(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0012638
(43) 공개일자 2024년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)
A01H 6/00 (2018.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8216 (2013.01)
A01H 5/10 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2022-0089445
(22) 출원일자 2022년07월20일
심사청구일자 2022년07월20일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
대한민국(산림청 국립산림과학원장)
서울특별시 동대문구 회기로 57 (청량리동)
(72) 발명자
고재홍
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 254호 (경희대학교 국제캠퍼스 생명과학대학)
김민하
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 206호 (경희대학교 국제캠퍼스 생명과학대학)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

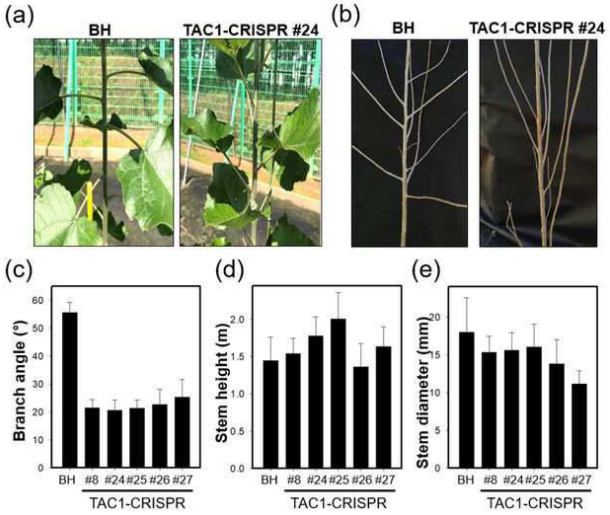
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **산림 수종의 직립생장 유도용 유전자 교정 가이드 RNA 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 산림 수종의 직립생장 유도용 현사시나무 유래 TAC1 유전자 교정 가이드 RNA 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 가이드 RNA는 은백양 및 수원사시나무의 교잡종인 현사시나무의 TAC1 유전자를 표적으로 4개의 상동유전자에 대해 동시 교정이 가능하여 현사시나무의 직립생장을 유도할 수 있다. 직립형으로 자라는 현사시나무는 성장시 개별 생육공간이 현저히 줄어들기 때문에 단위 면적당 더 많은 수의 개체 식재가 가능해 토지 면적당 수확량 증가로 이어질 수 있다. 또한 직립형 생장 형태로 조경 및 방풍림 조성에도 커다란 활용이 가능하다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A01H 6/00 (2022.05)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/8202 (2013.01)
C12N 15/8241 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자
최나영
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 206호 (경희대학교 국제캠퍼스 생명과학대학)
장현아
경기도 수원시 권선구 서수원로 99, 213동 1103호 (수원권선꿈에그린아파트)
이효신
경기도 수원시 영통구 인계로 165, 523동 208호 (주공5단지아파트)
배은경
경기도 수원시 팔달구 화양로50번길 30, 102동 1201호 (블루밍 푸른숲 아파트)
최영임
경기도 수원시 영통구 청명로 132, 324동 601호 (벽산삼익아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711167099
과제번호 2018R1A2B2005362
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 목본식물 목부형성 조절인자 연구
기 여 율 35/100
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2022.06.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1405004954
과제번호 2014071G10-2022-AA04
부처명 산림청
과제관리(전문)기관명 한국임업진흥원
연구사업명 임업기술연구개발(R&D)
연구과제명 진화-발달학적 유전체 연구를 통한 유용 목부형성 유전자원 개발 연구
기 여 율 35/100
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2022.06.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1405005174
과제번호 FG0702-2018-01-2022
부처명 산림청
과제관리(전문)기관명 국립산림과학원
연구사업명 산림과학연구(R&D)
연구과제명 유전자 가위를 이용한 임목 유전체 교정 기술 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 국립산림과학원
연구기간 2018.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1; 및

서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2; 를 포함하는, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 *PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자를 동시에 교정하는 것인, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 *PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자는 현사시나무 유래 유전자인 것인, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 조성물.

청구항 4

서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1; 및

서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2; 를 포함하는, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, Cas9 절단효소를 암호화하는 염기서열을 더 포함하는 것인, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 벡터.

청구항 6

서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1; 및

서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2; 를 포함하는, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 키트

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 키트는 *PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자를 동시에 교정하는 것인, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 *PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자는 현사시나무 유래 유전자인 것인,

식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 키트.

청구항 9

제1항의 조성물 또는 제4항의 벡터를 형질도입하여 직립생장이 유도된, 형질전환 식물체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 식물체는 은백양(*Populus alba*), 수원사시나무(*Populus glandulosa*) 또는 현사시나무(*Populus alba* × *Populus glandulosa*)인 것인, 형질전환 식물체.

청구항 11

제9항에 따른 형질전환 식물체의 종자.

청구항 12

서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1; 및

서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2;

를 식물체에 형질도입하는 단계; 를 포함하는, 직립생장이 유도된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 식물체는 은백양(*Populus alba*), 수원사시나무(*Populus glandulosa*) 또는 현사시나무(*Populus alba* × *Populus glandulosa*)인 것인, 직립생장이 유도된 형질전환 식물체의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 산림 수종의 직립생장 유도용 현사시나무 유래 PagTAC1 유전자 교정 가이드 RNA 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 식물의 가지는 중력의 반대 방향으로 하늘을 향해 위치함으로써 잎이 태양에너지를 효율적으로 흡수하여 광합성능을 증가시켜 생장을 최적화하는데 식물 종에 따라 중심 줄기 대비 가지의 각도는 매우 다양하며 유전적 및 환경적 요인(중력, 빛, 물, 물리적 자극 등)의 영향을 받고 있다.

[0003] 복숭아나무(peach)에서 가지의 수직생장을 보이는 돌연변이(*pillar*)가 발견되었고 이 돌연변이는 벼에서 발견된 *TILLER ANGLE CONTROL1* (*TAC1*) 유전자의 상동 유전자가 손상(loss-of-function)되었음이 보고되었다(Dardick et al., 2013). 또한 자두나무(plum)의 상동 유전자인 *PpTAC1*을 자두나무에 과발현 형질전환시킨 결과 더 넓은 수평형 가지 각도를 나타내었다(Hollender et al., 2018). 즉, TAC1은 중력방향으로 가지 각도를 넓히는 기능을 하는 것으로 여겨지고 있다.

[0004] 한편, CRISPR/Cas9 유전자 가위 시스템은 특정 염기서열에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA (guide RNA, gRNA)와 Cas9 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 이용하여 전체 유전체에서 원하는 염기서열을 정확하게 편집(절

단)할 수 있다. 절단된 이중가닥 DNA는 복구되는 과정에서 indel 돌연변이가 발생하게 되어 해당 유전자의 기능이 손상될 수 있다. 이를 SDN (Site Directed Nuclease)-1 유전자 가위 기술이라고 하며 이 경우, 자연발생 천연 돌연변이와 사실상 동일하기 때문에 선진 각국(미국, 캐나다, 호주, 일본 등)에서는 GMO 식물의 위해성 평가를 면제해주고 있다.

[0005] 이러한 유전자 가위 시스템은 수명이 긴 산림 수종에 적용되기에 적합한 기술로 널리 활용되기 시작하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1; 및 서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2; 를 포함하는, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 조성물, 유전체 교정용 벡터 및 유전체 교정용 키트를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물 또는 벡터를 형질도입하여 직립생장이 유도된 형질전환 식물체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1; 및 서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2; 를 포함하는, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 조성물은 *PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자를 동시에 교정하는 것일 수 있다.

[0010] 상기 *PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자는 현사시나무 유래 유전자일 수 있다.

[0011] 또한 본 발명은 서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1; 및 서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2; 를 포함하는, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 벡터를 제공한다.

[0012] 상기 벡터는 Cas9 절단효소를 암호화하는 염기서열을 더 포함할 수 있다.

[0013] 또한 본 발명은 서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1; 및 서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2; 를 포함하는, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 키트를 제공한다.

[0014] 상기 키트는 *PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자를 동시에 교정하는 것일 수 있다.

[0015] 상기 *PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자는 현사시나무 유래 유전자일 수 있다.

[0016] 또한 본 발명은 상기 조성물 또는 상기 벡터를 형질도입하여 직립생장이 유도된, 형질전환 식물체를 제공한다.

[0017] 상기 식물체는 은백양(*Populus alba*), 수원사시나무(*Populus glandulosa*) 또는 현사시나무(*Populus alba* × *Populus glandulosa*)일 수 있다.

