

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0100778
(43) 공개일자 2023년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 1/06* (2006.01)
A01H 5/10 (2018.01) *C07K 14/415* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 15/8225 (2013.01)
A01H 1/06 (2021.01)
 (21) 출원번호 10-2021-0189438
 (22) 출원일자 2021년12월28일
 심사청구일자 2021년12월28일

(71) 출원인
 동아대학교 산학협력단
 부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)
 (72) 발명자
 김정태
 부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 생명자원
 과학대학 S09-0422 (하단동, 동아대학교)
 전상은
 부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 생명자원
 과학대학 S09-0422 (하단동, 동아대학교)
 (74) 대리인
 위병갑

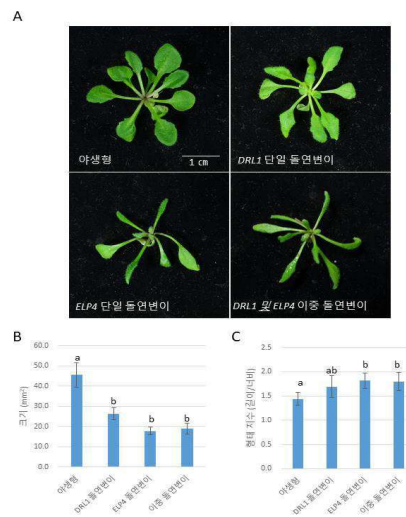
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 DRL1 및 ELP4의 유전자의 발현이 억제된 이중 동형 접합 돌연변이 유전체 및 그에 따른 식물체

(57) 요약

본 발명은 DRL1 및 ELP4의 이중 동형접합 돌연변이를 이용한 잎 기관의 형태를 변형시키는 방법과 그에 따른 돌연변이 식물체를 제공 하는 것으로서, 애기장대의 ELONGATOR 구성인자 DRL1 및 ELP4 각각의 단일 동형접합 돌연변이 식물체를 교배하여 DRL1 및 ELP4 유전자의 발현 기능이 억제된 이중 동형접합 돌연변이 식물체를 제조하였다. 또한, 제조한 DRL1 및 ELP4 유전자의 발현기능이 억제된 이중 동형접합 돌연변이 식물체는 식물의 생리활성 및 광합성 활성의 변화없음을 확인하였고, 또한, 잎 기관의 크기와 형태를 변형시킴으로써 산업적 부가가치를 창출하거나 개선할 수 있는 식물 육종의 새로운 방법을 제시한 바, 이와 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A01H 5/10 (2022.05)

C07K 14/415 (2013.01)

C12N 15/8242 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345342368
과제번호	2020R1A6A1A03047729
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원(이공계분야)
연구과제명	농업생명과학연구소(작물 마이크로바이옴 상호작용 제어 연구)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	동아대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130489
과제번호	2021R1A2C1006572
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(유형1-1)중견연구
연구과제명	애기장대 잎 생장발달과정의 세포신장 조절 메커니즘 규명
기 여 율	1/2
과제수행기관명	동아대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

DRL1(Deformed roots and leaves 1) 및 ELP4(Elongator Protein 4) 유전자의 발현이 억제된 이중 동형접합 돌연변이 식물체를 제조하는 단계를 포함하는, 식물체의 형태를 조절하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 DRL1 유전자는 서열번호 1을 포함하는 염기서열인 것인, 식물체 형태를 조절하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 ELP4 유전자는 서열번호 2를 포함하는 염기서열인 것인, 식물체 형태를 조절하는 방법.

청구항 4

제 2항 또는 3항에 있어서,

상기 DRL1 및 ELP4 유전자에 T-DNA을 삽입하여 돌연변이를 일으키는 것인 식물체 형태를 조절하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 식물체는 잎의 형태 변화로 인한 엽록소는 대조군과 비교하여 감소하나, 광합성 효율은 유지되는 것인, 식물체 형태를 조절하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 식물체는 식물체의 잎의 길이 및 너비를 조절된 것인, 식물체 형태를 조절하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 식물체는 식물체의 잎의 세포 수 및 잎의 세포의 크기가 조절된 것인, 식물체 형태를 조절하는 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 식물은 쌍자엽 식물인 것인 식물체 형태를 조절하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 쌍자엽 식물은 애기장대, 브로콜리, 무, 겨자 및 고추냉이로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 십자화과 식물인 것인 식물체 형태를 조절하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 식물체는 DRL1 단일 동형접합 돌연변이 식물체와 ELP4 단일 동형접합 돌연변이 식물체를 교배시켜 수득한 F1종자를 자가수분하여 제조된 것인, 식물체 형태를 조절하는 방법.

청구항 11

DRL1 및 ELP4 유전자의 발현이 억제되어 이중 동형접합 돌연변이가 유도된, 식물체의 형태가 조절된 식물체.

청구항 12

제11항의 식물체에서 수득되는, 식물체의 형태가 조절된 식물체의 종자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 DRL1 및 ELP4의 유전자의 발현이 억제된 이중 동형 접합 돌연변이 유전체 및 그에 따른 식물체를 제공한다.

