 및 야생형의 표현형을 발아 후 매 2주 간격으로 확인한 사진이다.

도 5B는 형질전환 애기장대, 낙아웃 애기장대 및 야생형의 5번째 잎의 형태를 확인한 사진이다.

도 5C는 형질전환 애기장대, 낙아웃 애기장대 및 야생형의 5번째 잎의 크기를 측정한 도이다.

도 6A는 야생형 및 형질전환 어린 애기장대 식물체의 뿌리 길이 형질을 비교한 사진이다.

도 6B는 야생형 및 형질전환 어린 애기장대 식물체의 뿌리 길이 형질을 그래프로 나타낸 도이다.

도 6C는 야생형 및 형질전환 어린 애기장대 식물체에서 *BrARP1* 와 *BrDRM1*의 전사 수준을 확인한 도이다.

도 7은 *BrARP1*-와 *BrDRM1*-과발현 애기장대에서 배축 신장의 억제를 확인한 도이다;

NAA: naphthalene acetic acid.

도 8은 *BrARP1*-과발현 및 *BrDRM1*-과발현 애기장대의 씨앗 발아를 정량화한 그래프이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0015] 본 발명에서 사용된 약어는 하기와 같다.

[0016] ARP1: Auxin-repressed protein 1

[0017] DRM1: Dormancy-associated protein 1

[0018] RPL27: Ribosomal protein 27

[0019] ARF: Auxin response factor

[0020] ACT1: Actin 1

[0021] NAA: Naphthalene acetic acid

[0022] Br: Brassica rapa

[0023] At: Arabidopsis thaliana.

[0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명은 비생물적 스트레스 상황에서 서열번호 1의 *BrARP1* 유전자 및/또는 서열번호 2의 *BrDRM1* 유전자를 과발현하는 식물 생장 억제용 벡터를 제공한다.

[0026] 상기 재조합 벡터는 제초제 저항성 Bar 유전자가 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0027] 상기 벡터는 비생물적 스트레스에 의해 유도되는 프로모터를 포함하는 것이 바람직하며, SWPA4일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 상기 유전자는 배추(*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*) 유래의 옥신-억제 슈퍼 패밀리 유전자이다.

[0029] 상기 옥신-억제된 단백질 1(auxin-repressed protein 1; *ARP1*) 및 휴지-관련된 단백질 1(ormancy-associated protein 1; *DRM1*)은 몇몇 식물 종의 휴면기인 싹과 생장하지 않는 조직에서 많이 발현된다.

[0030] 상기 비생물적 스트레스는 환경 스트레스를 말하며, 저온, 고온 또는 삼투압 스트레스인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0031] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "발현 벡터"는 흔히 "재조합 벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "재조합 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0032] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 재조합 벡터가 발현 벡터이고, 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pLλ프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다.

[0033] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예: λgt4·λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0034] 한편, 본 발명의 발현 벡터가 또는 재조합 벡터이고, 진핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0035] 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신, 테트라사이클린 및 바스타 제초제에 대한 내성 유전자가 있다.

[0036] 본 발명의 벡터에서, 프로모터는 비생물적 스트레스에 의해 유도되는 프로모터일 수 있다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 본 발명의 "비생물적 스트레스에 의해 유도되는 프로모터"는 비생물적 스트레스에 의해 유도되는 프로모터로, 비생물적 스트레스가 가해진 재해 상황에서 유전자의 과발현을 유발하는 프로모터를 말한다.

[0037] 본 발명의 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0039] 상기 형질전환 식물체는 *BrARP1* 및/또는 *BrDRM1* 유전자가 과발현되어 식물의 생장이 억제되는 것이 바람직하며, 상기 두 유전자가 동시에 과발현되어 식물의 생장이 억제되는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0040] 상기 형질전환 식물체는 비생물적 스트레스에 처하였을 때 식물체의 생장이 억제되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0041] 상기 비생물적 스트레스는 저온, 고온 또는 삼투압 스트레스인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0042] 또한, 본 발명의 발현 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주), 식물세포 및 식물체 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물체이다.

[0043] 본 발명의 발현 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있으며, 바람직하게는 아그로박테리움-매개 형질 감염법이다.

[0044] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate), 글루포시네이트암모늄(glufosinate ammonium) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및/(또는) 조직 배양기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.

[0046] 본 발명에 따른 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료작물류일 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명은

[0048] 1) 서열번호 1의 *BrARP1* 유전자 또는 서열번호 2의 *BrDRM1* 유전자를 포함하는 벡터를 제작하는 단계; 및

[0049] 2) 상기 단계 1)의 유전자를 도입한 벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되는 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0050] 상기 벡터는 비생물적 스트레스에 의해 유도되는 프로모터를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0051] 또한, 본 발명은

[0052] 1) 서열번호 1의 *BrARP1* 유전자를 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

[0053] 2) 서열번호 2의 *BrDRM1* 유전자를 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

[0054] 3) 상기 단계 1)의 벡터를 식물체에 형질전환하는 단계;

[0055] 4) 상기 단계 3)의 벡터로 형질전환된 식물체에 단계 2)의 벡터를 형질전환하는 단계; 및

[0056] 5) *BrARP1* 유전자 및 *BrDRM1* 유전자를 모두 과발현하는 형질전환 식물체를 선별하는 단계를 포함하는 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되는 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0057] 상기 벡터는 비생물적 스트레스에 의해 유도되는 프로모터를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0058] 아울러, 본 발명은

[0059] 1) 서열번호 2의 *BrDRM1* 유전자를 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

[0060] 2) 서열번호 1의 *BrARP1* 유전자를 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

[0061] 3) 상기 단계 1)의 벡터를 식물체에 형질전환하는 단계;

[0062] 4) 상기 단계 3)의 벡터로 형질전환된 식물체에 단계 2)의 벡터를 형질전환하는 단계; 및

[0063] 5) *BrARP1* 유전자 및 *BrDRM1* 유전자를 모두 과발현하는 형질전환 식물체를 선별하는 단계를 포함하는 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되는 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0064] 상기 벡터는 비생물적 스트레스에 의해 유도되는 프로모터를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0065] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 배추 유래의 *BrARP1* 유전자 및 *BrDRM1* 유전자를 분리하고 이의 염기서열 및 아미노산 서열을 확인하였으며, 배추에 비생물적 스트레스를 유도한 뒤, *BrARP1* 유전자 및 *BrDRM1* 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 또한, 상기 유전자 각각을 포함하는 벡터로 형질전환한 애기장대의 생장이 억제되는 것을 확인하였고, 상기 유전자가 동시에 과발현되는 애기장대가 더욱 생장이 억제됨을 확인하였다. 그러나, 상기 두 유전자를 낙다운하였을 때는 생장이 촉진되지 않고 야생형과 유사한 생장 정도를 보여 식물의 생장을 멈추는 것일 뿐 마이너스 생장을 유도하는 것은 아님을 알 수 있었다.

[0066] 따라서, 본 발명의 *BrARP1* 유전자 및 *BrDRM1* 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 식물체는 비생물적 스트레스 상황에서 생장이 억제되므로, 이를 환경 스트레스로 인해 생장이 불리한 상황에서 과대 생장이 억제되는 식물체로 유용하게 이용될 수 있다.

[0067] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 통상의 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0068] **<실시예 1> *BrARP1* 및 *BrDRM1*의 서열 분석**

[0069] **<1-1> BrARP1 및 BrDRM1의 cDNA 분리 및 염기서열 유사도 분석**

[0070] 본 발명자들은 *BrARP1* 및 *BrDRM1*의 cDNA를 동정한 뒤 이의 유사도를 비교하였다.

[0071] 구체적으로, *BrARP1* (서열번호 1)은 Chiifu 근교계통인 성숙한 잎의 고온-충격 처리를 포함하는 cDNA microarray 실험을 통해 동정하였고, *BrDRM1* (서열번호 2)은 염분-처리된 배추의 전체 cDNA 라이브러리로부터 동정하였다. 상기 분리된 cDNA 클론을 ABI 373091 자동배열기(ArraDx, Craigavon, Northern Ireland)로 배열하였다. DNA 염기서열 간의 유사도는 National Center for Biotechnology Information database/BLAST search program (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)을 이용하여 확인하였다.

