



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0137538

(43) 공개일자 2015년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0065566

(22) 출원일자 2014년05월30일

심사청구일자 2014년05월30일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

정인식

서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 109동 1102호 (도곡동, 삼성래미안아파트)

박중화

서울특별시 송파구 성내천로6길 9-12, 302호 (오금동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

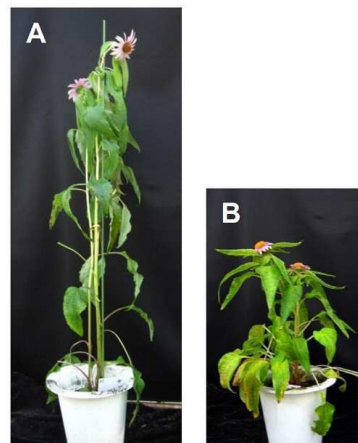
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **형질전환 난쟁이 식물**

(57) 요약

본 발명은 난쟁이 식물을 제조하기 위한 RNA 간섭 재조합 벡터 및 이에 의해 형질전환된 난쟁이 식물체에 관한 것이다. 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터를 이용하면 물을 덜 소비하고 바람과 강우 피해에 강한 난쟁이 식물체를 제조할 수 있다. 이러한 난쟁이 식물체는 기후 변화에 강하고 꽃과 과일 생산에 에너지를 집중하여 생산성이 높다. 또한 키가 작고 꽃이 작아 화단용, 절화용, 조경용, 분화용으로 적합하다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

이윤형

서울특별시 서초구 서운로 62, 7동 702호 (서초동,
우성아파트)

최근원

경기도 용인시 기흥구 사은로 274-22, 113동 601호
(지곡동, 자봉마을써니벨리아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 112019-5

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물식품기술기획평가원

연구사업명 생명산업기술개발사업

연구과제명 난쟁이 표현형 유전자 발현 억제 방법을 이용한 관상용 난쟁이 형질전환 식물 개발 및 산
업적 응용

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.08.10 ~ 2014.08.09

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 기재되는 서열의 전부 또는 일부의 센스 서열 및 상기 센스 서열에 대한 안티센스 서열을 포함하는, 식물의 CPD(*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) 유전자에 대한 RNA 간섭 재조합 벡터.

청구항 2

서열번호 2의 센스 서열 및 서열번호 2에 대한 안티센스 서열을 포함하는, 식물의 CPD(*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) 유전자에 대한 RNA 간섭 재조합 벡터.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 센스 서열 및 안티센스 서열은 스페이서를 사이에 두고 서로 역방향이 되도록 배치되고, 상기 RNA 간섭 재조합 벡터는 선별마커, 프로모터, 및 터미네이터를 더 포함하는, 식물의 CPD(*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) 유전자에 대한 RNA 간섭 재조합 벡터.

청구항 4

서열번호 2의 센스 서열, 서열번호 2에 대한 안티센스 서열, BAR 유전자 선별마커, CaMV35S 프로모터, CHSA 인트론, 및 옥토파인 신타제 터미네이터를 포함하고, 상기 서열번호 2의 센스 서열 및 안티센스 서열은 CHSA 인트론을 사이에 두고 서로 역방향이 되도록 배치된, 식물의 CPD(*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) 유전자에 대한 RNA 간섭 재조합 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 RNA 간섭 재조합 벡터를 포함하는 식물의 왜화 유도용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 식물은 국화과에 속하는 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 RNA 간섭 재조합 벡터로 형질전환된 미생물.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 RNA 간섭 재조합 벡터로 형질전환된 난쟁이 식물체.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 RNA 간섭 재조합 벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 난쟁이 식물체의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 난쟁이 식물을 제조하기 위한 RNA 간섭 재조합 벡터 및 이에 의해 형질전환된 난쟁이 식물체에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

2008년 조사에 의하면 전세계 화훼산업 분야의 시장 규모는 연간 약 26조원 정도이며, 경제 발전에 따라 꾸준히

성장해 왔다.

[0003] 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. 화훼 농가의 수도 1980년 불과 2733호로 집계되었던 것이 2012년 기준 9450호로 집계되어 32년만에 약 5배로 증가하였다. 1991년에는 양재동에 2만 1000평 규모의 한국농수산식품유통공사 aT 화훼공판장이 문을 열었고, 그 외에 서울고속버스터미널 꽃 도매상가, 구과발 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 생산성이 높은 신품종의 개발이 시급한 상황인데, 이러한 상황에 대한 해법이 될 수 있는 것이 바로 난쟁이 식물의 개발이다. 난쟁이 식물은 정상 크기의 식물에 비해서 바람과 강우 피해 및 병해충에 대한 피해에도 더 강한 경향이 있다. 또한 물을 덜 소비할 뿐 아니라 줄기나 잎을 만드는 대신 종자나 과일을 만드는 데 더 많은 비율의 에너지를 투자하여 생산성이 높은 것으로 알려져 있다. 그리고 실내의 유휴 공간을 꾸밀 수 있는 관상 식물로서도 가치가 높다.