배경 기술

[0002] 관상용 혹은 화훼용 원예작물에서 잎과 꽃의 색과 형태는 중요한 가치를 갖는다. 특히, 식물 잎을 관상의 대상으로 하는 관엽식물에서 잎의 형태와 크기, 색과 색의 분포, 무늬는 트렌드와 함께 식물 선택의 중요한 요인이다. 또한, 관엽식물의 관상대상이 잎이기 때문에 잎을 통한 실내 공기 오염물질과 냄새 제거, 음이온의 발생, 전자파의 차단, 심신 안정 등의 효과를 기대할 수 있다. 대부분의 관엽식물이 실내 재배용이기 때문에 관상과 실내 정화 기능 등의 효과를 얻기 위해서는 재배 면적에 맞추어 적절하고 다양한 식물체 또는 잎의 크기와 형태가 요구된다.

[0003] 잎의 크기와 형태 형성은 잎의 발달 과정 중 잎 세포의 증식과 신장에 의한 세포 수와 크기에 의해 결정된다. 세포의 증식과 신장 과정은 외부 환경의 변화와 내부 인자들의 인지와 반응, 프로그램화된 발달 과정 등 복잡한 네트워크에 의해 발달 시기와 잎 기관 내 하위 조직에 따라 제어된다.

[0004] 잎 발달 초기에 잎은 공간적으로 세 가지 축, 향-배축 (adaxial-abaxial), 중앙-가장자리축 (medial-marginal), 기부-말단축 (proximal-distal)을 형성하고, 위 세 축 중에서 잎의 윗면과 아랫면이 형성되는 배복성 (adaxial-abaxial (dorsoventral) patterning)의 확립은 잎의 형태와 광합성과 호흡 등의 생물학적 기능과도 밀접한 관련이 있다. 배복성 형성 과정을 통해 형태적으로 잎의 윗면에서는 아랫면에 비해 외부 공격으로부터의 방어를 위해 두꺼운 큐티클층과 풍부한 트라이코미 발달되고 아랫면에서는 윗면보다 다수의 공변세포가 발달된다.

[0005] 기능적으로 윗면에는 광합성을 위한 광수용을 위해 책상조직이, 아랫면에는 가스 교환을 위한 기공과 해면조직이 발달한다. 광수용, 증산작용, 가스교환 등의 작용은 잎의 구조와 크기에 의존하여 식물의 생존을 결정하는 중요한 요인이 된다. 현재까지 잎의 배복성을 확립하는, 윗면 특이적 class III HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER (HD-ZIP III) 전사인자 (Emery et al., 2003) 또는 아랫면 특이적 KANADI, YABBY 유전자군들이 밝혀져 있다 (Bowman, 2000; Eshed et al., 2001). 이들 유전자에 대한 최종적으로, 잎의 크기와 형태 형성 과정은 배복성 등 형태 결정 과정과 세포증식과 신장 과정 간의 조절인자들에 의한 유기적 상호작용에 의해 이루어진다. 그러나 잎의 구체적인 형태 변형을 위한 직접적인 조절 기작이 알려져 있지 않아 현재에도 이들 유전자의 과발현 또는 다중 돌연변이체를 이용하여 중 특이적 형태 다양성의 분자적 조절 기작을 규명하는 연구들이 활발히 진행되고 있다.

[0006] 이전 연구를 통해 ELOGATOR 결합체는 RNA polymerase II의 전사 조절 기구로서 히스톤 아세틸화와 tRNA 변형을 조절한다고 밝혀졌다 (Xu et al., 2012). ELONGATOR 결합체는 6 개의 서브유닛 (Elongator protein (ELP) 1-6)과 Elongator associated protein, Deformed roots and leaves 1 (DRL1) 으로 구성되어 있으며, 이들 유전자들의 염기서열은 진핵생물체에서 높은 유사성을 보이고 있으나 기능면에서는 부분적으로 유사성이 확인되었다.

[0007] 특정 유전자의 기능을 규명하기 위해서, 목적하는 유전자의 기능을 제거한 기능손실 돌연변이체(loss of function mutant)를 이용한 유전학적 및 분자생물학적 방법이 널리 사용되고 있다. 이 방법은 어떤 유전자의 기능을 손상시킨 후에 유발되는 돌연변이 표현형이 그 유전자의 기능을 추정하는 데 가장 직접적인 증거를 제공하기 때문에 널리 이용하고 있다. 그러나, 식물은 기능손실 돌연변이체를 제조하기 위한 방법으로 상동 재조합

(homologous recombinant)을 이용할 경우 효율이 매우 낮기 때문에 EMS(ethyl methanesulfonate)와 같은 화학 물질을 이용하는 화학적인 방법, 감마선 조사와 같은 물리화적인 방법 또는 T-DNA나 트랜스포존(transposon)과 같은 생물학적인 방법 등이 이용되고 있다. 하지만, 상기와 같은 방법으로 기능손실 돌연변이체를 제조하여 특정 유전자의 기능을 연구하는데 있어서 여러 가지 장점에도 불구하고 목적하는 유전자의 기능과 동일한 기능을 갖는 다른 유전자가 존재하는 경우에는 돌연변이 형질이 검출되지 않는 문제점이 있다. 또한, 어떤 유전자의 경우에는 식물의 발달 초기에 발현되어 이 유전자의 기능손실 돌연변이체가 일찍 죽게 되는 경우에는 돌연변이체를 얻지 못하게 된다. 이러한 이유로 기존의 기능손실 돌연변이체를 이용한 방법은 그 막강한 장점에도 불구하고 식물에서는 제한적으로 사용되고 있다.

