



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0092629
(43) 공개일자 2008년10월16일

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0036202

(22) 출원일자 2007년04월12일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

포항공과대학교 산학협력단

경상북도 포항시 남구 효자동 산31 포항공과대학교내

(72) 발명자

이준승

서울 서대문구 대현동 럭키아파트 101동 1502호

최윤희

서울 강서구 화곡본동 56-293 웨라톤빌라 101호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김석현, 이희숙

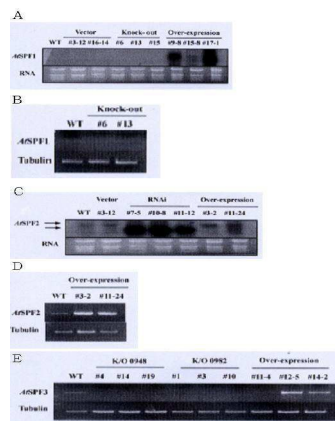
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 식물체에서 A t S P F 3 의 수준을 조절하여 식물의 종자생산량을 변화시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 식물체에서 AtSPF3의 수준(level)을 조절하여 식물의 종자 생산량을 변화시키는 방법에 관한 것으로서 보다 상세하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 세포내 수준을 조절하여 식물의 종자 생산량을 변화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 AtSPF3는 그 발현이 증가 또는 감소하는 경우 식물의 종자 생산량을 변화시키는 효과를 갖는다. 따라서 본 발명의 AtSPF3는 식물의 증산, 품종의 개량에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

김민정

서울 마포구 신공덕동 5-61번지

남홍길

경북 포항시 남구 효자동 산 31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 세포내 수준(level)을 조절하여 식물의 종자 생산량(seed productivity)을 변화시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포내 수준을 조절하는 것은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가 또는 감소시키는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 식물은 애기장대, 배추, 양배추, 겨자, 평지(유채), 무, 호무(*Brassica napobrassica*), 순무(*Brassica rapa/Brassica campestris*), 트리케일, 콜리플라워, 브로콜리, 냉이, 황새냉이, 장대나물, 꽃다지, 상갓(*Brassica juncea*), 누른갓(*Brassica napus*), 브라시카 올레라케아(*Brassica oleracea*), 콜라비(*Brassica caulorapa*), 브라시카 펴브리아타(*Brassica fimbriata*), 브라시카 루보(*Brassica ruvo*), 브라시카 셉티캡스(*Brassica septiceps*), 검은겨자(*Brassica nigra*), 코클레아리아 오피키날리스(*Cochlearia officinalis*), 겨자무(*Armoracia lapathifolia*), 데스쿠라이니아 핀나타(*Descurainia pinnata*), 아우브리에타 델토이데아(*Aubrieta deltoidea*)로 이루어진 피자식물에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 식물을 형질전환하는 단계를 포함하는 종자 생산량(seed productivity)이 변화된 식물의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항의 제조방법에 의해 제조된 식물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 식물은 애기장대, 배추, 양배추, 겨자, 평지(유채), 무, 호무(*Brassica napobrassica*), 순무(*Brassica rapa/Brassica campestris*), 트리케일, 콜리플라워, 브로콜리, 냉이, 황새냉이, 장대나물, 꽃다지, 상갓(*Brassica juncea*), 누른갓(*Brassica napus*), 브라시카 올레라케아(*Brassica oleracea*), 콜라비(*Brassica caulorapa*), 브라시카 펴브리아타(*Brassica fimbriata*), 브라시카 루보(*Brassica ruvo*), 브라시카 셉티캡스(*Brassica septiceps*), 검은겨자(*Brassica nigra*), 코클레아리아 오피키날리스(*Cochlearia officinalis*), 겨자무(*Armoracia lapathifolia*), 데스쿠라이니아 핀나타(*Descurainia pinnata*), 아우브리에타 델토이데아(*Aubrieta deltoidea*)로 이루어진 피자식물에서 선택된 것임을 특징으로 하는 식물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<13> 본 발명은 식물체에서 AtSPF3의 수준(level)을 조절하여 식물의 종자 생산량을 변화시키는 방법에 관한 것으로서 보다 상세하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 세포내 수준을 조절하여 식물의

종자 생산량을 변화시키는 방법에 관한 것이다.

- <14> 초본 식물은 씨앗에서 발아하여 성장과 분화 과정을 거치면서 꽃을 피워 다시 열매를 맺음으로써 다음 세대를 준비하는 생활사를 가지고 있다. 이 과정에는 빛, 물, 온도, 토양 등의 외부 환경 조건과 함께 식물체 내부에서 생성되는 성장 조절 인자인 여러 호르몬과의 상호작용이 식물의 성장과 분화에 중요한 영향을 미치게 된다. 식물의 성장에 가장 중요한 요소는 광합성을 통한 양분의 생산인데 광합성은 녹색식물의 가장 기본적인 생활현상의 하나로 식물의 생존에 필요한 에너지원과 식물체의 구성성분을 얻는 중요한 과정이다.
- <15> 광합성을 통해 생성된 당은 탄소와 에너지 대사에 필요한 주요 물질로, 발아에서부터 노화에 이르기까지 식물체의 생활사 전반에 걸쳐 성장과 발달에 중요한 역할을 수행한다. 또한 당은 호르몬처럼 신호전달 물질로 작용하여 식물체 내의 유전자 발현을 조절할 수 있다. 당에 의한 신호전달은 광합성에 관련된 유전자뿐만 아니라 호흡, 녹말과 sucrose의 합성과 분해, 질소 대사, 세포주기 조절, 노화 등과 같이 식물 성장에 중요한 물질대사와 발달과정에 관련된 유전자의 발현을 유도하거나 억제한다. 따라서 식물체 내에서 당과 관련된 반응들은 물질대사뿐만 아니라 세포의 구성성분과 조절인자로서의 기능들로 유추하여 볼 때 복잡하게 연결되어 있음을 알 수 있다.
- <16> 이러한 당 관련 유전자 중 SPF1(SWEET POTATO FACTOR1)는 고구마에서 처음 분리되었으며, 이는 고구마의 스포라민(sporamin)과 β -아밀라제(β -amylase) 유전자의 프로모터에 존재하는 SP8 모티프(motif)를 인지하여 결합하는 DNA 결합 단백질(DNA binding protein)이다. SPF1은 수크로스에 의해 목적 유전자의 전사를 억제시키는 음성 조절자(negative regulator)로 작용한다고 알려져 있다(Ishiguro and Nakamura, 1994). SPF1은 오이 (Kim DJ *et al.*, 1997, Gene, 185: 265-269) 및 파슬리 (Rushton *et al.*, 1996, EMBO J., 15: 5690-5700)에서도 그 존재가 보고되었는데 이들은 공통적으로 WRKY 도메인 전사인자(WRKY domain transcription factor)를 암호화하고 있다.
- <17> WRKY 인자는 N 말단에 징크핑거 유사 모티프(zinc-finger-like motif)와 함께 WRKYGQK의 아미노산 서열을 가지고 있다. WRKY 도메인은 W-박스라고 알려진 (T)(T)TGAC(C/T)의 특정 염기서열에 대해 높은 결합력을 가지고 있다. 기존에 보고된 모든 WRKY 단백질들은 분자 내에 1개 또는 2개의 WRKY 도메인을 가지고 있는데 이 WRKY 도메인의 수와 징크핑거 유사 모티프의 구조에 따라 세 개의 group으로 분류된다 (Eulgem *et al.*, 2000, Trends plant sci. 5: 199-206). 지금까지 애기장대에서는 70개 이상의 WRKY 유전자들이 밝혀졌으며 이 WRKY 단백질들은 전사유도 또는 억제인자로 기능하고 있다. 이 유전자의 전사는 상처, 병원체 감염, 비생물적인 스트레스에 의해 빠르고 강하게 유도되며(Asai *et al.*, 2002, Nature, 415: 977-983) 식물의 방어 기작에 중요한 역할을 수행한다고 보고되었다. 또한 일부 WRKY 유전자는 배발생, 종피, trichome 발달, 노화에도 관여하고 있다(Miao *et al.*, 2004, Plant Mol. Biol. 55(6): 853-867).
- <18> 본 연구는 수박을 대상으로 한 과일의 숙성에 관한 연구에서 비롯되었다. 수박의 과숙 과정에 관련된 유전자를 선별하기 위해 과육 부분에서 확보한 EST중에서 고구마에서 발견된 SPF1-유사 단백질 동형체(SPF1-like protein homolog)와 유사성을 보이는 유전자가 발견되었으며, 이의 기능을 밝히기 위해 간접적으로 애기장대에서 찾은 다른 SPF1 유사체(*AtSPF1*, *AtSPF2*, *AtSPF3*)의 기능을 연구하던 중 *AtSPF1* 및 *AtSPF3*의 결실 또는 과발현 돌연변이체가 식물의 종자 생산량을 변화시키는 점을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <19> 따라서, 본 발명의 목적은 식물체에서 *AtSPF3*의 세포내 수준(level)을 조절하여 식물의 종자 생산량을 변화시키는 방법을 제공하는 것이다.
- <20> 본 발명의 또 다른 목적은 식물체에서 *AtSPF3*의 세포내 수준(level)을 조절하여 종자 생산량이 변화된 식물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <21> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물체에서 *AtSPF3*의 세포내 수준(level)을 조절하여 식물의 종자 생산량을 변화시키는 방법을 제공한다.
- <22> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물체에서 *AtSPF3*의 세포내 수준(level)을 조절하여 종자 생산량이 변화된 식물을 제공한다.
- <23> 이하 본 발명의 내용을 보다 상세히 설명하기로 한다.

- <24> 본 발명은 식물체에서 AtSPF3의 세포내 수준(level)을 조절하여 식물의 종자 생산량을 변화시키는 방법에 관한 것이다.
- <25> 본 발명의 AtSPF3은 298개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드로서 식물의 종자 생산량을 변화시키는 기능을 한다. 이러한 AtSPF3의 기능은 본 발명자들에 의해 최초로 밝혀진 것이다. AtSPF3은 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다.
- <26> 한편, 상기 폴리펩티드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에 대해 기능적 동등물일 수 있다. 상기 '기능적 동등물'이란, 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 80% 이상, 즉 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 서열 상동성을 갖는 것으로서 본 발명의 AtSPF1과 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 폴리펩티드를 말한다. 여기서, '실질적으로 동질의 활성'이란 식물의 종자 생산량에 관여하는 것을 의미한다. 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 중 일부가 치환되거나, 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황 함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 본 발명의 AtSPF1의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다. 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 AtSPF1의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 폴리펩티드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩티드 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경 및 생리활성을 유지하면서 GFP와 같은 다른 단백질과 융합으로 만들어진 융합단백질 등이 이에 포함된다.
- <27> 본 발명에서 식물의 종자 생산량이란 한 개체에서 생산되는 종자의 개수를 나타내며, 이는 식물의 생산성에 중요한 역할을 한다. 예를 들어, 종자 생산성이 증가되면, 곡류에 있어서의 생산성을 증가시킬 수 있으며, 종자 생산성을 감소시키는 경우 종자의 섭취가 불필요한 수박, 참외 등의 식물에 있어서 유용한 품종을 제조할 수 있다.
- <28> 상기 '세포내 수준'이란 세포내에 존재하는 양을 말하는 것으로, 이는 당업자에게 공지된 여러 방법으로 조절될 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나, 세포내 수준은 전사 단계에서의 조절 또는 전사후 단계에서의 조절을 통해 조절될 수 있다. 전사 단계에서의 조절은 당업자에게 공지된 유전자의 발현을 증진시키기 위한 방법, 예를 들면, 프로모터에 서열번호 1의 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 연결한 재조합 발현벡터를 제조하여 상기 유전자의 발현을 증진시키는 방법 또는 서열번호 1의 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 주변에 상기 유전자의 발현이 증진되도록 하는 발현조절서열을 삽입하는 방법, 또는 유전자의 발현을 억제하기 위한 방법, 예를 들면 프로모터 또는 유전자 부위의 돌연변이를 유도하여 프로모터 활성 또는 단백질의 기능을 저해하는 방법, 안티센스(antisense) 유전자를 발현시키는 방법, RNAi 또는 마이크로RNA(microRNA) 방법 등에 의해 수행될 수 있다.
- <29> 상기 '프로모터'란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미하며, '작동 가능하게 연결된다(operably linked)'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 아울러, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 프로모터로는 모든 시간대에 상시적으로 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터(constitutive promoter) 또는 특정한 위치, 시기에 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터(inducible promoter)를 사용할 수 있으며, 그 예로는 SV40 프로모터, CMV(cytomegalovirus) 프로모터, CAG 프로모터(Hitoshi Niwa et al., Gene, 108:193-199, 1991; Monahan et al., Gene Therapy, 7:24-30, 2000), CaMV 35S 프로모터(Odell et al., Nature 313:810-812, 1985), Rsyn7 프로모터(미국특허출원 제08/991,601호), 라이스 액틴(rice actin) 프로모터(McElroy et al., Plant Cell 2:163-171, 1990), 유비퀴틴 프로모터(Christensen et al., Plant Mol. Biol. 12:619-632, 1989), ALS 프로모터(미국 특허출원 제08/409,297) 등이 있다. 이외에도 미국특허 제5,608,149; 제5,608,144호 제5,604,121호 제5,569,597호 제5,466,785호, 제5,399,680호 제5,268,463호 및 제5,608,142호 등에 개시된 프로모터들을 모두 사용할 수 있다.
- <30> 전사 후 단계에서의 조절은 당업자에게 공지된 단백질 발현을 증진 또는 저해시키기 위한 방법, 예를 들면, 서열번호 1의 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 주형으로 전사된 mRNA의 안정성을 증진 또는 저해하는 방법, 단