[0006] 현재까지는 난쟁이 식물을 만들기 위해 주로 적심을 통해 줄기생장을 억제하거나 왜화제를 이용하는 방법이 이용되어 왔다. 이 중 왜화제를 이용하는 방법이 가장 용이하여 여러 작물에 적용되고 있으나, 왜화제로 널리 사용되는 트리아졸계 농약은 환경오염을 야기하고 식물 및 이를 섭취한 동물에게 생리장해를 유발할 위험이 있다는 단점이 있다. 따라서 환경오염이나 생리장해의 위험이 없는 식물의 왜화 방법의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 난쟁이 식물 제조를 위한 RNA 간섭 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 이용하여 난쟁이 식물을 제조하는 방법 및 형질전환된 난쟁이 식물을 제공함을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 서열을 포함하는 식물의 왜화 유도용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 서열의 전부 또는 일부의 센스 서열 및 상기 센스 서열에 대한 안티센스 서열을 포함하는, 식물의 CPD(*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) 유전자에 대한 RNA 간섭 재조합 벡터를 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 서열번호 2의 센스 서열 및 서열번호 2에 대한 안티센스 서열을 포함하는, 식물의 CPD(*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) 유전자에 대한 RNA 간섭 재조합 벡터를 제공한다.

[0011] 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터에서, 상기 센스 서열 및 안티센스 서열은 스페이서를 사이에 두고 서로 역방향이 되도록 배치되고, 상기 RNA 간섭 재조합 벡터는 선별마커, 프로모터, 및 터미네이터를 더 포함할 수 있다. 센스 서열과 안티센스 서열이 서로 역방향이 되도록 배치된다는 것은 센스 서열은 5'→3' 방향으로, 안티센스 서열은 3'→5' 방향으로 배치됨을 의미한다.

[0012] 본 발명은 서열번호 2의 센스 서열, 서열번호 2에 대한 안티센스 서열, BAR 유전자 선별마커, CaMV35S 프로모터, CHSA 인트론, 및 옥토파인 신타제 터미네이터를 포함하고, 상기 서열번호 2의 센스 서열 및 안티센스 서열은 CHSA 인트론을 사이에 두고 서로 역방향이 되도록 배치된, 식물의 CPD(*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) 유전자에 대한 RNA 간섭 재조합 벡터를 제공한다.

[0013] 상기 서열번호 1로 기재되는 서열은 본 발명자들이 에키네시아 퍼퓨레아(*Echinacea purpurea*)에서 분리하여 NCBI에 등록한 유전자로서(GeneBank accession number : KF170019), 23-알파-하이드록실라제 기능을 갖는다. 상기 유전자는 에키네시아 퍼퓨레아와 마찬가지로 국화과 초롱꽃목에 속하는 식물인 백일홍(*Zinnia elegans*)의

CPD 유전자(Genebank accession number AB231153)와 일부 상동성이 있는 것으로 확인되었다. 또한 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 cytochrome P450 90A1 유전자와도 관련성이 있는 것으로 확인되었다.

[0014] CPD 유전자는 DWARF3, DWF3 등으로도 지칭되며, 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터는 CPD 유전자의 발현을 억제하여 식물의 발달과 관련된 호르몬인 브라시노스테로이드의 생성을 억제함으로써 식물의 왜화를 유도한다.

[0015] 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터는 서열번호 1로 기재되는 서열의 전부 또는 일부에 대한 센스 서열 및 상기 센스 서열에 대한 안티센스 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 서열번호 1에 기재된 염기서열의 일부는 약 100 내지 약 500 bp 길이의 서열이 될 수 있다. 가장 바람직하게는 상기 서열번호 1에 기재된 염기서열의 일부는 서열번호 2로 기재되는 서열이 될 수 있다. 상기 서열번호 2로 기재되는 서열은 서열번호 1로 기재되는 서열의 5' 말단으로부터 1062 - 1473번째 염기에 해당하는 염기 부위(총 412 bp 길이)에 해당한다.

[0016] 또한 형질전환되는 식물체 내에서 발현되어 CPD mRNA와 결합하여 CPD 유전자의 발현을 저해할 수 있는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열의 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상기 변이체는 서열번호 1 또는 2의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함하며, 서열번호 1 또는 2의 염기서열의 대립유전자형 또는 중간 변이체, 또는 이의 단편들을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 겹)를 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명에서 '안티센스 서열'은 상기 센스 서열에 대한 상보적인 서열을 의미한다. 센스 서열과 안티센스 서열을 단일 사슬상에 배열함으로써 센스 서열과 안티센스 서열간에 수소결합에 의해 '스텝-루프(step-loop)' 구조가 형성되며 이중가닥 RNA(dsRNA)가 생성되는데, 이중가닥 RNA는 식물체내에 존재하는 다이서(dicer)라는 효소에 의해 절단되어 RNA 간섭 현상을 일으켜 식물체에서 CPD 유전자의 발현을 억제한다.

[0018] 본 발명에 있어서 '벡터'는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미한다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다.

[0019] 본 발명의 벡터는 식물에서 발현시키기 위한 식물 발현 벡터이며, 일 예로 Ti-플라스미드 벡터가 될 수 있다. 또한 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비환전성 식물 바이러스 벡터 역시 될 수 있다. 바람직하게는 좌측 경계(LB)와 우측 경계(RB) 사이에, 제조제 저항성을 가지는 BAR 유전자, CaMV35S 프로모터, 옥토파인 신타제(OCS) 터미네이터 및 CHSA 인트론을 포함하는 pFGC954 벡터가 될 수 있다. 그러나 벡터의 종류는 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명의 재조합 벡터에서 '스페이스(spacer)'는 스페이스 양쪽에 각각 존재하는 센스 서열 및 안티센스 서열이 수소 결합을 할 수 있는 한 어느 염기서열이라도 될 수 있으며, 그 길이는 특별히 제한되지 않지만, 통상적으로 1~10,000 bp 길이이다. 본 발명에 있어서 스페이스는 바람직하게는 CHSA 유전자(*penunia chalcone synthase A*)로부터 얻은 1,352 bp 인트론 ('CHSA 인트론')을 사용할 수 있다.