[0018] 또한 본 발명은 상기 형질전환 식물체의 유전체가 교정된 종자를 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은 서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1 및 서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2를 식물체에 형질도입하는 단계; 를 포함하는, 직립생장이 유도된 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0020] 상기 식물체는 은백양(*Populus alba*), 수원사시나무(*Populus glandulosa*) 또는 현사시나무(*Populus alba* × *Populus glandulosa*)일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 가이드 RNA는 은백양(*Populus alba*) 및 수원사시나무(*Populus glandulosa*)의 교잡종인 현사시나무의 TAC1 유전자를 표적으로 4개의 상동유전자에 대해 동시 교정이 가능하여 현사시나무의 직립생장을 유도할 수 있다. 직립형으로 자라는 현사시나무는 성장시 개별 생육 공간이 현저히 줄어들기 때문에 단위 면적당 더

많은 수의 개체 식재가 가능해 토지 면적당 수확량 증가로 이어질 수 있다. 또한 직립형 생장 형태로 조경 및 방풍림 조성에도 커다란 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a는 은백양(*Populus alba*)에서 유래한 *PaTAC1-1* 유전자의 gDNA 염기서열(서열번호 5) 및 gDNA 엑손으로 구성된 Coding sequence (CDS; 서열번호 6)를 나타낸 도이다.

도 1b는 *PaTAC1-1*의 아미노산 서열(서열번호 7)을 나타낸 도이다.

도 2a는 수원사시나무(*Populus glandulosa*)에서 유래한 *PgTAC1-1* 유전자의 gDNA 염기서열(서열번호 8) 및 gDNA 엑손으로 구성된 Coding sequence (CDS; 서열번호 9)을 나타낸 도이다.

도 2b는 *PgTAC1-1*의 아미노산 서열(서열번호 10)을 나타낸 도이다.

도 3a는 은백양(*Populus alba*)에서 유래한 *PaTAC1-2* 유전자의 gDNA 염기서열(서열번호 11) 및 gDNA 엑손으로 구성된 Coding sequence (CDS; 서열번호 12)을 나타낸 도이다.

도 3b는 *PaTAC1-2*의 아미노산 서열(서열번호 13)을 나타낸 도이다.

도 4a는 수원사시나무(*Populus glandulosa*)에서 유래한 *PgTAC1-2* 유전자의 gDNA 염기서열(서열번호 14) 및 gDNA 엑손으로 구성된 Coding sequence (CDS; 서열번호 15)을 나타낸 도이다.

도 4b는 *PgTAC1-2*의 아미노산 서열(서열번호 16)을 나타낸 도이다.

도 5는 현사시나무(*P. alba x P. glandulosa*) 유전자 교정용 CRISPR-Cas9 벡터 모식도를 나타낸 도이다.

도 6은 현사시나무 유전체의 교정 전, 후 *TAC1* 유전자들의 구조를 비교한 결과를 나타낸 도이다(sg1은 빨간색, sg2는 노란색으로 표시). (a) 유전체 교정 전 현사시나무의 정상/야생형(normal) *TAC1* 유전자들(*PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자)의 구조, (b) 대조구(Control; Bonghwa(BH)) 및 교정 유전체(TAC1-CRISPR)의 *TAC1* 유전자들 구조 비교.

도 7은 유전체 교정 전의 *TAC1* 단백질 변이 예상 구조(Control; BH) 및 교정 유전체(TAC1-CRISPR)의 *TAC1* 단백질 변이 예상 구조를 나타낸 도이다.

도 8은 유전체 교정된 현사시나무의 직립형 엽병 표현형을 나타낸 도이다. (a) 시험관에서 배양된 대조구(BH) 및 교정 유전체(TAC1-CRISPR), (b) 화분에 순화 후의 대조구(BH) 및 교정 유전체(TAC1-CRISPR), (c) 엽병의 각도 정량분석, (d) 묘고(토양 바닥에서 개체의 높이) 정량분석, (e) 근원경(토양 바닥에서 1cm위의 직경) 정량분석.

도 9는 유전체 교정된 현사시나무의 직립형 가지 생장 표현형을 나타낸 도이다. (a) 유전자변형(LMO) 격리포장에 식재 후 5개월째 대조구(BH) 및 교정 유전체(TAC1-CRISPR), (b) 유전자변형(LMO) 격리포장에 식재 후 8개월째 대조구(BH) 및 교정 유전체(TAC1-CRISPR), (c) 엽병의 각도 정량분석, (d) 묘고(토양 바닥에서 개체의 높이) 정량분석, (e) 근원경(토양 바닥에서 5cm위의 직경) 정량분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0025] 본 발명은 일관점에서, 서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1; 및 서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2; 를 포함하는, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 조성물에 관한 것이다.

[0026] 본 발명의 “유전자 교정(genome/gene editing)”은 인간 세포를 비롯한 동·식물 세포의 유전체 염기서열에 타겟지향형 변이를 도입할 수 있는 기술로서, DNA 절단에 의한 하나 이상의 핵산 분자의 결실, 삽입, 치환 등에 의하여 특정 유전자를 녹-아웃(knock-out) 또는 녹-인(knock-in)하거나, 단백질을 생성하지 않는 비-코딩 DNA 서열에도 변이를 도입할 수 있는 기술을 말한다. 본 발명의 목적상 상기 유전자 교정은 특히 Cas 단백질 및 가

이드 RNA를 이용하여 식물체에 변이를 도입하는 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 “가이드 RNA (guide RNA, gRNA)”란 인간이나 동식물의 특정 유전자를 암호화하는 DNA를 인식하여 찾아내는 특이적인 RNA를 말하며, 타겟 DNA 서열번호 전부 또는 일부와 상보적으로 결합하여 해당 타겟 DNA 서열로 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 이끄는 역할을 하는 리보핵산(ribonucleic acid)을 의미한다. 상기 가이드 RNA는 두 개의 RNA, 즉, crRNA (CRISPR RNA) 및 tracrRNA (trans-activating crRNA)를 구성 요소로 포함하는 이중 RNA (dual RNA); 또는 타겟 DNA 내 서열과 전부 또는 일부 상보적인 서열을 포함하는 제1 부위 및 RNA-가이드 뉴클레아제와 상호작용하는 서열을 포함하는 제2 부위를 포함하는 단일 사슬 가이드 RNA (sgRNA) 형태를 말하나, RNA-가이드 뉴클레아제가 타겟 서열에서 활성을 가질 수 있는 형태라면 제한 없이 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 가이드 RNA는 바람직하게는, 단일 가닥 가이드 RNA (single guide RNA) 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 사용된 엔도뉴클레아제의 종류 또는 그 유래 미생물 등에 따라서 적절히 선택할 수 있다.

[0028] 또한, 상기 가이드 RNA는 플라스미드 주형으로부터 전사된 것 또는 생체 외(in vitro)에서 전사된(transcribed) 것(예컨대, 올리고뉴클레오티드 이중가닥)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 상기 엔도뉴클레아제 단백질은 Cas9 (CRISPR associated protein 9), Cpf1 (CRISPR from Prevotella and Francisella 1), TALEN (Transcription activator-like effector nuclease), ZFN (Zinc Finger Nuclease) 또는 이의 기능적 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 Cas9 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명에서 “식물체”는 성숙한 식물체뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미일 수 있다. 식물체의 잎은 크게 엽신, 엽병, 탁엽으로 나뉘는데 엽병은 엽신을 줄기와 연결해주는 부위이며 줄기로부터 벌어진 엽병의 각도를 측정하여 수평 성장 또는 직립 성장의 형태를 관찰할 수 있다.

[0031] 본 발명에서는 상기 유전자 교정을 통해 산림 수종의 직립생장 유도에 대한 연구를 거듭한 결과, 식물의 가지 각도에 관여하는 유전자를 탐색하고, 현사시나무에서 총 4개의 *TAC1* 상동 유전자(*PaTAC1-1, PaTAC1-2, PgTAC1-1, PgTAC1-2*)를 발견하였다. 구체적으로 은백양(*Populus alba*)에서 유래한 *PaTAC1-1* 및 *PaTAC1-2*, 수원사시나무(*Populus glandulosa*)에서 유래한 *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2*이다.

[0032] 상기 "*TAC1* (*TILLER ANGLE CONTROL 1*)” 유전자는 식물에서 측면 싹 방향을 조절하는 유전자 패밀리의 구성원으로 빛에 반응하여 바깥쪽 방향을 촉진하는데, 중력방향으로 가지 각도를 넓히는 기능을 하는 것으로 여겨지고 있다. 상기 TAC1 유전자가 녹-아웃되면 엽병의 직립형 표현형(albinism)을 유도하는 것으로 추정하고, 유전자가위 시스템을 이용하여 직립(수직) 생장형 현사시나무를 개발하기 위해 상기 4개 유전자 모두를 동시에 편집할 수 있는 2 개의 싱글 가이드 RNA (single guide RNA; sg1 및 sg2)를 개발하였다.

[0033] 상기 조성물은 *PaTAC1-1, PaTAC1-2, PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자를 동시에 교정하는 것일 수 있고, 상기 *PaTAC1-1, PaTAC1-2, PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자는 현사시나무 유래 유전자일 수 있다.