백질 또는 폴리펩티드의 안정성을 증진 또는 저해하는 방법 또는 단백질 또는 폴리펩티드의 활성을 증진 또는 저해하는 방법에 의해 수행될 수 있다

- <31> 상기 방법의 보다 구체적인 예로 1군 인트론 타입, M1 RNA 타입, 망치머리(hammerhead) 형, 또는 머리핀(hairpin) 형 또는 마이크로RNA 형 등의 전사된 mRNA에 작용하는 RNA를 암호화하는 DNA서열로 형질전환하거나, 표적 유전자 서열과 동일 또는 유사한 서열을 가지는 DNA의 형질전환을 통한 동시억제(cosuppression)를 유도할 수 있다.
- <32> 바람직하게는 본 발명에서 서열번호 1의 폴리펩티드의 세포내 수준을 조절하는 것은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가 또는 감소시키는 방법에 의해 수행될 수 있다. 이러한 증가 또는 감소시키는 방법은 각각 당업자에게 공지된 방법을 사용할 수 있으나, 예를 들면, 프로모터에 서열번호 1의 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 연결한 재조합 발현백터를 제조하여 그 발현을 증진시키거나, 프로모터에 상기 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 폴리뉴클레오티드를 연결한 재조합 발현백터를 제조하여 그 발현을 감소시킬 수 있다. 이 때 상기 폴리뉴클레오티드는 바람직하게 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가질 수 있다.
- <33> 상기 식물은 애기장대, 배추, 양배추, 겨자, 평지(유채), 무, 호무(*Brassica napobrassica*), 순무(*Brassica rapa/Brassica campestris*), 트리케일, 콜리플라워, 브로콜리, 냉이, 황새냉이, 장대나물, 꽃다지, 상갓(*Brassica juncea*), 누른갓(*Brassica napus*), 브라시카 올레라케아(*Brassica oleracea*), 콜라비(*Brassica caulorapa*), 브라시카 펄브리아타(*Brassica fimbriata*), 브라시카 루보(*Brassica ruvo*), 브라시카 셉티캡스(*Brassica septiceps*), 검은겨자(*Brassica nigra*), 코클레아리아 오피키날리스(*Cochlearia officinalis*), 겨자 무(*Armoracia lapathifolia*), 데스쿠라이니아 핀나타(*Descurainia pinnata*), 아우브리에타 델토이데아(*Aubrieta deltoidea*)와 같은 피자식물일 수 있다.
- <34> 아울러, 본 발명은 AtSPF3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 식물을 형질전환하는 단계를 포함하는 종자 생산량(seed productivity)이 변화된 식물의 제조방법을 제공한다.
- <35> 형질전환을 위한 폴리뉴클레오티드의 제조는 당업자에게 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 이는 상기 기재한 바와 같다.
- <36> 본 발명에서 AtSPF3를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 식물을 형질전환하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법, 미세사출법(microprojectile bombardment), 일렉트로포레이션(electroporation), PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포솜 매개법(liposome-mediated method), 인-플란타 형질전환법(In planta transformation), 진공 침윤법(Vacuum infiltration method), 화아침지법(floral meristem dipping method), 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method)를 이용할 수 있으며, 더 바람직하게는 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법을 이용할 수 있다. 이 때 상기 폴리뉴클레오티드는 형질전환된 식물에서 발현될 수 있도록 프로모터에 작동가능하게 연결된 상태, 예를 들면 프로모터와 작동가능하게 연결된 재조합 발현백터의 형태일 수 있다.
- <37> 본 발명에서 사용된 표준 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기술은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 다음 문헌에 기재되어 있다(Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989); by Silhavy, T. J., Bannan, M. L. and Enquist, L. W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984); and by Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, published by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987)).
- <38> 본 발명의 실시예에서는 애기장대에서 SPF1 유전자와 유사한 유전자를 blastx 검색을 통하여 탐색하였다. 그 결과, 애기장대에서 SPF1 유전자와 유사한 유전자를 11개 검색하였으며, 그 중 가장 높은 유사성을 보이는 3개의 유전자를 선별하였다.
- <39> 한편, 본 발명의 다른 실시예에서는 선별된 3개의 유전자의 기능을 알아보기 위하여 이에 대한 결실 및 과발현 돌연변이체를 제조하고 선별하였다. 그 결과 선별된 유전자 중 AtSPF1 및 AtSPF3는 결실 및 과발현 돌연변이체가 잘 제조되었으나, AtSPF2에 대해서는 결실 돌연변이체가 제조되지 않았다. 이에 AtSPF1 및 AtSPF3에 대해서만 그 생리적 기능에 대한 연구를 수행하였다.
- <40> 본 발명의 또 다른 실시예에서는 야생형 및 AtSPF1 및 AtSPF3 돌연변이체를 대상으로 표현형, 생활사, 엽록소 함량, 하배축의 성장률, 발아율 및 종자 생산량을 확인하였다. 그 결과, 종자 생산량에 있어서 상기 돌연변이체

들이 야생형에 비해 뚜렷한 변화가 있는 점을 확인하였다.

<41> 따라서, 본 발명은 AtSPF3의 세포내 수준을 조절하여 식물의 종자 생산량을 변화시키는 방법을 제공한다.

<42> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<43> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<44> <실시예 1>

<45> 애기장대에서 SPF1 유전자와 유사한 유전자의 탐색

<46> <1-1> AtSPF1 및 AtSPF3 유전자의 탐색

<47> 종전 실험을 통해 수박의 과육 부분에서 발견한 SPF1-like 단백질 유사체(SPF1-like protein homolog)와 유사한 유전자를 애기장대에서 탐색하였다. NCBI 사이트(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 blastx 검색을 통하여 고구마에서 밝혀진 SPF1(NCBI Accession No. D30038)과 유사한 유전자가 애기장대에 11개 있음을 확인하였다. 11개의 유전자 중에서 고구마의 SPF1 유전자와 가장 높은 유사성을 보이는 3개의 유전자를 선별하여 이들을 AtSPF1 (At4g26440), AtSPF2 (At4g18170), AtSPF3 (At4g01250)라고 명명하였다.

<48> AtSPF1 유전자는 크기가 1,955 bp로 4개의 엑손(exon)으로 이루어져 있으며 2번째 엑손에 한 개의 WRKY 도메인(domain)이, 3번째와 4번째 엑손에 걸쳐 한 개의 WRKY 도메인이 존재한다. AtSPF2 유전자는 3개의 엑손으로 구성되어 있으며 크기는 1,184 bp이고 2번째와 3번째 엑손에 걸쳐 한 개의 WRKY 도메인이 존재하는 것으로 확인되었다. AtSPF3 유전자는 1,291 bp로, 3개의 엑손으로 이루어져 있으며 2번째와 3번째 엑손에 걸쳐 한 개의 WRKY 도메인이 존재한다.

<49> <실시예 2>

<50> AtSPF 유전자들의 기능 연구

<51> <2-1> AtSPF 유전자들의 결실 돌연변이체 확보

<52> 유전자들의 기능을 알아보기 위해 AtSPF 결실 돌연변이체의 종자를 ABRC(Arabidopsis Biological Resource Center)를 통하여 확보하였다. AtSPF1의 경우는 돌연변이체 1 라인 (SALK133019, Fig. 7A-(a))을, AtSPF3는 돌연변이체 2 라인 (SALK094892; SALK098205, Fig. 9A)을 확보할 수 있었으나, AtSPF2 유전자의 경우 T-DNA 삽입 돌연변이체가 보고되지 않아서 RNAi 기법을 이용하여 다음과 같이 AtSPF2-RNAi 형질 전환 식물체를 제작하였다(도 1A 참조).

<53> pBluscript II KS(Stratagene, 미국)의 MCS(multi cloning site)에 155 bp 크기의 Act12-3rd 인트론(intron)을 삽입하여 만든 pBS-int 벡터 (Nam-Hai. Chua 박사 제공, pBluscript 벡터의 HindIII와 EcoRI 제한효소부위 사이에 Actin12의 3번째 exon이 삽입된 벡터)에 인트론을 사이에 두고 안티센스(anti-sense) 및 센스(sense) 방향으로 AtSPF2 유전자의 ORF(open reading frame)을 삽입시켰다(pBS-int 벡터의 센스방향의 삽입은 pBS-int 벡터의 Not I 제한효소 부위에 이루어지며, 안티센스방향의 삽입은 Apa I과 Sal I 제한효소 부위에 이루어짐). pCambia 3301 벡터(Cambia, 미국)에서 GUS 부분을 35S promoter와 함께 제거하고 새로이 BCB promoter를 넣은 p3301:BCB 벡터에 이를 삽입하였다. p3301:BCB 벡터는 다음과 같이 제조하였다: pCambia 3301를 Hind III로 처리하고, 클레나우(Klenow) 효소로 처리하여 평활말단을 만든 후 다시 PmlI을 처리하여 lacZ alpha부터 histidine tag까지 2840 bp를 제거하였다. 이를 자가연결(self ligation)을 시킨 다음 BCB 단백질(Blue copper binding protein, CA78771)의 1573bp 업스트림(upstream)부터 ATG까지의 서열을 상기에서 자가연결시킨 벡터의 EcoRI 제한효소 부위에 삽입하였다. p3301:BCB 벡터를 SmaI으로 처리한 뒤, 상기 pBS-int 벡터에 삽입된 AtSPF2 안티센스 ORF-인트론-AtSPF2 센스 ORF 부분을 BSSHII으로 처리하여 자르고 이를 클레나우(Klenow) 효소를 처리하여 평활말단으로 만든 후 연결하였다. 이후 아그로박테리움 매개 플로랄 디핑(agrobacterium-mediated floral dipping) 방법(Plant J. 16: 735-743, 1998)을 이용하여 장일 조건, 23±1℃에서 3-4주 정도 키워 꽃대가 2 내지 10 cm에 이르는 애기장대에 형질 전환하여 형질전환체를 얻었다.

<54> <2-2> AtSPF 유전자들의 과발현 돌연변이체 확보

<55> AtSPF 유전자들의 과발현 돌연변이체의 제작을 위해 애기장대에서 35S 프로모터와 비슷한 수준으로 일정하게 유전자를 발현시키면서 메틸 자스몬산염(Methyl Jasmonate, MeJA)과 여러 가지 스트레스에 의해서 발현이 증가되는 블루 커퍼 바인딩 단백질(Blue Copper Binding protein, BCB)의 프로모터를 이용하여 유전자의 ORF를 과

발현시켰다(도 1B 내지 D 참조).

<56> *AtSPF1*, *AtSPF2* 및 *AtSPF3*의 ORF 부분을 각각 수득한 다음 이를 T4 DNA 중합효소를 이용하여 평활말단으로 만들었다. 이를 p3301:BCB vector의 *Sma*I 제한효소 부위에 삽입하여 식물체로 형질전환이 가능한 바이너리 벡터(binary vector)를 제작하였다. 이렇게 제작한 바이너리 벡터를 아그로박테리움 매개 플라스미드 도입 방법을 통하여 장일 조건, 23±1℃에서 3-4주정도 키워 꽃대가 2-10 cm에 이르는 애기장대에 형질전환하여 형질전환체를 얻었다.

<2-3> 돌연변이체 선별

<58> 분주 받은 결실 돌연변이체 종자를 받아서 각 유전자의 동형접합체 라인(homo line)을 선별하기 위하여 0.5×MS(Murashige & Skoog) 배지, 1% 수크로스(sucrose) 배지에 카나마이신(kanamycin) 항생제(35 μg/L)를 첨가하여 3주동안 키운 후 카나마이신-저항성 식물체들을 상토(Sunshine Mix #5, SUN GRO, 이하 화분 재배시 상토를 이용함)로 옮겨 심고 23±1℃의 항온실에서 16시간 명기, 8시간 암기의 광주기를 주면서 키워 각 개체 별로 종자를 확보하였다.

