

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0121936
(43) 공개일자 2024년08월12일(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01) A01H 6/34 (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
A01H 6/346 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2023-0014373
(22) 출원일자 2023년02월02일
심사청구일자 2023년02월02일(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
이상협
서울특별시 성동구 동일로 237, 104동 601호(송정동, 서울숲아이파크)
마디 바드리 아나잔
서울특별시 광진구 천호대로116길 56(능동)
(74) 대리인
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 왜성 오이 판별용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 왜성 오이 판별용 조성물 및 이를 이용한 왜성 오이 판별 방법에 관한 것으로, 종자 상태에서도 DNA를 추출하여 왜성 여부를 확인할 수 있어 왜성 계통 품종 개발 시 왜성 형질을 나타내는 오이 품종을 효율적으로 판별하고 육성할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/8261 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

C12Q 2600/13 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711162038
과제번호	2020R1A2C1008800
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	효모 이중잡종화 검사법을 활용한 오이 노균병/흰가루병 저항성
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

확인 대상 오이의 *CsGy7G019320* 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 또는 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에서의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 검출하는 제제를 포함하는, 왜성 오이 판별용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 검출 제제는 서열번호 26 및 27의 서열로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 28 및 29의 서열로 이루어진 프라이머 세트인, 왜성 오이 판별용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에서의 SNP 검출 제제는 서열번호 24 및 25의 서열로 이루어진 프라이머 세트인, 왜성 오이 판별용 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 왜성 오이 판별용 키트.

청구항 5

확인 대상 오이의 *CsGy7G019320* 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 또는 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에서의 G 염기의 존재를 확인하는 단계; 및

상기 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기가 결실되었거나 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에 G 염기가 존재하는 경우 왜성 오이로 판단하는 단계를 포함하는, 왜성 오이 판별 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 확인은 서열번호 26 및 27의 서열로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 28 및 29의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 사용하여 수행되는, 왜성 오이 판별 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에서의 G 염기의 존재의 확인은 서열번호 24 및 25의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 사용하여 수행되는, 왜성 오이 판별 방법.

청구항 8

오이의 *CsGy7G019320* 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기를 결실시키는 단계를 포함하는, 왜성 오이 종자의 제조 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 염기 결실은 CRISPR, TALEN 또는 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)로 수행되는, 왜성 오이 종자의 제조 방법.

청구항 10

CsGy7G019320 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기가 결실된 왜성 오이.

청구항 11

청구항 10의 왜성 오이의 종자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 왜성 오이 판별용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 오이(*Cucumis sativus* L.)는 전세계적으로 중요한 채소 작물이다. 높은 수확량은 오이 재배에서 가장 중요한 육종 목표 중 하나이다. 생물학적 및 비생물학적 스트레스 요인을 무시하면, 수확량 구성 요소는 식물당 수확 수, 식물 높이, 절간 길이, 식물당 가지 수, 개화 마디 수 등으로 구성된다. 그 중에서도 식물의 높이, 특히 절간 길이는 오이의 중요한 구성 요소이다. 그 이유는 높이가 낮은 단간(SI; short internode) 품종(DW; dwarfism)은 많은 수의 열매에 쉽게 견디기 때문이다. 또한, 왜소함과 짧은 절간 특성은 관리 및 수확 전략에서 노동력 감소에 큰 이점을 제공한다.

[0004] 한편, 박과 식물에서 DW와 SI 특성을 조절하는 유전자에 관한 정보는 제한적이다. 현재까지 오이 왜성 및 단간을 유도하는 유전자가 존재하는 염색체의 위치(loci)는 밝혀져 있지만, 왜성 및 단간을 유도하는 특정 유전자는 규명되지 못한 실정이다. 오이의 왜성 및 단간 형질은 오이 생산성(수량) 증대에 아주 중요한 역할을 할 수 있어, 상업용 오이 품종 육성에서는 왜성 및 단간이 아주 중요한 형질 중 하나라고 볼 수 있다. 하지만 분자마커를 활용하는 분자유종프로그래를 적용하기에 오이 분자유종에 사용할 왜성 및 단간 유전자 규명이 미흡한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제2154701호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 왜성 오이 판별용 조성물 및 이를 포함하는 왜성 오이 판별용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 본 발명은 왜성 오이 판별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명은 왜성 오이 종자의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명은 왜성 오이 및 이의 종자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 1. 확인 대상 오이의 *CsGy7G019320* 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 또는 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에서의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 검출하는 제제를 포함하는, 왜성 오이 판별용 조성물.
- [0013] 2. 위 1에 있어서, 상기 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 검출 제제는 서열번호 26 및 27의 서열로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 28 및 29의 서열로 이루어진 프라이머 세트인, 왜성 오이 판별용 조성물.
- [0014] 3. 위 1에 있어서, 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에서의 SNP 검출 제제는 서열번호 24 및 25의 서열로 이루어진 프라이머 세트인, 왜성 오이 판별용 조성물.
- [0015] 4. 위 1 내지 3 중 어느 하나의 조성물을 포함하는 왜성 오이 판별용 키트.
- [0016] 5. 확인 대상 오이의 *CsGy7G019320* 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 또는 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에서의 G 염기의 존재를 확인하는 단계; 및
- [0017] 상기 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기가 결실되었거나 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에 G 염기가 존재하는 경우 왜성 오이로 판단하는 단계를 포함하는, 왜성 오이 판별 방법.
- [0018] 6. 위 5에 있어서, 상기 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 확인은 서열번호 26 및 27의 서열로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 28 및 29의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 사용하여 수행되는, 왜성 오이 판별 방법.
- [0019] 7. 위 5에 있어서, 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에서의 G 염기의 존재의 확인은 서열번호 24 및 25의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 사용하여 수행되는, 왜성 오이 판별 방법.
- [0020] 8. 오이의 *CsGy7G019320* 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기를 결실시키는 단계를 포함하는, 왜성 오이 종자의 제조 방법.
- [0021] 9. 위 8에 있어서, 상기 염기 결실은 CRISPR, TALEN 또는 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)로 수행되는, 왜성 오이 종자의 제조 방법.
- [0022] 10. *CsGy7G019320* 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기가 결실된 왜성 오이.
- [0023] 11. 위 10의 왜성 오이의 종자.

발명의 효과

- [0025] 본 발명의 왜성 오이 판별용 조성물 및 판별 방법으로 왜성 계통 품종 개발 시 종자 상태에서도 DNA를 추출하여 왜성 여부를 확인할 수 있어, 왜성 형질을 나타내는 오이 품종을 효율적으로 판별하고 육성할 수 있다.

[0026] 본 발명의 왜성 오이 종자의 제조 방법으로 오이를 왜성 형질을 나타내도록 개량하여 재배할 수 있고, 왜성 오이를 재배함으로써 오이 생산량을 증대시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 *si-2*와 야생형(WT) 오이 근친 교배 계통의 표현형 특성화를 나타낸 사진이다. (A)와 (B)는 *si-2*와 WT 오이의 줄기 길이를 나타내고, (C)와 (D)는 각각 *si-2*와 WT의 성인 오이 식물을 나타낸다(빨간색 막대: 절간 길이).

도 2는 왜성/짧은 절간 후보 유전자의 발현 분석을 그래프로 나타낸 것이다(검은 막대: WT, 하얀 막대: *si-2* 돌연변이체; 오차 막대는 평균 $\pm$ SE(n=3), *p < 0.05).

도 3은 WT(오이, 멜론, 호박, 수박)과 *si-2*에서 SNP가 있는 인트론 부분의 유전자 서열을 나타낸 것이다.

도 4는 SNP(A)와 프로모터 20bp 결실(B)을 시퀀싱 크로마토그램으로 나타낸 것이다.

도 5는 프로모터 20bp 결실을 확인하기 위해 사용된 프라이머 조합(A)과 이 중에 2F+1R 프라이머 조합을 이용한 결과(B)를 나타낸 것이다.

도 6은 30개의 F₂ 개체의 유전형 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 *si-2*와 박과 WT 종들 간에 프로모터 서열을 비교하여 나타낸 것이다.

도 8은 cis-조절 요소 후보들을 식별한 것을 나타낸 것이다.

도 9는 왜성 오이에 3종류의 호르몬을 각각 다른 농도로 처리하였을 때의 식물의 길이를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0031] 본 발명은 확인 대상 오이의 *CsGy7G019320* 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 또는 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째 대응되는 위치에서의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 검출하는 체제를 포함하는, 왜성 오이 판별용 조성물에 관한 것이다.