[0008] 이러한 한계를 극복하기 위하여, T-DNA 표지를 이용한 기능손실 돌연변이 연구에 유전자 포획 방법을 사용하고 있다. 유전자 포획 방법은 T-DNA 내부에 GUS(β -글루쿠로니다제, β -glucuronidase) 또는 GFP(녹색 형광 단백질, green fluorescence protein)와 같은 리포터 유전자를 이용하여 T-DNA가 삽입된 유전자의 발현을 추적할 수 있는 방법이다(Jeon J.S. et al., Plant J., 22, 561-570, (2000) 및 Krysan P.J. et al., Plant cell, 11, 2283-2290, (1999)). T-DNA가 내부에 삽입된 유전자의 프로모터 발현 조절에 의해 특정 시기와 장소에서 상기 유전자와 리포터 유전자의 결합 단백질이 활성화된다. 이때, 리포터 유전자의 활성화를 추적하면 T-DNA가 삽입된 유전자의 발현 양상을 유추할 수 있다. 이러한 유전자 포획 방법을 이용함으로써 T-DNA가 유전자의 내부에 삽입된 형질전환체를 쉽게 선별할 수 있으며, 발현 양상을 통한 돌연변이의 관찰이 용이하다. 또한, 기능이 중복되어 돌연변이 표현형이 나타나지 않는 유전자들도 이러한 발현 양상 연구를 통해 부분적인 연구가 가능하며, 발달 초기에 중요하게 관여하는 유전자들도 동형 접합체는 일찍 죽을 수 있지만, 이형 접합체에 유전자 발현 양상 연구를 적용하면 상기 유전자의 기능 유추가 가능하다.

[0010] 이에 본 발명자들은 잎의 형태 결정에 관여하는 DRL1과 ELP4 유전자의 이중 돌연변이체를 작성하여 식물체들의 잎 형태 표현형과 생물학적 기능을 검증함으로써 식물 잎 기관의 생물학적 기능의 소실 없이 형태를 변화시키는 방법을 제공하고 잎 형태의 다양화와 품종 개량함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 DRL1(Deformed roots and leaves 1) 및 ELP4(Elongator protein 4) 유전자의 발현이 억제된 이중 동형접합 돌연변이 식물체를 제조하는 단계를 포함하는, 식물체의 형태를 조절하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 목적은 DRL1 및 ELP4 유전자의 발현이 억제되어 이중 동형접합 돌연변이가 유도된, 식물체의 형태가 조절된 식물체를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 목적은 식물체의 형태가 조절된 식물체의 종자를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 DRL1(Deformed roots and leaves 1) 및 ELP4(Elongator protein 4) 유전자의 발현이 억제된 이중 동형접합 돌연변이 식물체를 제조하는 단계를 포함하는, 식물체의 형태를 조절하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 DRL1 및 ELP4 유전자의 발현이 억제되어 이중 동형접합 돌연변이가 유도된, 식물체의 형태가 조절된 식물체를 제공한다.

[0016] 본 발명은 식물체의 형태가 조절된 식물체의 종자를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 DRL1 및 ELP4의 유전자의 발현이 억제된 이중 동형 접합 돌연변이 유전체에 관한 것으로서, 애기장대의 ELONGATOR 구성인자 DRL1 및 ELP4 각각의 단일 동형접합 돌연변이 식물체를 교배하여 DRL1 및 ELP4 유전자의 발현 기능이 억제된 이중 동형접합 돌연변이 식물체를 제조하였다. 또한, 제조한 DRL1 및 ELP4 유전자의 발현 기능이 억제된 이중 동형접합 돌연변이 식물체는 식물의 생리활성 및 광합성 활성의 변화없음을 확인하였고, 또한, 잎 기관의 크기와 형태를 변형시킴으로써 산업적 부가가치를 창출하거나 개선할 수 있는 식물 육종의

새로운 방법을 제시한 바, 이와 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018]

도 1A는 단자엽 및 쌍자엽 식물의 DRL1 단백질 염기서열 유사성 분석 모식도를 나타낸 도이다.

도 1B는 단자엽 및 쌍자엽 식물의 ELP4 단백질 염기서열 유사성 분석 모식도를 나타낸 도이다.

도 1C는 DRL1 및 ELP4 유전자의 대략적인 구조와 돌연변이체의 T-DNA 삽입 위치와 그리고 이를 확인하기 위한 프라이머의 위치를 나타낸 도이다.

("▼"는 유전자 내에 삽입된 T-DNA의 위치이고, "→"는 유전자의 발현을 확인하기 위한 프라이머의 위치와 DNA 증폭반응시 진행방향을 나타낸다)

도 1D는 야생형과 DRL1 및 ELP4 유전자의 단일 및 이중 동형접합 돌연변이체에서 추출한 RNA를 원형으로 수행한 RT-PCR 방법을 활용하여 DRL1 및 ELP4 유전자의 발현량을 나타낸 도이다.