<59> 확보한 종자들을 0.5×MS, 1% 수크로스 배지에서 2주간 키운 후 공지의 식물 게놈 DNA 추출방법(Dellaportaplant DNA extraction method(Dellaportaplant et al., Plant Mol Biol Rep 1:19-21, 1983)을 이용하여 게놈 DNA를 분리하였다. T-DNA 삽입과 동형접합체 라인인지 여부를 PCR을 통해 다음과 같이 확인하였다.

<60> *AtSPF1*에 대해서는 T-DNA 삽입 여부를 확인하기 위하여 서열번호 7의 프라이머(T-DNA의 Left Board에 해당; TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG)와 서열번호 9의 프라이머(*AtSPF1* R: TCATATCTGTCGTAATCTACTCAACATCTC)를 이용하여 PCR을 수행한 다음 T-DNA가 삽입되어 약 1.9 kbp 크기의 PCR 산물이 나오는 라인을 선별하였다. 선별된 라인을 대상으로 *AtSPF1* 유전자의 ORF가 존재하는지 확인하기 위하여 서열번호 8의 프라이머(*AtSPF1* F: ATGGCTGGTATTGATAATAAAGCTGCTGTA) 및 서열번호 9의 프라이머(*AtSPF1* R)를 이용하여 다시 PCR을 수행하여 PCR 산물이 증폭되지 않는 라인을 동형접합체 라인으로 선별하였다(도 2A 참조).

<61> *AtSPF3*에 대해서는 마찬가지로 방법으로 T-DNA 삽입 여부를 확인하기 위하여 서열번호 7의 프라이머(T-DNA의 Left Board에 해당; TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG)와 서열번호 13의 프라이머(*AtSPF3* R: TCATATCTCTCCGGTGGTAGTGGCGGCACT)를 이용하여 PCR을 수행한 다음 T-DNA가 삽입되어 약 700 bp 크기의 PCR 산물이 나오는 라인을 선별하였다. 선별된 라인을 대상으로 *AtSPF3* 유전자의 ORF가 존재하는지 확인하기 위하여 서열번호 12의 프라이머(*AtSPF3* F: ATGGCCGACGATTGGGATCTCCACGCCGTA) 및 서열번호 13의 프라이머(*AtSPF3* R)를 이용하여 다시 PCR을 수행하여 PCR 산물이 증폭되지 않는 라인을 동형접합체 라인으로 선별하였다(도 2B 참조).

<62> *AtSPF2* 결실 돌연변이체와 *AtSPF1*, *AtSPF2* 및 *AtSPF3* 과발현 돌연변이체에 대해서는 T1 종자를 상토에 과종하고 0.01%의 바스타(basta)를 주기적으로 분사함으로써 바스타-저항성 식물체를 선별하여 각각의 개체에서 T2 종자를 확보하였다. 확보된 T2 종자는 0.5×MS, 1% 수크로스 배지에 50 μg의 PPT(DL-phosphinothricin)를 첨가한 배지에 200개씩 과종하여 바스타에 저항성을 보이는 개체와 민감성을 보이는 개체의 수가 3:1의 비율로 나타나는 것을 선별(Chi-square (χ^2) goodness of fit test로 통계 처리하여 p-value > 0.05로 나타나는 라인을 선별)하여 T-DNA가 1 카피(copy) 삽입된 것으로 간주하였다 (Table 2). 이렇게 선별한 개체를 과종 및 재배하여 개별적으로 종자를 확보하고 이를 0.5×MS, 1% 수크로스 배지에 50 μg/L의 PPT(DL-phosphinothricin)를 첨가한 배지에 각각 20개씩 과종하여 다음 세대(T3)에서 모두 바스타 저항성을 보이는 라인을 동형접합체 라인으로 선별하였다(표 1 참조).

표 1

		예상치		측정치		χ^2	p 값
		Basta ^R	Basta ^S	Basta ^R	Basta ^S		
<i>AtSPF1</i> 과발현체	#9	152	64	162	54	2.47	p>0.05
	#15	193	59	189	63	0.34	p>0.05
	#17	160	44	153	51	1.28	p>0.05
	#18	135	55	142.5	47.5	1.58	p>0.05

AtSPF2 결실 돌연변이체	#7	120	49	126.75	42.25	1.44	p>0.05
	#10	169	46	161.25	53.75	1.49	p>0.05
	#11	159	59	163.5	54.5	0.50	p>0.05
	#13	173	63	177	59	0.36	p>0.05
	#16	151	67	163.5	54.5	3.82	p>0.05
AtSPF2 과발현체	#3	206	52	193.5	64.5	3.23	p>0.05
	#11	128	42	127.5	42.5	0.01	p>0.05
AtSPF3 과발현체	#11	146	37	137.25	45.75	2.23	p>0.05
	#12	179	67	184.5	61.5	0.66	p>0.05
	#14	125	52	132.75	44.25	1.81	p>0.05
	#18	175	56	173.25	57.75	0.07	p>0.05

<64> (Basta^R : 바스타 저항성, Basta^S : 바스타 민감성)

<65> <2-4> 동형접합체 라인의 유전자의 발현도 검증

<66> 동형접합체 라인으로 선별한 결실 돌연변이체 및 과발현 돌연변이체에서 각각 3개의 라인을 선택하여 0.5×MS, 1% 수크로스를 함유한 배지에서 2주 동안 키운 후 전체 RNA(total RNA)를 추출하여 각 유전자의 발현 정도를 노던 블롯 분석과 RT-PCR로 확인해 보았다.

<67> 전체 RNA 분리는 TRI 반응액(TRI reagent, MRC, 미국)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 분리하였다. 분리한 10 µg의 RNA를 5.5% 포름알데히드(formaldehyde)가 포함된 1.2% 아가로스 겔에서 전기영동하여 전개한 후 Hybond-N+ 나일론 멤브레인(Amersham Bioscience, 미국)에 모세관 전이(capillary transfer) 방법으로 옮긴 후 AtSPF1, AtSPF2와 AtSPF3 각 유전자에 대한 프로브와 혼성화하였다.

<68> RT-PCR은 Total RNA 2 µg에 25 ng oligo(dT)₁₅ 프라이머, 10 mM dNTP 혼합용액, 2 µl의 10× 반응버퍼, 5 mM MgCl₂, 2 unit의 리보뉴클레아제 저해제, 15 unit의 AMV 역전사효소(Promega, 미국)를 넣어 최종 부피가 20 µl가 되게 한 후 42℃에서 60분간 반응시키고 95℃에서 5분간 반응을 정지시켜 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 하고, AtSPF1에 대해서는 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머를, AtSPF2에 대해서는 서열번호 10(AtSPF2 F: ATGTCTAATGAAACCAGAGATCTCTACAAC) 및 서열번호 11(AtSPF2 R: TCAAGGCTCTTGCTTAAAGAAAATTGAAGG)의 프라이머를, AtSPF3에 대해서는 서열번호 12 및 서열번호 13의 프라이머를 이용하여 94℃ 30초, 52℃ 30초, 72℃ 1분의 30 사이클(cycle)의 조건으로 PCR을 수행하였다.

<69> 그 결과, 도 3에서 보듯이 AtSPF1의 경우 과발현 돌연변이체에서 유전자의 발현이 현저하게 증가된 것을 알 수 있었다(도 3A). 그러나 대조구로 사용한 야생형에서의 발현이 확인되지 않았으므로 결실 돌연변이체에서의 유전자 발현억제 여부를 확인할 수 없어 상기에 기재한 바와 같이 상토에서 5주 동안 키운 야생형 및 결실 돌연변이체를 대상으로 RT-PCR을 수행하여 유전자 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 야생형에서는 AtSPF1이 발현되는 반면 knock out mutant line에서는 유전자가 발현되지 않음을 확인할 수 있었다(도 3B).

<70> AtSPF2의 경우 과발현 돌연변이체에서 유전자의 발현이 야생형에 비하여 증가된 경향을 확인할 수 있었고 이러한 경향은 RT-PCR에서도 똑같이 확인할 수 있었다. 그러나 RNAi에 의한 결실 형질전환체의 경우 유전자의 발현이 감소하지 않고 본래 유전자의 크기보다 약간 작은 크기의 band가 오히려 과다 발현된 것으로 보아 AtSPF2의 유전자 발현이 억제되지 않았음을 확인할 수 있었다(도 3C 및 D).

<71> AtSPF3의 경우 결실 돌연변이체(K/O 0948(SALK094892) 및 K/O 0982(SALK098205))에서는 유전자의 발현이 억제되고 과발현 돌연변이체에서는 발현이 증가되었음을 확인할 수 있었다(도 3E).

<72> 이와 같은 형질전환체의 제조 및 검증을 통해 AtSPF1에 대해서는 결실 돌연변이체로 #6과 #13을 선별하고, 과발현 돌연변이체로 #9-8과 #17-1를 선별하고, AtSPF3에 대해서는 결실 돌연변이체로 K/00948 #4와 K/00982 #1을 선별하고, 과발현 돌연변이체로 #12-5, #14-2를 선별하여 AtSPF1 및 AtSPF3의 기능을 확인하기 위한 이하의 실험을 진행하였다.

<73> <실시예 3>

<74> AtSPF1 돌연변이체에서의 생리활성 변화

<75> <3-1> 돌연변이체와 야생형의 표현형 비교

<76> *AtSPF1* 유전자의 결실 돌연변이체와 과발현 돌연변이체를 야생형과 함께 같은 화분에 심어 3-5주간 키운 뒤 표현형을 비교하였다.

<77> 그 결과 도 4에서 보듯이 *AtSPF1* 유전자의 발현이 억제된 결실 돌연변이체 라인에서는 야생형과 뚜렷한 표현형의 차이가 나타나지 않았으나 유전자가 가장 많이 과발현되었던 과발현 돌연변이체 #17-1 라인에서는 꽃대가 올라오기 직전의 4주차 식물에서 야생형에 비해 잎의 색이 연해지고, 뒤쪽으로 잎이 말리는 표현형을 관찰할 수 있었고 꽃대가 올라오고 종자가 형성되는 노화 단계에서 야생형과 비슷한 키를 가지나 꼬투리의 생성이 약간 감소되는 경향을 확인할 수 있었다.

<78> <3-2> 돌연변이체와 야생형의 생활사 비교

<79> *AtSPF* 유전자가 당 관련 유전자로 밝혀진 고구마의 *SPF1*과 유사성을 가지고 있고 식물체의 성장에 당이 매우 중요한 역할을 수행하므로 *AtSPF* 유전자의 형질전환체를 이용하여 유전자의 발현 정도가 식물체의 발달과 생활사에 미치는 영향을 알아보려고 인플란타 분석(*in planta assay*)를 다음과 같이 수행하였다. 같은 화분에 야생형과 *AtSPF1*의 결실 및 과발현 돌연변이체를 심어 키움으로써 식물의 성장에 필요한 조건을 동등하게 유지하고, 각 개체의 발아시기(*germination*), 3-4번 잎이 형성되는 시기(*emergence*), 꽃대 형성 시기(*bolting*), 육안으로 3-4번 잎의 노화가 시작되는 시기(*senescence initiation*), 잎 면적의 50% 노화가 진행되는 시기(50% *senescence*)를 관찰하였다. 관찰은 동일한 2개의 화분을 1배치로 하여 3번 반복 실험하였다.

<80> 그 결과, 도 5에서 보듯이 *AtSPF1* 유전자의 결실 돌연변이체에서 꽃대의 형성시기가 약간 빨라지는 경향을 관찰하였으나 발아시기를 비롯한 노화의 진행에서 야생형과 비교하였을 때 큰 차이를 관찰하지 못하였다.

<81> <3-3> 엽록소 함량 비교

<82> 상기 실시예 <3-1>에서 *AtSPF1* 유전자의 과발현 돌연변이체에서 야생형에 비해 잎의 색이 연해지는 것을 확인할 수 있었다. 이것이 잎에 존재하는 엽록소의 양의 차이에서 비롯된 것인지 확인하고자 4주 동안 상토에서 키운 각 개체의 3-4번 잎에서 엽록소의 양을 측정하였다.

<83> 상토에서 4주 동안 키운 식물체의 3-4번 잎을 Mes-Tris buffer (5 mM, pH 6.5)에 뒤집어 띄운 후 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도에서 0일, 1일, 2일, 3일에 걸쳐 암처리 하였다. 엽록소를 추출하기 위하여 잎 2장 당 500 μl 의 95% ethanol을 넣고 80°C 에서 가열한 후 648 nm와 664 nm에서 잎을 제외한 용액의 OD값을 측정하였다. 측정된 OD값은 $[(648 \text{ nm에서 측정된 OD값} \times 22.24) + (664 \text{ nm에서 측정된 OD값} \times 5.24)] / \text{ethanol volume} / \text{잎의 수}$ 를 활용하여 엽록소의 양을 계산하였다(Lichtenthaler, H.K. *Methods in enzymol.* 148:350-382, 1987).