[0034] 상기 “현사시나무(*Populus alba* × *Populus glandulosa*)”는 버드나무과(*Salicaceae*) 사시나무속(*Populus*) 낙엽 교목으로, 1950년 은백양(*Populus alba*)과 수원사시나무(*Populus glandulosa*)의 자연교잡종을 발견한 이래 임목육종연구소에서 산지용 포플러로 인공교잡하여 개발한 신품종이다.

[0035] 상기 가이드 RNA는 상기 현사시나무 유래 *PaTAC1-1, PaTAC1-2, PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자(이하, *PagTAC1* 유전자)의 3번 엑손에서 프로토스페이서 인접 모티프(protospacer-adjacent motif; PAM)를 포함한 23bp 크기의 표적 부위에 상보적인 23~25개의 연속 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드이다. 상기 PAM은 구아닌(guanine; G)이 많은 영역으로서, 유전자 편집이 일어나는 표적 서열을 타깃하는 역할을 한다. 즉 가이드 RNA는 PAM과 인접한 절단된 표적 서열(프로토스페이서)을 찾아 결합한다. 상기 PAM은 5'-AGG-3', 5'-GGG-3', 5'-CGG-3' 및 5'-TGG-3'로 이루어진 군으로부터 선택된 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, *PagTAC1* 유전자 서열의 동일 위치에 존재하며 Out-of-frame score가 66 이상이고 전체 염기서열에서 TAC1 외 다른 유전자에 비특이적 결합(mismatch)이 되지 않는 표적 서열을 선발하고 싱글 가이드 RNA, sg1 및 sg2를 최종 설계하였다.

[0037] 상기 sg1은 *PagTAC1* 유전자의 Coding sequence (CDS)에 존재하며 서열번호 1로 표시되는 표적 부위와 이의 상보적인 23~25개의 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있고 바람직하게는 5'- GCCCTGGTGGATGTGCTTGATGG -3'이

다.

[0038] 상기 sg2는 *PagTAC1* 유전자의 Coding sequence (CDS)에 존재하며 서열번호 3으로 표시되는 표적 부위와 이의 상보적인 23~25개의 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있고 바람직하게는 5'- GAAAGGAGAAAGAATAACACTGG -3'이다.

[0039] 상기 *PagTAC1* 유전자의 Coding sequence (CDS)는 서열번호 6으로 표시되는 *PaTAC1-1*의 CDS, 서열번호 9로 표시되는 *PaTAC1-2*의 CDS, 서열번호 12로 표시되는 *PgTAC1-1*의 CDS 또는 서열번호 15로 표시되는 *PgTAC1-2*의 CDS일 수 있다.

[0040] 상기 가이드 RNA는 표적 부위의 염기서열에 특이적인 RNA로서, Cas9 효소와 결합하여 Cas9 효소를 표적 부위로 인도할 수 있는 폴리뉴클레오티드이다.

[0041] 상기 폴리뉴클레오티드는 RNA, DNA, 또는 이들의 조합을 더 포함하는 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 유전자 가위(programmable nuclease)의 구성요소일 수 있다. 유전자 가위는 유전체상의 특정 위치를 인식하여 절단할 수 있는 형태의 뉴클레아제를 말한다. 본 발명에서는 바람직하게는 CRISPR/Cas9이다. 상기 폴리뉴클레오티드는 CRISPR/Cas9를 구성하는 가이드 RNA일 수 있다.

[0042] 본 발명에서 사용된 "CRISPR/Cas9"은 미생물의 면역체계로 알려진 CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템을 이용해 원하는 유전자 염기서열을 절단하도록 고안된 것으로서, 특정 유전자의 특정위치에 이중나선 절단을 도입하여 DNA 수선 과정에서 유도되는 불완전 수선에 의한 삽입-결실(insertion-deletion, InDel) 돌연변이를 유도시키는 NHEJ (non-homologous end joining) 기작에 의한 유전자 교정 방법이다. 고정적 구성요소로서 Cas9 단백질을 포함하고, 가변적 구성요소로서 타겟 유전자에 특이적인 가이드 RNA를 포함한다.

[0043] 본 발명의 "타겟 유전자"는 교정하고자 하는 식물체의 유전체 내에 있는 일부 DNA를 의미한다. 즉, 원칙적으로 그 유전자의 종류에 제한되지 않으며, 코딩 영역 및 비-코딩(non-coding) 영역을 모두 포함할 수 있다. 당업자는 그 목적에 따라, 제조하고자 하는 유전자가 교정된 식물체에 대하여 원하는 변이에 따라 상기 타겟 유전자를 선별할 수 있다. 본 발명에서 상기 타겟 유전자는 서열번호 5로 표시되는 *PaTAC1-1* 유전자, 서열번호 8로 표시되는 *PaTAC1-2* 유전자, 서열번호 11로 표시되는 *PgTAC1-1* 유전자 또는 서열번호 14로 표시되는 *PgTAC1-2* 유전자일 수 있다.

[0044] 본 발명에서 상기 가이드 RNA는 Cas9 절단효소에 의해 PAM 근처에서 상기 타겟 유전자의 표적 서열에 이중 가닥 절단을 유도한다. 상기 이중 가닥 절단은 비상동성 말단 접합에 의해 복구되는데, 이러한 과정은 *PagTAC1* 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열에 삽입/결손 부위를 형성하여 구조-이동 변이를 유발할 수 있다. 변이가 유발된 *PagTAC1* 유전자는 그의 발현이 억제되어 녹-아웃된다.

[0045] 본 발명에서, *PagTAC1* 유전자의 변이는 한 쌍의 대립유전자(allele)에서 모두가 변이를 갖는 것이다. 상기 변이는 예를 들면, 하나 이상의 염기의 결손, 치환, 삽입, 삽입/결손 또는 그에 의한 구조-이동 돌연변이를 갖는 것일 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 가이드 RNA sg1 및 sg2를 도입하고 현사시나무 유전체의 교정 전후 *TAC1* 유전자들의 구조를 비교한 결과 유전체 교정 현사시나무 형질전환체에서 4개의 *PagTAC1* 유전자 모두 서열의 삽입-결실(indel) 변이가 일어난 것을 확인하고 본 발명에 따른 가이드 RNA, sg1 및 sg2는 *PaTAC1-1, PaTAC1-2, PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자를 동시에 교정하는 것을 확인하였다. 상기 유전자 교정에 의해 유전체 교정 현사시나무 형질전환체에서 직립형 엽병 표현형이 나타났으며 구체적으로 유전체가 교정된 어린 현사시나무 형질전환체의 *PagTAC1* 유전자 구조를 분석한 결과 유전체 교정 전의 어린 현사시나무와 대비하여 엽병의 각도가 현저히 작게 나타나 수직의 방향을 유지하며 자란 것을 확인하고 본 발명의 가이드 RNA, sg1 및 sg2는 직립생장을 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0047] 본 발명은 다른 관점에서, 서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1; 및 서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2; 를 포함하는, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 벡터에 관한 것이다.

[0048] 상기 가이드 RNA, sg1 및 sg2는 전술한 바와 같다.

[0049] 본 발명에서 상기 유전자 교정용 벡터는 현사시나무 유전자, 구체적으로는 *PagTAC1* 유전자를 교정하기 위해 특

이적으로 인식하는 가이드 RNA가 도입된 식물형질 전환용 재조합 벡터를 의미하며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 상기 "재조합 벡터"는 타겟 유전자에 특이적인 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 삽입하고 이를 숙주세포 내에서 발현시킬 수 있는 발현 시스템을 포함하는 모든 플라스미드일 수 있다. 상기 플라스미드는 목적 유전자 발현을 위한 요소(elements)를 포함하는 것으로, 복제원점(replication origin), 프로모터, 작동 유전자(operator), 전사 종결 서열(terminator) 등을 포함할 수 있고, 숙주 세포의 게놈 내로의 도입을 위한 적절한 효소 부위(예컨대, 제한 효소 부위) 및/또는 임의로 숙주 세포 내로의 성공적인 도입을 확인하기 위한 선별 마커 및/또는 단백질로의 번역을 위한 리보좀 결합 부위(ribosome binding site; RBS) 및/또는 전사 조절 인자 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 벡터는 cas9 절단효소를 암호화하는 염기서열을 더 포함할 수 있다. 또한 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[0052] 상기 cas9 절단효소를 암호화하는 염기서열은 미생물 유래일 수 있다. 예를 들면, 스트렙토코커스 속(예를 들면, *Streptococcus pyogens*), 네이세리아 속(예를 들면, *Neisseria meningitidis*), 파스테우렐라 속(예를 들면, *Pasteurella multocida*), 프란시셀라 속(예를 들면, *Francisella novicida*), 또는 캄필로박터 속(예를 들면, *Campylobacter jejuni*)의 미생물로부터 유래된 것일 수 있고, 재조합된 것일 수 있다.

[0053] 본 발명은 또 다른 관점에서, 서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1; 및 서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2; 를 포함하는, 식물체의 직립생장 유도를 위한 유전체 교정용 키트에 관한 것이다.