[0072] 그 결과, 애기장대(*A. thaliana*)와 배추 모두에서 ARP1 와 DRM1 간의 동등성이 비교적 낮다는 것을 발견하였으나, 도메인 1과 2는 잘 보존되어 있었다. 대조적으로 애기장대와 배추 사이의 ARP1 혹은 DRM1 중 하나의 동등성은 매우 높다 (도 1A).

[0073]

[0074] **<1-2> 배추의 BrARP1 및 BrDRM1의 아미노산 서열 분석**

[0075] 본 발명자들은 *BrARP1* 및 *BrDRM1*의 아미노산 서열을 분석하였다.

[0076] 구체적으로, *BrARP1* 및 *BrDRM1*의 아미노산 서열의 상동성을 분석하여 다중 염기서열 정렬 프로그램 CLUSTAL W (1.82)을 이용하여 정렬하였다. 정렬에 사용되는 *ARP/DRM* 패밀리 단백질은 *BrARP1* (*B. rapa ARP1*, AAO32054) *BrDRM1* (*B. rapa DRM1*), *AtARP1* (*Arabidopsis thaliana ARP1*, AAK32858) 및 *AtDRM1* (*Arabidopsis thaliana DRM1*, NP_564305)을 포함한다.

[0077] 그 결과, *BrARP1*(FJ965338) 및 *BrDRM1*(FJ965337) 유전자는 모두 높은 등전점(pIs; 9.52 및 9.10)에서 작은 펩티드 단백질 (11.7 및 14.0 kDa 단백질)을 암호화하였으며, BrARP1 및 BrDRM1가 사이토졸 단백질을 암호화할 수 있다는 것을 나타내는 소기관 표적 및 신호 펩티드 서열이 아닌 것을 발견하였다. 또한, *BrARP1* 및 *BrDRM1*의 아미노산 서열이 애기장대 대조군 *AtARP1* (At2G33830) 및 *AtDRM1* (At1G28330)과 각각 93과 90%의 유사도를 보였다. 이들의 높은 동일성은 배추 단백질이 애기장대 식물의 비상동(heterologous) 시스템 내에서 작동할 수 있다는 것을 의미한다. 또한, 배추와 애기장대 내의 *ARP1* 와 *DRM1* 간의 동일성은 각 각 53 와 63 %로 낮다 (도 1A).

[0078] **<1-3> BrARP1 및 BrDRM1 단백질의 위치 확인**

[0079] 본 발명자들은 BrARP1 및 BrDRM1 단백질의 식물체 내의 위치를 확인하기 위하여 GFP-벡터를 제작하였다.

[0080] 구체적으로, 배추 cDNA를 표 1의 *BrARP1*-GFP 프라이머 (서열번호 3 및 4) 및 *BrDRM1*-GFP 프라이머 (서열번호 5 및 6)를 이용하여 PCR 증폭한 뒤, pUC19-GFP3-포함 벡터 내로 클로닝이 수행되었다. 녹색 형광단백질(green fluorescent protein; GFP) 복합체는 프레임이 맞도록 유전자의 3`-말단으로 융합되었으며 이 DNA 30 ㎍을 애기장대 원형질체(protoplast)로 도입하였다. 유전자가 도입된 원형질체를 22℃ 암 조건에서 24 시간 동안 배양한 후 형광-현미경과 명시야-현미경을 이용해 확인하였다.

[0081] 그 결과, *BrARP1*-GFP 및 *BrDRM1*-GFP가 애기장대 원형질체 내에서 사이토졸에 위치함을 확인하였다 (도 1B).

*표 1*

[0082]

| 서열번호 | 프라이머 서열(5'->3' |
|---|---|
| 3 | CGTACGGATCCATGTGGGATGA |
| 4 | GGTTCGGATCCACGGTGCTG |
| 5 | CGTACGGATCCATGGTTCTGCT |
| 6 | CGGCGGATCCTTTAATCCAC |

[0083] **<실시예 2> 배추에서의 *BrARP1* 및 *BrDRM1*의 발현 분석**

[0084] **<2-1> 배추의 다양한 조직에서 BrARP1 및 BrDRM1의 발현**

[0085] 본 발명자들은 기능상의 기본적인 정보를 얻기 위해 다양한 조직 내 전사 단계에서 *BrARP1* 및 *BrDRM1* 발현을 qRT-PCR로 확인하였다.

[0086] 구체적으로, *BrRPL27*(*B. rapa* ribosomal protein 27) (EST IdKFFB-141H09) 및 *BrACT1*(*B. rapa* actin 1 gene) (GenBank Accession Number FJ969844)이 각각 생장 표지와 구성상의 발현된-유전자로서 선택되었다. Primer Quest computer program (http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/)을 통해 80-90 bp 절편의 *BrARP1, BrDRM1, BrRPL27, BrACT1* 표적 프라이머를 설계하였다 (표 2의 서열번호 7 내지 14). 그 후, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 화분에서 7 일간 생장한 어린 식물의 뿌리, 배축, 자엽에서 전체 RNA를 추출하였으며, 45일 된 식물의 어린 잎과 성숙한 잎 그리고 꽃 조직에서도 전체 RNA를 추출하였다. 전체 RNA로부터 배추의 cDNA는 iScript Select cDNA 분석키트(BIO-RAD, BR170-8897)를 이용하여, 제조자 지침서에 따라 합성되었다. qRT-PCR은 MiniOption detection system (Bio-Rad, CFD-3120) 및 SYBR Green RT-PCR kit (IQ Sybr Green Super Mix, BR170-8880)를 이용하여 수행되었다. 결과는 비교임계 주기법(comparative threshold cycle method)을 이용하여 BIORAD software (GeneXpression Macro Chromo4)에서 분석되었고, 발현은 데이터 표준화를 이용해 제조자 지침서에 따라서 참조 유전자 *BrACT1*에 표준화되었다. *BrACT1*의 mRNA 수준은 국내 참고자료가 이용되었다.

[0087] 그 결과, *BrARP1* 및 *BrDRM1*의 전사 수준은 성장 연관 마커 유전자인 *BrRPL27*에 비해 뿌리, 배축, 성숙한 잎, 꽃잎, 꽃받침에서 높게 나타났다. 또한, 자엽, 어린 잎, 꽃눈, 수술, 꽃밥에서는 *BrARP1* 및 *BrDRM1*가 상대적으로 낮은 수준을 보였지만, *BrRPL27*의 수준은 높았으며, 이것은 이들이 여전히 생장 중임을 나타냈다. 전체적인 전사 수준은 암술, 수술, 꽃밥, 꽃잎, 꽃받침에서 낮았고, 이는 낮은 전사활성을 시사하며, *BrARP1* 및 *BrDRM1*의 발현이 다양한 조직 내에서 *BrRPL27*와 반비례 관계가 있음을 알 수 있었다 (도 2).

*표 2*

[0088]

| 서열번호 | 프라이머 서열 (5'->3') |
|---|---|
| 7 | AGTAACATCGCCACCAGAGG |
| 8 | TCGTCGCTGTACAACCAGTC |
| 9 | CGTAAAATCACCACCCAACC |
| 10 | GTCGGCATAGTCAACGACCT |
| 11 | AGTTCGAGAAGTTTGGTCCCGACA |
| 12 | TCGACCGTAGCAGATGCAAGAACA |
| 13 | ACACCATGATGTCTTGGCCTACCA |
| 14 | AATGGTACCGGAATGGTCAAGGCT |
| 15 | CTAAGCCGGAGCATGGCCTT |
| 16 | GGCATGTCACTCCTTCCTCTCGAT |
| 17 | GGATAACGTGTGGAGGAGCGTC |
| 18 | GACTCAACCTCTCCACTTGCAAGTTAC |
| 19 | CTAAGCCGGAGCATGGCCTT |
| 20 | CGGCGACATGAAGCAAATAAAAG |
| 21 | GGATAACGTGTGGAGGAGCGTC |
| 22 | CTGTCTTCCCACCTAAGCAATGTG |
| 23 | GTCTTGACCTTGCTGGACGTGA |
| 24 | CCTTTCAGGTGGTGCAACGAC |
| 25 | GGGCTGCAGGAATTC |
| 26 | CAGGTCACCACTCACTATAGGGCGAAT |
| 27 | CGGCGGATCCATAAAATGGTTC |
| 28 | GCCCGTCTAGAGGGTTTTCATTT |

[0089] **<2-2> 어린 식물체에서 BrARP1 및 BrDRM1의 발현**

[0090] 본 발명자들은 어린 배추 식물체에서 BrARP1 및 BrDRM1의 발현을 확인하였다.