[0021] 본 발명의 재조합 벡터에서 '센스 서열-스페이스-안티센스 서열'은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 유전자 서열과 프로모터가 작동가능하게 연결되었다고 함은 프로모터 서열이 목적하는 유전자 서열의 전사를 지시할 수 있게 하는 방식으로 연결되었음을 의미한다. 본 발명에서 사용가능한 프로모터는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터로서, CaMV35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, 히스톤 프로모터 등이 있으며, 바람직하게는 CaMV35S 프로모터가 사용된다.

[0022] 본 발명의 재조합 벡터는 또한 형질전환이 일어났는지 여부를 확인할 수 있게 하는 '선별 마커'를 포함할 수 있다. '선별 마커'는 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자를 의미하며, 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열을 말한다. 선별 마커의 예로는 글리포세이트(glyphosate), 포스포노트리신과 같은 제조제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있다. 바람직하게는 본 발명의 재조합 벡터에 포함될 수 있는 선별 마커로는 제조제 저항성 유전자인 바스타 저항성(BAR) 유전자가 사용된다. BAR 유전자는 제조제인 바스타(glufosinate ammonium)에 대한 저항성을 부여한다.

- [0023] 또한 본 발명의 재조합 벡터는 전사를 종결시킬 수 있는 터미네이터를 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용가능한 터미네이터는 당업계에서 통상적으로 사용되는 터미네이터일 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으며, 바람직하게는 옥토파인 신타아제(OCS) 터미네이터가 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명은 상기 RNA 간섭 재조합 벡터를 포함하는 식물의 왜화 유도용 조성물을 제공한다. 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터에 의해 왜화가 유도된 식물은 초장(식물의 키)이 크게 감소하며, 또한 꽃의 크기가 감소하여 상품화 가치가 높은 꽃을 피우게 된다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 식물은 바람직하게는 국화과에 속하는 식물일 수 있으며, 예를 들어 백일홍, 에키네시아 퍼퓨레아, 코레옵시스(*Coreopsis rosea*), 달리아(*Dahlia pinnata*) 등이 될 수 있고, 가장 바람직하게는 에키네시아 퍼퓨레아가 될 수 있다. 그러나 식물의 종류는 이에 제한되지 않으며, 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터에 의해 CPD 유전자 발현이 저해되는 식물은 모두 포함된다.
- [0026] 상기 에키네시아 퍼퓨레아(*Echinacea purpurea*)는 초롱꽃목 국화과에 속하는 식물로서, 드린국화, 자주 루드베키아 등의 명칭으로도 불리며, 영어로는 coneflower라고도 종종 지칭된다. 에키네시아 퍼퓨레아는 그 초장이 1 ~ 1.7 m 내외로 키가 비교적 큰 초화류이며, 꽃이 아름다워 화단용 또는 절화용으로 이용되고 있고 국내외 수요가 점차 증가하는 추세에 있다.
- [0027] 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터에 의한 식물체의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및/또는 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다.
- [0029] 예를 들어, 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 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 바람직하게는 아그로박테리움 매개 DNA 전달 방법이 사용될 수 있다.
- [0030] 아그로박테리움 벡터에 의한 식물체의 형질전환을 위한 최적 절차는 형질전환될 식물체의 종류에 따라 다양하다. 아그로박테리움 매개 형질전환을 위한 대표적인 방법은 멸균된 묘목 및/또는 작은 식물체로부터 유래된, 배축, 정단(shoot tip), 줄기 또는 잎 조직의 외식편의 형질전환을 포함한다. 그와 같은 형질전환된 식물체는 유성생식으로 또는 세포 또는 조직 배양에 의해 번식될 수 있다. 아그로박테리움 매개 형질전환은 이전에 다수의 상이한 종류의 식물체를 위해 기재되었으며 그와 같은 형질전환을 위한 방법은 당업계에 공지된 문헌에서 찾을 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 사용가능한 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 이용되는 어떠한 균주라도 사용이 가능하다. 구체적으로 본 발명에서는, 식물시료에 침투하여 외래 유전자를 전달하는데 필요한 병원성이 큰 것으로 알려진 아그로박테리움 투메파시엔스, 더욱 바람직하게는, 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 유전자 pCambia 1300 플라스미드가 들어 있는 GV3101 계통의 아그로박테리움 투메파시엔스를 사용할 수 있다.
- [0032] 이에 본 발명은 본 발명은 상기 RNA 간섭 재조합 벡터로 형질전환된 미생물을 제공한다. 상기 미생물은 바람직하게는 아그로박테리움 투메파시엔스, 보다 바람직하게는 아그로박테리움 투메파시엔스 LBA4404 세포가 될 수 있다. 그러나 미생물의 종류는 이에 제한되지 않으며, 그 외의 박테리아, 예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 역시 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터로 형질전환될 수 있는 미생물에 해당한다. 한편 미생물에 대한 적당한 배양 배지 및 조건은 당업계에 공지되어 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 상기 RNA 재조합 벡터로 형질전환하는 것을 포함하는, 난쟁이 식물체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 있어서 '난쟁이 식물체'는 왜화가 유도되어 초장이 감소하고 꽃의 크기 역시 감소된 식물체를 의미한다.