<84> 또한 잎의 색이 야생형에 비해 연하면 노화를 유도하는 환경조건에서 노화의 진행이 촉진되는 경향들을 보이므로 5 mM Mes-Tris 버퍼 (pH 6.5)에 잎 뒷면의 기공이 공기와 접촉하도록 띄우고 3일 동안 암처리 한 후 엽록소 양의 변화를 야생형과 비교하여 보았다.

<85> 그 결과, 도 6에서 보듯이 잎의 색이 연해지는 표현형을 나타내었던 *AtSPF1* 과발현 돌연변이체 #17-1은 야생형에 비하여 약 43.6% 정도 적은 엽록소를 가지고 있으나 다른 과발현 돌연변이체인 #9-8이나 발현이 억제된 돌연변이체의 경우 야생형보다 비슷하거나 약 13%정도 감소되는 결과를 나타내었다(도 6A). 이를 통하여 유전자의 발현이 일정 수준 이상 증가해야 엽록소 생성이 현저히 감소하는 것이라 추측할 수 있었으나 3일 동안 암처리를 하여 엽록소의 붕괴를 유도한 후 그 정도를 처리 전과 비교하여 노화의 진행 속도를 측정한 결과 *AtSPF1*의 형질전환체들의 엽록소가 야생형과 비슷한 속도로 감소되는 것으로 보아 자연상태에서나 노화 촉진 처리에 대해서 영향을 받지 않음을 알 수 있었다(도 6B).

<86> <3-4> 하배축의 성장률 변화

<87> *AtSPF* 유전자가 식물체의 성장에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 하배축의 길이를 측정하였다. 수크로스를 0, 1, 3, 5%의 농도 별로 처리한 $0.5 \times \text{MS}$ 배지에 형질전환체와 야생형 종자를 함께 파종하였고, 12시간 동안 명처리하고 발아시 자엽에서 광합성에 의해 합성된 당의 영향을 배제하기 위하여 3.5일간 암처리하여 발아를 유도하였다. 암처리가 끝난 식물체의 자엽과 뿌리를 제외한 부분의 길이를 측정하였다. 형질전환체와 야생형 종자는 각각 30개씩 파종하였으며 동일한 3개의 배지를 한 세트로 하여 2번 이상 반복 실험하였다.

<88> 그 결과, 도 7에서 보듯이 수크로스의 농도나 유전자 발현 정도 차이에 상관없이 야생형에 비하여 모든 형질전환체의 하배축 길이가 길어짐을 확인할 수 있었으며 잎의 변형을 나타내었던 *AtSPF1* 과발현 돌연변이체 #17-1도

같은 결과를 나타내었다.

<89> <3-5> 발아율 변화

<90> 성장과의 관련성을 알아보기 위해 하배측의 길이를 측정하는 과정에서 야생형에 비하여 형질전환체의 발아율이 높은 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 당을 비롯한 여러 가지 스트레스의 처리가 형질전환체의 발아율에 어떤 영향을 미치는지 조사해 보았다.

<91> 0.5× MS에 NaCl(각각 0, 50, 100, 200mM), ABA(0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μM), 수크로스(0, 1, 3, 5%) 및 만니톨(0, 1, 3, 5, 7, 10%)을 농도별로 첨가하여 배지를 만들고 각 유전자의 형질전환체와 야생형을 함께 파종한 후 23±1℃에서 12시간 명처리하고 3.5일 동안 암처리를 한 뒤 자엽이 형성된 것을 발아한 것으로 보고 발아율을 측정하였다. 형질전환체와 야생형 종자는 각각 30개씩 파종하였으며 동일한 3개의 배지를 한 세트로 하여 2번 이상 반복 실험하였다.

<92> 그 결과, 도 8에서 보듯이 AtSPF1 유전자의 형질전환체는 고농도의 수크로스 처리에서 야생형에 비하여 약간씩 높은 발아율을 나타내었으나 유전자 발현 정도의 차이에 따른 경향성을 확인할 수는 없었으며 만니톨을 활용한 삼투 스트레스의 영향을 알아본 결과 특이적인 사항을 확인하지 못하였다. 그러나 NaCl을 이용한 염 스트레스와 발아를 억제시키는 호르몬인 ABA의 처리에 대하여 AtSPF1 과발현 돌연변이체에서 발아율이 뚜렷하게 감소하는 경향성을 나타내었다.

<93> <3-6> 종자 생산량의 변화

<94> AtSPF1 유전자의 형질전환체에서 식물체의 성장이 촉진되는 경향을 나타내고 유전자의 과발현이 잎의 모양을 변화시키므로, 이것이 종자의 생산량에 어떠한 영향을 미치는지 확인해보고자 각 형질전환체들의 종자 생산량을 측정하여 보았다.

<95> 각 유전자의 형질전환체와 야생형을 한 화분에 파종하여 23±1℃ 장일 조건에서 2달간 키웠다. 형질전환체와 야생형 각각 10개의 개체에서 개체 당 맺히는 꼬투리의 수를 기록하고 개체 당 10개의 꼬투리를 임의로 선발하여 꼬투리당 생성되는 종자의 개수를 기록한 후 이를 바탕으로 전체 종자 생산량을 계산하였다. 이 실험은 화분 2개를 1배치로 하여 3번 반복하여 수행하였다.

<96> 그 결과, 하기 표 2에서 보듯이, AtSPF1의 과발현 돌연변이체는 야생형에 비하여 종자의 생산량이 감소되는 경향을 나타내었으며 특히, AtSPF1 유전자가 가장 많이 과발현되었던 #17-1 line은 30% 정도의 감소율을 나타내었다. 그러나 AtSPF1 유전자의 발현이 억제된 돌연변이체에서도 엽록소의 농도 변화 같은 표현형을 보인 #17-1보다는 감소 정도가 뚜렷하지 않았으나 야생형보다 종자의 생산량이 감소되는 경향을 확인할 수 있었다. 이에 대하여 선별된 결실 돌연변이체 이외의 다른 돌연변이체에서 같은 방법으로 종자 생산량을 확인하였으나 야생형보다 감소되는 경향을 보였다. 한편, 꼬투리당 맺히는 종자의 수가 야생형과 비슷한 수준으로 유지되므로 이러한 종자 생산량의 감소는 개체 당 맺히는 꼬투리 수의 감소에서 비롯된 것이다. 그러나 AtSPF1 과발현 돌연변이체 #17-1의 생산량 감소는 꼬투리 수뿐만 아니라 꼬투리당 맺히는 종자의 수도 감소된 결과로 나타났다.

표 2

라인	꼬투리 수	꼬투리 당 종자수	전체 종자수	비(%)
야생형	306.14±122.49	44.91±8.45	13748.88±382.51	100
AtSPF1K/0	260.09±36.95	44±7.21	11444±184.11	83.24
야생형	48±8.61	44.91±8.45	2230.24±382.51	100
AtSPF10/E #9-8	45.75±11.61	44.59±7.42	2103.05±581.11	94.30
AtSPF10/E #17-1	37.38±13.47	40.60±7.41	1572.05±666.83	70.49

<98> <실시예 4>

<99> AtSPF3 돌연변이체에서의 생리활성 변화

<100> <4-1> 돌연변이체와 야생형의 표현형 비교

<101> AtSPF3 유전자의 결실 돌연변이체와 과발현 돌연변이체를 야생형과 함께 같은 화분에 심어 3-5주간 키운 뒤 표현형을 비교하였다.

- <102> 그 결과, 도 9에서 보듯이 *AtSPF3* 유전자의 발현이 증가된 돌연변이체에서 야생형에 비해 식물의 키가 약간 증가되는 경향을 보였으나 형질전환체에서 잎이나 꽃에서 나타나는 형태적인 변화를 찾을 수 없었다.
- <103> **<4-2> 돌연변이체와 야생형의 생활사 비교**
- <104> 같은 화분에 야생형과 *AtSPF3*의 결실 및 과발현 돌연변이체를 심어 키움으로써 식물의 생장에 필요한 조건을 동등하게 유지하고, 각 개체의 발아시기(germination), 3-4번 잎이 형성되는 시기(emergence), 꽃대 형성 시기(bolting), 육안으로 3-4번 잎의 노화가 시작되는 시기(senescence initiation), 잎 면적의 50% 노화가 진행되는 시기(50% senescence)를 관찰하였다. 관찰은 동일한 2개의 화분을 1배치로 하여 3번 반복 실험하였다.
- <105> 그 결과, 도 10에서 보듯이 야생형과 비교하였을 때 형질전환체들의 전반적인 발달과 생활사에서 차이를 나타내지 않았다.
- <106> **<4-3> 하배축의 성장률 변화**
- <107> *AtSPF3* 유전자가 식물체의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 하배축의 길이를 측정하였다. 수크로스를 0, 1, 3, 5%의 농도 별로 처리한 $0.5 \times MS$ 배지에 형질전환체와 야생형 종자를 함께 파종하였고, 12시간 동안 명처리하고 발아시 자엽에서 광합성에 의해 합성된 당의 영향을 배제하기 위하여 3.5일간 암처리하여 발아를 유도하였다. 암처리가 끝난 식물체의 자엽과 뿌리를 제외한 부분의 길이를 측정하였다. 형질전환체와 야생형 종자는 각각 30개씩 파종하였으며 동일한 3개의 배지를 한 세트로 하여 2번 이상 반복 실험하였다.
- <108> 그 결과, 도 11에서 보듯이, 상기 실시예 <3-4>에서와 유사하게 수크로스의 농도나 유전자 발현 정도 차이에 상관없이 야생형에 비해서 모든 형질전환체의 하배축의 길이가 증가되는 양상을 나타내었다.
- <109> **<4-4> 발아율 변화**
- <110> 성장과의 관련성을 알아보기 위해 하배축의 길이를 측정하는 과정에서 야생형에 비하여 형질전환체의 발아율이 높은 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 당을 비롯한 여러 가지 스트레스의 처리가 형질전환체의 발아율에 어떤 영향을 미치는지 조사해 보았다.
- <111> $0.5 \times MS$ 에 NaCl(각각 0, 50, 100, 200mM), ABA(0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μM), 수크로스(0, 1, 3, 5%) 및 만니톨(0, 1, 3, 5, 7, 10%)을 농도별로 첨가하여 배지를 만들고 각 유전자의 형질전환체와 야생형을 함께 파종한 후 $23 \pm 1^\circ C$ 에서 12시간 명처리하고 3.5일 동안 암처리를 한 뒤 자엽이 형성된 것을 발아한 것으로 보고 발아율을 측정하였다. 형질전환체와 야생형 종자는 각각 30개씩 파종하였으며 동일한 3개의 배지를 한 세트로 하여 2번 이상 반복 실험하였다.
- <112> 그 결과, 도 12에서 보듯이 *AtSPF3* 유전자의 형질전환체는 수크로스 처리에서 전반적으로 야생형에 비하여 약간씩 높은 발아율을 나타냈으나 유전자 발현 정도의 차이에 따른 경향성을 확인할 수 없었다. 만니톨이나 ABA 호르몬 처리에 대하여 결실 돌연변이체와 과발현 돌연변이체에서 공통적인 경향성을 나타내지 않으나 NaCl을 처리한 염 스트레스에 대하여 과발현 돌연변이체의 종자 발아가 억제되는 양상을 나타내었다.
- <113> **<4-5> 종자 생산량의 변화**
- <114> *AtSPF3*의 과발현 돌연변이체에서 형태상 식물의 키가 증가되고 결가지의 생성이 증가되면서 꽃의 수가 증가되는 모습을 보여 이것이 종자의 생산량에 어떠한 영향을 미치는지 확인해보고자 각 형질전환체들의 종자 생산량을 측정하여 보았다.
- <115> 각 유전자의 형질전환체와 야생형을 한 화분에 파종하여 $23 \pm 1^\circ C$ 장일 조건에서 2달간 키웠다. 형질전환체와 야생형 각각 10개의 개체에서 개체 당 맺히는 꼬투리의 수를 기록하고 개체 당 10개의 꼬투리를 임의로 선발하여 꼬투리당 생성되는 종자의 개수를 기록한 후 이를 바탕으로 전체 종자 생산량을 계산하였다. 이 실험은 화분 2개를 1배치로 하여 3번 반복하여 수행하였다.
- <116> 그 결과, 표 3에서 보듯이 *AtSPF3* 유전자의 과발현 돌연변이체에서는 야생형보다 평균 약 30%정도 종자 생산량이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 식물체에 맺히는 꼬투리의 수가 증가하는 데서 기인하는 것으로 꼬투리당 맺히는 종자의 수에는 큰 차이를 나타내지 않았다.