[0091] 구체적으로, 발아(DAG) 후 2, 3, 6, 8, 11, 13, 15일 지난 각 단계의 10개의 어린 배추 식물체의 자엽으로부터 추출된 전체 RNA를 이용하여 상기 실시예 <2-1>과 같은 방법으로 qRT-PCR을 수행하였다. 또한, 20개의 어린 식물체의 뿌리와 배축의 위부터 아래까지 5 mm 분절로 절개한 20개의 분절에서 각각 총 RNA를 추출한 뒤, 이를 이

용하여 qRT-PCR을 수행하였다. *BrACT1*의 mRNA 수준은 국내 참고자료가 이용되었다.

[0092] 그 결과, BrARP1 및 BrDRM1의 전사 수준은 자엽이 발달하는 동안에 서서히 증가했지만, *BrDRM1*는 *BrARP1* 만큼 많이 변하지 않았다 (도 3A). *BrRPL27*의 전사 수준은 발아 15일 후에 노화되는 경우를 제외하고는 대부분 일정하였다. 암 조건에서 72 시간 동안 생장된 어린 식물체와 25 mm 길이의 배축에서 BrARP1 및 BrDRM1 전사의 안정 상태 정도는 배축의 상단 부분에서는 낮지만, 하단 부분에서는 높다. 이와 대조적으로 상단 부분에서, *BrRPL27* 생장 마커의 전사 수준은 다른 부분과 비교해서 높았다 (도 3B). *BrARP1 및 BrDRM1*의 발현은 뿌리 끝 지점에서 더 낮았고 더 많은 신장이 생길 수 있지만, 지점 사이에 변화는 *BrARP1*과 같이 크지는 않았다. 반대로, *BrRPL27* 전사 수준은 생장하는 뿌리에서 우선적으로 늘어났다. 이러한 결과는 BrARP1 및 BrDRM1의 수준이 생장이 끝나는 식물 영역 내에서 높으며, BrARP1 및 BrDRM1의 발현이 자엽 발달, 배축 신장, 뿌리 생장과 음의 상관관계가 있다는 것을 나타낸다.

[0093] **<2-3> 비생물적 스트레스 조건에서 BrARP1 및 BrDRM1의 발현**

[0094] 본 발명자들은 다양한 비생물적 스트레스 상태에서 배추 잎 내의 BrARP1 및 BrDRM1의 발현을 확인하였다.

[0095] 구체적으로, 22 ± 2 ℃의 생장실에서 45일 동안 생장한 배추의 20개 잎 디스크(1 $cm^2$)는 250 mM NaCl 용액 (염분 스트레스), 4 ℃ (저온) 또는 42 ℃ (고온) 상태에서 100 μmol photons/$m^2$s으로 노출되었다. 그 후 전체 RNA가 잎 디스크로부터 추출되었고 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 qRT-PCR이 수행되었다. *BrACT1*의 mRNA 수준은 국내 데이터를 참고하였다.

[0096] 그 결과, 성숙한 잎 디스크가 냉기, 열 충격, 염분 스트레스에 노출되었을 때, BrARP1 및 BrDRM1의 전사 수준은 모두 증가되었으나, *BrRPL27*의 변화는 옥신-억제 슈퍼패밀리 유전자만큼 높지 않았다 (도 4). 따라서, 세 종류의 비생물적 스트레스는 BrARP1 및 BrDRM1 유전자의 발현을 촉진시키고 *BrRPL27*는 감소시킴을 알 수 있다.

[0097] **<실시예 3> *BrARP1* 및 *BrDRM1* 형질전환 애기장대의 분석**

[0098] **<3-1> *BrARP1* 및 *BrDRM1* 과발현 벡터 및 형질전환체 제작**

[0099] 본 발명자들은 상기 *BrARP1* 및 *BrDRM1* 유전자를 포함하는 벡터를 제작하여 애기장대에 형질도입하였다.

[0100] 구체적으로, 전장 *BrARP1* cDNA(GenBank Accession Number FJ965338) 및 *BrDRM1* cDNA (GenBank Accession Number FJ965337)염기서열로부터 제한효소 자리 (*BrARP1*: *Nco*I 및 *Bst*EII 자리; *BrDRM1*: *Bam*HI 및 *Xba*I 자리)를 포함하는 *BrARP1* 및 *BrDRM1* 코딩 영역을 pBluescriptII KS (+) (Stratagene, USA) 및 프라이머 (표 2의 서열번호 25 내지 28)를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 절편을 변형한 바이너리(binary) 벡터인 pCambia3300 벡터의 노팔린 합성효소(*nos*) 말단과 CaMV *35S-P* 사이에 삽입하여 벡터를 제작하였다 (*35S::BrARP1* 및 *35S::BrDRM1*). 제작한 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 내로 형질도입하였으며, 이를 일반적인 꽃 침지법을 이용하여 애기장대 (생태형, Columbia)에 유전자 각각을 형질전환하여 *35S::BrARP1*, 35S::*BrDRM1* 형질전환체를 제작하였으며, 각각의 이식유전자의 단일 카피와 동형의 $T_3$ 세대 식물은 16시간 광주기로 22 ℃에서 유지되었고, 표현형은 Boyes et al.에 의해 기술된 방법에 따라 분석되었다. 그 후, *BrARP1* 및 *BrDRM1* 를 모두 과발현하는 애기장대를 제작하기 위해, *35S::BrARP1* 식물 내로 *BrDRM1*를 형질도입한 뒤, 두 유전자를 모두 과발현하는 형질전환체를 선발하였다. 표현형 분석은 적어도 20개의 야생형 식물과 과발현된 *BrARP1* 또는 *BrDRM1*의 세 개의 독립적인 유전자도입 애기장대 계통과 함께 수행되었다. 분석은 3개월 간격으로 세 차례 수행되었다.

[0101] **<3-2> *ARP1* 및 *DRM1* 낙아웃 벡터 및 형질전환체 제작**

[0102] 본 발명자들은 *ARP1* 및 *DRM1* 유전자가 낙아웃 되었을 때의 효과를 확인하기 위하여 애기장대에서 *AtARP1* 및 *AtDRM1* 유전자를 낙아웃시켰다.

[0103] 구체적으로, Silence *AtDRM1* 발현을 위해 pSKint 벡터 내 정반대 방향에서 *AtDRM1* cDNA의 동일한 두 개 절편을 삽입하여 RNAi 복합체를 제작하였다. *AtDRM1* cDNA에서 PCR 산물의 5' 말단에 *Xho*I 또는 *Sal*I 중 하나 및 3'

말단에 *Spe*I 또는 *Pst*I 중 하나의 사이트가 추가된 프라이머를 이용하여 *AtDRM1* cDNA의 399 bp 절편이 증폭되었다. PCR 산물은 *Xho*I나 *Sal*I 중 하나 또는 *Spe*I 중 *Pst*I 하나로 절단되어 pSKint로 클로닝되었다. 그 결과 생성된 *AtDRM1*-RNAi 절편 결과물이 방출되었고 바이너리 벡터 pBA002의 *Xho*I 및 *Spe*I 자리로 서브클로닝되었다. 최종 산물은 아그로박테리움(*A. tumefaciens* GV3101 균주)으로 옮겨졌으며, 꽃 침지법으로 애기장대에 형질전환되었다. 14개의 형질변환체 중 세 개는 *AtDRM1* RNA 발현이 명확하게 감소되었다. 이 중 *AtDRM1* RNA 발현이 가장 낮은 계통이 실험에 이용되었다. 이와 같은 과정으로 *AtARP1* 유전자가 낙아웃된 형질전환 애기장대를 제작하였다.

