(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0055767
(43) 공개일자 2018년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A01N 37/10* (2006.01) *A01G 7/06* (2006.01)
*A01G 9/00* (2018.01) *A01N 43/72* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A01N 37/10* (2013.01)
*A01G 7/06* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0037639(분할)
(22) 출원일자 2018년03월30일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2016-0153631
원출원일자 2016년11월17일
심사청구일자 2016년11월17일

(71) 출원인
**경희대학교 산학협력단**
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
**안진흥**
경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 210동 1703호 (공세동, 탑실마을대주피오레2단지아파트)
**조래현**
경기도 수원시 영통구 영통동 1003-6번지 102호
(74) 대리인
**손민**

전체 청구항 수 : 총 15 항

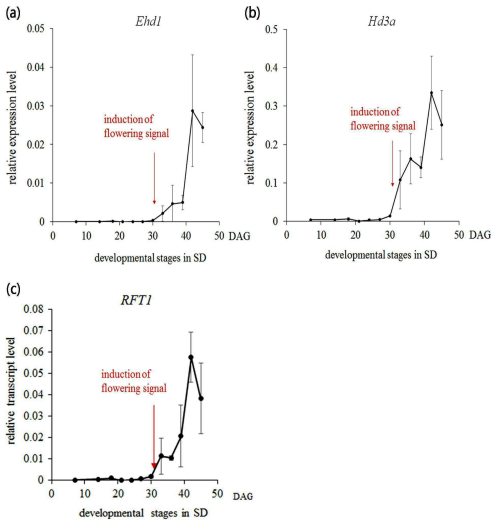
(54) 발명의 명칭 **벼의 개화 지연방법 및 벼 개화 지연 유도용 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 벼의 개화 지연방법 및 벼 개화 지연 유도용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로는 사이토카이닌을 벼에 처리하는 단계를 포함하는 벼의 개화 지연방법 및 사이토카이닌을 포함하는 벼 개화 지연 유도용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 벼의 개화 지연방법은 온실효과에 따른 평균 기온상승에도 불구하고 특정 시기까지 벼의 개화를 지연시키는 것이 가능하기 때문에, 벼 이삭의 성숙기간을 연장하는 것이 가능하여 쌀의 생산량을 늘릴 수 있으면서, 벼의 미질 및 쌀의 맛을 향상시킬 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*A01G 9/00* (2013.01)
*A01N 43/72* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01108001
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21사업_식물분자육종사업단
연구과제명 벼의 생산량 및 개화 시기 조절 유전자 발굴 및 육종소재개발
기 여 율 1/2
주관기관 경희대학교
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2007-0093862
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 모델 벼 시스템 개발 및 활용
기 여 율 1/2
주관기관 경희대학교
연구기간 2012.12.01 ~ 2017.11.30

# *명 세 서*

## *청구범위*

### 청구항 1

사이토카이닌을 벼에 처리하는 단계를 포함하는, 벼의 개화 지연방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 사이토카이닌은 벼의 지상부 또는 지하부에 처리하는 것인, 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 사이토카이닌은 사이토카이닌 처리 전의 개화 예상일로부터 24 내지 33일 전에 처리하는 것인, 방법.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 사이토카이닌은 사이토카이닌 처리 전의 개화 예상일로부터 28 내지 30일 전에 처리하는 것인, 방법.

### 청구항 5

제3항에 있어서,

상기 사이토카이닌을 처리한 벼는 상기 개화 예상일로부터 5 내지 10일 후로 개화가 지연되는 것인, 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 사이토카이닌은 1 내지 5회의 횟수로 처리하는 것인, 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 사이토카이닌은 0.5 내지 20 μM 의 농도로 처리하는 것인, 방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 사이토카이닌은 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP, BAP 또는 BA), 티디아주론(thidiazuron, TDZ), 트랜스제아틴, 제아틴, 키네틴(kinetin) 및 아이소펜틸아데닌(isopentyl adenine)로 이루어지는 군으로부

터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 방법.

**청구항 9**

제1항에 있어서,

상기 사이토카이닌은 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP) 또는 티디아주론(thidiazuron, TDZ)인 것인, 방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서,

상기 사이토카이닌이 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP)인 경우에는 5 내지 20㎛M 의 농도에서 벼의 개화가 지연되는 것인, 방법.

**청구항 11**

제9항에 있어서,

상기 사이토카이닌이 티디아주론(thidiazuron, TDZ)인 경우에는 2 내지 5회의 처리횟수에서 벼의 개화가 지연되는 것인, 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서,

상기 사이토카이닌의 처리로 벼에서 Hd3a의 발현은 30 내지 95% 감소하며, RFT1의 발현은 20 내지 75% 감소하는 것인, 방법.

**청구항 13**

사이토카이닌을 포함하는, 벼 개화 지연 유도용 조성물.

**청구항 14**

제13항에 있어서,

상기 사이토카이닌은 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP, BAP 또는 BA), 티디아주론(thidiazuron, TDZ), 트랜스제아틴, 제아틴, 키네틴(kinetin) 및 아이소펜틸아데닌(isopentyl adenine)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 조성물.

**청구항 15**

제13항에 있어서,

상기 사이토카이닌은 0.5 내지 20㎛M 의 농도인 것인, 조성물.

## *발명의 설명*

## 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 벼의 개화 지연방법 및 벼 개화 지연 유도용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로는 사이토카이닌을 벼에 처리하는 단계를 포함하는 벼의 개화 지연방법 및 사이토카이닌을 포함하는 벼 개화 지연 유도용 조성물에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0003] 벼, 밀, 옥수수, 보리는 세계에서 가장 주요하게 이용되는 작물이며, 벼는 국내는 물론 전 세계의 3분의 1 이상의 나라에서 주식으로 삼고 있는 쌀의 생산식물로서 경제적으로 중요한 농작물 중 하나이다. 이렇게 중요한 식량 자원인 쌀을 생산하는 벼는 생산량 증가 및 미질 향상을 위해 육종 방법 및 유전자 연구가 활발하다.

[0004] 벼는 단일조건 개화촉진 식물로써, 봄에 파종되어 여름 동안 활발한 영양생장 단계를 거친 후, 늦여름에 개화하게 된다. 이러한 벼의 개화시기에 따라 수확기까지 벼 이삭의 수량 및 과실의 성숙기간이 결정될 수 있다. 그러므로 벼의 개화시기에 따라 벼 이삭의 생산성 및 미질이 결정될 수 있으므로, 벼의 적절한 개화 시기를 유도하는 것은 매우 중요하다고 볼 수 있다.