표 3

라인	꼬투리 수	꼬투리 당 종자수	전체 종자수	비(%)
야생형	327.92±44.20	44.68±7.48	14651.6±681.36	100
AtSPF3K/O 0948	364.64±43.54	43.04±5.72	15694.11±684.58	107.12
AtSPF3K/O 0982	303.35±36.15	44.21±7.60	13410.93±1338.23	91.53
야생형	45±10.92	44.68±7.48	2034.98±681.36	100
AtSPF30/E #12-5	64.38±15.15	46.90±8.06	3038.49±805.45	149.31
AtSPF30/E #14-2	57.14±20.05	45.57±6.59	2654.67±1030.35	130.49

발명의 효과

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명의 AtSPF1는 그 발현이 증가 또는 감소하는 경우 식물의 종자 생산량을 변화시키는 효과를 갖는다. 따라서 본 발명의 AtSPF1는 식물의 증산, 품종의 개량에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 AtSPF2 결실용(A), AtSPF1 과발현용(B), AtSPF2 과발현용(C), AtSPF3 과발현용(D) 재조합 발현벡터의 구조를 나타낸 모식도이다.(LB : left border, 35S poly : 35S 프로모터용 poly A 해당서열, BAR : Basta(phosphinothricin) 저항성 유전자, 35S : 35S 프로모터, BCB promoter : 애기장대의 Blue Copper Binding protein의 프로모터, Nos poly A : Nos 프로모터용 poly A 해당서열, RB : right border)

도 2는 본 발명의 AtSPF1 결실돌연변이체(A) 및 AtSPF3 결실돌연변이체(B)에서 동형접합체를 선별한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 AtSPF1 돌연변이체(A, B), AtSPF2 돌연변이체(C, D) 및 AtSPF3 돌연변이체(E)에서 각각 AtSPF1, AtSPF2 및 AtSPF3의 발현여부를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 AtSPF1 돌연변이체와 야생형의 표현형을 비교한 결과이다.

도 5는 본 발명의 AtSPF1 돌연변이체와 야생형의 생활사를 비교한 결과이다.(KO : 결실 돌연변이체, OE : 과발현 돌연변이체)

도 6은 본 발명의 AtSPF1 돌연변이체와 야생형의 엽록소 함량(A) 및 노화촉진시 엽록소 함량(B)을 비교한 결과이다.(K/O : 결실 돌연변이체, O/E : 과발현 돌연변이체)

도 7은 본 발명의 AtSPF1 돌연변이체와 야생형의 하배축의 성장률을 비교한 결과이다.

도 8은 본 발명의 AtSPF1 돌연변이체와 야생형의 발아율을 비교한 결과이다.

도 9는 본 발명의 AtSPF3 돌연변이체와 야생형의 표현형을 비교한 결과이다.

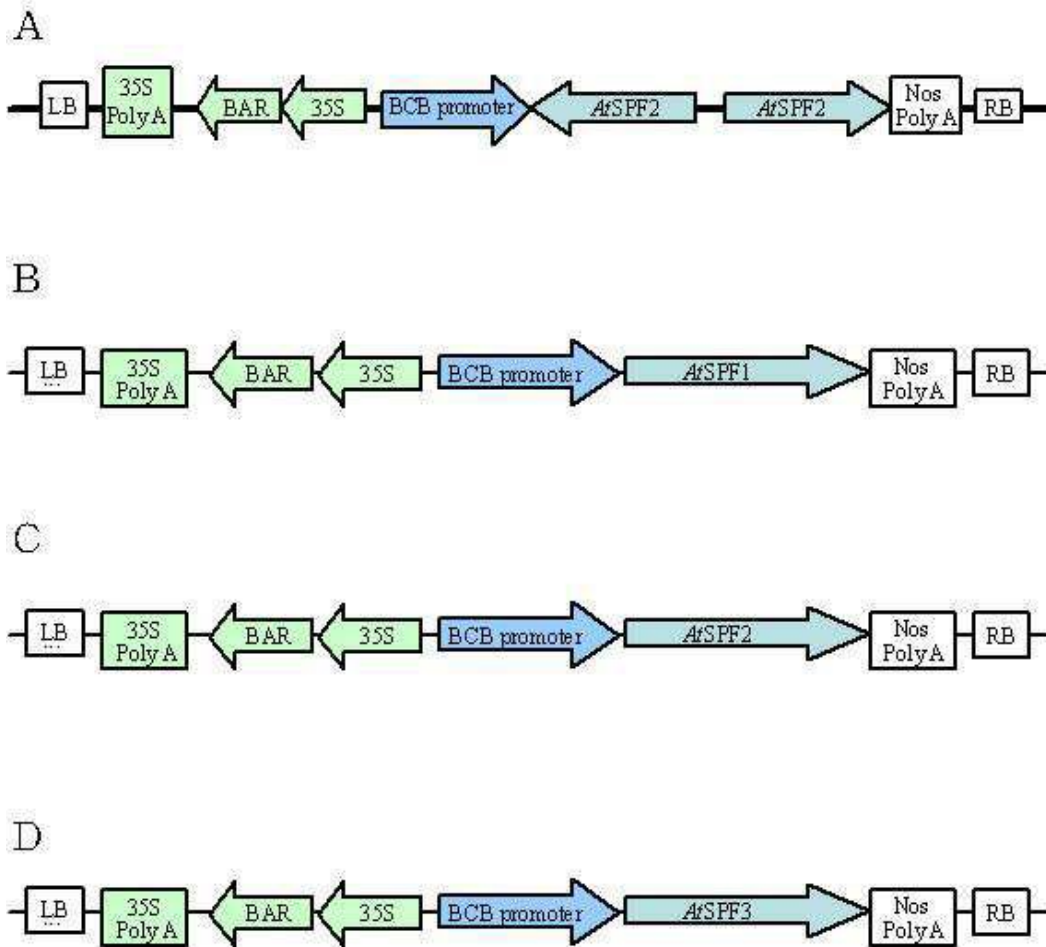
도 10은 본 발명의 AtSPF3 돌연변이체와 야생형의 생활사를 비교한 결과이다.

도 11은 본 발명의 AtSPF3 돌연변이체와 야생형의 하배축의 성장률을 비교한 결과이다.

도 12는 본 발명의 AtSPF3 돌연변이체와 야생형의 발아율을 비교한 결과이다.