[0034] 본 발명은 상기 RNA 간섭 재조합 벡터로 형질전환된 난쟁이 식물체를 제공한다. 상기 식물은 바람직하게는 국화과에 속하는 식물일 수 있으며, 예를 들어 백일홍, 에키네시아 퍼퓨레아, 코레옵시스(Coreopsis rosea), 달리아(Dahlia pinnata) 등이 될 수 있고, 가장 바람직하게는 에키네시아 퍼퓨레아가 될 수 있다. 그러나 식물의 종류는 이에 제한되지 않으며, 본 발명의 RNA 간섭 재조합벡터에 의해 CPD 유전자 발현이 저해되는 식물은 모두 포함된다.

[0035] 또한 본 발명은 상기 RNA 간섭 재조합 벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 난쟁이 식물체의 제조 방법을 제공한다. 상기 방법은 1) 상기 RNA 간섭 재조합 벡터로 미생물, 바람직하게는 아그로박테리움 투메파시엔스를 형질전환시키고, 2) 상기 미생물을 식물체에 감염시키는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0036] 본 발명을 이용하면 물을 덜 소비하고 바람과 강우 피해에 강한 난쟁이 식물체를 제조할 수 있다. 이러한 난쟁이 식물체는 기후 변화에 강하고 꽃과 과일 생산에 에너지를 집중하여 생산성이 높다. 또한 키가 작고 꽃이 작아 화단용, 절화용, 조경용, 분화용으로 적합하다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 에키네시아 퍼퓨레아 CPD 유전자의 전체 염기서열(서열번호 1)을 나타낸 도이다.

도 2의 A는 본 발명의 pFGC5941/shEpCPD RNA 간섭 재조합 벡터 구축에 사용된 에키네시아 퍼퓨레아 CPD 유전자의 5' 말단으로부터 1062~1473번째 염기에 해당하는 염기 부위(총 412 bp 길이, 서열번호 2)를 나타낸 도이고, 도 2는 본 발명의 pFGC5941/shEpCPD RNA 간섭 재조합 벡터의 구조를 나타낸 모식도이다.

도 3은 야생형 에키네시아 퍼퓨레아(A)와 에키네시아 퍼퓨레아 형질전환체(B)의 초장을 비교한 도이다.

도 4는 야생형 에키네시아 퍼퓨레아(A)와 에키네시아 퍼퓨레아 형질전환체(B, C)의 꽃 크기를 비교한 도이다.

도 5는 에키네시아 퍼퓨레아 형질전환체에서 pFGC5941/shEpCPD RNA 간섭 재조합 벡터의 도입 유무를 확인하기 위한 genomic PCR 결과를 나타낸 도이다(WT는 야생형, Tg는 에키네시아 퍼퓨레아 형질전환체를 의미).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0039] **실시예 1. RNA 간섭 재조합 벡터 제작**

[0040] **1-1. 에키네시아 퍼퓨레아 CPD 유전자의 분리**

[0041] 23-알파-하이드록실라제 기능을 갖는 에키네시아 퍼퓨레아의 CPD 유전자를 확인하고 유전자 정보를 NCBI(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록하였다(GeneBank accession number: KF170019). 상기 에키네시아 퍼퓨레아의 CPD 유전자는 서열번호 1로 기재하고, 도 1에 나타내었다.

[0042] **1-2. RNA 간섭 재조합 벡터 제작**

[0043] 서열번호 1의 에키네시아 퍼퓨레아 CPD 유전자의 5' 말단으로부터 1062~1473번째 염기에 해당하는 염기 부위(총 412 bp 길이, 서열번호 2로 기재)에 대해 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 상기 염기 부위에 대한 센스(sense) 서열 및 안티센스 서열을 각각 증폭하였다.

[0044] 각 프라이머는 제노텍(한국) 사에 의뢰하여 제작하였다. 상기 프라이머는 정방향은 AscI 및 SmaI의 제한효소 부위를 갖도록 하였고 역방향은 BamHI 및 XbaI의 제한효소 부위를 갖도록 디자인하였다.

[0045] PCR 조건은 전변성 94℃에서 5분, 변성 94℃에서 1분, 어닐링 55℃에서 1분, 신장 72℃에서 1분, 확장 72℃에서 10분간 총 30회 수행하였다.