[0032] 상기 확인 대상 오이는 오이가 왜성 형질을 나타내는지 판별하기 위한 목적으로 염기서열 변이를 검출하는 대상이 되는 미지의 오이를 의미한다. 왜성 오이는 낮은 신장과 짧은 절간 길이 특성을 갖는 오이를 의미하며 이러한 특성은 더 많은 식물 개체수, 암꽃 및 더 적은 식물당 가지수와 더 집중된 성숙을 가능하게 하여 오이 생산을 용이하게 할 수 있다. 따라서 오이 생산에 있어 왜성 오이를 판별하여 재배하게 되면 오이 생산량 증대에 기여할 수 있다.

[0033] *CsGy7G019320* 유전자는 GA3ox(gibberellin-3-beta dioxygenase 1-like)를 부호화하는 유전자이다. Gibberellic acid(GA)는 종자 발아, 줄기 신장, 잎 확장, 열매 맺기 및 발달 등을 포함하여 모든 식물의 수명 주기에 영향을 미치는 호르몬이다. GA3ox는 GA 생합성 경로의 마지막 단계를 촉매하여 GA20을 GA1로, GA9를 GA4로, GA5를 GA3으로 전환하여 GA를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.

[0034] 상기 서열번호 1의 서열은 *CsGy7G019320* 유전자 서열로, 프로모터, 엑손 및 인트론 영역을 포함한다.

[0035] 프로모터는 전사의 시작에 관여하는 유전자의 상류 영역으로 RNA 중합효소가 DNA 가닥의 한 부위에 결합하여 전사가 시작되는 부위를 말한다.

[0036] 인트론은 DNA 서열 중 단백질로 번역되지 않는 부분을 의미한다.

[0037] 일반적으로 유전자의 발현은 프로모터 영역의 서열, cis-조절 인자, 프로모터 영역에 결합하는 다양한 전사인자 단백질, RNA 결합 단백질, 인트론 서열의 차이, 유전자 자체의 안정성 또는 microRNA 등에 의해 조절될 수 있다.

- [0038] 왜성 오이 품종은 야생형 오이와 달리 *CsGy7G019320*의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기가 결실되어 있고, 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번에 대응되는 위치에서의 염기에 변이가 일어난 것을 확인하였다. 따라서 상기 유전자의 프로모터 영역과 인트론 영역에서 상기와 같은 특정 염기의 존부나 변이 여부를 확인할 수 있다면, 대상 오이가 왜성인지 아닌지 구별할 수 있다.
- [0039] 용어 "대응되는 염기"는 비교대상이 되는 염기와 실질적인 동일성을 갖는 염기를 의미하며, 일부 염기에 차이가 있더라도 전체 염기로 인해 발현되는 형질이 보존되는 염기를 의미한다. 상기 실질적인 동일성은 본 발명의 서열(예컨대, 서열번호 1)과 임의의 다른 서열(예컨대, 확인 대상 오이의 *CsGy7G019320* 유전자 서열)을 최대한 대응되도록 배열하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 두 서열이 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 것을 의미한다.
- [0040] 용어 "대응되는 위치"는 서열을 배열(alignment)하였을 때의 대응되는 위치의 서열을 의미한다.
- [0041] 용어 "다형성(polymorphism)"은 하나의 유전자 좌위(locus)에 두 종류 이상의 대립 유전자(allele)가 존재하는 경우를 의미하며, 다형성 중에서 개체에 따라 단일 염기만이 차이가 있는 것을 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)이라 한다.
- [0042] 용어 "대립 유전자(allele)"는 상동염색체의 동일한 유전자좌에 존재하는 한 종류의 유전자의 여러 타입을 의미한다.
- [0043] 상기 제제는 상기 특정 염기의 결실 여부 또는 SNP를 검출 또는 확인할 수 있는 제제라면 그 종류는 제한되지 않으며, 예를 들면 상기 염기 결실 부위 또는 SNP를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 상기 염기 결실 부위 또는 SNP를 포함하는 영역에 상보적으로 결합하는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로, 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 주로 특정 구간을 증폭하는 프라이머 세트의 형태로 사용된다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(예를 들어, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소) 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼합할 수 있다. 프라이머의 적합한 길이는 사용하고자 하는 프라이머의 특성에 의해 결정되며, 통상적으로 15 내지 30 bp의 길이로 사용하나, 이에 제한되지 않는다. 프라이머는 주형의 염기 서열과 정확하게 상보적일 필요는 없지만, 주형과 혼성복합체(hybrid-complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적이어야 한다.
- [0045] 상기 제제는 상기 특정 위치의 염기 결실 여부 또는 SNP를 검출 또는 확인할 수 있는 것이라면 그 서열 및 길이는 제한되지 않고 적절하게 설계 또는 선택될 수 있다.
- [0046] 예를 들어, 상기 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 검출 제제는 서열번호 26 및 27의 서열로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 28 및 29의 서열로 이루어진 프라이머 세트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 예를 들어, 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번에 대응되는 위치에서의 SNP 검출 제제는 서열번호 24 및 25의 서열로 이루어진 프라이머 세트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 또한, 본 발명은 상기 왜성 오이 판별용 조성물을 포함하는 왜성 오이 판별용 키트에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명의 키트는 전술한 염기 결실 부위 또는 SNP를 검출 또는 증폭시킬 수 있는 제제를 포함하는 조성물; 상기 검출 또는 증폭을 위한 시약; 및 제한효소를 포함하는 키트일 수 있다. 상기 증폭을 위한 시약은 dNTPs, DNA 폴리머라아제 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 dNTPs는 dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 포함하며, DNA 폴리머라아제는 내열성 DNA 중합효소로서 Taq DNA 폴리머라아제, Tth DNA 폴리머라아제 등 시판되는 폴리머라아제를 이용할 수 있다.
- [0051] 상기 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물일 수 있다. 안내서는 팜플렛 또는

전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함할 수 있다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함할 수 있다.

[0052] 상기 왜성 오이 판별용 키트의 판별 대상이 되는 오이는 전술한 바와 같다.

[0054] 또한, 본 발명은 확인 대상 오이의 *CsGy7G019320* 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 또는 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에서의 G 염기의 존재를 확인하는 단계; 및

[0055] 상기 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기가 결실되었거나 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에 G 염기가 존재하는 경우 왜성 오이로 판단하는 단계를 포함하는, 왜성 오이 판별 방법에 관한 것이다.

[0056] 상기 확인 대상 오이는 전술한 바와 같다.

[0057] 상기 확인 단계는 당 분야에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 특정 위치의 염기에 대응되는 염기를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 상기 특정 위치의 염기에 대응되는 염기를 포함하는 영역에 상보적으로 결합하는 프로브를 사용하여 해당 영역을 증폭하고, 그 증폭 산물을 확인하는 등에 의해 수행될 수 있다. 상기 프라이머 또는 프로브는 상기 특정 염기의 결실 또는 특정 염기의 존재를 확인할 수 있다면, 그 서열은 특정 서열에 한정되지 않는다.

[0058] 예를 들어, 상기 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기의 결실 여부 확인은 서열번호 26 및 27의 서열로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 28 및 29의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 예를 들어, 상기 유전자의 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에서의 G 염기의 존재의 확인은 서열번호 24 및 25의 서열로 이루어진 프라이머 세트를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 왜성 오이 품종은 야생형 오이와 달리 *CsGy7G019320*의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기가 결실되어 있고, 인트론 영역에서 서열번호 1의 590번째에 대응되는 위치에서의 염기가 A가 아니라 G로 변이가 일어난 것을 확인하였다. 따라서 상기 유전자의 프로모터 영역에서 상기 특정 염기가 결실되어 있거나, 인트론 영역에서 상기 특정 염기가 G로 변이되어 있다면 확인 대상 오이가 왜성이라고 판단할 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명은 오이의 *CsGy7G019320* 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기를 결실시키는 단계를 포함하는 왜성 오이 종자의 제조 방법에 관한 것이다.

[0063] 상기 염기 결실은 당 분야에서 공지된 염기를 결실 방법이라면 제한 없이 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 염기 결실 단계는 유전자 가위를 사용하여 수행될 수 있다.

[0064] 상기 유전자 가위는 예를 들어 천연 유전자가위(제한효소) 또는 인공 유전자 가위일 수 있다.

[0065] 상기 인공 유전자 가위는 예를 들어, CRISPR, TALEN 또는 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)일 수 있다.

[0066] 유전자 가위를 이용하여 염기 결실 시 뉴클라아제 또는 니케이즈와 가이드 벡터를 포함하여 목적하는 서열에 특이적으로 작용하는 효소를 이용할 수 있다.