도 2A는 야생형과 DRL1 및 ELP4의 단일 또는 이중 동형접합 돌연변이 식물체의 로제트 부분의 표현형을 나타낸 도이다.

도 2B는 야생형과 DRL1 및 ELP4의 단일 또는 이중 동형접합 돌연변이 식물체의 크기를 나타낸 도이다.

도 2C는 야생형과 DRL1 및 ELP4의 단일 또는 이중 동형접합 돌연변이 식물체의 형태 지수를 나타낸 도이다.

도 3A는 야생형과 DRL1 및 ELP4의 단일 또는 이중 동형접합 돌연변이 식물체의 세포수 및 세포 크기를 현미경으로 관찰한 것을 나타낸 도이다.

도 3B는 야생형과 DRL1 및 ELP4의 단일 또는 이중 동형접합 돌연변이 식물체의 세포수를 나타낸 도이다.

도 3C는 야생형과 DRL1 및 ELP4의 단일 또는 이중 동형접합 돌연변이 식물체의 세포 크기를 나타낸 도이다.

도 4A는 야생형과 DRL1 및 ELP4의 단일 또는 이중 동형접합 돌연변이 식물체의 엽록소 함량을 나타낸 도이다.

도 4B는 야생형과 DRL1 및 ELP4의 단일 또는 이중 동형접합 돌연변이 식물체의 광합성 효율을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019]

이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0020]

본 발명은 DRL1(Deformed roots and leaves 1) 및 ELP4(Elongator protein 4) 유전자의 발현이 억제된 이중 동형접합 돌연변이 식물체를 제조하는 단계를 포함하는, 식물체의 형태를 조절하는 방법을 제공한다.

[0021]

상기 DRL1 유전자는 서열번호 1을 포함하는 염기서열인 것이다.

[0022]

상기 ELP4 유전자는 서열번호 2를 포함하는 염기서열인 것이다.

[0023]

본 발명은 DRL1 유전자 또는 ELP4 유전자를 제공한다. 본 발명의 유전자는 식물체의 형태를 조절하는 특징이 있으며, DRL1 유전자 또는 ELP4 유전자와 관련된 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80%이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 염기 서열에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 염기 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0024]

또한, 본 발명에 따른 DRL1 유전자 또는 ELP4 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 범위는 애기장대(Arabidopsis thaliana)로부터 분리된 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 염기 서열로 암호화되는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1

및 서열번호 2로 표시되는 염기 서열로 암호화되는 단백질의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

- [0026] 상기 DRL1 및 ELP4 유전자에 T-DNA를 삽입하여 돌연변이를 일으키는 것이다.
- [0027] 상기 식물체는 잎의 형태 변화로 인한 엽록소는 대조군과 비교하여 감소하나, 광합성 효율은 유지되는 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 상기 식물체는 식물체의 잎의 길이 및 너비를 조절된 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 상기 식물체는 식물체의 잎의 세포 수 및 잎의 세포의 크기가 조절된 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 상기 식물은 쌍자엽 식물인 것인 식물체 형태를 조절하는 방법이다.
- [0031] 상기 쌍자엽 식물은 애기장대, 브로콜리, 무, 겨자 및 고추냉이로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 상기 식물체는 DRL1 단일 동형접합 돌연변이 식물체와 ELP4 단일 동형접합 돌연변이 식물체를 교배시켜 수득한 F1종자를 자가수분하여 제조된 것이다.
- [0033] 본 발명은 DRL1 및 ELP4 유전자의 발현이 억제되어 이중 동형접합 돌연변이가 유도된, 식물체의 형태가 조절된 식물체를 제공한다.
- [0034] 상기 DRL1 및 ELP4 유전자의 발현이 억제되어 이중 동형접합 돌연변이가 유도된, 식물체의 형태가 조절된 식물체의 종자를 제공한다.

[0036] **[준비예]**

- [0037] 본 발명의 애기장대 DRL1과 ELP4 단일돌연변이체, SALK_056915와 SALK_079193는 국제 애기장대 생물자원 센터 (ABRC)에서 분양 받았다.

[0039] **[실시예]**

- [0040] **실시예 1. 단자엽 및 쌍자엽 식물의 DRL1 및 ELP4 단백질 염기서열 유사성 분석 및 돌연변이체의 T-DNA 삽입 위치, 이에 따른 프라이머의 위치 확인.**

- [0041] 애기장대의 DRL1 유전자 및 ELP4 유전자와 단자엽 및 쌍자엽 식물의 유사성을 알기 위해 염기서열을 분석하였다.
- [0042] 그 결과, 도 1A와 같이 애기장대의 DRL1 아미노산 서열은 단자엽 및 쌍자엽 식물의 DRL1 아미노산 염기서열과 각각 61.2%와 72.5% 동일한 것으로 나타났으며, 도 1B와 같이 애기장대의 ELP4 아미노산 염기서열은 단자엽 및 쌍자엽 식물의 ELP4 아미노산 염기서열과 각각 평균 57.7 %와 66.2% 동일한 것으로 나타나 식물 간 두 유전자의 높은 보존성을 보였다 (도 1A, 도 1B).