[0046] [표 1]

PCR 산물		프라이머 서열 (5' → 3')
서열번호 2에 대한 센스 서열	정방향 (서열번호 3)	5' GGCGGCGGAAATTACAAAGAAAAAGGGTGC 3'
	역방향 (서열번호 4)	5' ATTAAATACCAACTTATCTTCTCTGC 3'
서열번호 2에 대한 안티센스 서열	정방향 (서열번호 5)	5' TCTAGAATACCAACTTATCTTCTCTGC 3'
	역방향 (서열번호 6)	5' CCCGGGCAAAATTACAAAGAAAAAGGGTGC 3'

[0047]

[0048]

상기 각 PCR 산물 3 μ l, 2X 반응 버퍼 5 μ l, pGEM-T 벡터(Promega, USA) 1 μ l와 T4 DNA 라이게이즈(ligase)를 이용하여 25℃에서 2시간동안 라이게이션한 후, E. coli DH5a에 첨가하여 42℃에서 90초 동안 heat shock을 주는 방법으로 형질전환시킨 다음, 이로부터 E. coli 플라스미드를 추출하였다(이하 서열번호 2에 대한 센스 서열이 삽입된 플라스미드를 pGEM-T-센스 CPD 벡터, 서열번호 2에 대한 안티센스 서열이 삽입된 플라스미드를 pGEM-T-안티센스 CPD 벡터로 지칭).

[0049]

pGEM-T-센스 CPD 벡터를 AscI 및 SmaI로 절단하여 서열번호 2에 대한 센스 서열을 준비하는 한편, CaMV35S(Cauliflower mosaic virus 35S) 프로모터, CHSA(chalcone synthase A) 인트론, OCS(octopine synthase) 3' 터미네이터(OCS 3')와 BAR(phosphinothricin acetyl transferase gene) 선별유전자를 지니는 RNA 간섭 벡터인 pFGC5941 벡터 (식물 내 이중가닥 RNA 제조를 위한 이원 벡터 (http://www.chromdb.org/rnai/vector_info.html))를 AscI 및 SmaI로 절단하였다. 절단된 서열번호 2에 대한 센스 서열 유전자 5 μ l, 절단된 pFGC5941 벡터 3 μ l, 10X 반응버퍼 1 μ l와 T4 DNA 라이게이즈를 이용하여 25℃에서 2시간동안 라이게이션한 후(정방향), E. coli DH5a에 첨가하여 42℃에서 90초 동안 heat shock을 주는 방법으로 형질전환시킨 다음, E. coli 플라스미드를 분리하였다. 분리된 서열번호 2에 대한 센스 서열이 삽입된 pFGC5941 벡터를 BamHI 및 XbaI로 절단하였다. 한편 pGEM-T-안티센스 CPD 벡터를 BamHI 및 XbaI로 절단하여 서열번호 2에 대한 안티센스 서열을 준비하였다. 상기 서열번호 2에 대한 안티센스 서열 유전자 5 μ l, 상기 서열번호 2에 대한 센스 서열이 삽입되고 BamHI 및 XbaI로 절단된 pFGC5941 벡터 3 μ l, 10X 반응버퍼 1 μ l와 T4 DNA 라이게이즈를 이용하여 25℃에서 2시간동안 라이게이션한 후(역방향), E. coli DH5a에 첨가하여 42℃에서 90초 동안 heat shock을 주는 방법으로 형질전환시킴으로써, E. coli 플라스미드 pFGC5941/shEpCPD 벡터 (도 2B)를 구축하였다.

[0050]

실시에 2. 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환

[0051]

상기 실시에 1에서 준비한 형질전환된 E. coli에서 pFGC5941/shEpCPD RNA 간섭 재조합 벡터를 추출하였다.

[0052]

아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 세포 200 μ l에 상기 제작된 pFGC5941/shEpCPD RNA 간섭 재조합 벡터를 1 μ l (50ng/ μ l이상)를 넣고 ice에 30분간 방치한 후 알코올로 소독된 큐벳에 넣고 미세-전기천공 챔버를 이용하여 2.4kV의 전류를 가한 후 ice로 옮겨주었다. 이렇게 전류를 준 아그로박테리움 용액에 LB배지 800 μ l를 넣고 피펫을 이용하여 15ml 튜브로 옮겨서 25℃에서 4시간 동안 키운 뒤 50 μ g/mL 카나마이신(kanamycin) 및 25 μ g/mL 리팜피신(rifampicin) 항생제가 들어간 LB 고체 배지에 도말하여 25℃에서 2일간 배양하였다.

[0053]

배양된 아그로박테리움 단일 콜로니를 액체 배양하여, 플라스미드 DNA를 추출하여 아그로박테리움이 pFGC5941/shEpCPD RNA 간섭 재조합 벡터로 형질전환되었는지 여부를 PCR 방법으로 확인하였다. PCR 조건은 변형 94℃에서 5분, 변성 94℃ 30초, 어닐링 55℃ 30초, 신장 72℃ 30초, 확장 72℃에서 7분, 그리고 총 30사이클을 수행하였다.

[0054]

실시에 3. 아그로박테리움을 이용한 에키네시아 퍼퓨레아의 형질전환

[0055]

3-1. 에키네시아 퍼퓨레아 배양

[0056]

에키네시아 퍼퓨레아의 종자를 야생화 종자 전문업체인 (주) 우리꽃 으로부터 구입하였다. 에키네시아 퍼퓨레아를 무균상태에서 기내 발아시키기 위해, 에키네시아 퍼퓨레아 종자의 외피를 제거하고 70% 에탄올 용액에 1분, 1% NaOCl 용액에 20분간 침지시킨 후 멸균수로 10회 세척하여 남은 NaOCl 잔여물을 제거하였고 E1 agar 배지 (100

mg/L myo-inositol, 2 mg/L glycine, 1.5% sucrose, 0.7% micro agar, 2 ml/L plant preservation mix., pH 5.8)에 파종하였다. 에키네시아 퍼푸레아 종자는 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하였으며, 약 6주에서 8주 후 생성된 어린잎을 약 1 cm² 크기로 잘라 잎 절편체를 확보하였다.