[0067] 상기 CRISPR은 특정 단백질, 가이드 RNA와 함께 사용되어 표적 유전자를 찾아내 이를 잘라낼 수 있다. 상기 특정 단백질은 예를 들어, Cas9, cpf1 등일 수 있다.

[0068] 상기 TALEN(transcription activator-like effector nuclease)은 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인과 DNA 절단 도메인을 서로 융합하여 제조한 인공의 제한효소를 의미한다. TAL 이펙터 DNA 결합 도메인은 어떠한 원하는 DNA 서열에도 빠르게 결합하도록 엔지니어링된 것으로, 이를 DNA 절단 도메인과 결합시키는 경우, 원하는 DNA 서열에 특이적으로 결합하여 원하는 DNA 부위를 절단하는 효과를 가져온다.

[0069] 상기 징크 핑거 뉴클라아제(zinc finger nuclease; ZFN)란 징크 핑커 도메인 및 뉴클레오티드 절단 도메인을 포함하는 융합 단백질을 의미하며, 공지의 또는 상용의 징크 핑커 뉴클라아제 모두를 포함할 수 있다.

- [0071] 또한, 본 발명은 *CsGy7G019320* 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 559~578번째 염기에 대응되는 염기가 결실된 왜성 오이에 관한 것이다.
- [0072] 상기 오이에서의 염기 결실은 자연적으로 발생한 것이거나 인위적으로 만들어진 것일 수 있다.
- [0073] 염기 결실을 인위적으로 만드는 것은 예를 들어 전술한 유전자 가위를 사용하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 또한, 본 발명은 상기 왜성 오이의 종자에 관한 것이다.
- [0075] 이러한 왜성 오이나 왜성 오이 종자를 통해 왜성 오이 품종을 널리 퍼뜨릴 수 있고, 그로써 오이 생산량 증대에 도움을 줄 수 있다.
- [0077] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0079] **실시예 1. 오이의 왜성 형질 관련 유전자 선별 및 왜성 오이에서의 유전자 변이 확인**

[0080] **1. 실험 재료 및 방법**

[0081] **(1) 식물 재료 및 재배**

[0082] 본 실시예에서는 야생형(WT) 및 짧은 절간(SI; *si-2*) 돌연변이를 모델로 사용하였다(도 1) 두 유전자원의 종자는 동오 시드(안성, 대한민국)로부터 공급받았다. 모든 식물은 2020년 봄에 세종대학교 온실에서 영양액의 점적 관수와 함께 이탄 주머니에서 재배되었고, 필요에 따라 식물 보호 관행을 따랐다.

[0084] **(2) 발현량 분석 및 프라이머 설계를 위한 후보 유전자 선별**

[0085] 오이의 DW 및/또는 SI 후보 유전자 총 10개를 선별하였다. 오이 DW 및/또는 SI 특성에 대한 문헌 검색에서 6개의 유전자가 확인되었다. 이 유전자들의 서열은 오이(Gy14) v2 게놈 데이터베이스(CuGenDB)에서 다운로드했다. 2개의 수박 유전자(*Clao15405* 및 *Clao15407*, 각각 GA2ox 및 GA3ox를 코딩함)는 수박 DW 및/또는 SI 특성에 대한 문헌 검색에서 확인되었다. 두 서열 모두 수박(97103) v1 게놈 데이터베이스(CuGenDB)에서 다운로드했다. 오이(Gy14) v2 게놈 데이터베이스의 BLASTX 검색으로 위의 수박 유전자와 높은 유사도를 보인 오이 유전자 4개를 동정하였다. 다운로드한 모든 시퀀스는 Geneious Pro 9.1.8 (Biomatters, 오클랜드, 뉴질랜드)에 저장하였다. 본 실시예에 사용된 유전자 특이적 프라이머는 Geneious Pro 9.1.8을 기본 매개변수로 사용하여 설계되었다. 본 실시예에 사용된 모든 후보 유전자 및 프라이머 서열은 각각 표 1 및 2에 나타냈다.

표 1

[0086]

유전자 ID (오이)	유전자 ID (수박)	추정 기능
<i>CsGy7G019270</i>	<i>Clao15405</i>	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (GA2ox)
<i>CsGy7G019320</i>	<i>Clao15407</i>	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1-like (GA3ox)
<i>CsGy7G019280</i>	<i>Clao15407</i>	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1-like (GA3ox)
<i>CsGy7G019290</i>	<i>Clao15407</i>	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1-like (GA3ox)
<i>CsGy5G028960</i>	-	Cytochrome P450 (CsCYP85A1)
<i>CsGy4G024030</i>	-	cytokinin dehydrogenase 7 (CKX)
<i>CsGy3G041040</i>	-	CLAVATA1-type receptor-like kinase (CsCLAVATA1)
<i>CsGy4G022710</i>	-	Putative F-box (CsaVFB1)
<i>CsGy6G014690</i>	-	Cullin-1 (CsCullin1)
<i>CsGy3G029480</i>	-	OTU domain-containing protein At3g57810 (CsDET2)

표 2

[0088]

유전자 ID	정방향 프라이머 (5' - 3')	역방향 프라이머 (5' - 3')
<i>CsGy7G019270</i>	CGAGAGAATAAGGTCTTGCAGG (서열번호 2)	CGTCCACAACTCTTGAGGTAC (서열번호 3)
<i>CsGy7G019320</i>	GTGACCCCAACTCAACCATTAC (서열번호 4)	CGGAAAGGCGGATAGATGAAAG (서열번호 5)
<i>CsGy7G019280</i>	CTCTGCTAATTCCTCTTCTCC (서열번호 6)	GGAAGAAGGAGGAAATACGGAC (서열번호 7)
<i>CsGy7G019290</i>	CTACGGTAACCTGGGCTGAGTAC (서열번호 8)	CAGTAGGAGGAGTGGATAGAC (서열번호 9)
<i>CsGy5G028960</i>	GGTGGTGGAACAAGACTTTGTC (서열번호 10)	CTCCTCCAACTTCTTCCCATC (서열번호 11)
<i>CsGy4G024030</i>	GATCGTCTGGTCTTCAAGACTC (서열번호 12)	CTTCCCTTCTGGTAACACTAC (서열번호 13)
<i>CsGy3G041040</i>	GTAGACATAGTGAGATGGGTCC (서열번호 14)	CTTGGAGTGGGTATTCTGTGAG (서열번호 15)
<i>CsGy4G022710</i>	CGTCTCTCCCTTAAAGCTGAAG (서열번호 16)	GAGAGATGAGGATAAGCGAGTC (서열번호 17)
<i>CsGy6G014690</i>	CTACTCCACTCGTTGTCATGTG (서열번호 18)	GGCGGAAGAGGATCTTTATTC (서열번호 19)
<i>CsGy3G029480</i>	CTCTTCGTCCATTGAGGAG (서열번호 20)	CGTTCTAATGGCTCCTCTAC (서열번호 21)
<i>CsGy2G015500</i> (<i>Cs-Actin</i>)	CTCCTCTCAATCCTAAAGCC (서열번호 22)	GGCATACAGTGATAGAACGG (서열번호 23)

[0090]

(3) RNA 분리 및 정량적 역전사 PCR(RT-qPCR)

[0091]

식물당 3개의 줄기 샘플을 수집하여 단일 샘플로 함께 혼합하였다. 3개의 독립적인 생물학적 복제물이 RT-qPCR 분석에 사용되었다. 수집된 샘플은 액체 질소에서 즉시 동결되었고, RNA 분리를 위해 추가로 사용할 때까지 -80 °C에서 유지되었다. 식물 RNA 정제 시약(Invitrogen, MA, USA)을 사용하여 샘플로부터 총 RNA를 분리하고, 나노드롭 ND-2000 분광광도계(Thermo Fisher, MA, USA)를 사용하여 분리된 RNA의 품질을 결정하였다. 고품질 RNA 샘플 ($A_{260}/A_{230} > 2.0$, $A_{260}/A_{280} > 1.8$)을 후속 실험에 사용하였다. ReverTra Ace qPCR RT 마스터 믹스 키트(Toyobo, Osaka, Japan)의 지침에 따라 총 RNA 5 µg으로부터 첫 번째 가닥 상보적 DNA(cDNA)를 합성하였다. RT-qPCR은 Thunderbird SYBR qPCR mix(Toyobo, Osaka, Japan)를 사용하여 CFX Real-Time Detection System(Bio-Rad, CA, USA)에서 수행되었다. *Cs-ACTIN* 유전자를 참조로 사용하였다. 전사물의 상대적 풍부도를 계산하기 위해 Bio-Rad CFX Manager 소프트웨어(Bio-Rad, CA, USA)를 적용했다. 데이터는 평균 $\pm$ SE로 표시하였다. 엑셀에서 두 개의 샘플 *t*-테스트를 사용하여 유의성을 계산하였다. 유의한 차이는 $p < 0.05$ 일 때 고려되었다. 모든 RT-qPCR 반응은 세 가지 기술적 복제로 수행되었다. RT-qPCR 분석에 사용되는 프라이머 서열은 표 2에 나타내었다.