[0054] 상기 가이드 RNA, sg1 및 sg2는 전술한 바와 같다.

[0055] 상기 키트는 상기 가이드 RNA sg1 및 sg2를 포함하는 조성물을 동결 건조된 형태로 플라스틱 튜브에 담아 제조될 수 있다. 또한 조성물 외에, 분석에 사용되는 적절한 시약 및 도구를 더 포함할 수 있으며, 이러한 시약 및 도구로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제 등을 포함할 수 있다. 상기 적합한 담체로는, 이에 제한되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 덱스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0056] 상기 키트는 *PaTAC1-1, PaTAC1-2, PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자를 동시에 교정하는 것일 수 있고, 상기 *PaTAC1-1, PaTAC1-2, PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자는 현사시나무 유래 유전자일 수 있다.

[0057] 본 발명은 또 다른 관점에서, 가이드 RNA sg1 및 sg2가 포함된 조성물 또는 벡터를 형질도입하여 직립생장이 유도된, 형질전환 식물체 또는 상기 형질전환 식물체의 종자에 관한 것이다. 구체적으로는 형질전환 식물체, 이의 줄기 기내배양체 및 삽목 증식이 가능한 삽수 등을 포함할 수 있다.

[0058] 상기 가이드 RNA, sg1 및 sg2는 전술한 바와 같다.

[0059] 상기 식물체는 상록수, 낙엽수, 침엽수, 활엽수, 교목, 관목, 덩굴나무 등을 포함하는 수목류일 수 있으며 바람직하게는 포플러(*Populus*)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 은백양(*Populus alba*), 수원사시나무(*Populus glandulosa*) 또는 현사시나무(*Populus alba* × *Populus glandulosa*)일 수 있다.

[0060] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 가이드 RNA, sg1 및 sg2를 포함하는 벡터를 형질도입하여 제작된 형질전환체에서 직립형 엽병 표현형이 나타남을 확인하였다. 구체적으로 유전체가 교정된 어린 현사시나무 형질전환체의 *PagTAC1* 유전자 구조를 분석한 결과 유전체 교정 전의 어린 현사시나무와 대비하여 엽병의 각도가 현저히 작게 나타나 수직의 방향을 유지하며 자란 것을 확인하였다.

[0061] 또한 형질전환체의 성장을 정량 분석한 결과에서 묘고 및 근원경은 유전체 교정 전후 간에 큰 차이가 없어 유전체 교정으로 식물체의 수고 및 직경 성장에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

[0062] 본 발명은 또 다른 관점에서, 서열번호 1과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg1 및 서열번호 3과 동일하거나 상보적인 염기서열로 이루어진 가이드 RNA sg2를 식물체에 형질도입하는 단계; 를 포함하는, 직립생장이 유도된 식물체의 제조방법에 관한 것이다.

[0063] 상기 가이드 RNA sg1 및 sg2는 전술한 바와 같다. 상기 가이드 RNA는 매개체에 포함된 것일 수 있다. 상기 매개

체는 현사시나무 세포에 도입되어 상기 가이드 RNA를 생성하는 것일 수 있다. 상기 매개체는 현사시나무 세포에 도입되어 상기 가이드 RNA 및/또는 Cas9 폴리펩티드(절단효소)를 발현하여, 세포 또는 개체 내에서 PagPDS1 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열에 삽입/결손 부위를 형성하여 구조-이동 변이를 유발할 수 있다. 상기 매개체는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 본 발명에서 바람직하게는 상기 매개체는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)일 수 있다.

[0064] 상기 식물체는 상록수, 낙엽수, 침엽수, 활엽수, 교목, 관목, 덩굴나무 등을 포함하는 수목류일 수 있으며 바람직하게는 포플러(*Populus*)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 은백양(*Populus alba*), 수원사시나무(*Populus glandulosa*) 또는 현사시나무(*Populus alba* × *Populus glandulosa*)일 수 있다.

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0068] **실시예 1: 싱글 가이드 RNA(sgRNA) 및 벡터 디자인**

[0069] 2-1 sgRNA 디자인

[0070] 본 발명에 사용된 은백양(*Populus alba*)과 수원사시나무(*Populus glandulosa*)의 교잡종 현사시나무(*P. alba* × *P. glandulosa*)에 존재하는 4개의 TAC1 상동 유전자 *PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1*, *PgTAC1-2*의 염기 및 아미노산 서열을 도 1 ~ 도 4에 나타냈다.

[0071] 상기 *PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자 서열을 대상으로 CRISPR RGEN tools (http://www.rgenome.net/cas-designer)를 이용하여 *PagTAC1* 3번 엑손의 앞쪽 및 뒤쪽 영역에서 23 bp (타겟서열(20 bp) + PAM(NGG, 3bp)) 길이의 싱글 가이드 RNA를 선발하였다(표 1).

표 1

[0072]

sgRNA	Target gene	RGEN Target(5'to 3')	Position	Direction	GC Contents (w/o PAM)	Out-of-frame score	Mismatch 0 1 2
sg1	*PaTAC1-1*	GCCCTGGTGGATGTGCTTGATGG (서열번호1)	EXON 3 627	antisense (-)	60	77.4	3 1 0
	PgTAC1-1	GCCCTGGTGGATGTGCTTGATGG (서열번호1)	EXON 3 589	antisense (-)	60	77.4	3 1 0
	PaTAC1-2	GCCCTGGTGGATGTGCTTGATGG(서열번호1)	EXON 3 643	sense (+)	60	77.4	3 1 0
	PgTAC1-2	GCCCTGGTGGACGTGCTTGATGG(서열번호2)	EXON 3 641	sense (+)	60	77.4	1 3 0
sg2	*PaTAC1-1*	GAAAGGAGAAAGAATAACACTGG (서열번호3)	EXON 3 947	antisense (-)	35	72.0	2 2 0
	PgTAC1-1	GAAAGGAGAAAGAATAACACTGG (서열번호3)	EXON 3 909	antisense (-)	35	72.0	2 2 0
	PaTAC1-2	CAAAGGAGAAAGAATAACACTGG(서열번호4)	EXON 3 993	sense (+)	35	72.0	2 2 0
	PgTAC1-2	CAAAGGAGAAAGAATAACACTGG(서열번호4)	EXON 3 991	sense (+)	35	72.0	2 2 0

[0073] 이들 중에서 Out-of-frame score가 66 이상이고 전체 염기서열에서 TAC1 외 다른 유전자에 비특이적 결합(mismatch)이 되지 않고 *PaTAC1-1*, *PaTAC1-2*, *PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자 서열의 동일 위치에 존재하는 싱글 가이드 RNA 2개(sg1 및 sg2)를 최종적으로 설계하고 표 2에 나타냈다.

표 2

[0074]

No.	명칭	Target gene	sgRNA 서열
서열번호1	sg1	*PaTAC1-1/2* & *PgTAC1-1/2*	5'-GCCCTGGTGGATGTGCTTGA**TGG**-3'
서열번호3	sg2	*PaTAC1-1/2* & *PgTAC1-1/2*	5'-GAAAGGAGAAAGAATAACAC**TGG**-3'

[0075] **1-2 벡터 디자인 및 형질전환체 제작**

[0076] 현사시나무 형질전환용 유전자 교정 벡터 제작을 위한 gRNA, CRISPR-Cas9 벡터 모식도를 도 5에 나타냈다.

[0077] Multi-target gRNA 시스템을 갖고 있는 골든 게이트 복제(Golden Gate cloning) 방법을 이용하여 CRISPR/Cas9 벡터를 제조하였다. Cas9 발현 프로모터는 CaMV35S이며 각 sgRNA 프로모터는 U6 프로모터를 사용하였다. 바이너리 벡터 pHSE401 (Addgene, USA)에 *Bsa*I 제한효소를 이용하여 실시예 1-1에서 설계한 2개의 싱글 가이드 RNA, sg1 및 sg2를 각각 gRNA 스캐폴드 앞쪽, U6 프로모터 뒤쪽에 삽입하여 CRISPR/Cas9 유전자 교정 PagTAC1_pHSE401 벡터를 작성하였다.

[0078] 제작된 PagTAC1_pHSE401 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 형질전환 후 현사시나무 6주령의 줄기 조직에 감염시키고, 아그로박테리움을 제거한 다음 MS 배지로 옮겨 배양하였다. 형질전환된 캘러스를 선발하여 재배양하고 형질전환된 재분화 식물체를 유도하여 생육시킨 후 유전체 교정 분석에 사용하였다.

[0080] **실시예 2: 현사시나무 형질전환체의 유전체 교정 분석**

[0081] **2-1 *TAC1* 유전자 교정 확인**

[0082] 현사시나무 유전체의 교정 전후 *TAC1* 유전자들의 구조를 비교한 결과를 도 6에 나타내고 돌연변이를 분석하였다. 구체적으로, 도 6(a)의 유전체 교정 전 현사시나무의 정상/야생형(normal) *TAC1* 유전자들의 구조를 대조구(Control; Bonghwa(BH))로 하여 유전체 교정된 현사시나무 형질전환체(TAC1-CRISPR)들의 각 *TAC1* 유전자들 구조와 비교하였다.