- [0044] **실시예 2. RL1 및 ELP4 유전자의 단일 돌연변이체의 유전자 결여 및 발현 확인.**

- [0045] 애기장대의 DRL1 유전자 돌연변이체, SALK_056915와 ELP4 유전자 돌연변이체, SALK_079193이 단일 동형 돌연변이체임을 확인하기 위하여, 각각의 단일 돌연변이체에서 유전자의 발현이 결여되어 있음을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 도면 1C는 DRL1 및 ELP4 유전자의 대략적인 구조와 돌연변이체의 T-DNA 삽입 위치 (▼)와 유전자의 발현을 확인하기 위한 프라이머의 위치 (→, 화살표머리는 DNA 증폭반응시 진행방향을 나타냄)를 나타냈다(도 1C).

- [0046] DRL1 및 ELP4 유전자의 단일 돌연변이체를 제작하기 위해, 애기장대 ELP4 또는 DRL1 유전자의 T-DNA 삽입 단일 돌연변이체에서 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 원형으로 하여, ELP4 발현을 확인하기 위해 ELP4-F (5' -CTCACTGGCTACAAGGATAT-3')과 ELP4-R (5' -ATGTGCCATACGATGTTCCA-3')을, DRL1 발현을 확인하기 위해 DRL1-F (5' -TACGAGTTGGACAGAGCGAC-3')과 DRL1-R (5' -GCTGAGAAGAATCTGAGAGG-3')을 프라이머로 이용하여 RT-PCR 산

물에 대한 전기영동 하였다.

[0047] 그 결과, DRL1 및 ELP4의 단일 동형접합 변이체에서 해당 유전자의 발현이 검출되지 않음을 확인하였다 (도 1D).

[0049] **실시예 3. DRL1 및 ELP4 유전자의 이중 동형접합 돌연변이체 제작 및 발현 확인.**

[0050] 상기 실시예 2의 예기장대 DRL1 단일 돌연변이 유전자 및 ELP4 단일 돌연변이 유전자 발현의 결여를 확인한 후, 단일 돌연변이체를 서로 교배하여 잡종 종자 F1을 생산하고, 다시 F1를 자가수분하여 생산된 F2 식물체에 대해 DRL1과 ELP4 유전자형을 분석하고 RNA를 추출하여 DRL1 및 ELP4 유전자에 대한 RT-PCR을 수행하여 발현을 확인 하였다.

[0051] 그 결과, DRL1 및 ELP4 이중 동형접합 돌연변이체에서 두 유전자의 발현이 검출되지 않음을 확인하여 DRL1 및 ELP4 유전자의 이중 동형접합 돌연변이체 제작하였다 (도 1D).

[0053] **실시예 4. DRL1 및 ELP4 유전자의 이중 동형접합 돌연변이체의 잎 표현형 비교 분석.**

[0054] 영양생장이 완료된 야생형과 DRL1 및 ELP4의 단일 또는 이중 동형접합 돌연변이 식물체의 로제트 부분을 비교하였다.

[0055] DRL1 단일 동형 돌연변이체는 야생형에 비해 잎의 너비와 길이가 소폭 감소하였으며 ELP4 단일 동형 돌연변이체는 잎의 크기가 심각하게 감소하였다(도 2A). 특히, 도 2A와 같이 잎의 발생 순서에 따라 잎의 형태 변형 정도가 달라 최근 잎일수록 잎의 모양 변형이 커진걸 확인 하였다.

[0056] 반면, DRL1 및 ELP4 이중 동형접합 돌연변이 식물체는 잎의 형태 변화는 ELP4 단일 동형 돌연변이체와 비슷하였으나 잎의 발생순서와 상관없이 모든 로제트 잎에서 일관성 있게 잎 형태 변화를 보였다(도 2A).

[0057] 이에 따라, DRL1 단일 동형 돌연변이체는 잎의 너비와 길이가 소폭 감소하였고, DRL1 단일 동형 돌연변이체 잎의 크기가 심각하게 감소하였으나, DRL1 및 ELP4 이중 동형접합 돌연변이 식물체는 잎의 발생순서와 상관없이 모든 로제트 잎에서 일관성 있게 잎 형태 변화를 확인 하였다(도 2A).

[0059] **실시예 5. DRL1 및 ELP4 유전자의 이중 동형접합 돌연변이체의 잎의 크기 및 형태 지수 비교 분석.**

[0060] 잎의 형태를 비교하기 위해, 21일 성장한 야생형과 DRL1 및 ELP4 유전자의 단일 및 이중 동형접합 돌연변이체의 성숙한 3번째 잎을 채취하여, ImageJ 프로그램을 이용하여 잎몸의 크기와 잎몸의 길이와 너비를 측정하였다.