[0005] 이렇게 벼의 생산성 및 쌀의 미질을 결정하는 중요한 인자인 벼의 개화는 다른 식물체와 마찬가지로 내부적인 유전적 프로그램과 외부적인 환경변화에 의하여 정교하게 조절된다고 알려져 있다. 특히 광주기와 온도의 변화, 토양의 영양분 상태, 가뭄, 염분, 호르몬 또는 화학물질의 처리 등에 따라 개화시기를 조절할 수 있지만, 벼의 개화시기가 생산량 및 미질에 미치는 영향을 고려할 때 이러한 요인을 밝히려는 연구는 현재 많이 부족한 문제점이 있다. 또한 온실효과에 의해 지속적인 기온 증가와 이에 수반되는 국제적 또는 국지적 기후변화의 가속화로 인해 벼의 개화시기가 점차 앞당겨지고 있는 추세이지만, 이에 대한 적절한 대응을 도모하려는 연구는 많이 부족한 실정이다.

[0006] 한편, 식물의 주요 성장 호르몬 중 하나인 사이토카이닌은 식물 지상부의 분화, 세포분열, 성장, 엽록소 형성 촉진, 관다발 조직발달, 노화방지, 영양분 흡수, 면역, 스트레스 반응 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 본 발명과 관련한 선행기술문헌으로는 식물체의 개화시기를 조절하는 CmFT 유전자 및 이를 이용한 단일 조건에서 식물체의 개화시기 조절방법에 관한 대한민국 공개특허 제2016-0049222호(이하 이를 ‘특허문헌 1’이라 칭함)가 개시되어 있으나, 상기 특허문헌 1에는 벼의 개화시기를 조절하거나 지연하는 방법에 관하여는 어떠한 개시 또는 암시조차 되어 있지 않다.

[0008] 또한 식물의 개화조절인자인 CmSOC1 신규 유전자 및 이를 이용한 식물의 개화시기 조절방법에 관한 대한민국 공개특허 제2015-0049704호(이하 이를 ‘특허문헌 2’라 칭함)가 개시되어 있으나, 상기 특허문헌 2에서도 식물 호르몬인 사이토카이닌을 이용하여 벼의 개화시기를 조절하거나 지연하는 방법에 관하여는 어떠한 개시 또는 암시조차 되어 있지 않다.

[0010] 이에 본 발명자들은 벼의 개화시기를 조절, 특히 지연시키는 방법에 관하여 예의 연구 노력한 결과, 사이토카이닌을 처리하게 되면 벼의 개화시기를 늦춰 쌀의 생산량 및 미질을 향상시킬 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 대한민국 공개특허 제2016-0049222호

(특허문헌 0002) 특허문헌 2: 대한민국 공개특허 제2015-0049704호

## 발명의 내용

### *해결하려는 과제*

[0013] 본 발명의 주된 목적은 사이토카이닌을 벼에 처리하는 단계를 포함하는 벼의 개화방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 사이토카이닌을 포함하는 벼 개화 지연 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

### *과제의 해결 수단*

[0016] 벼는 단일조건 개화촉진 식물로써, 우리나라에서는 봄에 파종되어 여름 동안 활발한 영양생장 단계를 거친 후, 늦여름에 개화하게 되는 것이 일반적이었다. 하지만, 20세기 후반 이후로 온실효과의 문제가 대두되면서 평균 기온이 상승하기 시작하였고, 이로 인해 벼의 개화시기가 점차 빨라지는 추세에 있다. 그리고 이렇게 벼의 개화시기가 앞당겨 짐에 따라 쌀의 생산량 및 미질도 점차 하락하는 추세에 있어 문제가 있었다.

[0017] 이에 본 발명자들은 점차 앞당겨지는 벼의 개화시기를 적절한 시기로 지연시키기 위한 연구를 수행하던 중, 식물호르몬의 하나로서 식물의 분열 및 성장에 관여하는 사이토카이닌(cytokinin)을 벼에 처리하게 되면 벼의 개화시기가 지연됨을 발견하였다. 사이토카이닌은 일반적으로는 식물의 분열 및 성장에 관여하거나, 일부 특정 식물체의 개화를 앞당길 수 있는 식물호르몬인 것에 관하여는 기존에 보고된 바 있으나, 사이토카이닌을 처리하여 벼의 개화시기를 지연시키는 기술은 본 발명자에 의해 최초로 규명된 것이다.

[0019] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 사이토카이닌을 벼에 처리하는 단계를 포함하는 벼의 개화방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 용어 “사이토카이닌”은, 식물체의 생장을 조절하고 세포분열을 촉진하는 역할을 하는 식물 호르몬을 의미하며, 그 외에도 식물체의 휴면타파작용, 식물조직의 노화 억제, 잎과 곁눈의 생장 촉진, 잎과 과일의 노화 방지에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 지베렐린 등과 상호작용하여 단백질 대사를 조절하기도 하며, 기공을 열리게 하거나, 탄소동화산물의 이동을 조절하기도 한다.

[0021] 상기 벼에 처리하는 사이토카이닌은 식물 호르몬의 일종인 사이토카이닌으로 알려진 것이라면 그 종류에 있어서 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 구체적으로는 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP, BAP 또는 BA), 티디아주론(thidiazuron, TDZ), 트랜스제아틴, 제아틴, 키네틴(kinetin) 및 아이소펜틸아데닌(isopentyl adenine)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다. 또한 본 발명의 일 실시예로는 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP) 또는 티디아주론(thidiazuron, TDZ)일 수 있다. 상기 사이토카인이 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP)인 경우에는 처리횟수 보다는 처리농도에 보다 크게 영향을 받으며, 상기 사이토카이닌이 티디아주론(thidiazuron, TDZ)인 경우에는 처리농도 보다는 처리횟수에 보다 크게 영향을 받을 수 있다(표 2). 특히 상기 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP)은 처리농도가 증가할수록 개화시기를 더욱 지연시킬 수 있으며, 상기 티디아주론(thidiazuron, TDZ)은 처리횟수가 증가할수록 개화시기를 더욱 지연시킬 수 있다.