[0083] 도 6(b)에서 보는 바와 같이, 대조구(BH) 대비 유전체 교정 라인 #8, #24, #25, #26 및 #27 모두에서 *PaTAC1-1, PaTAC1-2, PgTAC1-1* 및 *PgTAC1-2* 유전자 서열의 삽입-결실(indel) 변이가 일어나면서 sg1과 sg2 사이의 서열이 결손(deletion) 되거나 다른 서열이 삽입(insertion)되는 돌연변이가 발생한 것을 확인하였다.

[0085] **2-2 유전자 교정에 따른 단백질 변이 구조 예측**

[0086] 유전체 교정 전, 후의 현사시나무 TAC1 단백질들의 변이 예상도를 도 7에 나타냈다. 검은색 막대로 표시된 유전체 교정 전 대조구(BH)의 정상/야생형 TAC1 단백질 구조와 비교하여, 회색 막대로 표시된 유전체 교정된 현사시나무 형질전환체(#8, #24, #25, #26, #27)의 TAC1 단백질들은 염기의 삽입-결실로 인해 비정상적 종결 코돈(*)이 형성되었다. 도 7의 이미지 오른쪽 숫자로 표시된 아미노산 개수에서 보는 바와 같이 단백질이 비정상적으로 작아져서, 식물가지의 수평 성장을 나타내는 TAC1의 기능 손실이 유발될 수 있음을 확인하였다.

[0088] **실시예 3: 현사시나무 형질전환체의 직립형 표현형**

[0089] **3-1 직립형 엽병 표현형**

[0090] 식물의 잎은 크게 엽신, 엽병, 탁엽으로 나뉘는데 엽병은 엽신을 줄기와 연결해주는 부위이며 줄기로부터 벌어진 엽병의 각도를 측정하여 수평 성장 또는 직립 성장의 형태를 관찰할 수 있다.

[0091] 유전체 교정된 어린 현사시나무에서 직립형의 엽병 표현형이 나타남을 도 8에 나타냈다. 도 8(a)에서 보는 바와 같이, 줄기 대비 엽병의 각도를 표시한 빨간색 라인을 비교해보면 시험관에서 5주째 배양된 대조구(BH) 대비 형질전환체(#8, #24, #25, #26, #27)의 엽병의 각도가 훨씬 작게 나타남을 확인하였다. 화분에 순화 후 8주째의 대조구(BH) 및 형질전환체(#24, #27)의 모습을 나타낸 도 8(b)를 살펴보면 엽병의 각도가 대조구 대비(BH) 수직

의 방향을 유지하며 자란 것을 확인할 수 있다.

[0092] 또한 도 8의 (c) ~ (e)에 나타낸 순화 후 12주째의 엽병(Petiole) 표현형 및 성장(묘고 및 근원경)을 정량 분석한 결과에서도 줄기로부터 벌어진 엽병의 각도(c)는 대조구(BH) 대비 형질전환체에서 현저하게 작게 나타나 엽병의 직립 성장을 확인하였다. 토양 바닥에서 측정한 개체의 높이 묘고(d) 및 토양 바닥의 1cm 위의 직경을 측정한 근원경(e)은 대조구(BH) 및 형질전환체 간에 큰 차이가 없었다. 따라서 유전체 교정으로 식물체의 수고 및 직경 성장에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

[0094] **3-1 직립형 가지 생장 표현형**

[0095] 유전자변형(LMO) 격리포장에 유전체 교정된 현사시나무 형질전환체를 식재하고 가지 생장 표현형 및 성장을 도 9에 나타냈다.

[0096] 도 9(a)를 살펴보면, LMO 격리포장에 식재 후 5개월된 대조구(BH)와 형질전환체(#24)를 비교한 결과 줄기 대비 엽병의 각도가 크게 다르게 나타났는데 대조구(BH)의 엽병은 줄기로부터 거의 수평이거나 아래로 향한 반면, 형질전환체(#24)는 수직형의 엽병을 나타냈다. 또한 줄기 대비 가지(Branch)의 각도를 나타낸 도 9(b)에서 보는 바와 같이, 대조구(BH) 대비 형질전환체(#24)의 가지 생장의 표현형이 직립형으로 나타남을 확인하였다.

[0097] 도 9의 (c) ~ (e)에 나타낸 식재 후 8개월차의 가지 표현형 및 성장(묘고 및 근원경)을 정량 분석한 결과에서도 줄기 대비 가지의 각도(c)는 대조구(BH) 대비 형질전환체에서 현저하게 작게 나타났다. 토양 바닥에서 측정한 개체의 높이 묘고(d) 및 토양 바닥의 5cm 위의 직경을 측정한 근원경(e)은 대조구(BH) 및 형질전환체 간에 큰 차이가 없었다. 따라서 유전체 교정으로 식물체의 수고 및 직경 성장에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

도면

도면1a

PaTAC1-1 genomic DNA (2302 bp) 염기서열 (대문자(엑손), 소문자(인트론))

```
ATGAAGgtta gaagtatagc acattatcag aattgaagtg tatcttgatg ctttttttaat       60
ggccaggctg atcatctact ctcactctct acagttgttc tagtgatgat attttattgg      120
tttctaatgt ttttttctc ttggaaacag ATCTTCAACT GGGTGCAGAG GAGGTTTCAT       180
CATGGCGCAA TGAAAGgttt ggtattcatt cgtatttctg tctctctttt ttttttttt       240
ttttttttt ttttttttt tatctactgg aacaaactgg atttttgaat ggaacaaaag       300
tctagttgac tcggtcttga gaatttcttt ttagtattat aataatcatc gtgccctcta      360
taaatgagtg ccttgttgat tttagttcgc ctctttttt ttttttatta ttccccaaca       420
ggcctgtgtc acaatcatta tcaacacttg ttttgccaat caaaatcatt aaaattatta      480
tttaattgtg actgtgattg ttgtttatat aattgttcaa ttaaatggat gagaaatttg      540
ttttaaccag ATGGGCTAGC TAGAAATGTG AAGAAGGCTG AATCCATTAC AAACGAGGCG      600
GACAAGCAAG CATTGCTGAA ACAAGTAGCC CTGGTGGATG TGCTTGATGG TTGGAAAGAT      660
GGCATTTTAA CAATTGGCAC ATTAGGTCTT GACCCTTTAA AACCCTTTAA CCAACAAAAT      720
GATCAGTATT TCATTTTGGA AAGTGAAGAA GAGGAGGAAG TAGAAAGGGA ACAAGAACAA      780
TACTCAGTTG ATGATGATTA TTTTGATGAT GACAATGTTG AAGATGAAGA AGTGAGCCCT      840
TTGATATATG CAACATTTGA GCACAGTTTT GAGGGAACTG GATCAAATAC CGTGACATGT      900
GATGTCATAA CCAACTCTAG TCTCACCGAG CAAGAACAAA GAAAAAGGAA AGGAGAAAGA      960
ATAACACTGG CAGAACTGTT CTTGGAAGAT GCTGACATGA AAAAGAAGCC GGATTCTGTT     1020
GAAATTGAGA CCAAACCAGG TAATAAAAAG CCGGTTGCTC GTGCCAAGGG TGGCCTTTCT     1080
TTCGCCAAGA AGCTAATACG TACTCGCCCA GGAGAGGATT CACGTCCCAT AAAAAAGTTC     1140
AACCAGgtaa gtatcgattc tctcttcatg tgcaatgata cacttttctt caaggtattt     1200
tcaagtaaca attagtcaat tttgtgatgt attgtagTTG ATGAGGAGGA TGTTGAAGAG     1260
AAAAATTCAC CCAGAACTTG ATGGGAAGGG AAATAAATCA GACAATCAAA ATAAGCCTGG     1320
CATTATGGAT GTCCAAATCC GCAAGGGAAA TGAAGCCGAA TCAGTTTTTC TGCTTCAAAC     1380
TCCATCAGgt acttgatctc tgccctctct aggaaaaaaa gttcaaaaaa acataaaata     1440
aataatcgag caatgctcac ttaatcttca cattaaaata taaagacaaa ataattaaag     1500
caagaattgt atatatgcat ccaatgaacc tgcacatatg accataccgc ttgaggacac     1560
ggcttaaaaa ttaatctgtc aagttgtgta taatcatttt agtacaatgg atgattgcaa     1620
tatgtttaaa catccaatca ttgggtgtgt caacaatttc catcggcaga ttatttaatc     1680
tccattttca gagtggcccc gattgacaag aatctgcatc ttaatttctc tgtgatttgg     1740
tagtgcttag catctaacaa tcgatgccac ataaatcaga aaacaatttc ccacattatg     1800
tatgatatct tgtaattctt cttggacttc taaacttcgc gtatgtgctt tacaacctgt     1860
tctacttgga cgtgccttgg tcgcatgcat ggtctgggtg gacgggagag agctggagct     1920
ggcctccctg tcattttcca tggatttctt atagggtttc catcatctat agggtaatgg     1980
ggtccctcct aggaaaaagc ttaaaacata aatccaaaga ggaagccatc caataaaaac     2040
gttccaatta gcttcgatat gaatggaaat gctcaaacaa ttctccttct caaattgagt     2100
ccaactctgc tacagtgtaa tctcctagct gtccatagac tggtagggca tacagaccag     2160
taacattttc tccccttctc catattacgt atacaatcat caccgcatga ttactatttg     2220
tagcgttgcg atttgtactg cagagtgact ttgctaacat atctctcttg ccgtgacttg     2280
tattgcagGT CCTGCCATAT GA                                              2302
```