[0061] 그 결과, 상기 실시예 4와 같이, DRL1과 ELP4 단일 돌연변이체의 성숙한 잎의 크기가 야생형에 비해 크게 감소하였으며 (야생형에 비해 각각 약 58%와 39%), 잎의 형태도 야생형에 비해 잎의 너비 감소에 의해 가늘어졌다. 특히, DRL1 단일 돌연변이체는 잎 가장자리에서 아래 방향으로 말리는 형태를 보였으며, 이러한 형태는 ELP4 단일 돌연변이체에서 더욱 강하게 나타났다.

[0062] DRL1 및 ELP4 이중 동형접합 돌연변이 역시 야생형에 비해 식물체와 잎의 크기가 감소하여 잎의 크기는 야생형의 40%를 보였고(도 2B), 이는 DRL1 단일 돌연변이체에 비해 식물체와 잎의 크기, 잎의 형태에서 더 심각한 변화를 보였으며, 도 2C와 같이 ELP4 단일 돌연변이체와는 유사한 변화를 보였다.

[0063] 이에 따라, DRL1 및 ELP4 이중 동형접합 돌연변이 역시 야생형에 비해 식물체는 DRL1 및 ELP4 단일 돌연변이체와 다르게 잎 가장자리에서 아래 방향으로 말리는 형태도 없음을 확인 하여, 일관성있는 형태 변화를 확인 하였다(도 2A).

[0065] **실시예 6. DRL1 및 ELP4 유전자의 이중 동형접합 돌연변이체 잎의 엽육조직과 세포 표현형 비교 분석.**

[0066] DRL1 및 ELP4의 단일 또는 이중 돌연변이체에서 잎의 크기 감소 원인을 찾기 위하여 잎 세포의 세포 크기와 수를 관찰하였다.

[0067] 상기 실시예 5에서 채취한 21일 성장한 식물체의 3번째 잎을 고정액에 넣어 24시간 동안 보관한 후, 현미경을

이용하여 잎의 너비가 가장 넓은 부분의 잎의 주맥부터 가장자리까지 엽육세포를 관찰하였다. 엽육세포의 이미지로부터 세포의 수를 측정하고 ImageJ 프로그램을 이용하여 세포의 크기를 측정하였다(도 3A).

[0068] 그 결과, 야생형에 비해 DRL1 및 ELP4의 단일 및 이중 동형접합 돌연변이체의 잎 세포 수는 62%, 61%, 58% 로 감소하였으며(도 3B) 세포의 크기는 75%, 51%, 52%로 감소한 것으로 나타났다 (도 3C).

[0070] 실시예 7. DRL1 및 ELP4 유전자의 이중 동형접합 돌연변이체의 엽록소 함량 및 광합성 효율 측정.

[0071] 상기 실시예 5에서 채취한 21일 생장한 식물체의 로제트잎을 채취하여 90% 아세톤에 넣고 4℃ 암실에서 12시간 보관하여 엽록소를 추출하였다. 엽록소 함량과 함께 상기 도 2에서 채취한 21일 생장한 식물체에서 PSI 엽록소 형광 이미지 분석장치, FluorCam을 이용하여 Fm/Fv 값을 측정하고, 광합성 효율을 분석하였다.

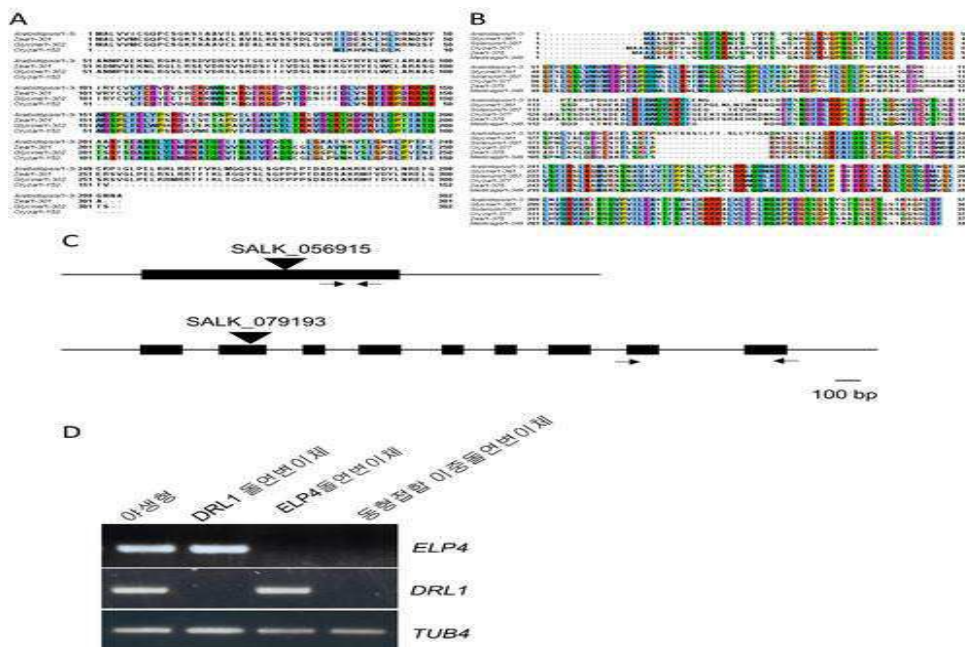
[0072] 그 결과 도 4A, 도 4B와 같이, DRL1과 ELP4의 단일 및 이중 동형접합 돌연변이체의 엽록소의 양은 엽록소a, b 모두 야생형의 약 40% 수준으로 감소하였다 (도 4a). 그러나 광합성 효율은 감소 없이 야생형과 같은 수준을 보였다 (도 4b)

[0073] 결과적으로, DRL1 및 ELP4 유전자의 이중 동형접합 돌연변이체는 엽록소 a,b가 감소하나, 광합성 효율은 감소가 없어, 식물의 기능적 소실이 없는 것을 확인 하였다.