[0093]

(4) *si-2* 돌연변이의 후보 유전자(*CsGy7G019320*, *CsGy5G028960*, *CsGy4G024030*)의 증폭 및 염기서열분석

[0094]

si-2 돌연변이체에서 WT 개체에 비해 발현량이 줄어든 3개의 후보 유전자(*CsGy7G019320*, *CsGy5G028960*, *CsGy4G024030*)를 선발하고, 이들 유전자들에 대한 WT과 *si-2* 간의 서열 비교를 위해, Geneious Pro 9.1.8(Biomatters, 오클랜드, 뉴질랜드)을 사용하여 1.2 kb 업스트림을 포괄하는 특정 프라이머 세트와 표적 유전자의 게놈 서열을 설계하였다. 게놈 DNA(gDNA)는 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, 독일)를 사용하여 오이에서 분리하였다. gDNA의 품질과 양은 제조업체(Thermo Fisher Scientific, USA)의 지침에 따라 나노드롭 ND-2000 분광광도계를 사용하여 측정하였다. 증합효소 연쇄 반응(PCR)은 표 3에 나열된 프라이머 세트를 사용하여 수행하였으며, 94 °C 에서 5분, 이어서 94 °C에서 20초, 53-63 °C에서 10초 동안, 그리고 72 °C에서 50초 동안의

35 주기, 72℃에서 5분 동안 마지막 주기로 하는 프로토콜로 수행하였다. 증폭된 DNA 절편을 0.5× TBE 완충액에 준비된 1% 아가로스 겔에서 시각화하고 RedSafe(iNtRON, Seoul, Korea)으로 염색하였다. PCR 증폭산물은 Expin™ Gel SV 프로토콜(GeneAll Biotechnology Company, Seoul, Korea)을 사용하여 정제되었다. 또한, 또한 ABI 3730XL(모세관 96ea X 50cm) 모델과 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit를 사용하여 BIONICS Company(서울, 대한민국)의 도움으로 생어 염기서열 분석을 수행했다. WT 및 *si-2* 돌연변이체로부터 수집된 *CsGy7G019320*, *CsGy5G028960* 및 *CsGy4G024030*의 모든 서열을 Geneious Pro 9.1.8에 기탁하고 서열 다형성을 'CLUSTALW' 기능(Biomatters, Auckland, New Zealand)으로 확인하였다.

표 3

유전자 ID	프라이머 이름	정방향 프라이머 (5' - 3')	역방향 프라이머 (5' - 3')	타겟
<i>CsGy7G019320</i>	019320_gene	TCTCTCCCTAATGCCCC (서열번호 24)	CGGCCCAATTCACATC (서열번호 25)	유전자
	Promoter_(1F+1R)	CTCAGACCACATACGTTTAGG (서열번호 26)	CACACAACCTACCTCCTTAC (서열번호 27)	프로모터
	Promoter_(2F+1R)	CAAGGGCACATAGATTGAAG (서열번호 28)	CACACAACCTACCTCCTTAC (서열번호 29)	프로모터
<i>CsGy5G028960</i>	028960_gene	GCTGTAAAGTTCTCCATGA (서열번호 30)	AGCAATTCCCAATTCTTTGC (서열번호 31)	유전자
	028960-promoter_(F+R)	ACGAATGAAATAGAAAGTGTGC (서열번호 32)	ACTTTAATCTATGTGGCTCT (서열번호 33)	프로모터
<i>CsGy4G024030</i>	024030_gene	GGAACAACGACCAAGTCTC (서열번호 34)	CGAATGGTAGTGTGGCAAG (서열번호 35)	유전자
	024030-promoter_(F+R)	GAATGACAAGCGTGCCTAAC (서열번호 36)	CTGTCTGCCACTCCCATAG (서열번호 37)	프로모터

(5) *CsGy7G019320*의 프로모터 분석

si-2 후보 유전자인 *CsGy7G019320*의 프로모터 분석을 위해 PlantPAN 3.0(<http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/>)을 사용하였다. *CsGy7G019320*의 전사 개시점(ATG)으로부터 1.2 kb 업스트림 영역을 PlantPAN 3.0으로 가져왔다. PlantPAN 3.0의 '애기장대 데이터베이스'에 '프로모터 분석' 도구를 적용하였다. 마지막으로, *si-2* 돌연변이에서 삭제된 20bp 영역에 해당하는 cis-acting 요소를 확인하였다.

(6) 박과작물에서의 오이 *CsGy7G019320* 유전자의 SNP(single nucleotide polymorphism) 와 20bp 결실에 대한 보존성 여부 확인

인트론에서 발견된 SNP와 프로모터 서열에서 발견된 20bp 결실이 기타 박과작물 에서도 발견되는지 여부를 확인하기 위해 SI(*si-2* 돌연변이)와 WT(Gy14, 9930) 오이, 수박(WT, 97103), 멜론 (WT, DHL92), 및 호박 (WT, *Cucurbita maxima* var. *Rimu*) 유전체(게놈) 서열을 박과작물 유전체 데이터베이스(CuGenDB)에서 다운로드했다. 모든 서열은 Geneious Pro 9.1.8 (Biomatters, 오클랜드, 뉴질랜드)로 가져왔다. 모든 *CsGy7G019320* 동족체(homologous 서열)는 'BLASTN' 기능을 통해 식별되었으며 Geneious Pro 9.1.8의 "Multi Align" 도구로 정렬되었다. 마지막으로 인트론의 SNP 유무와 프로모터의 20bp 결실을 확인하였다.

(7) 115개의 오이 핵심 유전자원에서 *CsGy7G019320* 유전자 유래의 자연적 돌연변이 발생 여부 확인

115개의 오이 핵심 유전자원의 서열을 사용하여 자연적인 변이, *CsGy7G019320* 유전자의 인트론에서 발생한 SNP 및 의 프로모터 서열에서 발생한 20bp 결실이 발견 여부를 평가했다. 115개의 핵심 오이 유전자원(SRA0506480)의 모든 염기 서열 정보는 NCBI 짧은 리드 아카이브(SRA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>)에서 다운로드되어 Geneious Pro 9.1.8(Biomatters, Auckland, New Zealand)로 가져왔다. 프로모터 서열을 포함하는 *CsGy7G019320*(WT)의 게놈 서열을 참조 서열로 하여 "Map to reference" 기능을 사용해 서열 정렬(Alignment)을

수행하였다.

[0106] (8) 통계 분석

[0107] R 버전 3.6.1 소프트웨어(시카고, IL, USA)를 사용하여 F2 모집단의 분리 비율을 측정하기 위해 카이 제곱 테스트를 적용하였다.

[0109] 2. 실험 결과

[0110] (1) WT와 *si-2* 돌연변이의 원예적 특성 평가

[0111] 오이 재배 포장에서 *si-2*(짧은 절간-2)라는 짧은 절간 표현형을 보이는 자연 돌연변이가 발견되었다. *si-2* 돌연변이는 DOS 1707(WT, 모계 부모)와 DOS 1908(WT, 부계 부모) 사이의 교배에 의해 생성된 자가수분 자손 중에서 자연발생하였다. 이 교배로부터 F₁ 세대의 연속적인 자가수분 후, 하나의 SI(DW) 오이(*si-2*)가 분리되었다. *si-2* 돌연변이를 WT 오이와 교배시켰을 때, 모든 F₁ 자손은 WT(정상 절간 길이)와 동일한 패턴을 보였다. 자가교배된 F₁의 F₂는 3:1의 분리 비율을 보였으며, 여기에는 110개의 야생형 식물과 33개의 *si-2* 돌연변이 식물을 포함된다. 이는 *si-2*의 유전적 유전이 단일 열성 유전 패턴을 따를 수 있음을 나타낸다.