[0022] 본 발명의 용어 “벼”는, 외떡잎식물 벼목 화본과의 한해살이풀을 의미하며, 쌀을 생산하는 식물체이다. 상기 방법에서 상기 사이토카이닌은 벼의 지상부 또는 지하부에 처리하는 것일 수 있다. 본 발명의 용어 “벼의 지상부”란, 벼의 뿌리를 제외한 땅위에 존재하는 수피, 줄기, 잎, 열매, 꽃 등을 포함하는 부위를 의미한다. 또한 본 발명의 용어 “벼의 지하부”란, 전체 벼 개체 중에서 지하에 식재된 부위를 의미하는 것으로서, 구체적으로는 벼의 뿌리를 포함하여 지하에 식재된 부위를 의미한다.

[0023] 본 발명의 용어 “개화”는, 식물체의 꽃이 피는 시기를 의미하며, 본 발명에서는 벼의 꽃이 피는 시기를 의미한다. 일반적인 벼의 개화시기는 단일조건에서 발아 후 56 내지 60일을 의미할 수 있다. 다만, 장일조건 또는 자연적인 논 조건에서는 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 105 내지 110일 수 있다.

[0024] 본 발명에서의 용어 “개화 예정일”은 사이토카이닌 처리 전에 벼의 개화가 예상되는 일자를 의미하는 것일 수 있다.

[0025] 상기 사이토카이닌을 벼의 지상부 또는 지하부에 처리하게 되면, 벼의 개화시기가 지연될 수 있다. 특히 사이토카이닌 처리 전의 개화 예상일로부터 24 내지 33일(보다 구체적으로는 28 내지 30일) 전에 처리하여 상기 개화 예상일로부터 5 내지 10일 후로 개화가 지연되는 것일 수 있다. 상기 개화 예상일로부터 24 내지 33일 전에 사

이토카이닌을 처리하는 것이 벼의 개화시기를 지연시킬 수 있으며(도 4), 상기 기간 이외에 사이토카이닌을 처리하게 되면 벼의 개화시기를 지연시킬 수 없음은 물론 벼의 개화시기에 큰 영향을 미치기 어렵다. 또한 상기 기간 이외에는 사이토카이닌의 농도 또는 횟수를 조절하여 처리하더라도 벼의 개화시기를 지연시키는 효과를 충분히 달성할 수 없다. 상기 사이토카이닌을 처리하여 상기 개화 예상일로부터 5 내지 10일 후로 개화가 지연되는데(도 3), 이렇게 되면 온실효과 또는 이상고온현상으로 인해 개화시기가 앞당겨지는 경우를 방지하여 쌀의 생산량을 보다 향상시키면서 미질이 우수하게 향상되어 소비자의 기호도를 충족시킬 수 있다. 구체적으로는 벼가 등숙 시기에 고온 스트레스를 받게 되면, 등숙이 저해될 수 있으며, 심복백미가 발생할 수 있고, 아밀로즈의 함량은 낮아지면서 전분의 점도가 높아짐으로 인하여 미질이 떨어질 우려가 있다.

[0026] 상기 사이토카이닌의 처리 횟수는 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 구체적으로는 1 내지 5회로 처리하는 것이 바람직하다. 상기 처리횟수의 범위에 해당하지 않을 경우 본 발명의 효과가 떨어지거나, 또는 개화 지연의 효율이 떨어질 수 있다.

[0027] 또한 상기 지연된 개화시기인 개화 예상일로부터 5 내지 10일 후의 기간이 쌀의 생산량을 늘리면서 미질을 향상시키는 기간임에도 불구하고, 상기 처리횟수가 상기 범위에 해당하지 않게 되면, 상기 지연된 기간에 맞추어 개화되기 어려우므로, 쌀의 생산량이 저하될 수 있으면서, 미질이 떨어질 수 있다. 또한 사이토카이닌 중에서 티디아주론(thidiazuron, TDZ)은 처리농도 증가 보다 처리횟수 증가에 의해 벼의 개화시기를 지연시키는 효과가 보다 우수하게 달성될 수 있으면서, 상기 지연된 기간의 범위를 맞출 수 있다. 상기 사이토카이닌이 티디아주론(thidiazuron, TDZ)인 경우에는 2 내지 5회의 처리횟수에서 벼의 개화가 지연되는 것일 수 있다.

[0028] 상기 방법은 사이토카이닌을 0.5 내지 20㎛M 의 농도(더욱 구체적으로는 3 내지 20 ㎛M의 농도)로 처리하는 것일 수 있다. 상기 농도의 범위로 처리하는 경우 벼의 개화시기를 개화 예상일로부터 5 내지 10일 후로 맞출 수 있다. 또한 사이토카이닌 중에서 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP)의 경우에는 처리횟수를 늘리는 것 보다는 상기 농도의 범위 내에서 처리농도가 높을수록 개화 지연 유도의 효과가 우수할 수 있다. 특히 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP)의 경우에는 보다 구체적으로 5 내지 20 ㎛M 의 농도로 처리하는 것이 개화 지연 유도의 효과가 보다 우수할 수 있다.

[0029] 상기 방법에서 구체적인 처리방법은 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 스프레이(spray), 도포, 분무 및 침지로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법일 수 있다.

[0030] 한편, 상기 방법은 사이토카이닌을 벼에 처리하여 개화촉진 유전자인 Edh1의 기능을 저하시켜 Hd3a 또는 RFT1의 발현을 감소시키는 것일 수 있다. Edh1은 벼에서 개화 신호를 통합하는 중요한 유전자인데, 상기 Edh1의 기능이 저하됨으로 인해 Hd3a 또는 RFT1의 발현이 감소될 수 있다. 이를 통해 사이토카이닌을 벼의 지상부 또는 지하부에 처리하면 Edh1의 기능의 저하를 통해 Hd3a 또는 RFT1의 발현이 감소되어 벼의 개화시기가 지연될 수 있다(도 6). 특히 상기 방법으로 사이토카이닌을 벼의 지상부 또는 지하부에 처리하게 되면, 벼에서 Hd3a의 발현은 30 내지 95% 감소할 수 있으며, RFT1의 발현은 20 내지 75% 감소할 수 있다.

[0032] 상기의 목적을 달성하기 위한 다른 양태로서, 본 발명은 사이토카이닌을 포함하는 벼 개화 지연 유도용 조성물을 제공한다.

[0033] 상기 조성물을 벼, 구체적으로는 벼의 지상부 또는 지하부에 처리하면 벼의 개화시기가 지연될 수 있다.