PaTAC1-1 CDS (813 bp) 염기서열

```
ATGAAGATCT TCAACTGGGT GCAGAGGAGG TTTCATCATG GCGCAATGAA AGATGGGCTA       60
GCTAGAAATG TGAAGAAGGC TGAATCCATT ACAAACGAGG CGGACAAGCA AGCATTGCTG      120
AAACAAGTAG CCCTGGTGGA TGTGCTTGAT GGTTGGAAAG ATGGCATTTT AACAATTGGC      180
ACATTAGGTC TTGACCCTTT AAAACCCTTT AACCAACAAA ATGATCAGTA TTTCATTTTG      240
GAAAGTGAAG AAGAGGAGGA AGTAGAAAGG GAACAAGAAC AATACTCAGT TGATGATGAT      300
TATTTTGATG ATGACAATGT TGAAGATGAA GAAGTGAGCC CTTTGATATA TGCAACATTT      360
GAGCACAGTT TTGAGGGAAC TGGATCAAAT ACCGTGACAT GTGATGTCAT AACCAACTCT      420
AGTCTCACCG AGCAAGAACA AAGAAAAAGG AAAGGAGAAA GAATAACACT GGCAGAACTG      480
TTCTTGGAAG ATGCTGACAT GAAAAAGAAG CCGGATTCTG TTGAAATTGA GACCAAACCA      540
GGTAATAAAA AGCCGGTTGC TCGTGCCAAG GGTGGCCTTT CTTTCGCCAA GAAGCTAATA      600
CGTACTCGCC CAGGAGAGGA TTCACGTCCC ATAAAAAAGT TCAACCAGTT GATGAGGAGG      660
ATGTTGAAGA GAAAAATTCA CCCAGAACTT GATGGGAAGG GAAATAAATC AGACAATCAA      720
AATAAGCCTG GCATTATGGA TGTCCAAATC CGCAAGGGAA ATGAAGCCGA ATCAGTTTTT      780
CTGCTTCAAA CTCCATCAGG TCCTGCCATA TGA                                    813
```

도면1b

PaTAC1-1 아미노산 서열 (271 aa)

```
MKIFNWVQRR FHHGAMKDGL ARNVKKAESI TNEADKQALL KQVALVDVLD GWKDGILTIG       60
TLGLDPLKPF NQQNDQYFIL ESEEEEEVER EQEQYSVDDD YFDDDNVEDE EVSPLIYATF      120
EHSFEGTGSN TVTCDVITNS SLTEQEQRKR KGERITLAEL FLEDADMKKK PDSVEIETKP      180
GNKKPVARAK GGLSFAKKLI RTRPGEDSRP IKKFNQLMRR MLKRKIHPEL DGKGNKSDNQ      240
NKPGIMDVQI RKGNEAESVF LLQTPSGPAI *                                     271
```

도면2a

PgTAC1-1 genomic DNA (2512 bp) 염기서열 (대문자(엑손), 소문자(인트론))

```
ATGAAGgtta gaagtatagc acattatcag aattgaagtg tatcttgatg ctttttttatg       60
gccagaggct gatcatctac tctcactctc tacagttgtt ctagtgatga tattttattg      120
gttactaatg ttttttctc ttggaaacag ATCTTCAACT GGGTGCAGAG GAGGTTTCAT       180
CATGGCGCAA TCAAAGgttt gatattcatt cgtatttctg tctctctttt ttttttttta      240
tctactggaa caaactggat ttttgaatgg aacaaaagtc tagttgactc ggtcttgaga      300
atttcttttt agtattataa taatcatcgt gtcctaaatg agtgccttgt tgattttagt      360
tcgcctcttt tttttattat tccccaacaa gcccgtgtca caatcattat caacacttgt      420
tttgctaatt cattaaaatt attatttaag tgtgaatgtg attgttgttt atataattgt      480
tcaataatgg atgtgaaatt tgttttaacc agATGGGCTA GCTAGAAATG TGAAGAAGGC      540
TGAATCCATT ACAAACGAGG CTGACAAGCA AGCATTGCTG AAACAAGTAG CCCTGGTGGA      600
TGTGCTTGAT GGTTGGAAAG ATGGCATTTT AACAATTGGC ACATTAGGTC TTGACCCTTT      660
AAAACCCTTT AACCAACAAA ATGATCAGTA TTTCATTTTG GAAAGTGAAG AAGAGGAGGA      720
AGTAGAAAGG GAACAAGAAC AATACTCAGT TGATGATGAT TATTTTGATG ATGACAATGT      780
CGAAGATGAA GAAGTGAGCC CTTTGATATA TGCAACATTT GAGCACAGTT TTGAGGGAAC      840
TGGATCAAAT ACCGTGACAT GTGATGTCAT AACCAACTCT AGTATCACCG AGCAAGAACA      900
AAGAAAAAGG AAAGGAGAAA GAATAACACT GGCAGAACTG TTCTTGGAAG ATGCTGACAT      960
GAAAAAGAAG CCGGATTCTG TTGAAATTGA GACCAAATCA GGTAATAAAA AGCCGGTTGC     1020
TCGTGCCAAG GGTGGCCTTT CTTTCGCCAA GAAGCTAATA CGTCCTCGCC CAGGAGAGGA     1080
TTCACGTCCA ATAAAAAAGT TCAACCAGgt aagtatcgat tctctcttca tgtgcaatga     1140
tacacttttc ttcaaggtat tttcaagtaa caattagtca actttgtgat gtactgtagT     1200
TGATGAGGAG GATGTTGAAG AGAAAAATTC ACCCAGAACT TGATGGGAAG GGAAATAAAT     1260
CAGACAATCA GAATAAGCCT GGCATTATGG ATGTCCAAAT CCGCAAGGGA AATGAAGCCG     1320
AATCAGTTTT TCTGCTTCAA ACTCCAACAG gtacttgatc tctgcctctc tcaggaaaaa     1380
aagttaaaaa aaaaaaaccc tttgattgaa tgtttgtgta aattatgtgt gctgatcgat     1440
atggcaaact tgcaacttta tacttaactg aaaatgatgg gttggtgacc attattaaga     1500
tgagtagcat cataatgtga tcacgctctt cttcactcta ggttgaaata ataacaacaa     1560
attatctact tgatatcagt aactgtgtga atattagaag accaaaatca tgagttcgcc     1620
ttccatctgg acagaataat gccaaataat tttatcaatt aaataattaa ccaatgctca     1680
cttaatcttc acattaaaat ataaagacaa aataattaaa gcaagtattg tatatatgca     1740
tccaatgaac ctgcacatat gaccataccg cttgaggaca cggcttaaaa attaatcagt     1800
caagttgtgt ataatcattt tagtacaatg gatgattgca atatgtttaa acatccaatc     1860
attgggtgtg tcaacaattt ccatcgtcgc actattttca gagtggccca gattgacaag     1920
aatctgcatc ttaatttctc cgtgatttgg tagtgcttag catctaacaa tcgatgccac     1980
ataaatcaga aagcaatttc ccacattatg tatgatatct tgtaattctt cttggtgttc     2040
taaacttcgc gtatgtgctt tacaacctgt tctacttgga cgtgccttag tcgcatgcat     2100
ggtctgggtg gacgggagag agctggagct ggcctccctg tcattttcca tggatttctt     2160
atagggtttc catcatctat agggtaatgc ggtccctcct aggaaaaagc ttaaaacata     2220
aatccaaaga ggaagccatc caataaaaac gttccaatta gctttgatat gaatggaaat     2280
gctccaacaa ttctccttct caaattgagt ccaactctgc tacagtgtaa tctcctagct     2340
gtccatagac tggtagggta tacagaccag taacattttc tccccttctc catattacgt     2400
atacaatcat caccgtatga ttactatttg tagcgttgcg atttgtactg cagagtgact     2460
ttgctaacat atctctcttg ccgtgacttg tattgcagGT CCTGCCATAT GA             2512
```