[0075] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

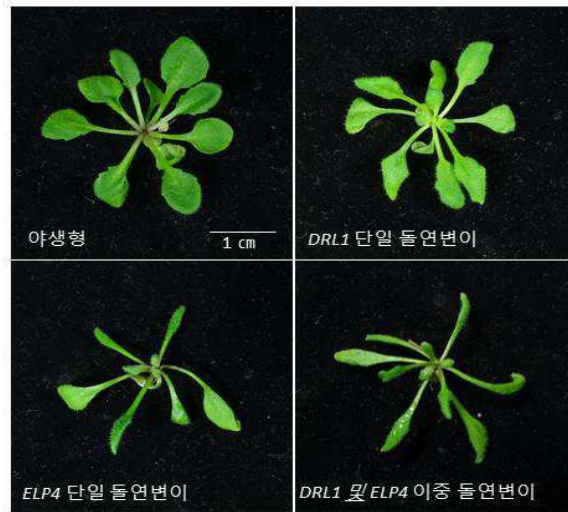
도면

도면1

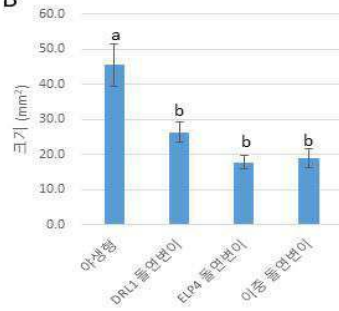


도면2

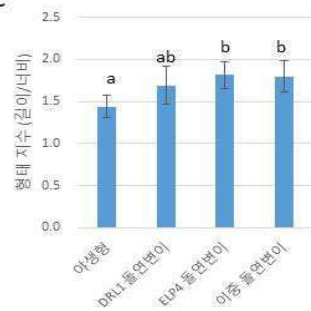
A



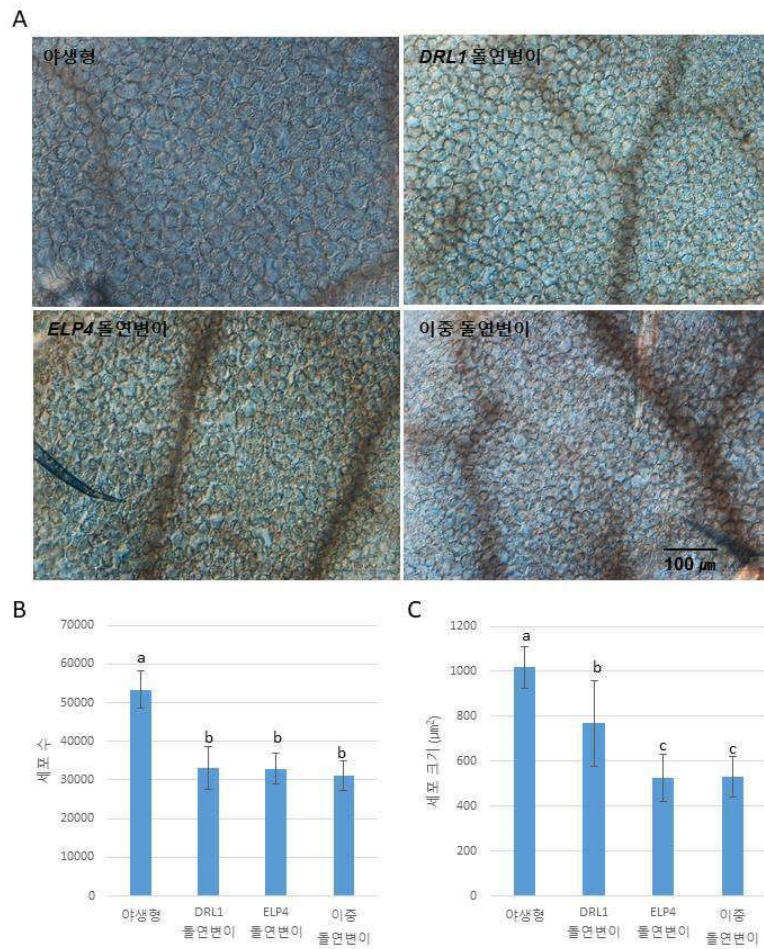
B



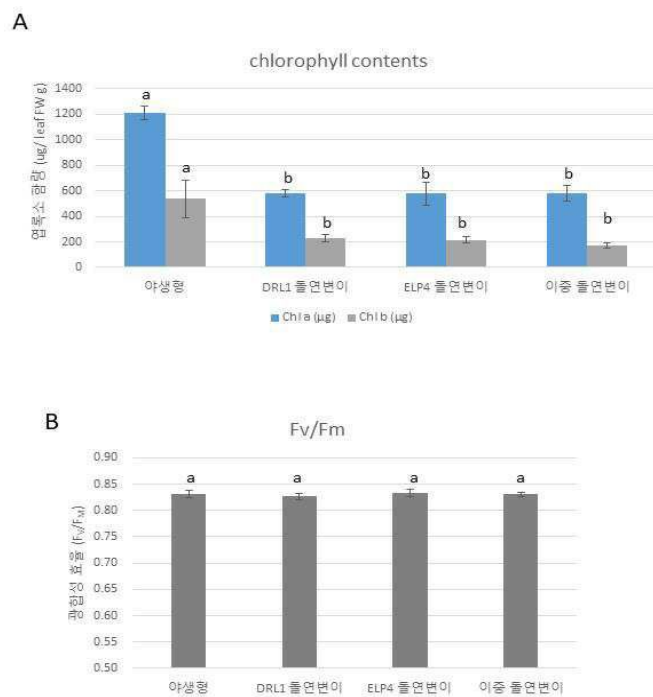
C



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Dong-A University Research Foundation For Industry-Academy Cooperation
- <120> Double homozygote mutation of DRL1 and ELP4 and the method for manipulation of leaf shape using thereof
- <130> PN2111-564
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 909
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> DRL1-AT1G13870
- <400> 1

atggcgctag ttgtgatttg tgggcaacct ttagtggtga agtcaatagc tgcagtaact 60

ttagctgaaa cattgaaaga gtctgaaacg aaacagagtg ttaggatcat cgatgaggct 120

tcgtttcattc tagaccgcaa ccaaaactat gctaacatgc ctgctgagaa gaatctgaga 180

ggaaagctta ggtcagatgt tgatagatca gtttcgacag gcgagattgt tattgtagat 240

tccttgaata gtatcaaagg ttacagatat gagctatggt gtatcgctcg tgctgctggg 300

attaggtatt gtgttgttta ttgtgatgta gatgaagctc attgtaggca atggaataag 360

gaacggagtg atagaggatga agatggatat gacgatggta tattcgaaga tctgggttaga 420

agatttgaga aacctgagag aagaaccga tgggattcac ctctctttga gctataccct 480

tctcgtgaag ttatagacaa atcctctcct gtgattttag aggcgtgtgac ttatctaacc 540

aagactgttg actccaaaac ccaagatgtg agaattctcc aaccaagtat tgccactcag 600

gctgctagat ttccagaagc aaattctctt tacgagttgg acagagcgac acaagaaatc 660

atcaacgcga ttgtggaaca acaatcactg ggcgcggcta taagcagagt tactcttggc 720

aatgaactac ctccgattga aatctgcaga ccgattgggc taccggagct aaggaggctt 780