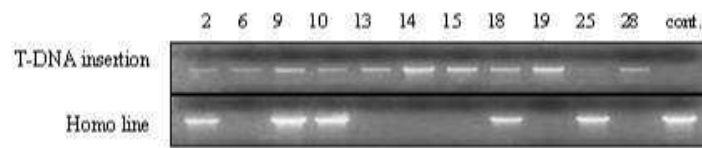
도면

도면1

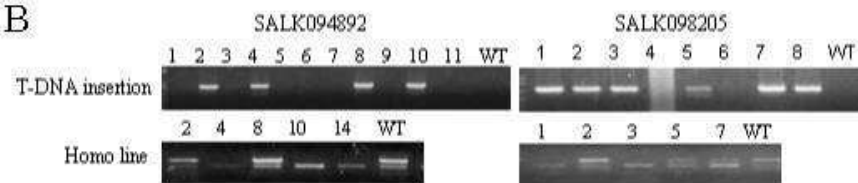


도면2

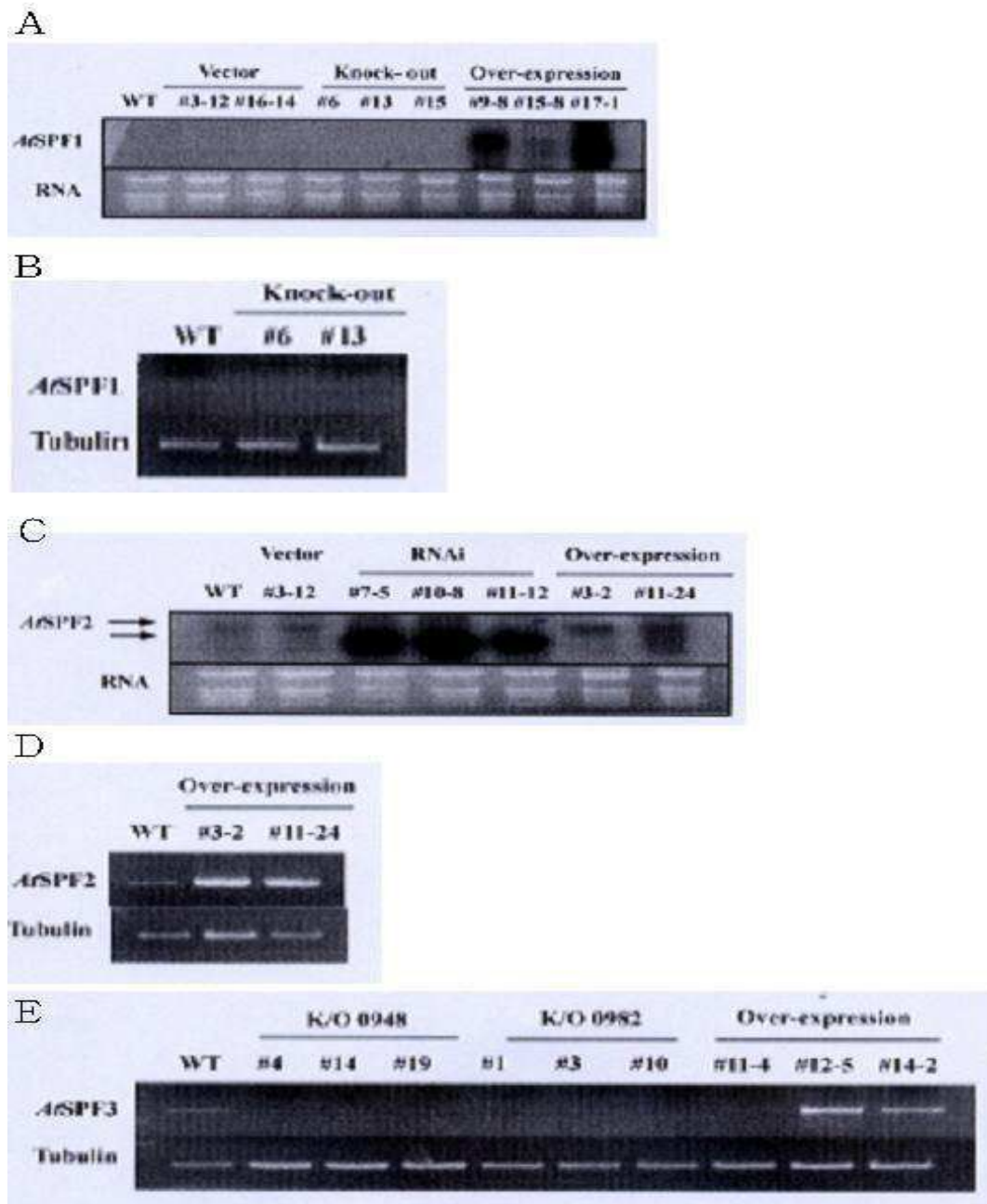
A



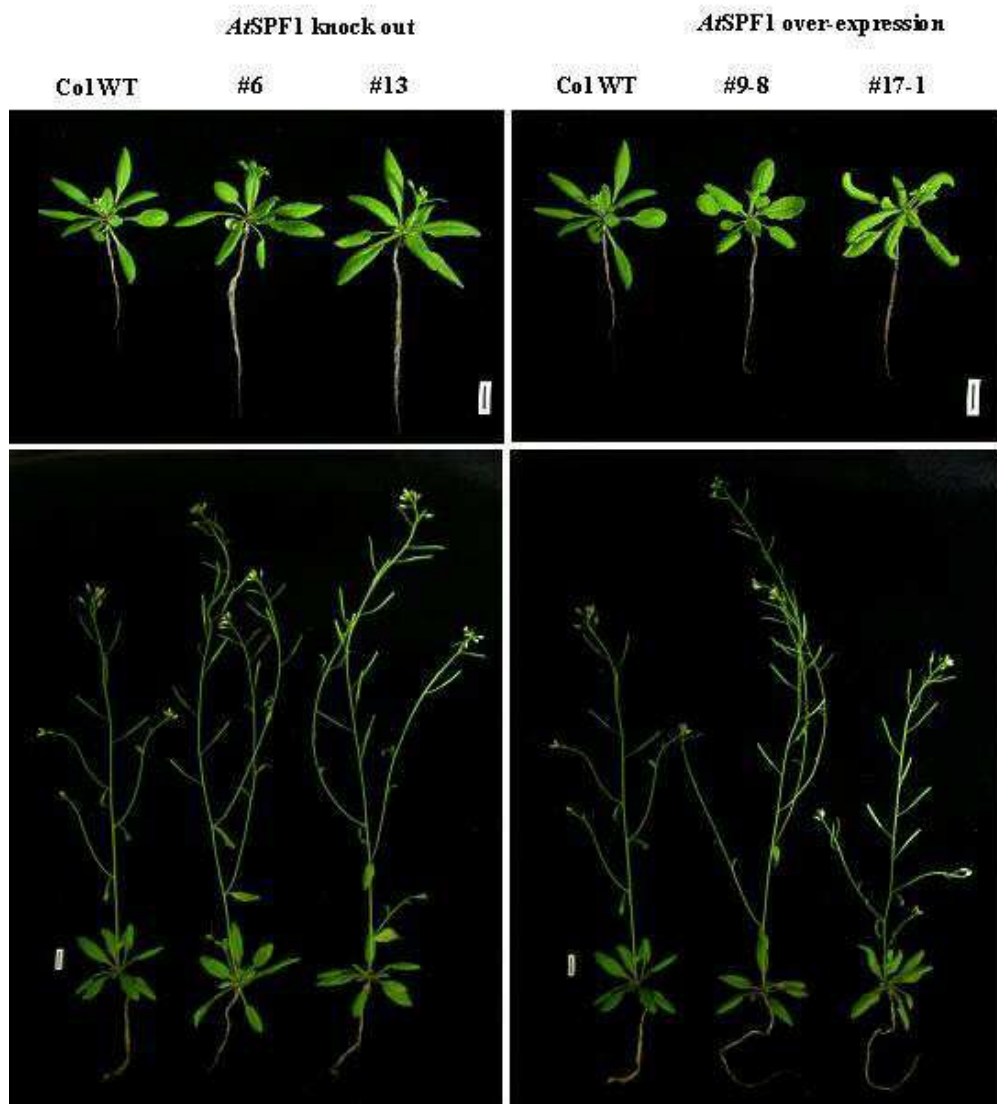
B



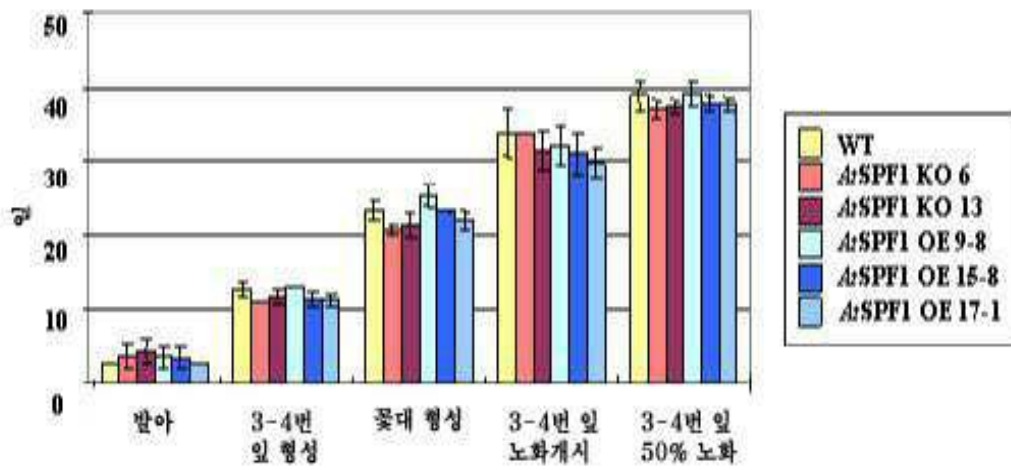
도면3



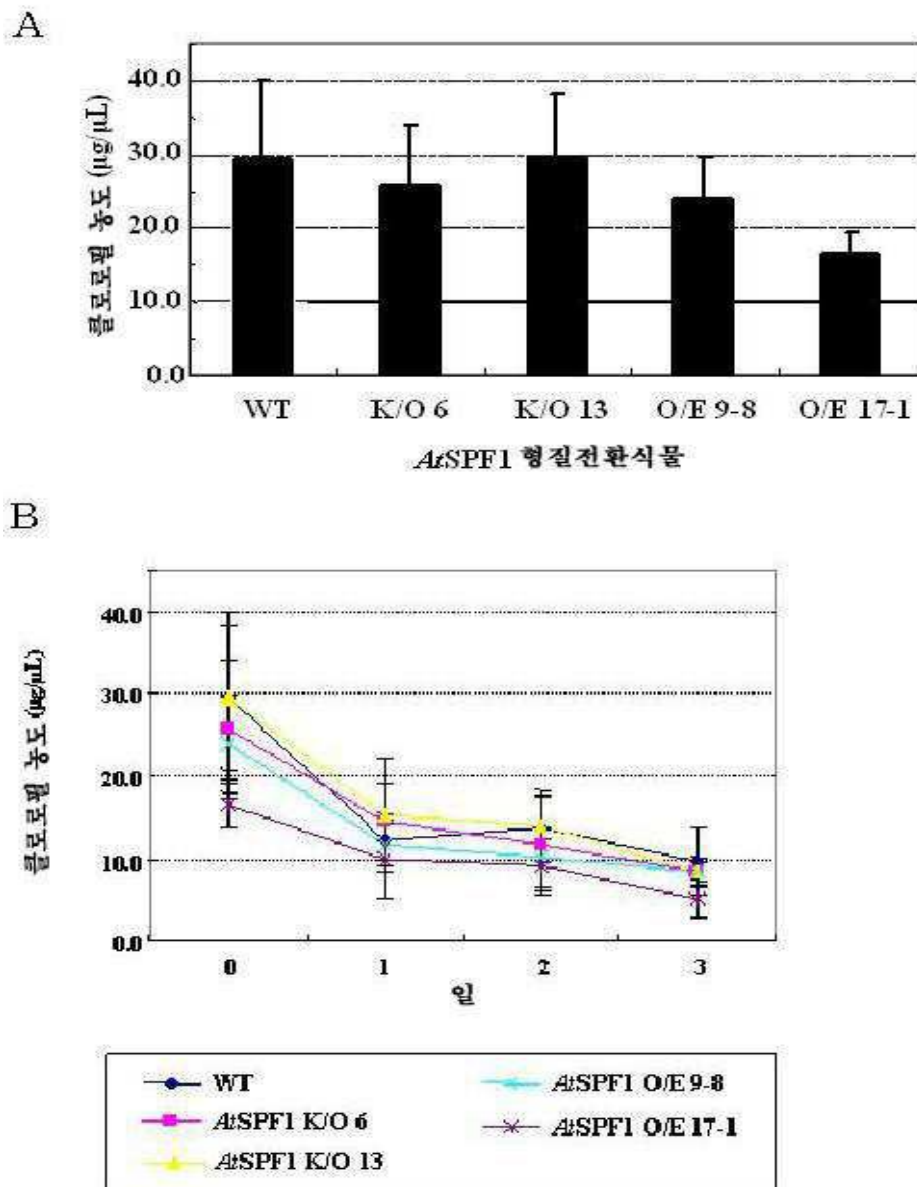
도면4



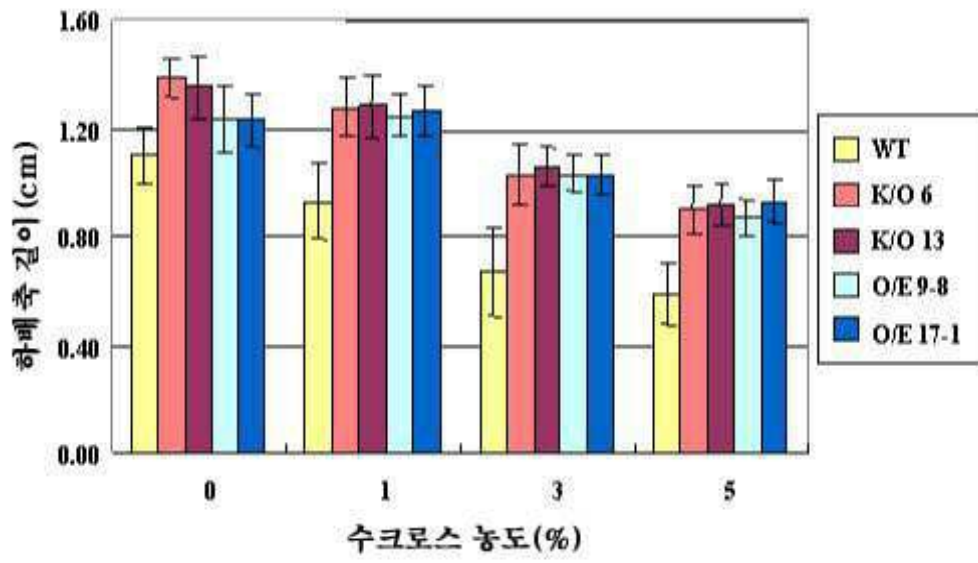
도면5



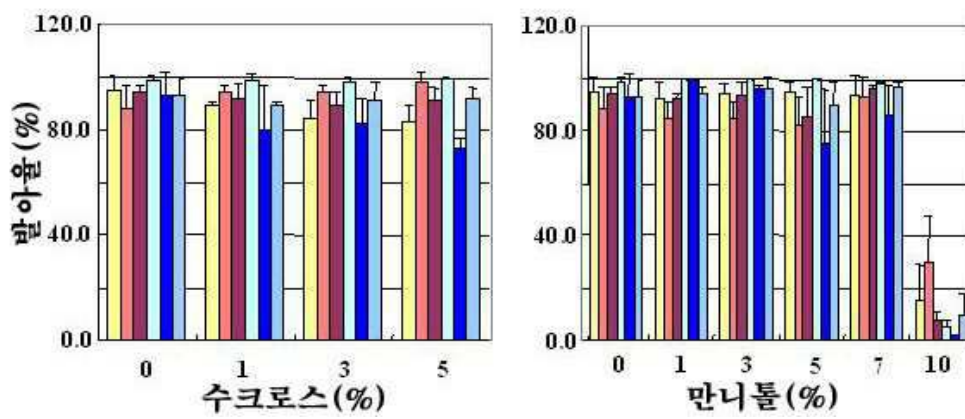
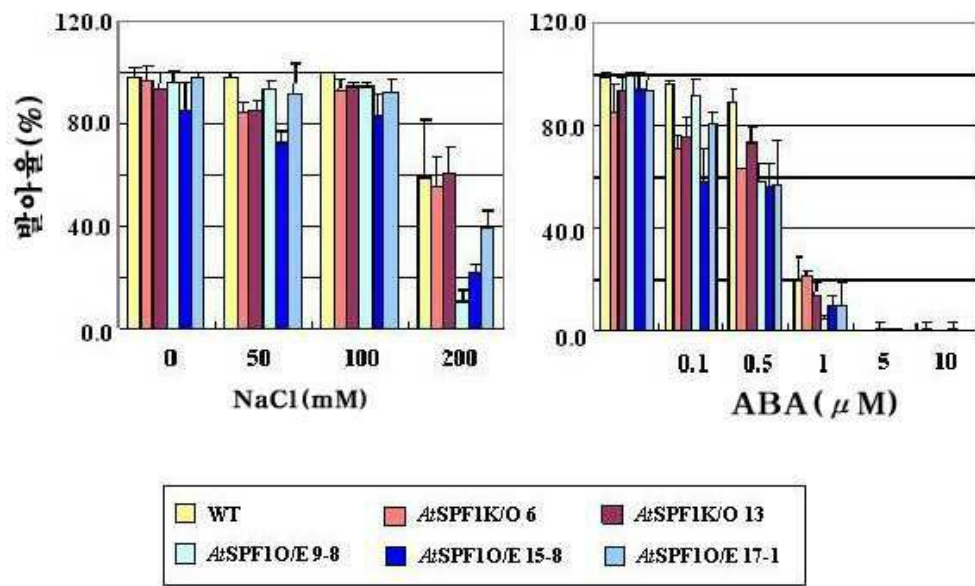
도면6