[0034] 상기 조성물은 상기 조성물 처리 전의 개화 예상일로부터 28 내지 30일 전에 처리하며, 상기 개화는 상기 조성물 처리 전의 개화 예상일로부터 5 내지 10일 후로 개화가 지연되는 것일 수 있다.

[0035] 상기 사이토카이닌은 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP, BAP 또는 BA), 티디아주론(thidiazuron, TDZ), 트랜스제아틴, 제아틴, 키네틴(kinetin) 및 아이소펜틸아데닌(isopentyl adenine)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0036] 상기 사이토카이닌은 0.5 내지 20㎛M 의 농도일 수 있다.

## *발명의 효과*

[0038] 본 발명에 따른 벼의 개화 지연방법은 온실효과에 따른 평균 기온상승에도 불구하고 특정 시기까지 벼의 개화를 지연시키는 것이 가능하기 때문에, 벼 이삭의 성숙기간을 연장하는 것이 가능하여 쌀의 생산량을 늘릴 수 있으

면서, 쌀의 미질 및 맛을 향상시킬 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 벼 발아 후 단일조건에서 (a) Ehd1, (b) Hd3a 및 (C) RFT1 의 발현양상을 일자별로 측정한 결과를 나타내는 그래프이다(developmental stages in SD(Short day)는 단일조건에서 벼의 발달 시기를 의미하며, DAG(Days after germination)는 발아 후 일수를 의미함).

도 2는 6-BAP를 벼에 처리하는 방법을 도식화한 그림이다.

도 3은 벼가 발아한 후 단일조건에서 치상후 31일 차에 6-BAP를 1일 동안 농도별로 처리한 후 30일 후인 총 발아 후 61일 차에 (a) 개화여부를 나타내는 사진 및 (b) 개화시기를 측정한 그래프이다.

도 4는 (a) 개화 예정일로부터 42일 전의 벼에 사이토카이닌을 처리한 경우, (b) 개화 예정일로부터 29일 전의 벼에 사이토카이닌을 처리한 경우, (c) 개화 예정일로부터 21일 전의 벼에 사이토카이닌을 처리한 경우에 있어서, 각각의 개화시기를 보여주는 그래프이다.

도 5는 논 조건에서 (a) 6-BAP 또는 (b) TDZ를 벼에 처리하였을 때 개화시기의 변화 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 벼에 사이토카이닌이 처리된 시기별로 벼 잎에서의 (a) Ehd1, (b) Hd3a 및 (C) RFT1의 발현 양상을 대조군과 비교하여 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0043] **실시예**

[0045] **실시예 1: 벼의 개화시기와 연관이 있는 식물 호르몬 선별**

[0047] 사이토카이닌이 벼의 개화시기와 연관이 있는 호르몬인지를 확인하기 이전에 벼의 구체적인 개화시기를 확인하기 위해, 벼의 주요 개화신호 촉진 유전자인 Ehd1, Hd3a 및 RFT1의 발현양상을 단일조건에서 잎 발달 시기별로 측정하였다(도 1).

[0048] 도 1은 발아 후 (a) Ehd1, (b) Hd3a 및 (c) RFT1의 발현양상을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1을 통해 발아 후 단일조건에서 30일이 경과한 시점부터 Ehd1, Hd3a 및 RFT1의 발현이 활발하게 진행됨을 확인할 수 있었다. 또한 이로부터 28 내지 30일 후에 개화가 일어남을 확인하였다. 그러므로 Ehd1, Hd3a 및 RFT1의 발현양상을 통해 단일조건에서 발아 후 58 내지 60일이 경과한 시점에 벼의 개화가 일어남을 확인할 수 있었다.

[0050] 이렇게 벼의 개화시기를 확인한 후, 사이토카이닌이 벼의 개화시기와 연관이 있는지를 확인하기 위해, 상기에서 확인한 개화시기에 맞춰 벼에서의 사이토카이닌(사이토카이닌 중 특히 트랜스제아틴)의 호르몬 함량을 측정하였다. 표 1은 발아후 시간에 따른 벼에서 측정한 사이토카이닌의 함량을 측정한 결과를 나타내는 표이다.

*표 1*

[0051]

| 식물체 나이(나이) | 트랜스제아틴 농도(ng/g FW) |
|---|---|
| 7 | 0.4923 ± 0.0053 |
| 14 | 0.4308 ± 0.0016 |
| 18 | 0.8478 ± 0.3578 |
| 21 | 0.72128 ± 0.0600 |
| 24 | 1.5654 ± 0.2585 |

| | |
|---|---|
| 30 | 0.9898± 0.0945 |
| 33 | 0.3363 ± 0.310 |
| 39 | 0.3776 ± 0.0677 |
| 45 | 0.3298 ± 0.0233 |

[0052] 상기 표 1을 통해, 발아 후 사이토카이닌의 함량이 24 내지 30일 사이의 시점까지 증가하다가, 30일이 경과한 시점부터 사이토카이닌의 함량이 감소하여 낮은 농도로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 도 1에서 측정된 개화신호가 만들어지기 시작하는 시점부터 사이토카이닌의 함량이 감소하는 것이므로, 이를 통해 사이토카이닌이 벼의 개화시기와 연관이 있을 것으로 예측하였다.

[0053] **실시예 2: 사이토카이닌이 벼의 개화시기에 미치는 영향 확인**

[0055] 도 1 및 표 1에서 나타난 것처럼 벼의 개화신호가 만들어지기 전과 만들어지고 난 후의 식물 내부 사이토카이닌 후보군의 함량 변화가 매우 두드러지는 것으로 보아, 상기 사이토카이닌이 벼의 개화에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위해 합성 사이토카이닌의 한 종류인 6-BAP(SIGMA-ALDRICH, B3408-5G, CAS Number 1214-39-7)를 수경재배 용액에 포함하고, 여기에 벼의 뿌리(지하부)를 침지하는 방법으로 벼의 지하부에 사이토카이닌을 처리하였다(도 2).

[0056] 도 2는 6-BAP를 벼의 지하부에 처리하는 시기를 도식화한 그림이다.