[0057] 3-2. 에키네시아 퍼푸레아의 형질전환

[0058] 상기 실시예 2에서 준비한 pFGC9541/shEpCPD RNA 간섭 재조합 벡터가 형질전환된 재조합 아그로박테리움 LBA4404 세포를 3% 수크로스(sucrose)가 함유된 MS (Murashige & Skoog medium) broth 배지를 이용해 OD₆₀₀ 0.6 - 0.8 값으로 희석하여 재조합 아그로박테리움 LBA4404 희석액을 준비하였다. 실시예 3-1에서 준비한 잎 절편체를 상기 희석액에 10분간 침지시킨 후, 여분의 희석액을 제거하고 E1 agar 배지에 치상하고 이를 동안 암상태에서 배양하여 형질전환된 에키네시아 퍼푸레아의 분화를 유도하였다.

[0059] 한편 상기 3-1에서 확보한 잎 절편체에서 상기 형질전환 과정을 거치지 않은 것을 야생형(wild type) 대조군으로 하였다.

[0060] 신초 형성을 위해 상기 각 잎 절편체를 0.6 mg/L PPT (phosphinothricin)를 포함하는 E8 agar 배지 (MS salts, 100 mg/L myo-inositol, 0.5 mg/L glycine, 2% sucrose, 0.7% microagar, BAP 1.0 mg/L, NAA 0.01 mg/L)에 치상한 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하였다. 4주에서 6주 후 생성된 신초에서 뿌리의 재분화를 유도하기 위해 WPM 배지 (2.5 g/L Woody Plant Medium, 1.5% sucrose, 1.5 mg/L IBA, 0.4% phytagal)에 치상한 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하여 뿌리의 발달을 유도하였고 약 2달 정도의 뿌리 생성 기간을 거친 후 토양에 옮겨심어 형질전환 식물체의 성장을 유도하였다.

[0061] 실시예 4. 형질전환체의 표현형 확인

[0062] 상기 실시예 3에서 준비한 형질전환 식물체와 야생형(wild-type)의 표현형을 비교하여 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0063] 도 3에 나타난 바와 같이, pFGC9541/shEpCPD RNA 간섭 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 아그로박테리움 LBA4404로 형질전환된 에키네시아 퍼푸레아(B)의 초장은 야생형(wild-type) 대조군(A)에 비해 크게 감소하였다.

[0064] 또한 도 4에 나타난 바와 같이 형질전환된 에키네시아 퍼푸레아(B, C)의 꽃 크기 역시 야생형(wild-type) 대조군(A)에 비해 감소하였다.

[0065] 실시예 5. 형질전환체에서 재조합 벡터의 도입 확인

[0066] 에키네시아 퍼푸레아 형질전환체에 pFGC9541/shEpCPD RNA 간섭 재조합 벡터의 도입 유무를 하기의 방법으로 확인하였다.

[0067] 에키네시아 퍼푸레아 형질전환체의 잎 1 g을 LN₂와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Kit (Sigma)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 동일한 방법으로 야생형 에키네시아 퍼푸레아의 genomic DNA도 추출하였다. 추출된 각 genomic DNA 500 ng과 pFGC9541/shEpCPD RNA 간섭 재조합 벡터의 CHSA 인트론에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 에키네시아 퍼푸레아 자체에 존재하는 18S rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(하기 표 2 참조)를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0068] PCR 결과는 도 5에 나타내었다. 도 5의 상단에서 Tg로 표시한 에키네시아 퍼푸레아 형질전환체에서는 CHSA 인트론 PCR 산물의 밴드가 확인되나, WT로 표시한 야생형 에키네시아 퍼푸레아에서는 CHSA 인트론 PCR 산물의 밴드가 나타나지 않음을 확인하여, 에키네시아 퍼푸레아 형질전환체에 pFGC9541/shEpCPD RNAi 벡터가 도입되었음을 확인하였다. 한편 도 5의 하단에서 에키네시아 퍼푸레아 18S rRNA 유전자는 에키네시아 퍼푸레아 형질전환체 및 야생형에서 모두 확인되었다.

[0069]

[표 2]

PCR 산물		프라이머 서열 (5' → 3')
CHSA 인트론	정방향 (서열번호 7)	5' TGTGGGAAGGTAGAAAGAGGGGAGG 3'
	역방향 (서열번호 8)	5' TCTAGACTCACCTAGGATCC 3'
18S rRNA	정방향 (서열번호 9)	5' TTCAGACTGTGAAACTGCGAATGG 3'
	역방향 (서열번호 10)	5' CAGACTTGCCCTCCAATGGATCCT 3'

[0070]

[0071]