[0104] 또한, *arp1/drm1* 이중-낙아웃 계통은 동형의 *arp1*(수)와 *drm1*(암)을 교배하여 제작하였다. 교배로 얻어진 종자는 $F_1$을 얻기까지 발아되고 생장되었다. $F_1$ 세대는 자가-수정되었으며, $F_2$ 식물은 바스타(Basta) 스프레이를 이용하여 선발되었다. 바스타(Basta)-저항성을 가지는 92개의 $F_2$ 세대 식물로부터 DNA가 추출되었다. 모든 *arp1/drm1* 이중 유전자제거 계통과 Col-0 계통은 *AtARP1* 및 *AtDRM1* 전사체의 존재여부를 측정을 위해 RT-PCR로 분석하여 낙아웃 애기장대를 선별하였다.

[0105] **<실시예 4> *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대 및 *ARP1* 및 *DRM1* 유전자 낙아웃 애기장대의 표현형 분석**

[0106] **<4-1> *ARP1* 및 *DRM1* 낙아웃 애기장대의 표현형 확인**

[0107] 본 발명자들은 애기장대 내부의 *ARP1* 및 *DRM1* 유전자가 낙아웃된 형질전환체의 표현형을 확인하였다.

[0108] 구체적으로, 애기장대에서 *ARP1* 및 *DRM1* 유전자를 제거한 낙아웃 돌연변이 (*arp1*, *drm1* 및 *arp1*/*drm1*) 모두 야생형 식물과 비슷한 표현형을 가졌다 (도 5A), 이는 최대 크기가 증가되지도 생장률이 가속화되지도 않는 생장-저지 단백질의 제거를 나타낸다. 생장률이나 최종 식물크기 중 하나와 두 가지 단백질(ARP, DRM1) 수준 간의 관계를 분명히 하기 위해, 표현형 분석을 위한 좋은 견본인. 5 번째 잎의 생장 확인을 위해 잎 길이, 잎자루 길이, 엽신 길이 및 잎의 표피세포 크기가 42 일째에 측정되었다. 5 주(35일) 후, 잎 생장은 모든 식물에서 정지 단계에 도달되었다. *ARP1* 및 *DRM1* 유전자 낙아웃 애기장대는 생장이 가속화되지 않고 그들의 야생형과 유사한 생장을 보였다 (도 5C).

[0109] 따라서, 두 단백질이 존재하면 브레이크와 같은 효과가 있으나, 제거하면 다시 원래와 같이 돌아가므로, 두 단백질 모두가 식물 생장률과 최종 크기 상에서 “제동 효과(braking effect)”와 관련되어 있는 것으로 판단된다.

[0110] **<4-2> *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대의 생장 확인**

[0111] 본 발명자들은 *BrARP1* 및 *BrDRM1*를 과발현하는 형질전환 애기장대의 생장을 확인하였다.

[0112] 구체적으로, *BrARP1*-과발현 및 *BrDRM1*-과발현 애기장대 식물체의 전반적인 생장이 지연되었으며, 시간이 지남에 따라 더 감소되었다. 이중 과발현체는 생장감소에 추가적인 효과를 일으켰다. 꽃종서기(bolting) 시간은 크게 다르지 않았고, 그 결과 꽃종서기에서 잎의 전체 수는 *BrARP1*-과발현 및 *BrDRM1*-과발현 식물에서 더 적었다. 한번 꽃종서기가 시작되면 신장은 *BrDRM1*-과발현 식물에서 크게 저지되었다 (도 5a의 *35S::BrARP1*, *35S::BrDRM1* 및 *35S::BrARP1/35S::BrDRM1*). 곁가지(lateral shoot) 수; 실리크(silique)의 수 및 길이; 실리크 당 씨앗의 수; 및 씨앗의 무게가 과발현 애기장대에서 훨씬 더 감소하였다. 그 중, 실리크의 길이 및 최종 수가 각각 30% 및 20%로 가장 크게 감소되었다. 식물 당 씨앗의 수 또한 과발현 애기장대에서 24 내지 28%로 감소되었다 (표 3). 이러한 데이터는 *BrARP1* 또는 *BrDRM1*의 과발현이 식물의 생장 및 생식 생장 모두를 감소시킨다는 것을 의미한다.

표 3

[0113]

| Measurement | Wild-type | *35S::BrARP1* | | | *35S::BrDRM1* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | #1 | #2 | #3 | #1 | #2 | #3 |
| Length of primary shoot (cm)[a] | 36.7 ± 0.9 | 31.5 ± 1.0 | 31.2 ± 0.9 | 32.7 ± 1.0 | 30.8 ± 1.1 | 31.2 ± 1.3 | 31.0 ± 1.1 |
| No. of lateral shoots[a] | 6.0 ± 0.3 | 5.3 ± 0.2 | 5.4 ± 0.2 | 5.3 ± 0.3 | 5.2 ± 0.3 | 5.2 ± 0.4 | 5.3 ± 0.3 |
| Total no. of leaves[a] | 11.3 ± 1.2 | 10.7 ± 1.0 | 10.5 ± 0.9 | 10.8 ± 0.9 | 10.2 ± 0.9 | 10.7 ± 1.0 | 10.8 ± 0.9 |
| Length of mature silique (cm)[b] | 1.5 ± 0.1 | 1.2 ± 0.1 | 1.2 ± 0.1 | 1.1 ± 0.2 | 1.2 ± 0.1 | 1.1 ± 0.1 | 1.1 ± 0.1 |
| No. of seeds per silique[b] | 58 ± 6 | 53 ± 4 | 54 ± 5 | 52 ± 4 | 53 ± 7 | 52 ± 5 | 51 ± 5 |
| Final no. of siliques[a] | 112 ± 17 | 93 ± 11 | 92 ± 10 | 93 ± 10 | 93 ± 13 | 92 ± 10 | 92 ± 13 |
| Weight of 150 seeds (mg) | 12.8 ± 0.8 | 12.4 ± 0.5 | 12.5 ± 0.6 | 12.5 ± 0.8 | 11.3 ± 0.7 | 11.2 ± 0.5 | 11.6 ± 0.8 |
| No. of seeds per plant | 6,496 ± 294 | 4,929 ± 246 | 4,968 ± 248 | 4,836 ± 241 | 4,929 ± 246 | 4,784 ± 239 | 4,692 ± 234 |

*SD* standard deviation

[0114] [a] 데이터는 식물의 성숙기에 기록되었다. 결과는 ± SD로 나타냈다(n=20).

[0115] [b] 결과는 ± SD로 나타냈다(n=20). 측정은 5개의 실리크/식물에서 이루어졌다(n=10).

[0116] **<4-3> *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대의 잎 생장 측정**

[0117] 본 발명자들은 *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대의 생장을 잎에서 측정하였다.

[0118] 구체적으로, 식물체는 2.5-inch 화분에서 장일(16-h 명/8-h 암) 조건에서 30 일간 배양되었다. 형질전환체의 잎의 생장을 확인하기 위해 화분에서 5 번째 잎 생장(잎 길이, 잎자루 길이, 엽신 길이, 표피세포 크기)이 42 일째에 측정되었다.

[0119] 그 결과, BrARP1, BrDRM1 또는 모두의 양적 증가는 발달의 처음부터 최종 단계까지 동안 잎 생장에서 감소를 일으키고, 그 결과로 최종 크기가 감소되었다. 이런 감소는 *BrARP1*-과발현체 보다 *BrDRM1*-과발현체에서 더 크고, 두 유전자 모두의 과발현은 상승적인 효과를 보여주었다 (도 5B 및 C). 잎의 길이, 폭, 무게, 면적은 형질전환 애기장대 식물체에서 11 내지 59%까지 감소되었다. 잎자루 길이는 *BrARP1* 과발현 애기장대 식물에서 44% 및 *BrDRM1* 과발현 애기장대에서 111% 감소되었다 (도 5C 및 표 4).