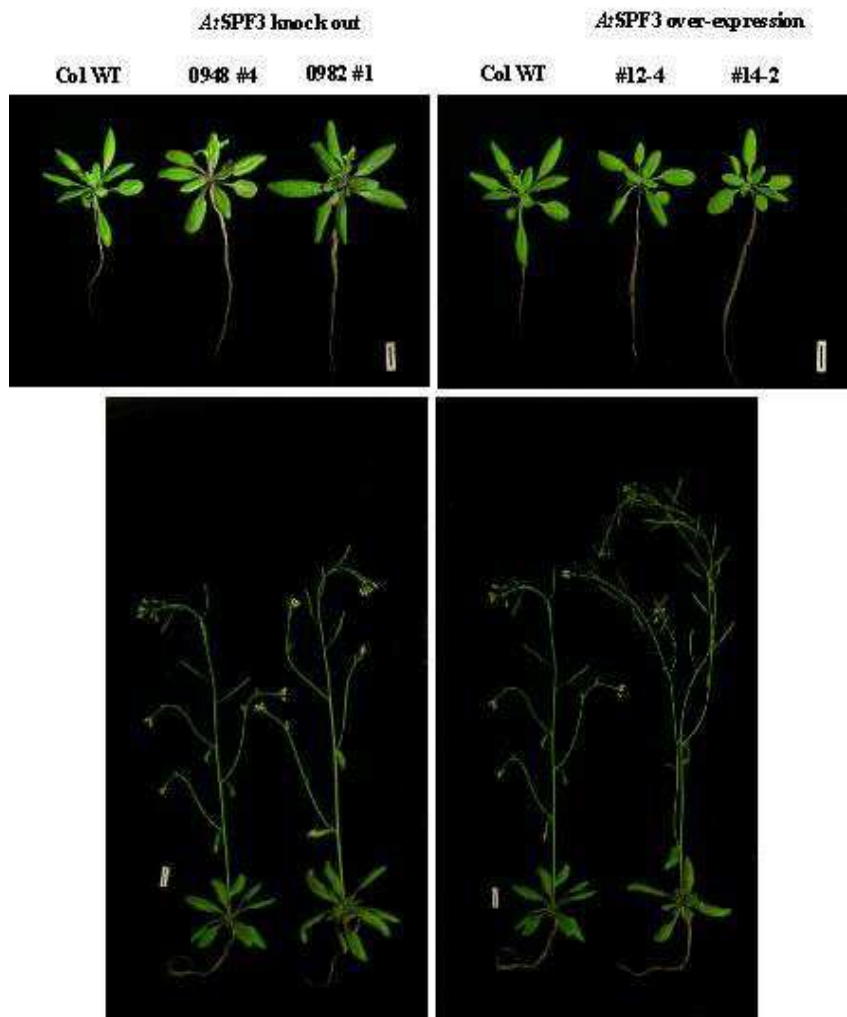
도면7



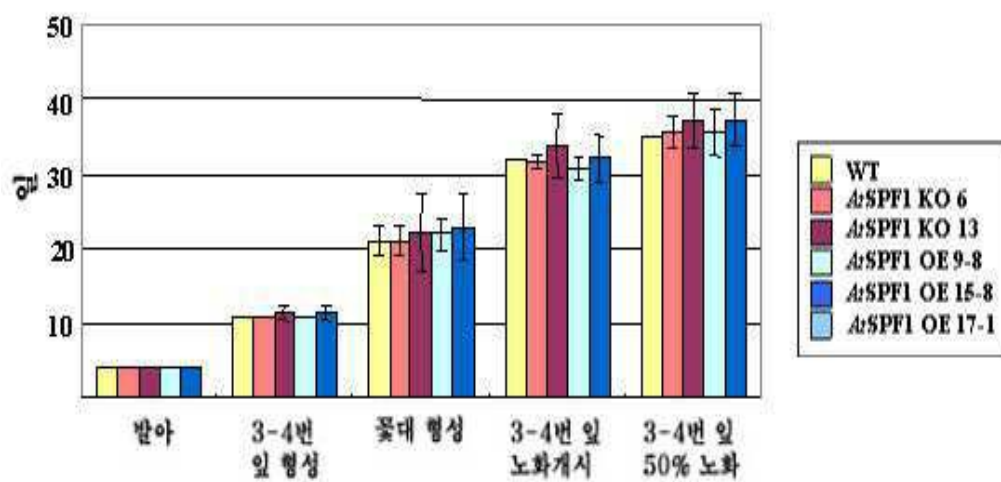
도면8



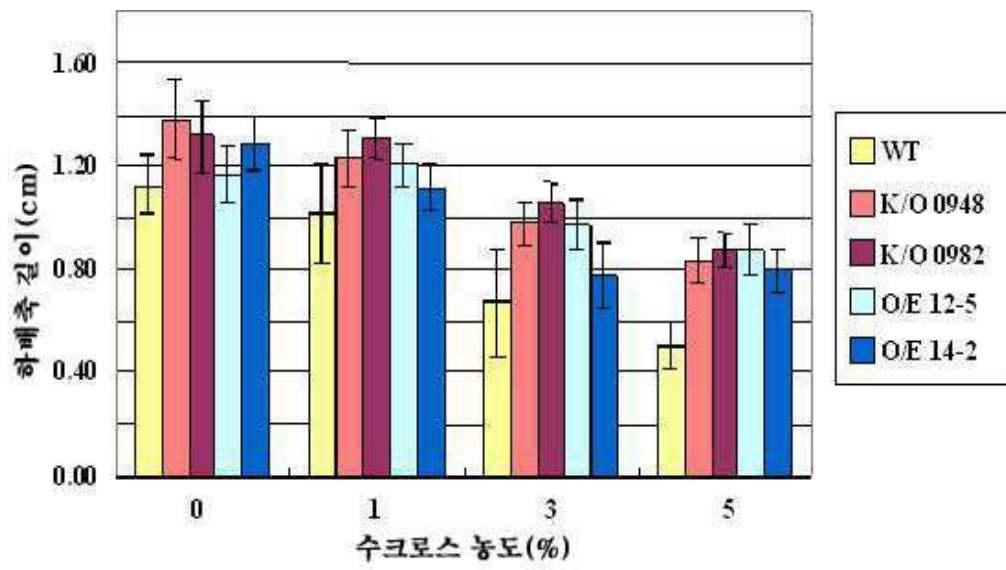
도면9



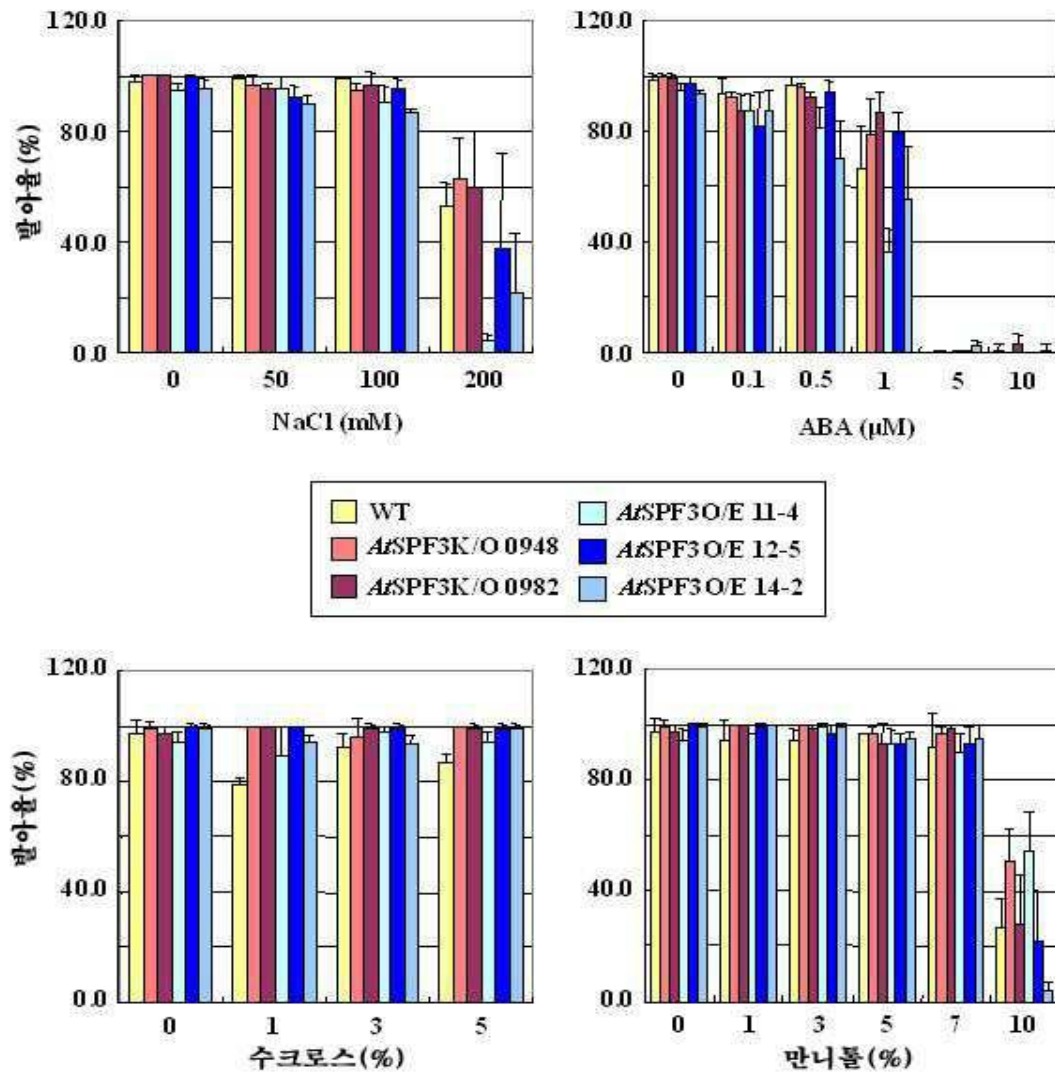
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation
Postech Academy-Industry Foundation
- <120> Method for changing seed productivity of plant by controlling the level of *AtSPF1* in plant
- <130> NP07-0042
- <160> 13
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 568
- <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Ala Gly Ile Asp Asn Lys Ala Ala Val Met Gly Glu Trp Phe Asp
1 5 10 15

Cys Ser Thr Thr Asn His Arg Lys Arg Ser Lys Ala Glu Leu Gly Arg
20 25 30

Glu Phe Ser Leu Asn Tyr Ile Lys Asn Glu Asp Ser Leu Gln Thr Thr
35 40 45

Phe Gln Glu Ser Ser Arg Gly Ala Leu Arg Glu Arg Ile Ala Ala Arg
50 55 60

Ser Gly Phe Asn Ala Pro Trp Leu Asn Thr Glu Asp Ile Leu Gln Ser
65 70 75 80

Lys Ser Leu Thr Ile Ser Ser Pro Gly Leu Ser Pro Ala Thr Leu Leu
85 90 95

Glu Ser Pro Val Phe Leu Ser Asn Pro Leu Leu Ser Pro Thr Thr Gly
100 105 110

Lys Leu Ser Ser Val Pro Ser Asp Lys Ala Lys Ala Glu Leu Phe Asp
115 120 125

Asp Ile Thr Thr Ser Leu Ala Phe Gln Thr Ile Ser Gly Ser Gly Leu
130 135 140

Asp Pro Thr Asn Ile Ala Leu Glu Pro Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Glu
145 150 155 160

Glu Arg Gln Leu Gly Gly Leu Gly Asp Ser Met Ala Cys Cys Ala Pro
165 170 175

Ala Asp Asp Gly Tyr Asn Trp Arg Lys Tyr Gly Gln Lys Leu Val Lys
180 185 190

Gly Ser Glu Tyr Pro Arg Ser Tyr Tyr Lys Cys Thr His Pro Asn Cys
195 200 205

Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Arg Ser Arg Glu Gly His Ile Ile Glu

210	215	220
Ile Ile Tyr Thr Gly Asp His Ile His Ser Lys Pro Pro Pro Asn Arg		
225	230	235 240
Arg Ser Gly Ile Gly Ser Ser Gly Thr Gly Gln Asp Met Gln Ile Asp		
	245	250 255
Ala Thr Glu Tyr Glu Gly Phe Ala Gly Thr Asn Glu Asn Ile Glu Trp		
	260	265 270
Thr Ser Pro Val Ser Ala Glu Leu Glu Tyr Gly Ser His Ser Gly Ser		
	275	280 285
Met Gln Val Gln Asn Gly Thr His Gln Phe Gly Tyr Gly Asp Ala Ala		
	290	295 300
Ala Asp Ala Leu Tyr Arg Asp Glu Asn Glu Asp Asp Arg Thr Ser His		
305	310	315 320
Met Ser Val Ser Leu Thr Tyr Asp Gly Glu Val Glu Glu Ser Glu Ser		
	325	330 335
Lys Arg Arg Lys Leu Glu Ala Tyr Ala Thr Glu Thr Ser Gly Ser Thr		
	340	345 350
Arg Ala Ser Arg Glu Pro Arg Val Val Val Gln Thr Thr Ser Asp Ile		
	355	360 365
Asp Ile Leu Asp Asp Gly Tyr Arg Trp Arg Lys Tyr Gly Gln Lys Val		
370	375	380
Val Lys Gly Asn Pro Asn Pro Arg Ser Tyr Tyr Lys Cys Thr Ala Asn		
385	390	395 400
Gly Cys Thr Val Thr Lys His Val Glu Arg Ala Ser Asp Asp Phe Lys		
	405	410 415
Ser Val Leu Thr Thr Tyr Ile Gly Lys His Thr His Val Val Pro Ala		
	420	425 430
Ala Arg Asn Ser Ser His Val Gly Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu Gln		
	435	440 445