[0112] *si-2* 및 WT의 표현형은 도 1에 나타내었다. *si-2*와 WT 품종 사이의 절간 길이 차이는 매우 뚜렷했다. *si-2*의 잎 크기는 WT보다 약간 작았다. *si-2* 돌연변이는 자성형(gynoecious type)을 보였으나, WT는 자웅이화동주형(monoecious sex-type)을 보였다. 그러나 *si-2*와 WT 식물의 열매 길이는 크기가 상당히 비슷했다. 두 계통 모두 가지 수와 단위결과(parthenocarpy) 특성은 유사했다(도 1).

[0114] (2) 짧은 절간 후보 유전자(들)에 대한 유전자 발현 분석

[0115] 박과작물에서 보고된 기존의 DW 및 SI 연구 결과를 조사하여, 박과 식물에서 DW 및/또는 SI 표현형을 유도하는 잘 식별된 10개의 유전자를 선택하였다(표 1 및 2). 이들 유전자의 RT-qPCR 분석을 *si-2* 돌연변이체 및 WT 오이의 줄기 조직에 적용하였다. 결과는 세 가지 유전자 *CsGy7G019320*, *CsGy5G028960* 및 *CsGy4G024030*(각각 gibberellin 3-beta-dioxygenase 1-like, cytochrome P450 및 cytokinin dehydrogenase 7을 암호화)의 mRNA 전사 수준이 *si-2* 돌연변이체의 줄기 세포에 특이적으로 줄어드는 것을 발견하였다(도 2). 그러나 다른 유전자인 *CsGy7G019270*, *CsGy7G019280*, *CsGy7G019290*, *CsGy3G041040*, *CsGy4G022700*, *CsGy6G014690*, *CsGy3G029480*은 WT과 *si-2* 돌연변이체의 줄기 세포에서 차별적인 발현을 보이지 않았다(도 2).

[0117] (3) WT와 SI 오이 근교계 사이의 후보 유전자 염기서열 및 프로모터 분석

[0118] RT-qPCR 분석 결과에 따라, *si-2* 돌연변이체를 유도하는 후보 유전자로 *CsGy7G019320*, *CsGy5G028960*, *CsGy4G024030*를 선정하였다. 전장 유전자 서열 (Full length clone) 1.2kb 프로모터 서열 증폭을 위한 특정 프라이머 세트를 설계하고 사용했다(표 3). 그 후 PCR 증폭산물을 사용한 염기서열 분석을 *si-2* 돌연변이와 WT 오이를 대상으로 실시하였다. *CsGy5G028960* 와 *CsGy4G024030*의 서열은 *si-2* 돌연변이체와 WT 오이 간에 동일하였다. 그러나 GA3ox(gibberellin 3-beta-dioxygenase 1-like)를 암호화하는 *CsGy7G019320*은 *si-2* 돌연변이에서 WT 오이의 인트론과 비교하여 단일염기 다형성(SNP; A → G, 590번째 뉴클레오티드)을 보였다(도 3A, 도 4A). 이러한 SNP가 다른 박과 식물에서도 동일하게 잘 보존되었는지 여부를 확인하기 위해 SNP를 포함하는 영역의 서열을 증폭하고 염기서열 분석을 실시하였다. 이 분석에는 *Citrullus lanatus*(수박(97103) v1), *Cucumis melo*(멜론(DHL92) v3.6.1) 및 *Cucurbita maxima*(호박(Rimu))가 사용되었다. 이 결과는 WT 식물이 WT 특이적인 서열(유전형)을 보였다는 것을 확인했다 (도 3B).

[0119] 동일한 방식으로, *si-2* 돌연변이와 WT 오이의 *CsGy7G019320*의 프로모터 서열도 비교하였다. *si-2* 돌연변이와 WT 오이 사이의 1.2kb 서열을 비교한 결과 *si-2* 돌연변이에서 20bp 결실(578th-ATATATATATATATATAT-559th)이 나타났다(도 5A, 도 4B). 이러한 결실을 다시 한번 더 확인하기 위해 20bp 결실을 포함하는 영역에서 프라이머 세트(2F+1R)를 설계하고 PCR 증폭을 실시했다. 분석에 사용된 WT 오이 라인에서는 20bp 삭제를 발견할 수 없었다(도

5B). 이와 더불어서 WT과 *si-2* 간의 교배를 통해 만들어진 F1을 자가수정(selfing)해서 만들어진 F2 개체 중에서, WT 표현형을 나타내는 15 개체와 *si-2* 돌연변이 표현형을 나타내는 15 개체를 포함하는 총 30개의 F₂ 개체를 사용하여 20bp 결실과 절간 길이 간의 상관관계를 테스트했다. 이 테스트 결과는 20bp 결실이 *si-2* 돌연변이와 밀접하게 연관되어 있음을 강력(표현형과 유전형이 100% 일치)하게 지지한다(도 6). 또한 다른 박과작물(*Cucurbitaceae*)의 다양한 WT 종(수박, 멜론, 호박)의 *CsGy7G019320* 프로모터 서열에서의 20bp 결실 유무를 확인한 결과, 분석된 WT 식물 중 어느 것도 20bp 결실을 나타내지 않았다(도 7).

[0120] 또한 PlantPAN 3.0을 사용하여 프로모터 서열, 특히 20bp 결실 영역을 대상으로 인실리코(*in silico*) 분석을 수행했다. 분석 결과, AP2/ERF 결합 요소, TBP(TATA-box 결합 단백질) 결합 요소 및 AT-hook 결합 요소의 3가지 cis-조절 요소가 20bp 결실 서열에 해당하는 것으로 나타났다. AP2/ERF, TBP 및 AT-hook 결합 요소의 보존된 서열은 각각 ATCTA, N₈ATATATATN₅, A (T/A) (A/T) (A/T) (A/T) (T/A) (A/ T) T 였다 (도 8). 하지만 AT 혹은 TA 반복 서열로 이루어진 20bp 결실 영역은 기존에 잘 알려진 TATA 상자 (TATA-box) 가 존재하는 위치로부터 멀리 떨어져 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, AP2/ERF 결합 부위는 짧은 스트레치 서열(ATCTA)로 구성되어 있으며, 프로모터 서열 전반에 걸쳐 많은 AP2/ERF 결합 요소가 확인되었다. 이를 고려하면 AT-hook 결합 요소는 그럴듯한 cis-조절 요소로 판단되므로 AT-hook 단백질은 *CsGy7G019320*의 발현을 제어하여 오이의 절간 길이를 제어할 수 있을 것으로 추정된다.

[0122] (4) 다양한 오이 유전자원에서의 *CsGy7G019320* 유전자 영역과 프로모터 서열에서의 자연적 다양성 분석

[0123] 이어서 115개의 오이 핵심 유전자원의 유전체(게놈) 서열로부터 *CsGy7G019320*의 프로모터에서 20bp 결실 및 인트론에서의 SNP의 발견 빈도를 분석하였다. 인트론에 있는 SNP의 경우 *si-2*와 WT 특이적 서열이 각각 18개(15.65%)와 97개(84.35%)에서 나타났다. 20bp 결실의 경우, 11개(9.56%) 및 104개(90.44%) 계통이 각각 *si-2* 및 WT 특이적인 서열을 나타냈다. 인트론에 SNP가 있는 18개의 유전자원(SI 돌연변이형 서열) 중 7개와 11개의 유전자원이 각각 20bp 결실(SI 돌연변이형 서열)과 WT 서열을 보였다. 프로모터 서열(SI 돌연변이형 서열)이 20bp 결실된 11개의 유전자원 중 7개 및 4개의 유전자원이 A(WT형 서열) 및 G(*si-2* 돌연변이형 서열)를 나타내었다. 115개의 핵심 오이 유전자원에서 7개의 유전자원만이 인트론의 SNP와 프로모터 서열의 20bp 결실을 기반으로 *si-2* 돌연변이가 유형으로 유전자형이 결정되었다(표 4). 이 유전자원의 기원을 조사했을 때, 프로모터 서열에서 20bp 결실을 가진 3개 및 8개의 유전자원은 각각 인도와 동아시아에서 유래했다(표 4). 이 결과는 SI 돌연변이가 인도와 동아시아에서 발생했음을 강력하게 시사한다.