[0057] 도 2에서의 6-BAP 처리 방법을 보다 구체적으로 살펴보면, 단일조건에서 벼 종자를 흙에 심어서 치상하여 26일 동안 키운 뒤, 순화를 위하여 수경재배 용액으로 식물체들을 옮긴 후 5일 동안 더 배양하였다. 실험은 비처리 대조군과 5 μM 농도의 6-BAP를 1일 동안 처리한 실험군 1을 가지고 표현형을 비교하여 수행하였다.

[0058] 도 3은 벼가 발아한 후 단일조건에서 치상후 31일 차에 6-BAP를 1일 동안 농도별로 처리한 후 30일 후인 총 발아 후 61일 차에 (a) 개화여부를 나타내는 사진 및 (b) 개화시기를 측정한 그래프이다.

[0059] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이 비처리 대조군(0 μM (mock), (a)의 좌측)에서는 개화를 확인할 수 있는 반면에, 6-BAP를 처리한 군(5 μM 6-BAP, (a)의 우측)에서는 개화가 지연되는 결과를 확인할 수 있었다. 보다 구체적으로는 개화 시기를 측정한 그래프인 도 3의 (b)를 통해 비처리 대조군에 비하여 실험군 1은 개화가 8 내지 9일 가량 지연되는 결과를 보였다.

[0061] **실시예 3: 단일조건에서 사이토카이닌의 시기별 처리가 벼의 개화지연에 미치는 영향**

[0063] 상기 실시예 2에서와 마찬가지로 치상후 6-BAP를 수경재배 용액에 포함시키고, 여기에 벼의 지하부를 침지하여 사이토카이닌을 벼의 지하부에 처리하되, 1) 치상후 단일조건 18일(개화 예정일로부터 42일 전) 된 벼에 처리한 실험군 1, 2) 치상후 단일조건 31일(개화 예정일로터 29일 전) 된 벼에 처리한 실험군 2, 3) 치상후 단일조건 39일(개화 예정일로부터 21일 전) 된 벼에 처리한 실험군 3을 설정하였다. 이렇게 설정된 각 실험군에 대하여 1 μM 로 1일, 1 μM로 3일, 5 μM로 1일 동안 각각 처리하여 개화시기의 지연 여부를 확인하는 실험을 진행하였다.

[0064] 도 4는 (a) 실험군 1에 사이토카이닌을 처리한 경우, (b) 실험군 2에 사이토카이닌을 처리한 경우, (c) 실험군 3에 사이토카이닌을 처리한 경우에 있어서, 6-BAP 처리농도별 각각의 개화시기를 보여주는 그래프이다.

[0065] 도 4에 의하면 실험군 2에서는 개화시기의 지연을 확인할 수 있으나, 실험군 1 및 실험군 3에서는 개화시기의 지연을 확인할 수 없었다. 이러한 결과로부터 개화 예상일로부터 24 내지 33일, 적어도 28 내지 30일 전에 사이토카이닌을 처리하는 것이 벼의 개화지연 효과를 달성할 수 있음을 확인하였다.

[0067] **실시예 4: 일반 재배조건에서 개화 지연 표현형 발현 여부**

[0069] 상기 실시예 1 내지 실시예 3을 통하여 인공적인 단일조건에서 사이토카이닌이 개화시기 지연에 미치는 영향을 확인한 것을 토대로, 일반적인 재배조건에서 처리하여도 벼의 개화시기를 지연시킬 수 있는지를 확인하는 실험을 진행하였다. 이를 위하여 논 조건에서 재배되고 있는 벼를 이용하여 외부 사이토카이닌 처리를 반복 수행하였다. 이때 처리는 논에서 재배되는 벼의 지상부에 사이토카이닌을 분무하는 방법으로 수행하였다. 또한 처리 대상으로 이용한 품종은 일반적으로는 8월 중순에 개화하는 동진벼(우리나라에서 벼 연구시 가장 일반적으로 사용하는 벼 품종임)를 그 대상으로 하였다.

[0070] 상기 동진벼를 4월 말에 파종하여 5월 말 모내기를 통해 논에 심고, 7월 중순 채취하여 화분으로 옮겨 심은 후, 온실에서 배양하였다. 또한 개화가 일어날 것으로 예상되는 8월 14일 내지 16일로부터 28일 전인 7월 17일부터 외부 사이토카이닌을 처리하였다. 처리시에는 앞서 사용한 6-BAP 처리군(실험군 1) 외에 thidiazuron(TDZ) 처리군(실험군 2)도 설정하였다. 각 실험군에는 5 또는 15㎛M 농도로 각 물질을 처리하였으며, 1회 또는 2회(상기 1회 처리하고 2일 경과 후 1회) 처리하였다. 그리고 처리하는 방법은 분무하는 방법을 이용하여 벼 잎이 충분히 젖을 정도로 사이토카이닌을 처리하였다. 표 2는 논 조건에서 b-BAP 또는 TDZ를 벼에 처리하였을 때 개화시기의 변화 결과를 나타내는 표이다. 또한 도 5는 논 조건에서 b-BAP(a) 또는 TDZ(b)를 벼에 처리하였을 때 개화시기의 변화 결과를 나타내는 그래프이다.

*표 2*

[0071]

| 처리 | 개화일수 | 처리 | 개화일수 |
|---|---|---|---|
| 6-BAP 비처리 대조구 | 106.8 ± 1.5 | TDZ 비처리 대조구 | 106.2±2.2 |
| 6-BAP 5 ㎛M-1 회 | 108.8 ± 1.7 | TDZ 5 ㎛M- 1 회 | 108.8 ± 2.3 |
| 6-BAP 5 ㎛M-2 회 | 108 ± 1.1 | TDZ 5 ㎛M- 2 회 | 109 ± 4.9 |
| 6-BAP 15 ㎛M-1 회 | 110 ± 2.0 | TDZ 15 ㎛M-1 회 | 107.5 ± 1.6 |
| 6-BAP 15 ㎛M-2 회 | 109.2 ± 2.6 | TDZ 15 ㎛M-2 회 | 110.2 ± 2.0 |

[0072] 표 2 또는 도 5를 통하여 6-BAP 또는 TDZ를 처리한 모든 실험군에서 적게는 1일, 크게는 4일의 개화 지연 효과가 나타남을 관찰할 수 있었다. 한편, TDZ를 처리한 실험군 2는 농도보다는 처리 횟수가 더 큰 영향을 미치나, 6-BAP를 처리한 실험군 1은 처리 횟수보다는 농도가 높을수록 더 큰 지연 효과가 발휘됨을 확인할 수 있었다.