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

도면

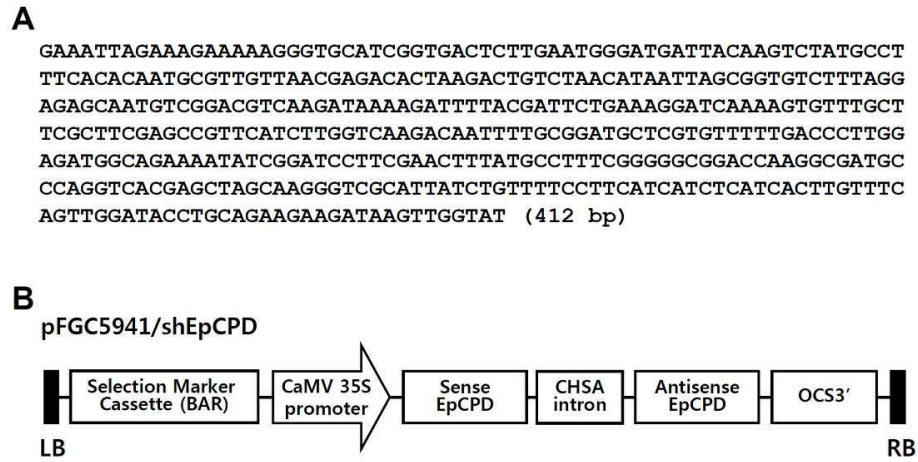
도면1

```

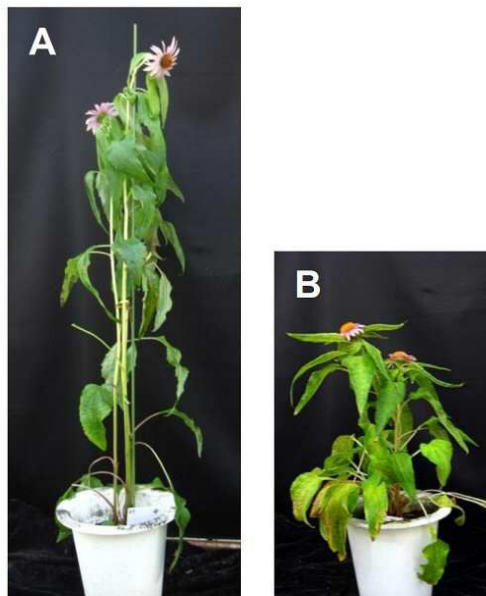
1  gaacctgcaa cacaccaacc aactgtgtgt gagagagaaa ctcaaacacac ctcatctcac
61  aacacaatca taacttcaaa accatacacc accccattac tcccaaaactt aaatcaccca
121 caccocatgat taccataata ctctccccctc tctctctctat cctctcactt tttctctcta
181 caatcatctt cctccttttc cgcaccacca cgcgcgcgcg cgggaacctc cgtccaccac
241 cgggaaccac cggctttcct ctcatcggcg aaacattcca gctcatatct gcttacaaga
301 cgggagaacc ggaaccgttc attgacacac gcgtggccag atatgggacc gtttttacia
361 cgcattgtgt tggcgaacgg acggtttttt cggcggatgc gaagacgaac cggtttatat
421 tgcagaatga aggacgggtt ttcgagtcga gttatccgag ttccattgog aatctggttg
481 ggaaacactc gttgttgctc atgagaggta gtttgcatag gagaatgcat tccttgacga
541 tgagttttgc taattcgaact attattaagg atcatttgct ggtggatata gaccggttgg
601 ttcggttgaa tttggattcg tggaccggtc ggattctttt gatggaggag gccaaaaaga
661 taacgtttga gtttaacgtt aagcaaatct tgagcatoga cccgtgtgag tggtcggaaa
721 atttaaggaa agaatacatg cttgtgatcg aaggcttttt ttgcattccc atccccctct
781 tttccctcac ttatcgtcgc gcgattcagg caogaaaaag ggtgactgag gcattacatt
841 tgggtggtgt tgagcggcgg gtagaaaggg aaaaagggtt gaagaagaac gacatgtttg
901 cagcattgtt tgacagtgat tgtgatgat acgagatcgt ggattttgtt gtgtctttgc
961 tgggttgccg ttatgacacc acatcaacca ccactgactc tgccgttaaa tttctcacgg
1021 atacaccttc ggcctcttgc cagcttaagg aagaacatga ggaattaga aagaaaaagg
1081 gtgcacatcg gactcttgaa tgggatgatt acaagtctat gcctttcaca caatgcgttg
1141 ttaacgagac actaagactg tctaacataa ttagcgggtg ctttaggaga gcaatgtcgg
1201 acgtcaagat aaaagatttt acgattctga aaggatcaaa agtggttgct tcgcttcgag
1261 ccgttcatct tgggtcaagac aattttgcgg atgctcgtgt ttttgaccct tggagatggc
1321 agaaaatatc ggatccttgc aactttatgc ctttcggggg cggaccaagg ccatgcccag
1381 gtcacgagct agcaagggtc gcattatctg ttttccttca tcatctcacc acttggttca
1441 gttggatacc tgcagaagaa gataagtttg tattttttcc tacgacaagg acacaaaagc
1501 ggtatccgat catcgtgcaa aaacgtgatg tagtagagta atgcaaaagag taaaacaccc
1561 c