Gly Ser Leu Ala Thr Gln Thr His Asn His Asn Val His Tyr Pro Met
450 455 460

Pro His Ser Arg Ser Glu Gly Leu Ala Thr Ala Asn Ser Ser Leu Phe
465 470 475 480

Asp Phe Gln Ser His Leu Arg His Pro Thr Gly Phe Ser Val Tyr Ile
485 490 495

Gly Gln Ser Glu Leu Ser Asp Leu Ser Met Pro Gly Leu Thr Ile Gly
500 505 510

Gln Glu Lys Leu Thr Ser Leu Gln Ala Pro Asp Ile Gly Asp Pro Thr
515 520 525

Gly Leu Met Leu Gln Leu Ala Ala Gln Pro Lys Val Glu Pro Val Ser
530 535 540

Pro Gln Gln Gly Leu Asp Leu Ser Ala Ser Ser Leu Ile Cys Arg Glu
545 550 555 560

Met Leu Ser Arg Leu Arg Gln Ile
565

<210> 2
<211> 1707
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2
atggctggta ttgataataa agctgctgta atgggagaat ggttcgactg tagtactact 60

aaccacagga agagatcgaa agcggaactt ggtagagagt tttctttaaa ttacatcaag 120

aatgaggatt ctttgcaaac cacctttcaa gaaagttcac gaggagctct tcgtgaaagg 180

attgctgcga gatccgggtt taatgcaccg tggtaaaca ctgaggatat tcttcagtcg 240

aaatctttaa ccattcttct tcttggtctt agtctcgcaa ctctgttaga gtctcctgtt 300

ttcctctcaa accctttgct atctccaaca accgggaagc tctcatcagt accttctgat 360

aaggctaaag ctgagttatt tgacgacatt accacatcct tagccttcca aaccatttca	420
ggaagtggcc ttgatcctac taacatcgct ttagaacccg atgattccca agactatgaa	480
gaaagacagc tcggcggttt aggagactcg atggcttggt gtgcacctgc agatgatgga	540
tacaactgga gaaaatatgg acaaaagcta gttaaaggaa gtgagtatcc gcggagctat	600
tacaagtgca cgcacccgaa ttgtgaggcc aagaagaagg ttgaacggtc tcgggaaggt	660
catattatag agatcatata cacaggagat catatacaca gcaaacctcc acctaaccgc	720
cggtcaggga ttggatcatc cggctactggc caagacatgc aaatagatgc aaccgaatac	780
gaaggttttg ctggaaccaa tgagaacata gaatggacat cacctgtatc tgcagagctc	840
gaatacggaa gccattcagg atcaatgcag gttcaaaacg ggactcatca gttcgggtat	900
ggtgatgcag cagctgatgc cttatataga gatgaaaacg aagatgatcg cacgtccac	960
atgagtgttt cctgactta cgatggagag gtagaagagt ccgaatcaa gagaaggaaa	1020
ctagaagctt atgcaacaga aacgagtgga tcaaccagag ccagccgtga gccaagagtt	1080
gtggtgcaga ccacaagtga cattgacatc ctcatgatg gttatcgctg gcgcaagtat	1140
gggcaaaaag tcgttaaagg aaacccgaat ccaaggagct actataaatg cacagctaat	1200
ggatgtaccg taacgaagca ttagagaga gcctctgatg acttcaagag cgtactaaca	1260
acttatatag gcaagcacac ccacgttgta ccagcagcac gcaacagcag ccacgtcgg	1320
gcaggcagtt cagggactct ccaaggcagt ttagcgactc agaccacaa ccacaatgtg	1380
cactatccaa tgccacacag tagatctgag ggactggcca cagccaactc atctctat	1440
gacttcagtt cacacctgag gcattctaca ggtttctcgg ttacatagg ccaatctgag	1500
ctttctgac tttcaatgcc tggcttaact attgggcaag agaagcttac cagcctgcag	1560

ggcctgaca ttggggatcc aactggccta atgttgagct tagcagcaca gccgaaggtg 1620

gaaccagtgt caccacaaca gggacttgat ttgtcagcga gctcattgat atgcagagag 1680

atgttgagta gattacgaca gatatga 1707

<210> 3
<211> 327
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3
Met Ser Asn Glu Thr Arg Asp Leu Tyr Asn Tyr Gln Tyr Pro Ser Ser
1 5 10 15

Phe Ser Leu His Glu Met Met Asn Leu Pro Thr Ser Asn Pro Ser Ser
20 25 30

Tyr Gly Asn Leu Pro Ser Gln Asn Gly Phe Asn Pro Ser Thr Tyr Ser
35 40 45

Phe Thr Asp Cys Leu Gln Ser Ser Pro Ala Ala Tyr Glu Ser Leu Leu
50 55 60

Gln Lys Thr Phe Gly Leu Ser Pro Ser Ser Ser Glu Val Phe Asn Ser
65 70 75 80

Ser Ile Asp Gln Glu Pro Asn Arg Asp Val Thr Asn Asp Val Ile Asn
85 90 95

Gly Gly Ala Cys Asn Glu Thr Glu Thr Arg Val Ser Pro Ser Asn Ser
100 105 110

Ser Ser Ser Glu Ala Asp His Pro Gly Glu Asp Ser Gly Lys Ser Arg
115 120 125

Arg Lys Arg Glu Leu Val Gly Glu Glu Asp Gln Ile Ser Lys Lys Val
130 135 140

Gly Lys Thr Lys Lys Thr Glu Val Lys Lys Gln Arg Glu Pro Arg Val
145 150 155 160

Ser Phe Met Thr Lys Ser Glu Val Asp His Leu Glu Asp Gly Tyr Arg
165 170 175

Trp Arg Lys Tyr Gly Gln Lys Ala Val Lys Asn Ser Pro Tyr Pro Arg
180 185 190

Ile Ile Ala Asn Gly Asn Glu Asn Arg Ser Tyr Tyr Arg Cys Thr Thr
195 200 205

Gln Lys Cys Asn Val Lys Lys Arg Val Glu Arg Ser Phe Gln Asp Pro
210 215 220

Thr Val Val Ile Thr Thr Tyr Glu Gly Gln His Asn His Pro Ile Pro
225 230 235 240

Thr Asn Leu Arg Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Met Phe Ser Ala Asp
245 250 255

Leu Met Thr Pro Arg Ser Phe Ala His Asp Met Phe Arg Thr Ala Ala
260 265 270

Tyr Thr Asn Gly Gly Ser Val Ala Ala Ala Leu Asp Tyr Gly Tyr Gly
275 280 285

Gln Ser Gly Tyr Gly Ser Val Asn Ser Asn Pro Ser Ser His Gln Val
290 295 300

Tyr His Gln Gly Gly Glu Tyr Glu Leu Leu Arg Glu Ile Phe Pro Ser
305 310 315 320

Ile Phe Phe Lys Gln Glu Pro
325

<210> 4
<211> 984
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4
atgtctaagt aaaccagaga tctctacaac taccaatacc cttcatcggtt ttcgttgac

gaaatgatga atctgcctac ttcaaatcca tcttcttatg gaaacctccc atcacaaaac 120

ggttttaatc catctactta ttcttccacc gattgtctcc aaagtctctc agcagcgtat 180

gaatctctac ttcagaaaac ttttggcttt tctccctctt cctcagaggt tttcaattct 240

tcgatcgatc aagaaccgaa ccgtgatgtt actaatgacg taatcaatgg tggatcatgc 300

aacgagactg aaactagggt ttctccttct aattcttctc ctagtgaggc tgatcacccc 360

ggatgaagatt ccgtaagag ccggaggaaa cgagagttag tcggtgaaga agatcaaatt 420

tccaaaaaag ttgggaaaac gaaaaagact gaggtgaaga acaaagaga gccacgagtc 480

tcgtttatga ctaaaagtga agttgatcat cttgaagatg gttatagatg gagaaaatac 540

ggccaaaagg ctgtaaaaaa tagcccttat ccaaggataa tagccaatgg aaacgaaaat 600

aggagtact atagatgtac aacacaaaag tgcaacgtga agaaacgagt ggagagatcg 660

ttccaagatc caacggttgt gattacaact tacgagggtc aacacaacca cccgattccg 720

actaatcttc gaggaagttc tgccgaggct gctatgttct ccgcagacct catgactcca 780

agaagctttg cacatgatat gtttaggacg gcagcttata ctaacggcgg tctgtggcg 840

gcggcttttg attatggata tggacaaagt ggttatggta gtgtgaattc aaaccctagt 900

tctcaccaag tgiatcatca aggggtgag tatgagctct tgaggagat ttttcttca 960

atcttcttta agcaagagcc ttga 984

<210> 5
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5
 Met Ala Asp Asp Trp Asp Leu His Ala Val Val Arg Gly Cys Ser Ala

1	5	10	15
Val Ser Ser Ser Ala Thr Thr Thr Val Tyr Ser Pro Gly Val Ser Ser	20	25	30
His Thr Asn Pro Ile Phe Thr Val Gly Arg Gln Ser Asn Ala Val Ser	35	40	45
Phe Gly Glu Ile Arg Asp Leu Tyr Thr Pro Phe Thr Gln Glu Ser Val	50	55	60
Val Ser Ser Phe Ser Cys Ile Asn Tyr Pro Glu Glu Pro Arg Lys Pro	65	70	75
Gln Asn Gln Lys Arg Pro Leu Ser Leu Ser Ala Ser Ser Gly Ser Val	85	90	95
Thr Ser Lys Pro Ser Gly Ser Asn Thr Ser Arg Ser Lys Arg Arg Lys	100	105	110
Ile Gln His Lys Lys Val Cys His Val Ala Ala Glu Ala Leu Asn Ser	115	120	125
Asp Val Trp Ala Trp Arg Lys Tyr Gly Gln Lys Pro Ile Lys Gly Ser	130	135	140
Pro Tyr Pro Arg Gly Tyr Tyr Arg Cys Ser Thr Ser Lys Gly Cys Leu	145	150	155
Ala Arg Lys Gln Val Glu Arg Asn Arg Ser Asp Pro Lys Met Phe Ile	165	170	175
Val Thr Tyr Thr Ala Glu His Asn His Pro Ala Pro Thr His Arg Asn	180	185	190
Ser Leu Ala Gly Ser Thr Arg Gln Lys Pro Ser Asp Gln Gln Thr Ser	195	200	205
Lys Ser Pro Thr Thr Thr Ile Ala Thr Tyr Ser Ser Ser Pro Val Thr	210	215	220
Ser Ala Asp Glu Phe Val Leu Pro Val Glu Asp His Leu Ala Val Gly	225	230	235
			240

Asp Leu Asp Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Leu Ser Asp Thr Val Val
245 250 255

Ser Asp Asp Phe Phe Asp Gly Leu Glu Glu Phe Ala Ala Gly Asp Ser
260 265 270

Phe Ser Gly Asn Ser Ala Pro Ala Ser Phe Asp Leu Ser Trp Val Val
275 280 285

Asn Ser Ala Ala Thr Thr Thr Gly Gly Ile
290 295

<210> 6
<211> 897
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6
atggccgacg attgggatct ccacgccgta gtcagaggct gtcagccgt aagctcatca 60

gctactacca ccgtatatcc ccccgccgtt tcatttcaca caaacctat attcacgctc 120

ggacgacaaa gtaatgccgt ctcttcgga gagattcgag atctctacac accgttcaca 180

caagaatctg tcgtctcttc gttttcttgt ataaactacc cagaagaacc tagaaagcca 240

cagaaccaga aacgtctctt ttctctctct gcttcttcg gtagcgtcac tagcaaaccc 300

agtggctcca atacctctag atctaaaaga agaaagatac agcataagaa agtgtgcat 360

gtagcagcag aagctttaaa ctccgatgtc tggcatggc gaaagtacgg acagaaaccc 420

atcaaaggtt caccatatcc aagaggatac tacagatgta gtacatcaa aggttgttta 480

gcccgtaaac aagtggagcg aaatagatcc gacccgaaga tgtttatcgt cacttacacg 540

gcggagcata atcatccagc tccgacacac cgtaattctc tcgccgaag cacacgtcag 600

aaaccatccg atcaacagac gagtaaactc ccgacgacca ctattgtac ttattcatcg 660

tctccggtga cttcagccga cgaatttggt ttgcctgttg aggatcatct agcgggtggga 720

gatcttgacg gagaagaaga tctgttatct ttgtcggata cggtaggttag cgatgatctc 780

ttcgaagggt tagaggaatt cgcagccgga gatagctttt ccgggaactc ggctccggcg 840

agttttgatc tctcttgggt tgtgaacagt gccgccacta ccaccggagg aatatga 897

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer for T-DNA left border

<400> 7
tgggtcacgt agtgggcat cg 22

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtSPF1 F

<400> 8
atggctggta ttgataataa agctgctgta 30

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtSPF1 R

<400> 9

tcatactgt cgtaatctac tcaacatctc

30

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtSPF2 F

<400> 10
atgtctaag aaaccagaga tctctacaac

30

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtSPF2 R

<400> 11
tcaaggctct tgcttaaaga aaattgaagg

30

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtSPF3 F

<400> 12
atggccgacg attgggatct ccacgccgta

30

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AtSPF3 R

<400> 13

tcatattcct ccggtggtag tggcggcact

30