표 4

[0120]

| Measurement | Wild-type | *35S::BrARP1* | | | *35S::BrDRM1* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | #1 | #2 | #3 | #1 | #2 | #3 |
| Length of leaf blade (cm)[a] | 1.6 ± 0.3 | 1.2 ± 0.3 | 1.1 ± 0.3 | 1.2 ± 0.2 | 1.1 ± 0.2 | 1.0 ± 0.3 | 1.1 ± 0.1 |
| Width of leaf blade (cm)[a] | 0.9 ± 0.2 | 0.8 ± 0.2 | 0.7 ± 0.3 | 0.8 ± 0.2 | 0.7 ± 0.2 | 0.6 ± 0.2 | 0.7 ± 0.1 |
| Length of petiole (cm)[a] | 1.2 ± 0.3 | 0.8 ± 0.3 | 0.9 ± 0.2 | 0.8 ± 0.1 | 0.6 ± 0.2 | 0.5 ± 0.3 | 0.6 ± 0.3 |
| Weight of leaf (mg)[a] | 107.4 ± 4.8 | 95.8 ± 4.0 | 97.2 ± 4.6 | 96.8 ± 4.2 | 91.7 ± 4.1 | 90.8 ± 4.5 | 91.5 ± 3.7 |
| Average epidermal cell area ($\times 10^{-3}$ mm$^2$)[b] | 2.1 ± 0.2 | 1.8 ± 0.1 | 1.9 ± 0.2 | 1.8 ± 0.1 | 1.8 ± 0.1 | 1.7 ± 0.1 | 1.7 ± 0.2 |

[0121] SD: 표준편차.

[0122] [a] 측정은 5 번째 좌엽에서 이루어졌다. 결과는 ± SD로 나타냈다(n=20).

[0123] [b] 측정은 5개의 식출체 5 번째 좌엽의 30개 표피 세포로부터 이루어졌다.

[0124] **<4-4> *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대의 세포 크기 확인**

[0125] 본 발명자들은 형질전환체의 세포 크기를 확인하였다.

[0126] 구체적으로, 각 형질전환체의 5번째 좌엽(rosette) 2 내지 3 개를 절단한 뒤, 부착점과 끝단 사이 잎의 중심 반지점에서 적어도 5 개의 표피 조직을 수득하였다. 수득한 표피 조직을 현미경용 슬라이드와 커버 상에 놓아 관찰하였다. 잎 면적과 배축 세포 면적은 공유된 NIH Image 1.61 program (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 측정되었다. 실험은 세 차례 반복되었고, 데이터는 합쳐졌다.

[0127] 그 결과, 표피세포 크기는 *BrARP1*-과발현 애기장대에서 13% 및 *BrDRM1*-과발현 애기장대에서 18% 감소된 것으로 관찰되었다 (표 4).

[0128] **<4-5> *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대의 뿌리 생장 측정**

[0129] 본 발명자들은 *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대의 생장을 뿌리에서 측정하였다.

[0130] 구체적으로, 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석을 이용하여 *BrARP1* 및 *BrDRM1*와 애기장대의 내재성 유전자인 *AtARP1*, *AtDRM1* 및 *AtACT1*의 발현을 확인하기 위하여, 전체 RNAs를 TriZol 시약을 이용하여 어린 형질전환 애기장대로부터 추출하였으며, 애기장대 액틴 유전자(애기장대 actin gene; *AtACT1*)를 로딩(loading) 대조군으로서 사용하였다. 표 2에 기재된 프라이머 (서열번호 15 내지 24)를 이용하여 Access Reverse Transcription-PCR System(Promega, WI, USA)에 따라 45 ℃ 에서 30 분, 그 다음 94 ℃에서 5 분; 25 주기(cycle)로 94 ℃ 에서 30 초, 55 ℃ 에서 30 초, 72 ℃ 에서 1 분을 반복하고, 마지막으로 72 ℃ 에서 7 분간 연장(extension)시키는 조건으로 RT-PCR을 수행하였다.

[0131] 또한, 형질전환체의 뿌리 생장 측정을 위해 씨앗은 위에 기재된 M5 배지에서 뿌려졌다. 3 일간 냉 처리 후에, 플레이트는 생장실 내에 수직으로 놓여졌고, 뿌리 생장은 4일 된 식물에서 측정되었다.

[0132] 그 결과, 뿌리 생장은 BrARP1 및 BrDRM1-과발현 애기장대 식물 모두에서 50% 이상 감소되었고 (도 6A 및 B), 감소는 BrARP1 및 BrDRM1 발현 수준에서 증가와 상관관계가 있었으며 (도 6C), 이는 BrARP1 및 BrDRM1가 애기장대 식물체에서 기능성이 있다는 것을 시사하는 것이다.

[0133] **<4-6> *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대의 배축 생장 측정**

[0134] 본 발명자들은 *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대의 생장을 배축에서 측정하였다.

[0135] 구체적으로, 형질전환 애기장대의 배축 길이의 측정은 나프탈렌 아세트산(NAA)을 사용하거나 하지 않고; 4 ℃에서 3일 동안 냉-처리; 암조건 22 ℃에서 4 일간 적응한 MS 배지 상에서 씨를 고르게 편 후에 수행되었다. 배축 길이는 ImageJ 1.40 software (NIH-Image; http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html)를 통해 직접적으로 측정되었다.

[0136] 그 결과, 배축 신장은 BrARP1 및 BrDRM1-과발현 식물체 내에서 암조건으로 생장할 때 37 내지 40%까지 역시 감소되었고, 이런 억제는 NAA의 존재 하에서 더욱 급격하게 나타났다 (도 7). 이러한 결과는 BrARP1 및 BrDRM1 모두는 배축 신장을 저지 한다는 것을 의미한다.

[0137] 따라서, *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 중 하나의 과발현이 잎의 생장을 저지한다는 것을 나타내고, 이것은 세포 신장의 억제나 세포 팽창의 감소가 이유일 것으로 판단된다.

[0138] **<4-7> *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대의 씨앗 발아 확인**

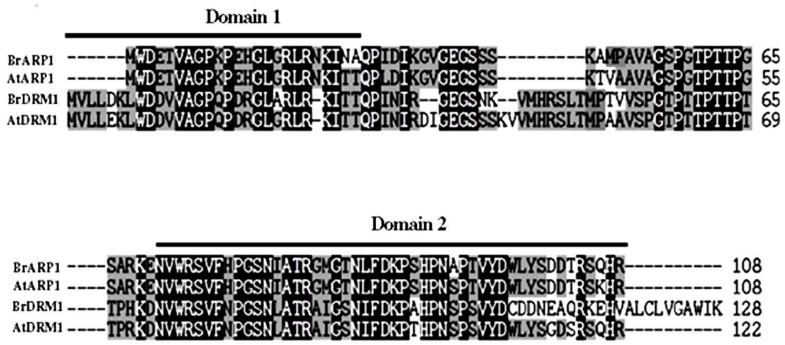
[0139] 본 발명자들은 *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대의 씨앗 발아 특성을 확인하였다.

[0140] 구체적으로, *BrARP1* 또는 *BrDRM1* 과발현 애기장대(35S::*BrARP1* 및 35S::*BrDRM1*)의 씨앗은 동일한 조건 하에서 생장하였고, 같은 시간에 수집되었다. 균일한 씨는 MS 배지가 있는 페트리 디쉬(Petri dish) 상에 둘러졌다. 플레이트는 4 ℃ 에서 3일 동안 냉장되었고, 그 후 암조건에서 22 ℃ 생장실로 이동되었다. 씨앗 발아의 비율은 흡수가 끝난 후 4일에 기록되었다. 발아는 종피를 통과해서 어린 뿌리가 명확히 눈에 보이게 발생하는 것으로 정의되었다.