PgTAC1-1 CDS (813 bp) 염기서열

```
ATGAAGATCT TCAACTGGGT GCAGAGGAGG TTTCATCATG GCGCAATCAA AGATGGGCTA       60
GCTAGAAATG TGAAGAAGGC TGAATCCATT ACAAACGAGG CTGACAAGCA AGCATTGCTG      120
AAACAAGTAG CCCTGGTGGA TGTGCTTGAT GGTTGGAAAG ATGGCATTTT AACAATTGGC      180
ACATTAGGTC TTGACCCTTT AAAACCCTTT AACCAACAAA ATGATCAGTA TTTCATTTTG      240
GAAAGTGAAG AAGAGGAGGA AGTAGAAAGG GAACAAGAAC AATACTCAGT TGATGATGAT      300
TATTTTGATG ATGACAATGT CGAAGATGAA GAAGTGAGCC CTTTGATATA TGCAACATTT      360
GAGCACAGTT TTGAGGGAAC TGGATCAAAT ACCGTGACAT GTGATGTCAT AACCAACTCT      420
AGTATCACCG AGCAAGAACA AAGAAAAAGG AAAGGAGAAA GAATAACACT GGCAGAACTG      480
TTCTTGGAAG ATGCTGACAT GAAAAAGAAG CCGGATTCTG TTGAAATTGA GACCAAATCA      540
GGTAATAAAA AGCCGGTTGC TCGTGCCAAG GGTGGCCTTT CTTTCGCCAA GAAGCTAATA      600
CGTCCTCGCC CAGGAGAGGA TTCACGTCCA ATAAAAAAGT TCAACCAGTT GATGAGGAGG      660
ATGTTGAAGA GAAAAATTCA CCCAGAACTT GATGGGAAGG GAAATAAATC AGACAATCAG      720
AATAAGCCTG GCATTATGGA TGTCCAAATC CGCAAGGGAA ATGAAGCCGA ATCAGTTTTT      780
CTGCTTCAAA CTCCAACAGG TCCTGCCATA TGA                                    813
```

도면2b

PgTAC1-1 아미노산 서열 (271 aa)

```
MKIFNWVQRR FHHGAIKDGL ARNVKKAESI TNEADKQALL KQVALVDVLD GWKDGILTIG       60
TLGLDPLKPF NQQNDQYFIL ESEEEEEVER EQEQYSVDDD YFDDDNVEDE EVSPLIYATF      120
EHSFEGTGSN TVTCDVITNS SITEQEQRKR KGERITLAEL FLEDADMKKK PDSVEIETKS      180
GNKKPVARAK GGLSFAKKLI RPRPGEDSRP IKKFNQLMRR MLKRKIHPEL DGKGNKSDNQ      240
NKPGIMDVQI RKGNEAESVF LLQTPTGPAI *                                     271
```

도면3a

PaTAC1-2 genomic DNA (1394 bp) 염기서열 (대문자(엑손), 소문자(인트론))

```
ATGAGCATGA AGgttagaag tagagaacgt tatcagaatt tctcacctta aatgtatttt      60
gatgcctttc tatggccagg ccgctgatcg tctactctca ctctcgacac tttttcttgt     120
gatgatcttt tggttactaa cattttgtt tcttgcaaac agATCTTCAA CTGGGTGCAG      180
AGGAGGTTTC ATCATGGCAC CATCAAAGgt ttgatattcg tgattgagtc gccgtctaaa     240
ctaatatatt agaacaaaat gaatttttaa atggtagaaa agtcccattg actcgatctt     300
atgctttttt tgtattataa tcatcgtgtc cttaatatat gagtttacct tgttgatttt     360
agtttgcctt ctattttata agaaccccta acaagcttga gttacaaaac aatcattatc     420
aacacttcgt ttagggcgac ttgttctgct gagcaaaagc attaaaatta aaattattat     480
ttactattat tactttgtac cacacttgtt aagtgttgtt tatataattg tctcagttaa     540
acggatgagg gaattgtttt gaacagATGG GCTCGCTGGA AATGTGAAGA AGGCTGAATC     600
CATTACAAAA GAGGCTGACA AGCAAGCATT GCTGAAACAA GTAGCCCTGG TGGATGTGCT     660
TGATGGTTGG AAAGATGGAA TTTTGACAAT TGGCACCTTA GGTCTTGACC CTTTAATACC     720
TTTTAACCAA CAAAATGATC AGTATTTCAT TTTGGAAAGT GACGAAGAAG GTCAAGAGGA     780
GGAGGAAGAC GAAGGAAAAG AAGAAGAAAG GGAAATAGAA CAATACTCAG TTGATGATGA     840
TTATTATTAT GATGACAATG TTGAAGATGA AGAAGTGAAC CCTTTGGTAT ATACAACATT     900
TGACCACAGT TTTGAGGAAA TTGGATCAGA TTCTCTGCAT TATGATGTCA TAACCAACTC     960
TACTACCATC GCTGAGCATG AACAAAGAAA AAACAAAGGA GAAAGAATAA CACTGGCAGA    1020
ACTGTTCTTG GAAGATTCTG ACATGAAAAG GAAGCCGGAT TCTGTTGAAG TTGAGACTGA    1080
ACCAGGGAAT AAAAAGCCGG TTGCTTGTGC CAAGAGTGGC CTCTCTTTTG CCAAGAAGCT    1140
CATACGTCCT CACGTTGTAG AGGATTCACG TCCAATCAAG AAATTCAACC AAgtaagtat    1200
actcatctca tggagtgaca cacttttctt caaggtatat ttaagtaaca attaattaat    1260
tctgtgattt tcagTTGATG AGGAGAATGT TGAAGAGAAA AATTCACCCA GAATTTGATT    1320
GGAAGGGAAA TAAAACAGAC AATCAAAATA AGTCTGGCAT TAAGGATGTT CATATTAGCA    1380
AGGGAAATAA ATAA                                                      1394
```

PaTAC1-2 CDS (804 bp) 염기서열

```
ATGAGCATGA AGATCTTCAA CTGGGTGCAG AGGAGGTTTC ATCATGGCAC CATCAAAGAT      60
GGGCTCGCTG GAAATGTGAA GAAGGCTGAA TCCATTACAA AAGAGGCTGA CAAGCAAGCA     120
TTGCTGAAAC AAGTAGCCCT GGTGGATGTG CTTGATGGTT GGAAAGATGG AATTTTGACA     180
ATTGGCACCT TAGGTCTTGA CCCTTTAATA CCTTTTAACC AACAAAATGA TCAGTATTTC     240
ATTTTGGAAA GTGACGAAGA AGGTCAAGAG GAGGAGGAAG ACGAAGGAAA AGAAGAAGAA     300
AGGGAAATAG AACAATACTC AGTTGATGAT GATTATTATT ATGATGACAA TGTTGAAGAT     360
GAAGAAGTGA ACCCTTTGGT ATATACAACA TTTGACCACA GTTTTGAGGA AATTGGATCA     420
GATTCTCTGC ATTATGATGT CATAACCAAC TCTACTACCA TCGCTGAGCA TGAACAAAGA     480
AAAAACAAAG GAGAAAGAAT AACACTGGCA GAACTGTTCT TGGAAGATTC TGACATGAAA     540
AGGAAGCCGG ATTCTGTTGA AGTTGAGACT GAACCAGGGA ATAAAAAGCC GGTTGCTTGT     600
GCCAAGAGTG GCCTCTCTTT TGCCAAGAAG CTCATACGTC CTCACGTTGT AGAGGATTCA     660
CGTCCAATCA AGAAATTCAA CCAATTGATG AGGAGAATGT TGAAGAGAAA AATTCACCCA     720
GAATTTGATT GGAAGGGAAA TAAAACAGAC AATCAAAATA AGTCTGGCAT TAAGGATGTT     780
CATATTAGCA AGGGAAATAA ATAA                                            804
```

도면3b

PaTAC1-2 아미노산 서열 (268 aa)

```
MSMKIFNWVQ RRFHHGTIKD GLAGNVKKAE SITKEADKQA LLKQVALVDV LDGWKDGILT      60
IGTLGLDPLI PFNQQNDQYF ILESDEEGQE EEEDEGKEEE REIEQYSVDD DYYYDDNVED     120
EEVNPLVYTT FDHSFEEIGS DSLHYDVITN STTIAEHEQR KNKGERITLA ELFLEDSDMK     180
RKPDSVEVET EPGNKKPVAC AKSGLSFAKK LIRPHVVEDS RPIKKFNQLM RRMLKRKIHP     240
EFDWKGNKTD NQNKSGIKDV HISKGNK*                                        268
```