[0073] **실시예 5: 벼에 대한 사이토카이닌의 처리가 Ehd1, Hd3a 및 RFT1의 발현에 미치는 영향**

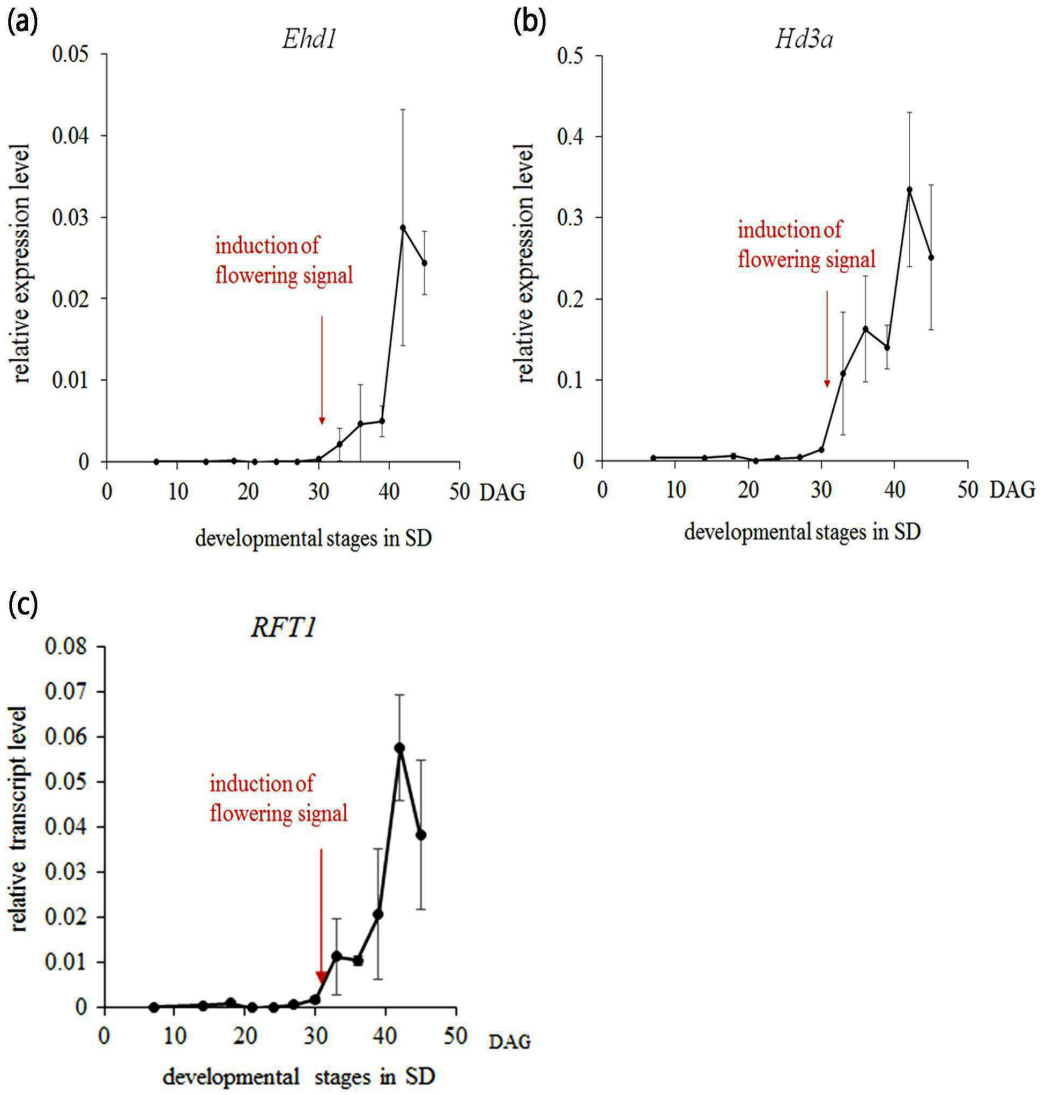
[0075] 벼에 외부 사이토카이닌을 처리하는 경우 개화촉진 유전자인 Ehd1 또는 Hd3a에 어떠한 영향을 미치는지를 측정하기 위하여 사이토카이닌이 처리된 시기별로 잎 조직을 샘플링하여 RNA를 준비하고, cDNA를 합성하였다. Rotor-Gene 6000 PCR 기기를 이용하여 정량적 실시간(quantitative real-time) RT-PCR 방법을 이용하여 이들의 발현을 관찰하는 방법으로 진행하였다. Ehd1은 벼에서 상위의 개화 신호를 통합하는 중요한 유전자이며, Hd3a 및 RFT1은 그 신호를 전달하는 주요한 인자이기 때문에 이들 유전자에 사이토카이닌 처리가 어떠한 영향을 미치는지를 조사한 것이다. 도 6은 벼에 사이토카이닌이 처리된 시기별로 벼 잎에서의 (a) Ehd1, (b) Hd3a 및 (c) RFT1의 발현 양상을 무처리 대조군(mock)과 비교하여 상대적으로 나타내는 그래프이다.

[0076] 도 6을 통하여 Ehd1은 사이토카이닌 처리 후 시간이 경과하여도 Ehd1의 발현 양상이 대조군과 크게 다르지 않음을 확인할 수 있었다. 하지만, Hd3a 및 RFT1은 사이토카이닌을 처리한 후에는 대조군과 비교하여 발현이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 사실을 통해 사이토카이닌의 처리로 인해 Edh1의 발현 저하가 아닌 Edh1 단백질의 기능이 저해되고, 이를 통해 Hd3a 및 RFT1의 발현이 저해됨을 예상할 수 있었다.