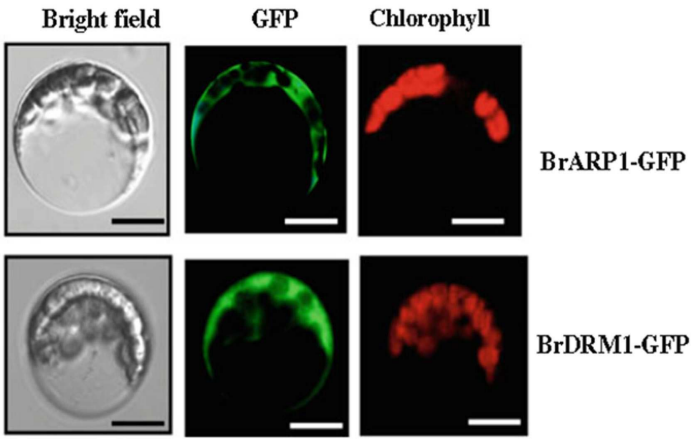
[0141] 그 결과, 씨앗 발아는 35S::*BrARP1*과 35S::*BrDRM1* 애기장대 식물체 모두에서 지연되었으나, *BrDRM1*-과발현체에서 더 길게 지연되었다 (도 8).

## 도면

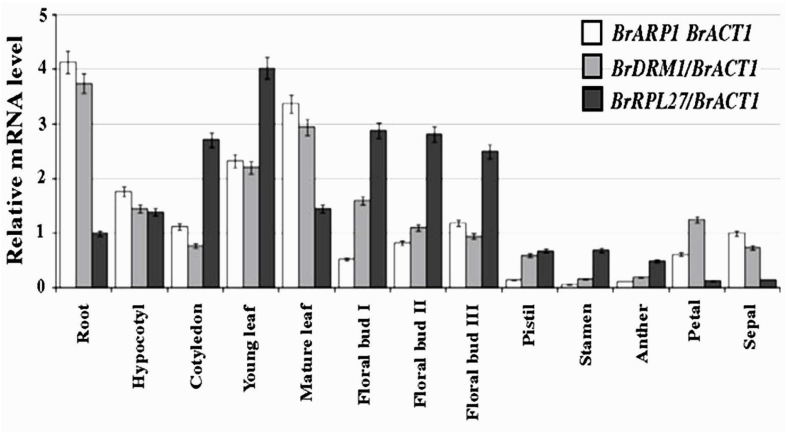
### 도면1a



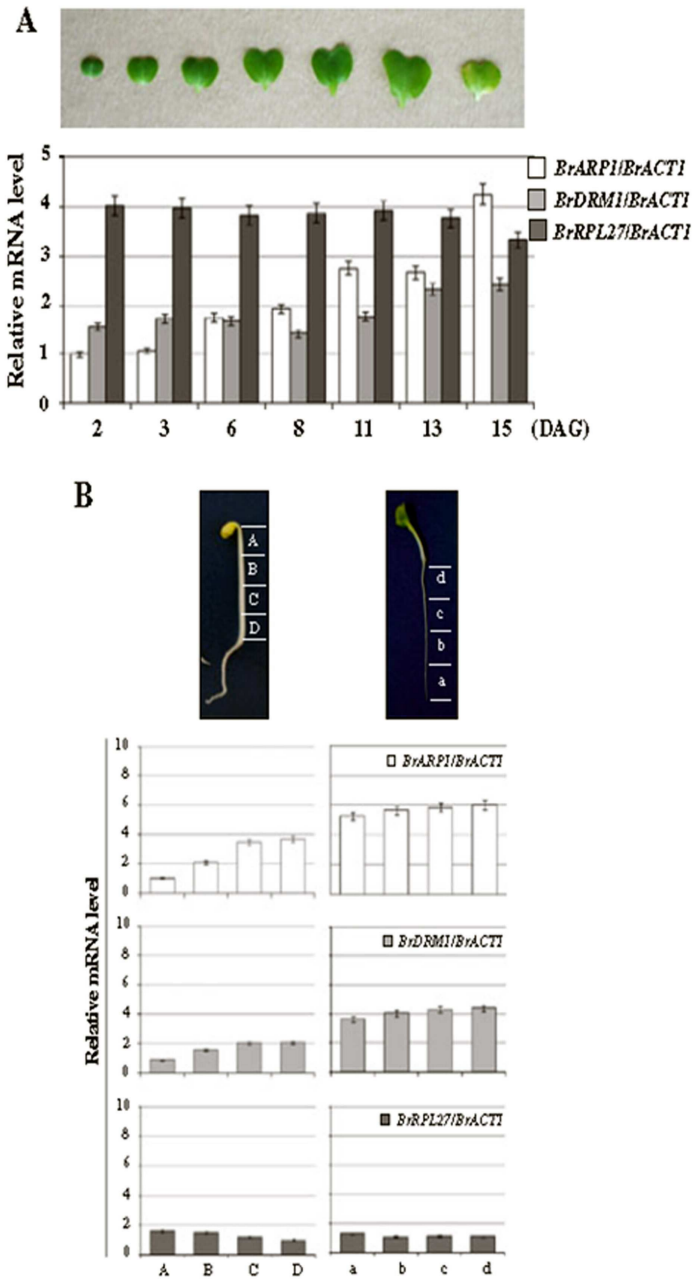

### 도면1b



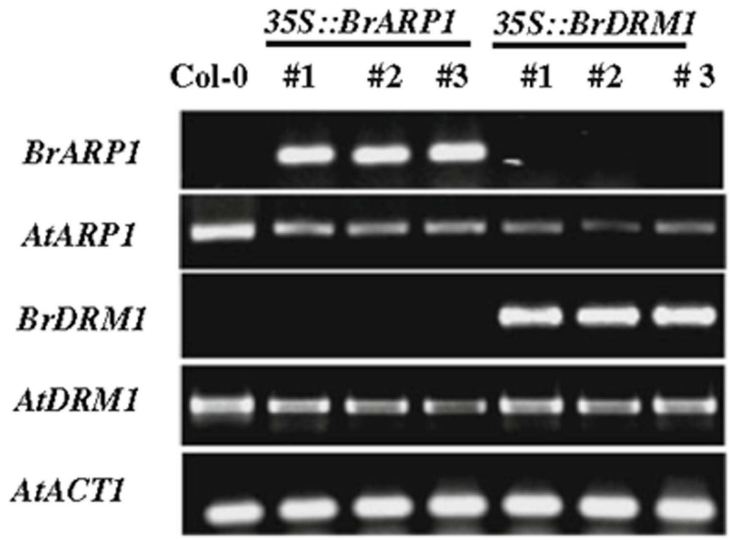
도면2


Relative mRNA level
0
1
2
3
4
5
BrARP1 BrACT1
BrDRM1/BrACT1
BrRPL27/BrACT1
Root
Hypocotyl
Cotyledon
Young leaf
Mature leaf
Floral bud I
Floral bud II
Floral bud III
Pistil
Stamen
Anther
Petal
Sepal