```

도면2



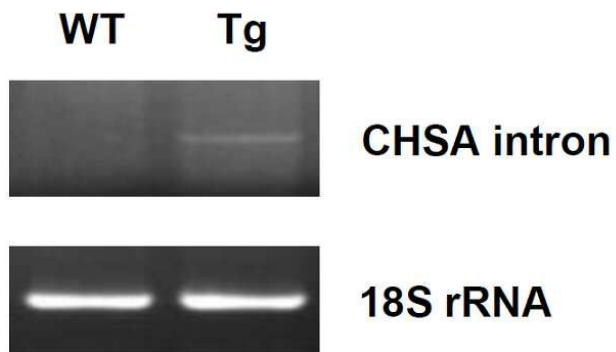
도면3



도면4



도면5



서열목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 <120> Transgenic dwarf plants
 <130> P14-035-KHU
 <160> 10
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 1561
 <212> DNA
 <213> Echinacea purpurea steroid 23- α -hydroxylase (CPD) mRNA, complete cds.
 <400> 1
 gaacctgcaa cacaccaacc aactgtgtgt gagagagaaa ctcaaacaac ctcattctac 60
 aacacaatca taacttcaaa accatacacc acccattac tccaaactt aaatcaccca 120
 caccatgat taccataata ctctccctc tctctcttat cctctcactt tttctctcta 180
 caatcatctt cctcttttc cgcaccacca cgcgcgccg ccggaacctc cgtccaccac 240

cggaaccac cggttttct ctcacggcg aaacattcca gtcatact gttacaaga	300
cggagaacc ggaaccgtt attgacacac gcgtggccag atatgggacc gtttttaca	360
cgcatgtgt tggcgaacgg acggtttttt cggcggatgc gaagacgaac cggtttatat	420
tgcagaatga aggacggtt ttcgagtcga gttatccgag ttccattgcg aatctggtt	480
ggaaacactc gttgttgctc atgagaggta gtttgcatag gagaatgcat tccttgacga	540
tgagttttgc taattcgact attattaagg atcatttgct ggtggatatc gaccggttgg	600
ttcggttgaa tttggattcg tggaccggtc ggattctttt gatggaggag gccaaaaaga	660
taacgtttga gttaacgtt aagcaaatct tgagcatcga cccgtgtgag tggtcggaaa	720
atttaaggaa agaatacatg cttgtgatcg aaggcttttt ttgcattccc atccccttct	780
tttccctcac ttatcgtcgc gcgattcagg cagaaaaag ggtgactgag gcattacatt	840
tgggtggtgtg tgagcggcgg gtagaaaggg aaaaagggtt gaagaagaac gacatgttg	900
cagcattgtt tgacagtgat tgtgatgatg acgagatcgt ggattttgtg gtgtcttgc	960
tggttgcggg ttatgacacc acatcaacca ccatgactct tgccgttaaa tttctcacgg	1020
atacaccttc ggctcttgct cagcttaagg aagaacatga ggaaattaga aagaaaaagg	1080
gtgcatcggg gactcttgaa tgggatgatt acaagtctat gcctttcaca caatgcgtt	1140
ttaacgagac actaagactg tctaacataa ttacgggtgt ctttaggaga gcaatgtcgg	1200
acgtcaagat aaaagatttt acgattctga aaggatcaa agtgtttgct tcgcttcgag	1260
ccgttcatct tggtaagac aattttgcgg atgctcgtgt ttttgaccct tggagatggc	1320
agaaaatac ggatccttcg aactttatgc ctttcggggg cggaccaagg cgatgccag	1380
gtcacgagct agcaagggtc gcattatctg ttttcttca tcctctcgc acttgtttca	1440
gttggatacc tgcagaagaa gataagttgg tattttttcc tacgacaagg acacaaaagc	1500
ggtatccgat catcgtgcaa aaacgtgatg tagtagagta atgcaaagag taaaacaccc	1560
c	1561
<210> 2	
<211> 412	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 1062-1473 bases of Echinacea purpurea steroid	
23-alpha-hydroxylase (CPD)	
<400> 2	
gaaattagaa agaaaaaggg tgcacgggtg actcttgaat gggatgatta caagtctatg	60

cctttcacac aatgcgttgt taacgagaca ctaagactgt ctaacataat tagcgggtgc 120

tttaggagag caatgtcgga cgtcaagata aaagatttta cgattctgaa aggatcaaaa 180

gtgtttgctt cgcttcgagc cgttcacatt ggtcaagaca attttgcgga tgctcgtgtt 240

tttgaccctt ggagatggca gaaaatatcg gatccttcga actttatgcc tttcgggggc 300

ggaccaaggc gatgcccgag tcacgagcta gcaagggtcg cattatctgt tttccttcac 360

catctcatca cttgtttcag ttggatacct gcagaagaag ataagtgggt at 412

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for SEQ ID NO:2

<400> 3

ggcgcgccga aattacaaag aaaaagggtg c 31

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for SEQ ID NO:2

<400> 4

atttaaatac caacttatct tcttctgc 28

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for the antisense sequence of SEQ ID NO:2

<400> 5

tctagaatac caacttatct tcttctgc 28

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for the antisense sequence of SEQ ID NO:2

<400> 6
cccgggcaaa ttacaaagaa aaagggtgc 29
<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> forward primer for CHSA intron
<400> 7
tgtgggaagg tagaaagagg ggagg 25
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> reverse primer for CHSA intron
<400> 8
tctagactca cctaggatcc 20
<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> forward primer for 18s rRNA of Echinacea purpurea
<400> 9
ttcagactgt gaaactgcga atgg 24
<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> reverse primer for 18s rRNA of Echinacea purpurea
<400>
> 10
cagacttgcc ctccaatgga tcct 24