표 4

[0124]

Accession ID	PI CGN#	프로모터 20 bp	인트론의 SNP	유전자원 유래
SRR543216	V05A0674	결실	G	동아시아
SRR543218	V05A0334	결실	G	동아시아
SRR543222	V05A0650	결실	G	동아시아
SRR543226	V05A0428	결실	G	동아시아
SRR543231	V05A0552	결실	G	동아시아
SRR543245	-	결실	G	동아시아
SRR543267	V05A0726	결실	G	동아시아
SRR543208	-	결실	A	인도
SRR543210	-	결실	A	인도
SRR543214	CUS 155	결실	A	인도
SRR543225	V05A0985	결실	A	동아시아

[0126] 실시예 2. 오이의 왜성 형질과 GA(gibberelin)의 관련성 확인

[0127] 왜성 오이의 왜성 형질이 GA 호르몬과 연관이 있다는 것을 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 하였다.

[0129] 실험방법

[0130] 왜성 오이를 발아시켜, 발아 2주 후 토양에 이식하였다. 이후 줄기(절간) 신장을 유도한다고 알려진 3개의 호르몬(GA3, BAP(benzylaminopurine; 사이토키닌 계열), IAA(indoleacetic acid; 옥신 계열))을 3가지 다른 농도로 한 주에 2회씩, 총 5주 동안 처리한 후 왜성 오이의 길이를 측정하였다. 각 처리군 별로 4개의 식물체를 사용하였고, 이들의 평균 길이를 측정하여 통계 처리하였다.

[0132] 실험결과

[0133] 실험결과는 표 5 및 도 9에 나타내었다.

표 5

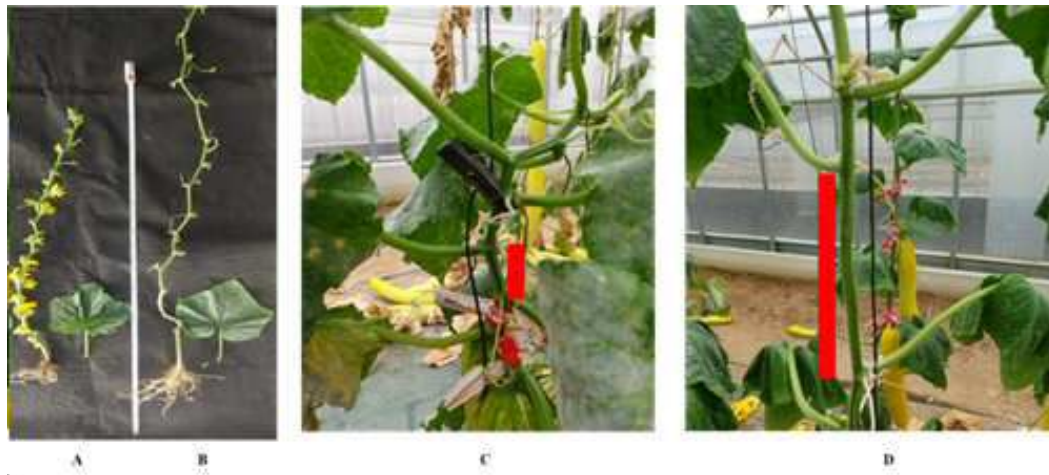
[0134]

호르몬 종류	농도	식물의 길이 (cm)					
		개체 1	개체 2	개체 3	개체 4	Avg	SD
852 (무처리)	-	54	54	47	58	53.25	4.573474
GA3	5 μ M/L	65	56	58	43	55.5	9.183318
	50 μ M/L	64	61	67	60	63	3.163378
	250 μ M/L	75	70	69	81	73.75	5.5
BAP	5 μ M/L	59	60	54	57	57.5	2.645751
	50 μ M/L	57	51	44	55	51.75	5.737305
	250 μ M/L	60	54	57	56	56.75	2.5
IAA	0.1 mg/L	55	54	58	61	57	3.162278
	0.4 mg/L	52	63	57	53	56.25	4.99166
	0.8 mg/L	61	62	55	58	59	3.162278

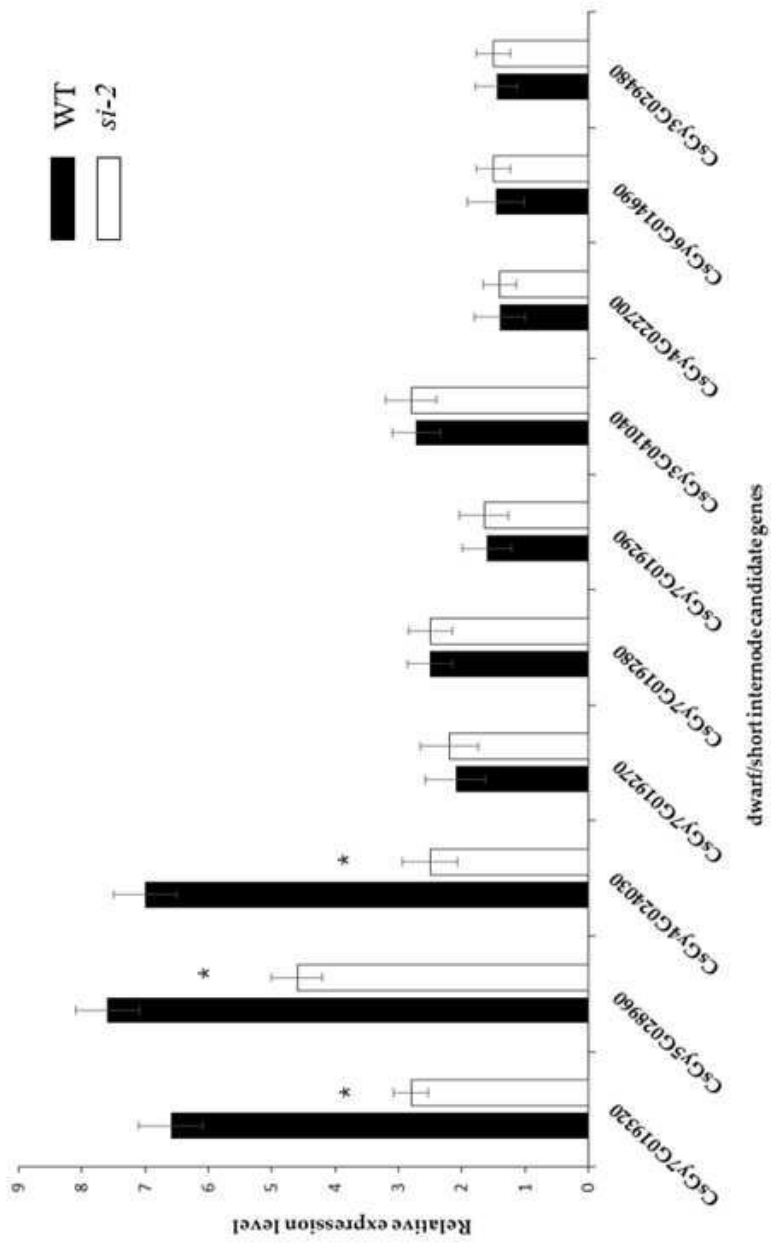
[0136] 무처리군과 호르몬 처리군 간의 식물 길이 차이를 확인하기 위해 t-테스트를 실시하였다. 그 결과 BAP와 IAA를 처리한 처리구와 무처리구 사이에는 차이가 나타나지 않았다(표 5, 도 9). 이는 BAP와 IAA 처리에 의해서 왜성 오이의 줄기 신장이 유도되지 않았다는 것을 의미한다. 따라서, 왜성 돌연변이체 오이가 옥신이나 사이토키닌 계열의 호르몬 결핍에 의해 발생한 것이 아니라는 점을 시사한다. 하지만 무처리구에 비해 GA3 50 μ M/L 처리구 ($p = 0.012717$)와 GA3 250 μ M/L 처리구 ($p = 0.001224$)는 유의한 차이를 보였다. 즉 GA3 처리가 왜성 돌연변이 오이의 줄기(절간) 신장을 촉진해서 무처리구에 비해 키가 커졌(줄기 혹은 절간이 신장하였)음을 나타낸다(표 5, 도 9). 뿐만 아니라, GA3 처리 농도에 비례하여 키(줄기/절간)가 커짐을 보여준다(도 9). 이러한 결과는 *si-2* 왜성 돌연변이체가 GA 결핍에 의해서 발생할 수 있다는 사실을 강력히 시사한다. 따라서, 이러한 결과는 GA3ox의 코딩에 관여하는 *CsGy7G019320* 유전자가 오이의 왜성 형질 조절에 관여한다는 실시예 1의 결과를 더 확실히 할 수 있다.