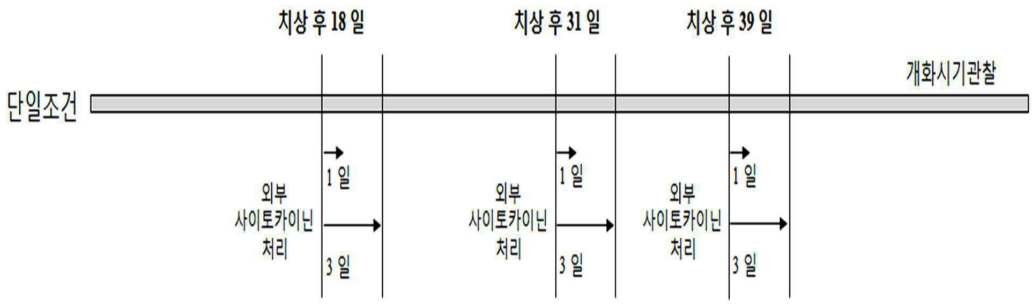
[0078] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

## 도면

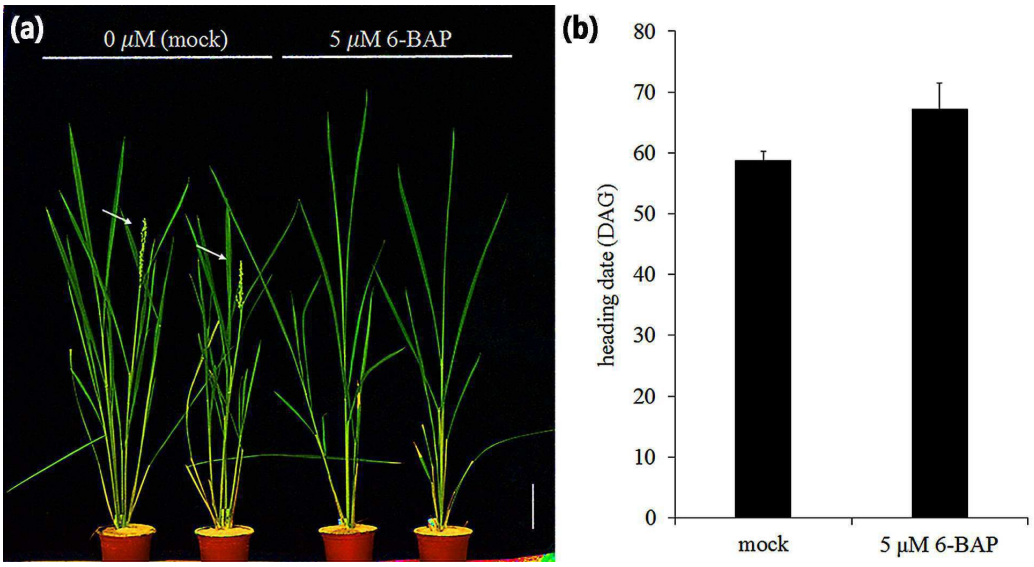
### 도면1


(a)
Ehd1
relative expression level
induction of flowering signal
developmental stages in SD
DAG
(b)
Hd3a
relative expression level
induction of flowering signal
developmental stages in SD
DAG
(c)
RFT1
relative transcript level
induction of flowering signal
developmental stages in SD
DAG