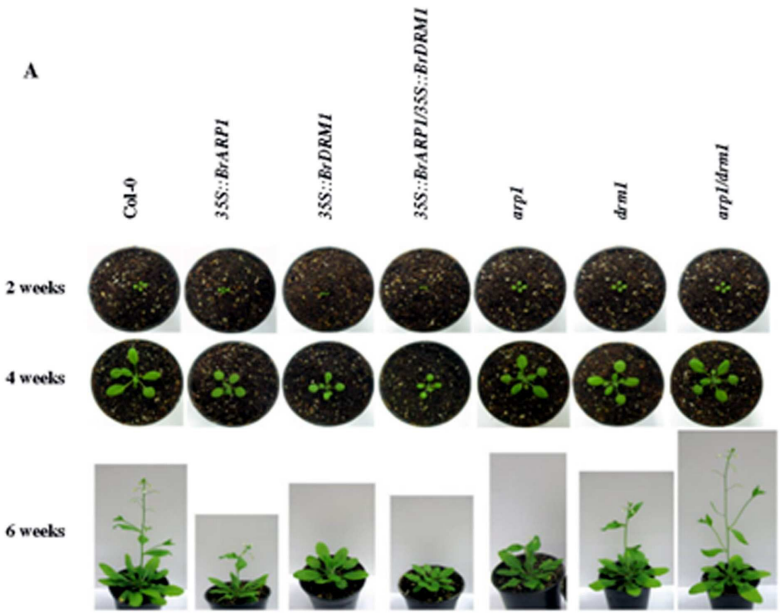
도면3


A
Relative mRNA level
BrARP1/BrACT1
BrDRM1/BrACT1
BrRPL27/BrACT1
2 3 6 8 11 13 15 (DAG)
B
A
B
C
D
d
c
b
a
Relative mRNA level
BrARP1/BrACT1
BrDRM1/BrACT1
BrRPL27/BrACT1
A B C D a b c d

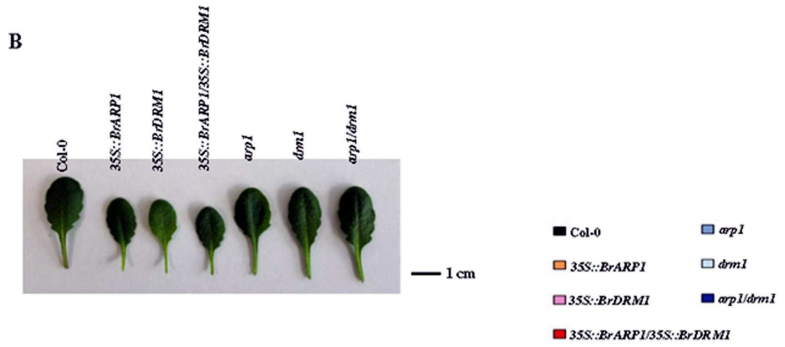
도면4


35S::BrARP1
35S::BrDRM1
Col-0
#1
#2
#3
#1
#2
# 3
BrARP1
AtARP1
BrDRM1
AtDRM1
AtACT1

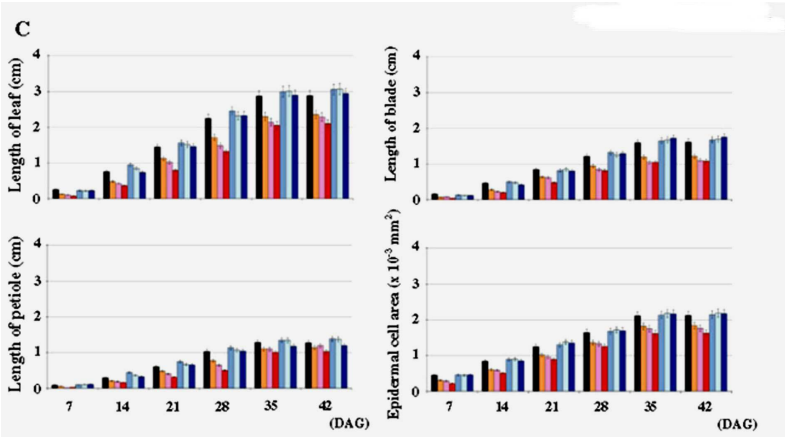
도면5a


A
Col-0
35S::BrARP1
35S::BrDRM1
35S::BrARP1/35S::BrDRM1
arp1
drm1
arp1/drm1
2 weeks
4 weeks
6 weeks