도면

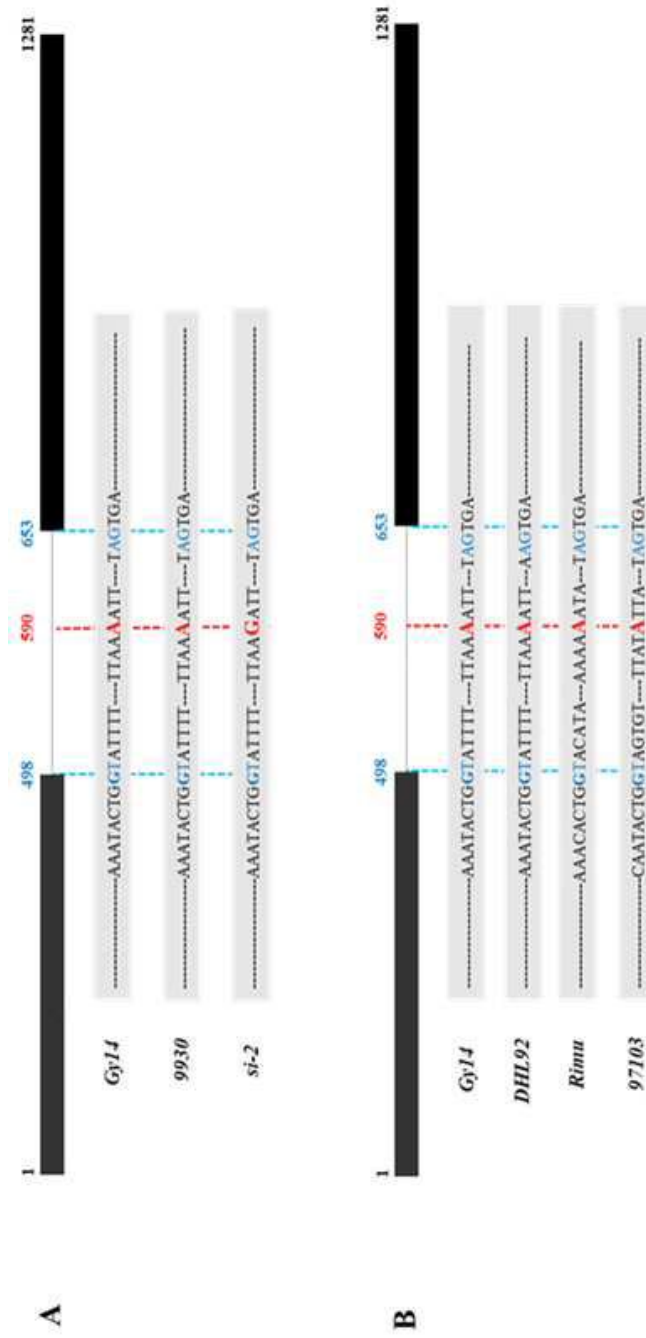
도면1



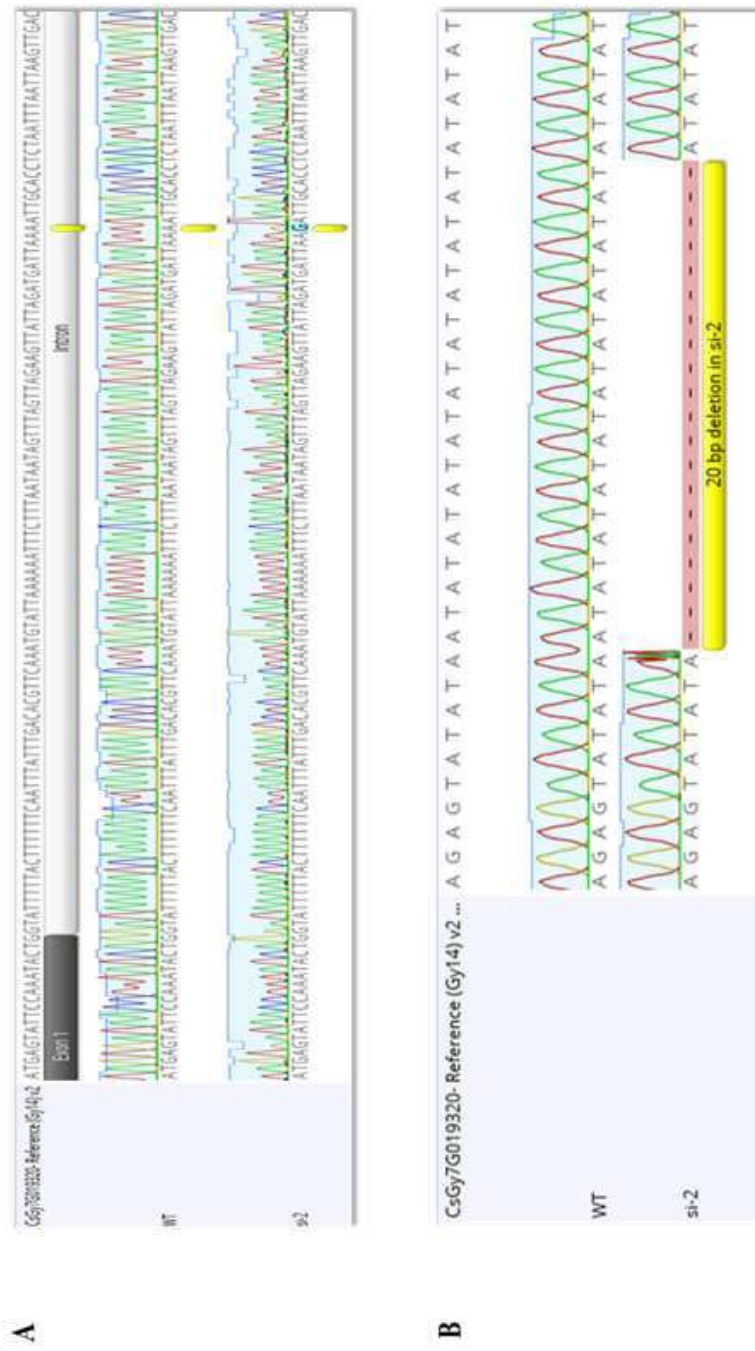
도면2



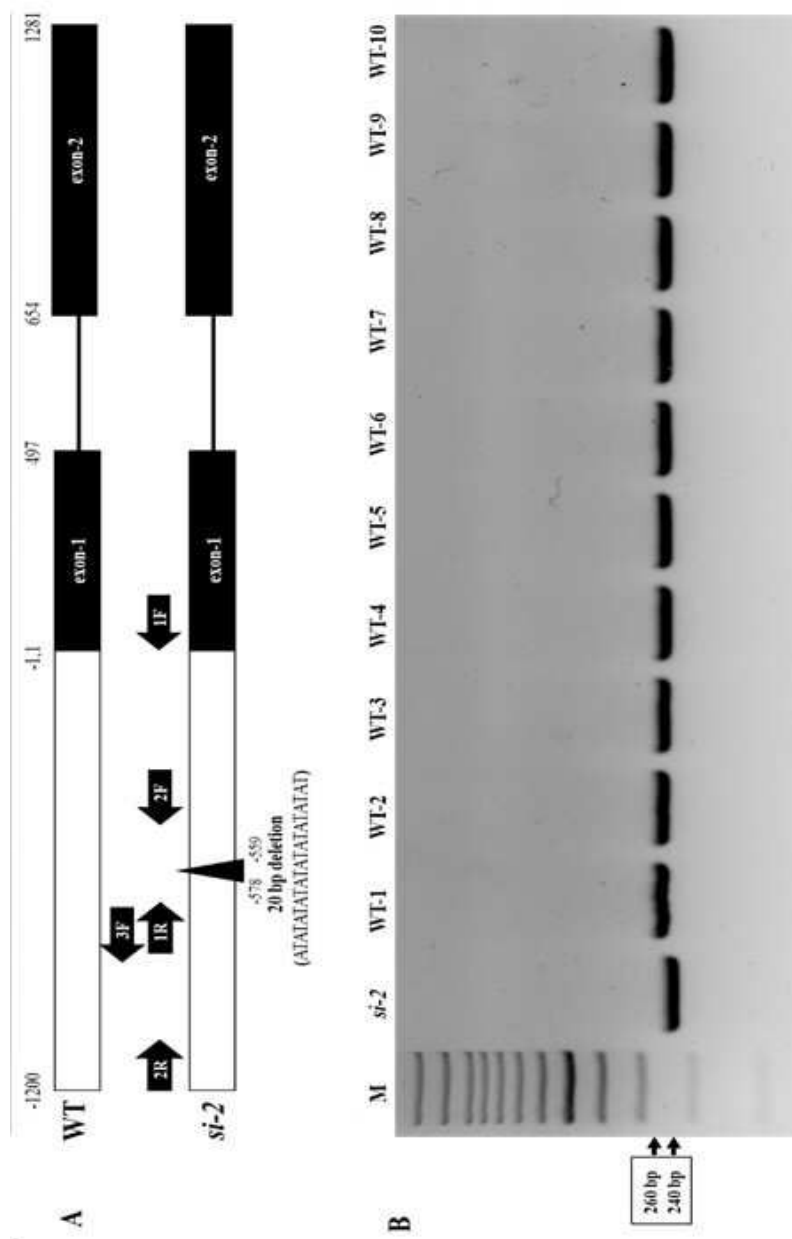
도면3



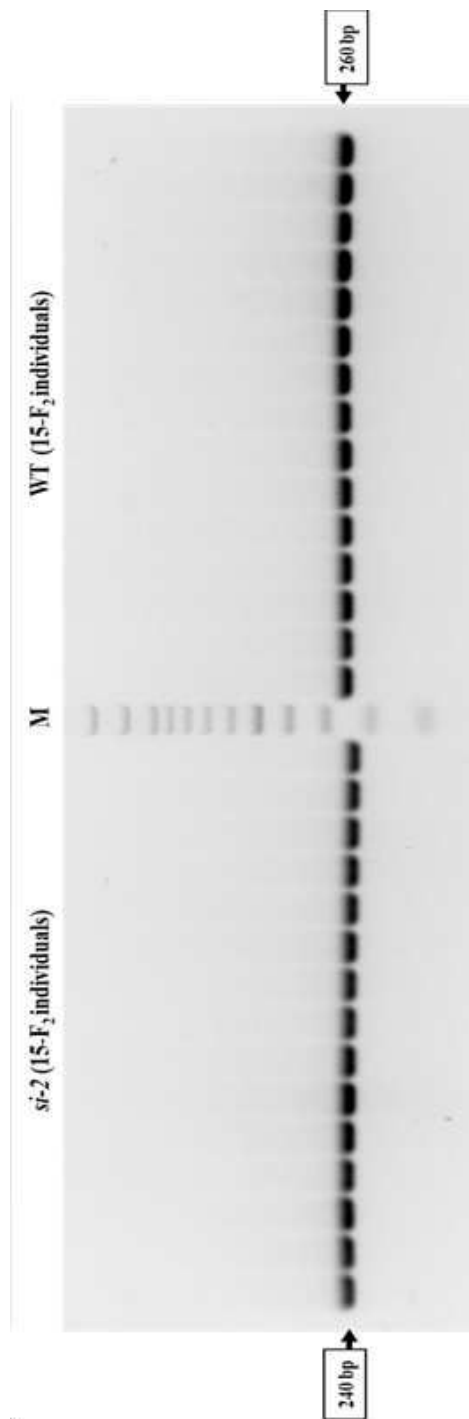
도면4



도면5



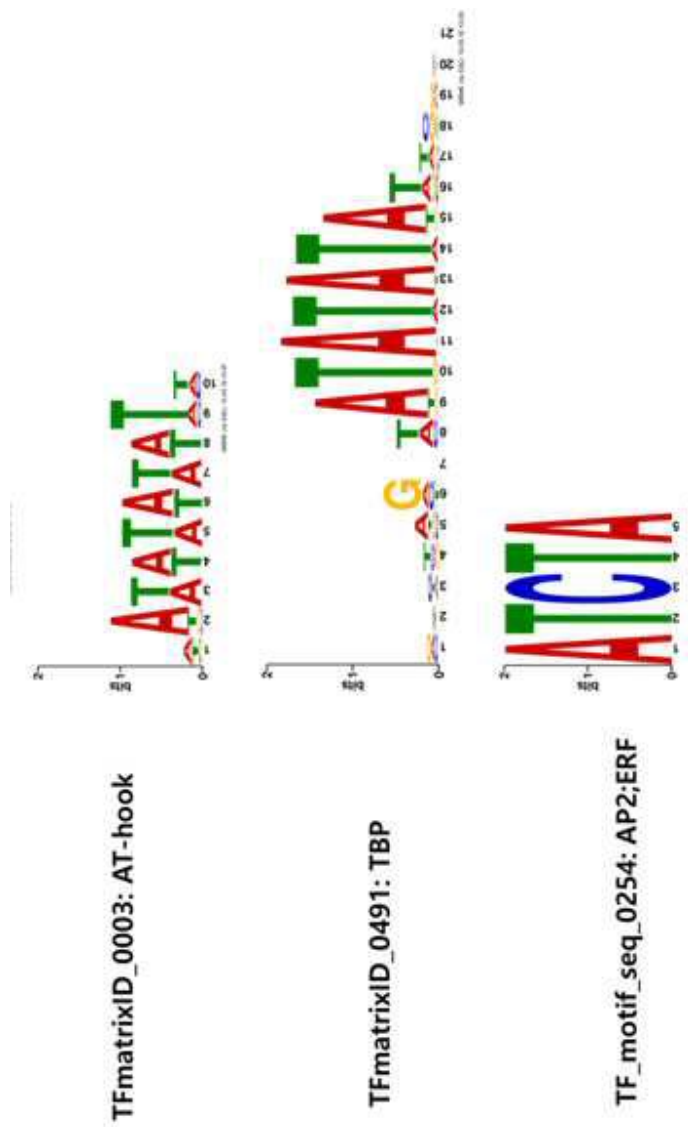
도면6



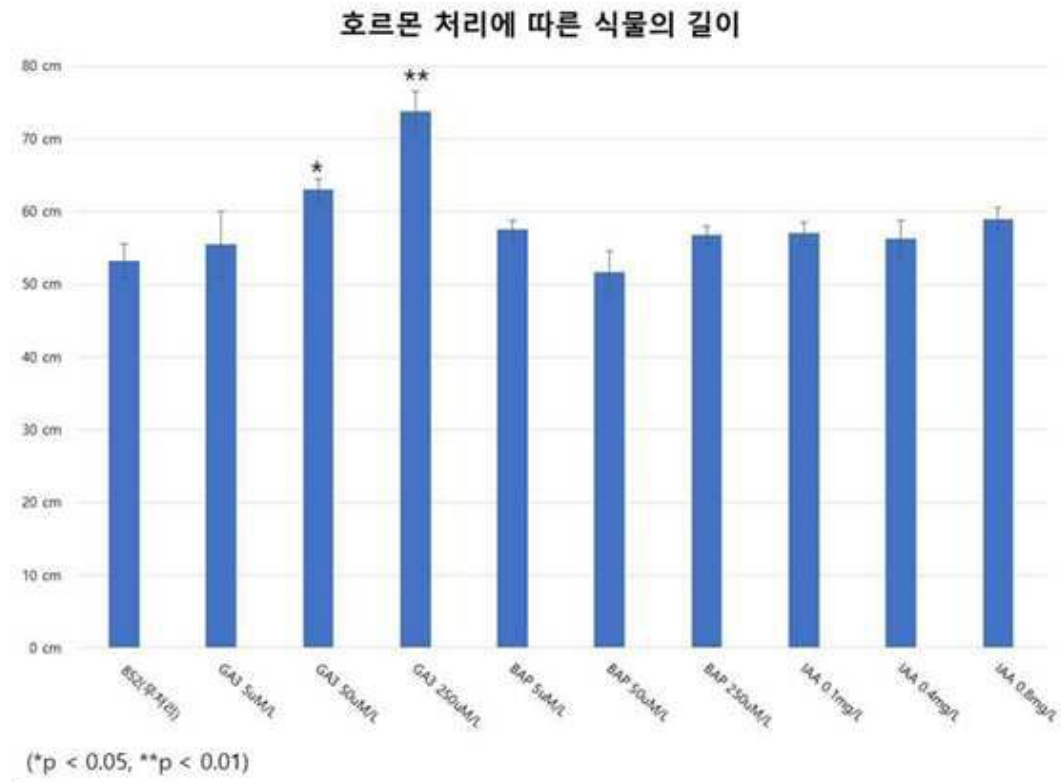
도면7

<i>si-2</i>	-----AGAGTATATA-----ATATATATAT-----
<i>Gy14</i>	-----AGAGTATATAATATATATATATATATATATATATATATAT-----
<i>DHL92</i>	-----AGAGTATATAATATATATATATATATATATATATATATATA-----
<i>Rimu</i>	-----GGACAAGACAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGCACATG-----
<i>97103</i>	-----TTTTTTTTTAATATATATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATT-----

도면8



도면9



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.