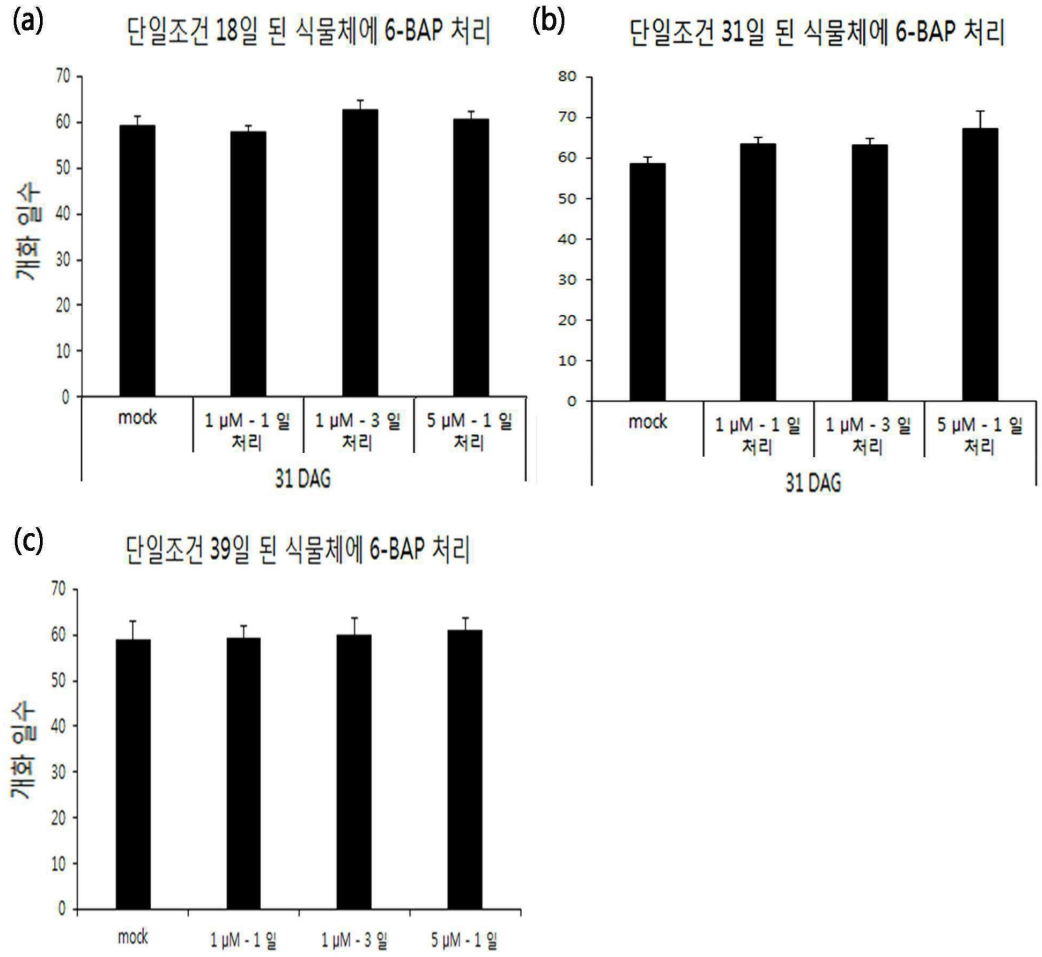
### 도면2


치상 후 18 일
치상 후 31 일
치상 후 39 일
개화시기관찰
단일조건
외부 사이토카이닌 처리
1 일
3 일

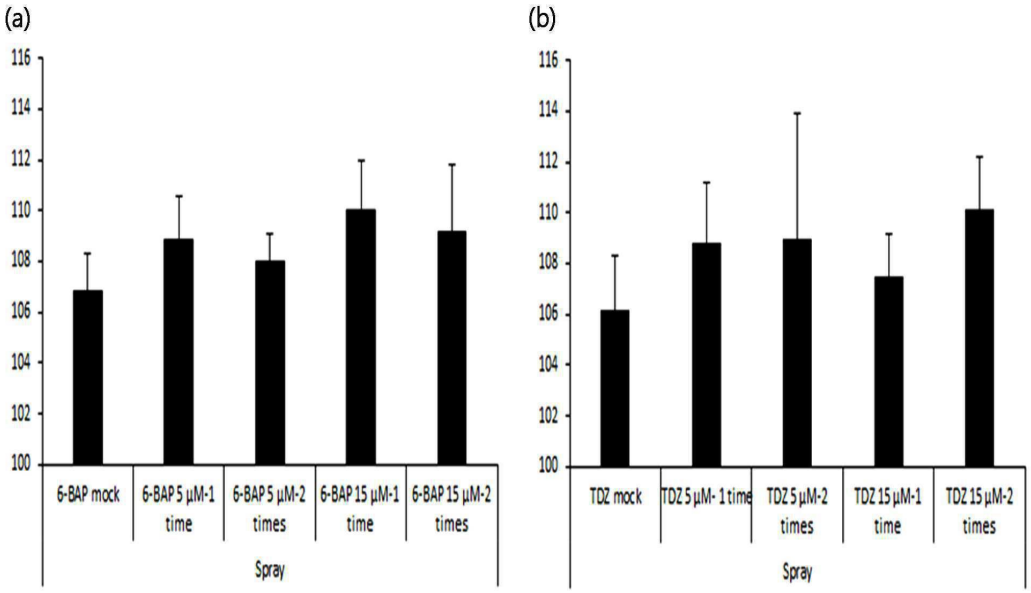
도면3


(a)
0 μM (mock)
5 μM 6-BAP
(b)
heading date (DAG)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
mock
5 μM 6-BAP

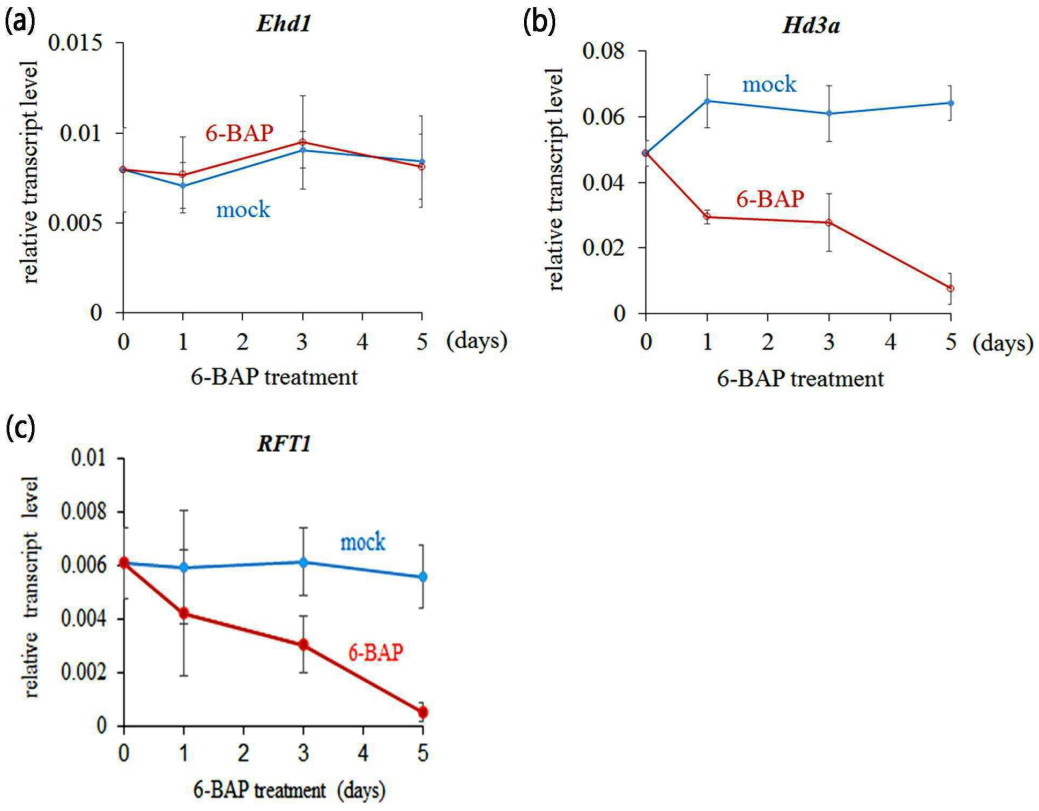
도면4


(a)
단일조건 18일 된 식물체에 6-BAP 처리
개화 일수
70
60
50
40
30
20
10
0
mock
1 μM - 1 일 처리
1 μM - 3 일 처리
5 μM - 1 일 처리
31 DAG
(b)
단일조건 31일 된 식물체에 6-BAP 처리
80
70
60
50
40
30
20
10
0
mock
1 μM - 1 일 처리
1 μM - 3 일 처리
5 μM - 1 일 처리
31 DAG
(c)
단일조건 39일 된 식물체에 6-BAP 처리
개화 일수
70
60
50
40
30
20
10
0
mock
1 μM - 1 일
1 μM - 3 일
5 μM - 1 일

도면5


(a)
116
114
112
110
108
106
104
102
100
6-BAP mock
6-BAP 5 μM-1 time
6-BAP 5 μM-2 times
6-BAP 15 μM-1 time
6-BAP 15 μM-2 times
Spray
(b)
116
114
112
110
108
106
104
102
100
TDZ mock
TDZ 5 μM- 1 time
TDZ 5 μM-2 times
TDZ 15 μM-1 time
TDZ 15 μM-2 times
Spray

도면6


(a)
Ehd1
relative transcript level
0.015
0.01
0.005
0
6-BAP
mock
0 1 2 3 4 5 (days)
6-BAP treatment
(b)
Hd3a
relative transcript level
0.08
0.06
0.04
0.02
0
mock
6-BAP
0 1 2 3 4 5 (days)
6-BAP treatment
(c)
RFT1
relative transcript level
0.01
0.008
0.006
0.004
0.002
0
mock
6-BAP
0 1 2 3 4 5
6-BAP treatment (days)