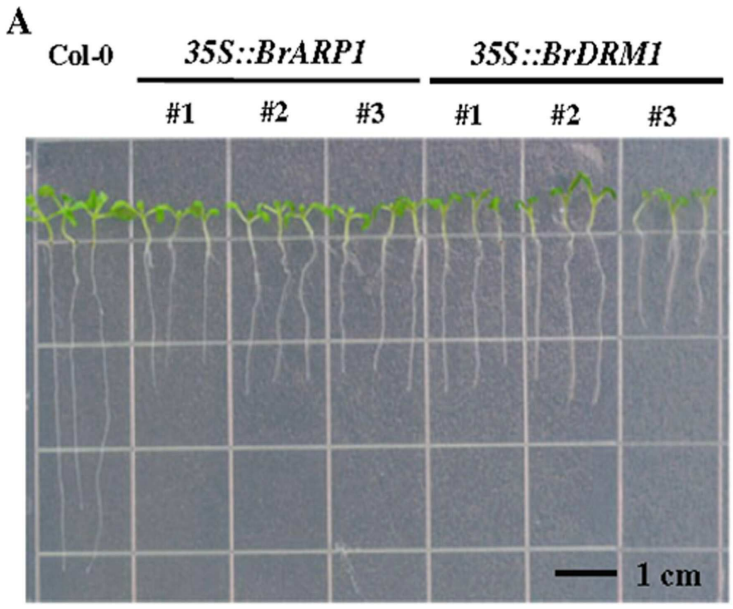
도면5b



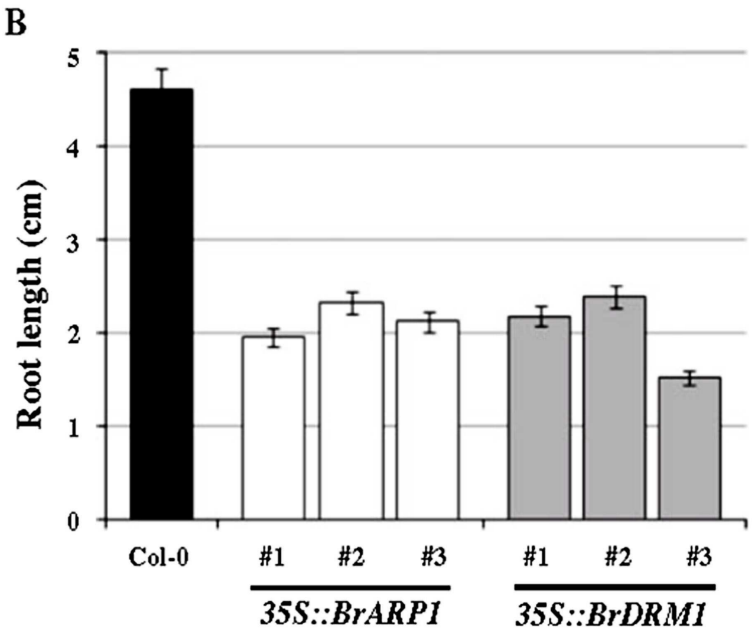

도면5c



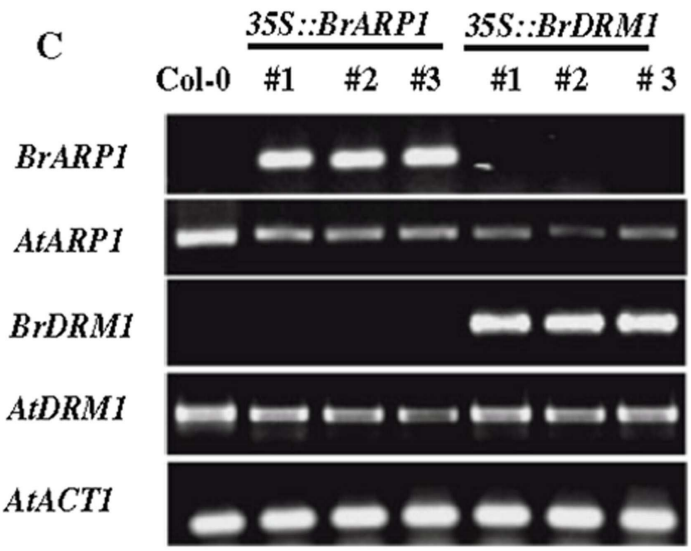

도면6a



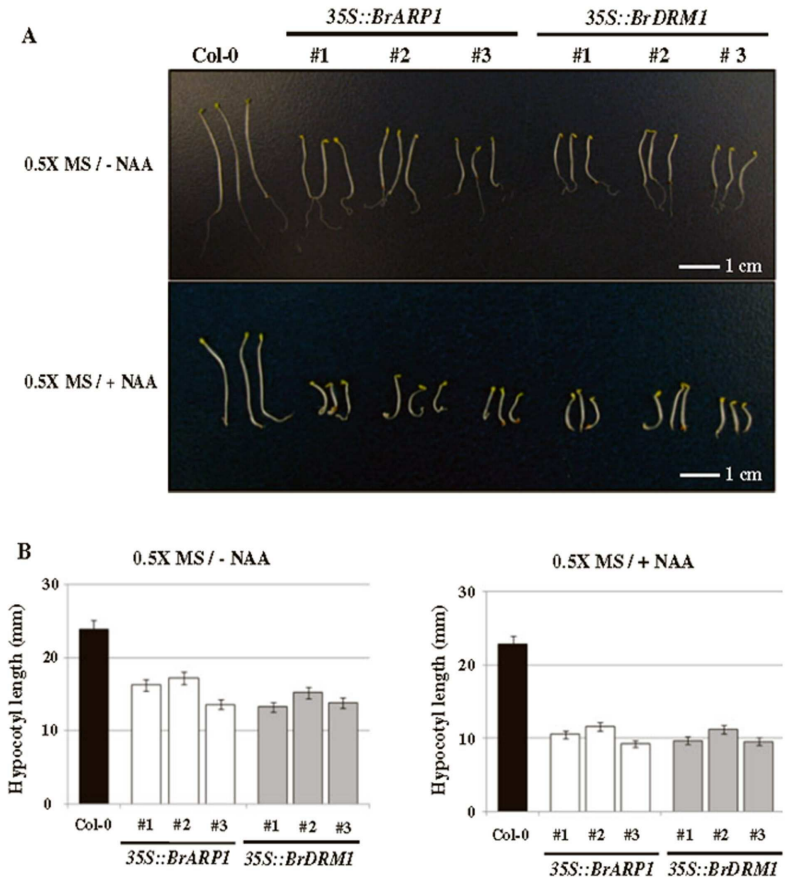
도면6b


B
Root length (cm)
0
1
2
3
4
5
Col-0
#1
#2
#3
#1
#2
#3
35S::BrARP1
35S::BrDRM1

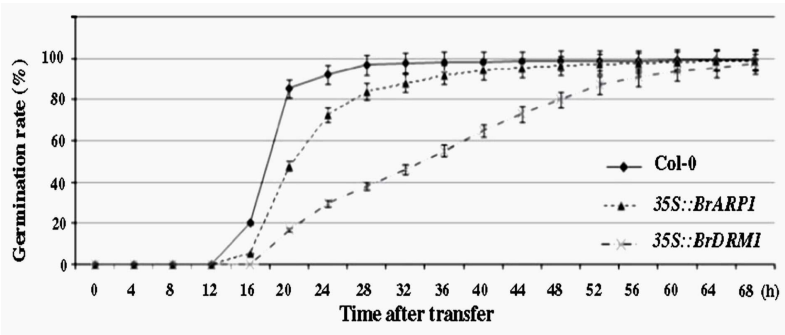
도면6c


C
35S::BrARP1
35S::BrDRM1
Col-0
#1
#2
#3
#1
#2
# 3
BrARP1
AtARP1
BrDRM1
AtDRM1
AtACT1

도면7




도면8




## 서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Auxin-repressed gene of Brassica rapa and their uses

<130> p130089

<160> 28

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 597

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 1

atggcgattg caacatccat gagtttgaat ctaattggag cattcaaagg cctatccctc 60

tcttcaacct cgtctttcct aagaggcgat ttgaatctaa acccaaaaac ctccttcact 120

gtgacactcc ctttggaaaa actccaagct ccggttccat tgacgattga atctgcgcac 180

aagaaaggag ccggtagtac taagaacggt cgtgattctc cgggacaaag actcggcgtc 240

aagatttacg gtgaccaagt cgctaaacca ggggccatca tcgttcgtca acgtggcact 300

aagttccatg ctggaaagaa cgttgggatt ggtaaagatc ataccatctt ctctttaatc 360

gatgggttag tcaagttcga gaagtttggt cccgacagga agaagattag tgtgtaccca 420

agggaaattg tgccagagaa tcccaacagt tacagggcaa gaaagagaga agcttttaga 480

gtgcaaaggg agaagaagaa ggccagacgc gagaactaca cttacacact tcctacccct 540

gagcttgttc ttgcatctgc tacggtcgat gatgaggaaa ccaatgccga ttgctga 597

<210> 2

<211> 387

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 2

atggttctgc tagataagct ttgggatgat gttgttgccg gacctcaacc tgaccgtggc 60

ctagcccgcc tccgtaaaat caccacccaa cccattaata tcagaggaga aggaagcaac 120

aaggtgatgc ataggtcgtt gactatgccg acggtagtga gccccggaac tccaactact 180

ccgaccactc cgacaacgcc acataaggat aacgtgtgga ggagcgtctt taatcctgga 240

agcaatctcg ccacaagagc catcggctcc aacatctttg ataaaccagc ccacccaaat 300

tctccatccg tctacgactg cgatgataac gaagctcaaa ggaaggaaca cgtggcactg 360

tgtttagtag gcgcgtggat taaatga 387

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrARP1-GFP forward primer

<400> 3

cgtacggatc catgtgggat ga 22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrARP1-GFP reverse primer

<400> 4

ggttcggatc cacggtgctg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrDRM1-GFP forward primer

<400> 5

ggttcggatc cacggtgctg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrDRM1-GFP reverse primer

<400> 6

cggcggatcc tttaatccac 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrARP1 qRT-PCR forward primer

<400> 7

agtaacatcg ccaccagagg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrARP1 qRT-PCR reverse primer

<400> 8

tcgtcgctgt acaaccagtc 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrDRM1 qRT-PCR forward primer

<400> 9

cgtaaaatca ccacccaacc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrDRM1 qRT-PCR reverse primer

<400> 10

gtcggcatag tcaacgacct 20

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrRPL27 qRT-PCR forward primer

<400> 11

agttcgagaa gtttggtccc gaca 24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrRPL27 qRT-PCR reverse primer

<400> 12

tcgaccgtag cagatgcaag aaca 24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrACT1 qRT-PCR forward primer

<400> 13

acaccatgat gtcttggcct acca 24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrACT1 qRT-PCR reverse primer

<400> 14

aatggtaccg gaatggtcaa ggct 24

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrARP1 RT-PCR forward primer

<400> 15

ctaagccgga gcatggcctt 20

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrARP1 RT-PCR reverse primer

<400> 16

ggcatgtcac tccttcctct cgat 24

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrDRM1 RT-PCR forward primer

<400> 17

ggataacgtg tggaggagcg tc 22

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BrDRM1 RT-PCR reverse primer

<400> 18

gactcaacct ctccacttgc aagttac 27

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtARP1 RT-PCR forward primer

<400> 19

ctaagccgga gcatggcctt 20

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtARP1 RT-PCR reverse primer

<400> 20

cggcgacatg aagcaaataa aag 23

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtDRM1 RT-PCR forward primer

<400> 21

ggataacgtg tggaggagcg tc 22

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtDRM1 RT-PCR reverse primer

<400> 22

ctgtcttccc acctaagcaa tgtg 24

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AACT1 RT-PCR forward primer

<400> 23

gtcttgacct tgctggacgt ga 22

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AACT1 RT-PCR reverse primer

<400> 24

cctttcaggt ggtgcaacga c 21

<210> 25

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 35S::BrARP1 forward primer

<400> 25

gggctgcagg aattc 15

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 35S::BrARP1 reverse primer

<400> 26

caggtcacca ctcactatag ggcgaat 27

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 35S::BrDRM1 forward primer

<400> 27

cggcggatcc ataaaatggt tc 22

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 35S::BrDRM1 reverse primer

<400> 28

gcccgtctag agggttttca ttt 23