cgaagaacgt ttgttaaatt gatgggtcaa tcgagtctaa gcggtccacc gttaccaact 840

gatgcagaca gtgcaaagag acgttttttg gattacttga acagagagtt tggaggtaat 900

aacgcttga 909

<210> 2

<211> 1122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ATELP4-AT3G11220

<400> 2

atggctgcac caaacgttcg tagtagtagc agcttctctc gcaacatata agttgtgtca	60
tcgcctcaaa ttcttggtct caaaagtggc cctaattggc cagcttttat atcgtcaggc	120
attcgtgata ttgacaggat actaggtggc gggtatcctt tgggaagctt agtaatggta	180
atggaagata ctgaagcacc gcatcataat gatctgttaa gaacttacat gtctcagggg	240
cttgtaaca atcaaccact tctttatgct agtcttcaa aagatccaaa agggtttctt	300
ggtactttgc cgcatactgc atcatccaaa gaggataagc ctactgcgcc cgacctgat	360
caggagaga gcttgaggat tgcttggcag tatcggaagt atttggaata ccagaagaat	420
gctattgatg attactccaa tgactttgat atgagaaagc ccttgagag gcaatttctg	480
agcggacggc ccatagattg tgtcagctctg ttagactctt cagatcttct cattgctcag	540
gaccactgtg ctacgttttt atcaaaattt ccaagcaaat tctgctcaag ctcaattctt	600
tttacatctc tcttatactt ccaagctcaa aacagcagta acattgcac tattggccgc	660
atcgcaatcc agtctttttg ctctccctg tgtgagtatt ctgaaaagga atcagacatg	720
ctctcattca taagattgct gaaaagtatg cttatggttt caaatgcggc agccattgtt	780
actttcccgc ctccctgct ctcccctct tctctaaaa gactgcagca tatggcagat	840
accttgctct ctatcaaagc aatcccagat ggtgacaagg aattggagaa actcctcact	900
ggctacaagg atataaatgg attcctcaac atacacaagg ttgctcgtat caacacacag	960
gtgcctgtaa ttcttgagc aaaaaccttc tcaatgagct tgaagaagag aagattcttg	1020
gctctagagt gtctgaatca agccctgta gacgggtcca gtggaacatc gtatggcaca	1080
tctggtagct gctcatccaa atccggagca ctagattttt ga	1122