도면4a

PgTAC1-2 genomic DNA (1392 bp) 염기서열 (대문자(엑손), 소문자(인트론))

```
ATGAGCATGA AGgttagaag tagagaacgt tatcagaatt tctcacctta aatgtatttt      60
gatgcctttc tatggccagg ccgctgatcg tctactctca ctctctacac cttttcttgt     120
gatgatcttt tggttactaa cattttgtt tcttgcaaac agATCTTCAA CTGGGTGCAG      180
AGGAGGTTTC ATCATGGCAC CATCAAAGgt ttgatattcg tgattgagtc gccgtctaaa     240
ctaatatatc agaacaaaat gaatttttaa atggtagaaa agtcccattg actcgatctt     300
atgctttttt tgtattataa tcatcgtgtc cttaatatat gagtgccttg ttgattttag     360
tttgccttct attttataat aacccctaac aagcttgagt tacaaaacaa tcattatcaa     420
cacttcgttt agggcgactt gttctgctga gcaaaagcat taaaattaaa attattattt     480
actattatta ctttgtacca cacttgttaa gtgttgttta tataattgtc tcagttaaac     540
ggatgaggga attgttttga acagATGGGC TCGCTGGAAA TGTGAAGAAG GCTGAATCCA     600
TTACAAAAGA GGCTGACAAG CAAGCATTGC TGAAACAAGT AGCCCTGGTG GACGTGCTTG     660
ATGGTTGGAA AGATGGAATT TTGACAATTG GCACCTTAGG TCTTGACCCT TTAATACCTT     720
TTAACCAACA AAATGATCAG TATTTCATTT TGGAAAGTGA CGAAGAAGGT CAAGAGGAGG     780
AGGAAGACGA AGGAAAAGAA GAAGAAAGGG AAATAGAACA ATACTCAGTT GATGATGATT     840
ATTATTATGA TGACAATGTT GAAGATGAAG AAGTGAACCC TTTGATATAT GCAACATTTG     900
ACCACAGTTT TGAGGAAATT GGATCTGATT CTCTGCATTA TGATGTCATA AACAACTCTA     960
CTACAATCGC TGAGCATGAA CAAAGGAAAA CCAAAGGAGA AAGAATAACA CTGGCAGAAC    1020
TGTTCTTGGA AGATTCTGAC ATGAAAAGGA AGCCGGATTC TGTTGAAGTT GAGACTGAAC    1080
CAGGGAATAA AAAGCCGGTT GCTCGTGCCA AGAGTGGCCT CTCTTTTGCC AAGAAGCTCA    1140
TACGTCCTCA CGTTGTAGAG GATTCACGTC CAATCAAGAA ATTCAACCAA gtaagtatac    1200
tcatctcatg gagtgacaca cttttcttca aggtatattt aagtaacaat taattaattt    1260
tgtcattttc agTTGATGAG GAGAATGTTG AAGAGAAAAA TTCACCCAGA ATTTGATTGG    1320
AAGGGAAATA AAACAGACAA TCAAAATAAG TCTGGCATTA TGGATGTTCA TATTAGCAAG    1380
GGAAATAAAT AA                                                        1392
```

PgTAC1-2 CDS (804 bp) 염기서열

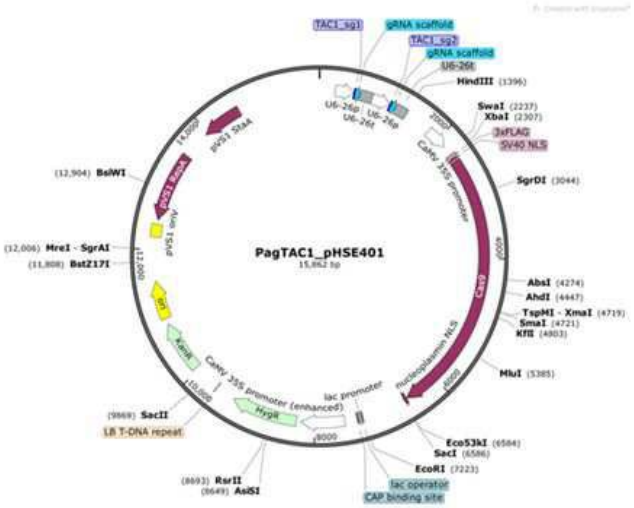
```
ATGAGCATGA AGATCTTCAA CTGGGTGCAG AGGAGGTTTC ATCATGGCAC CATCAAAGAT      60
GGGCTCGCTG GAAATGTGAA GAAGGCTGAA TCCATTACAA AAGAGGCTGA CAAGCAAGCA     120
TTGCTGAAAC AAGTAGCCCT GGTGGACGTG CTTGATGGTT GGAAAGATGG AATTTTGACA     180
ATTGGCACCT TAGGTCTTGA CCCTTTAATA CCTTTTAACC AACAAAATGA TCAGTATTTC     240
ATTTTGGAAA GTGACGAAGA AGGTCAAGAG GAGGAGGAAG ACGAAGGAAA AGAAGAAGAA     300
AGGGAAATAG AACAATACTC AGTTGATGAT GATTATTATT ATGATGACAA TGTTGAAGAT     360
GAAGAAGTGA ACCCTTTGAT ATATGCAACA TTTGACCACA GTTTTGAGGA AATTGGATCT     420
GATTCTCTGC ATTATGATGT CATAAACAAC TCTACTACAA TCGCTGAGCA TGAACAAAGG     480
AAAACCAAAG GAGAAAGAAT AACACTGGCA GAACTGTTCT TGGAAGATTC TGACATGAAA     540
AGGAAGCCGG ATTCTGTTGA AGTTGAGACT GAACCAGGGA ATAAAAAGCC GGTTGCTCGT     600
GCCAAGAGTG GCCTCTCTTT TGCCAAGAAG CTCATACGTC CTCACGTTGT AGAGGATTCA     660
CGTCCAATCA AGAAATTCAA CCAATTGATG AGGAGAATGT TGAAGAGAAA AATTCACCCA     720
GAATTTGATT GGAAGGGAAA TAAAACAGAC AATCAAAATA AGTCTGGCAT TATGGATGTT     780
CATATTAGCA AGGGAAATAA ATAA                                            804
```

도면4b

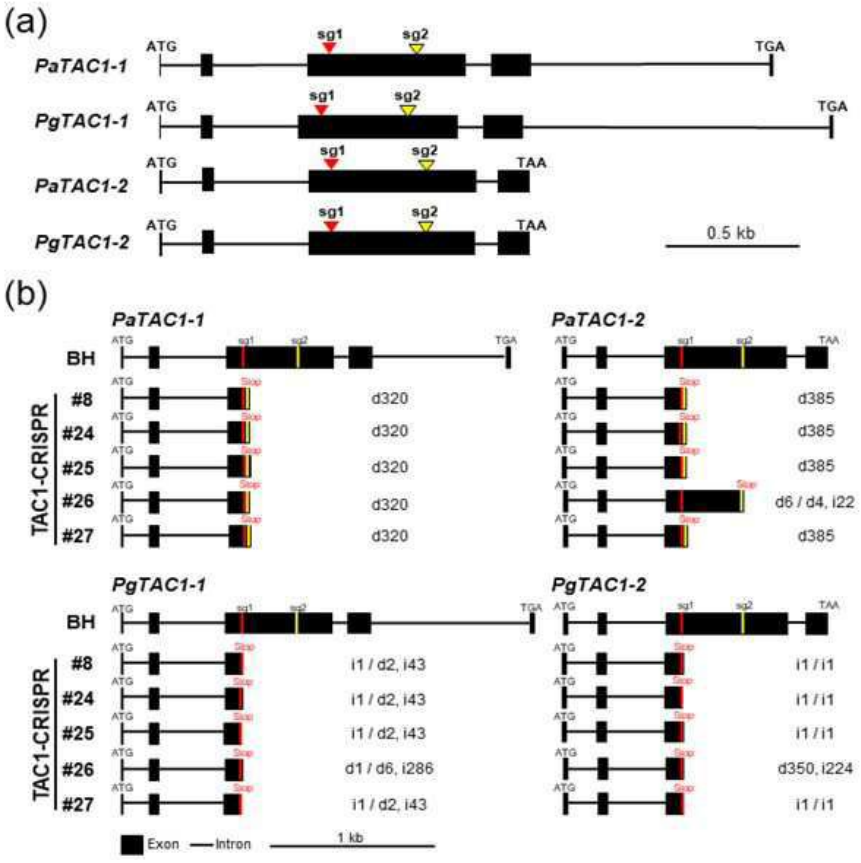
PgTAC1-2 아미노산 서열 (268 aa)

```
MSMKIFNWVQ RRFHHGTIKD GLAGNVKKAE SITKEADKQA LLKQVALVDV LDGWKDGILT      60
IGTLGLDPLI PFNQQNDQYF ILESDEEGQE EEEDEGKEEE REIEQYSVDD DYYYDDNVED     120
EEVNPLIYAT FDHSFEEIGS DSLHYDVINN STTIAEHEQR KTKGERITLA ELFLEDSDMK     180
RKPDSVEVET EPGNKKPVAR AKSGLSFAKK LIRPHVVEDS RPIKKFNQLM RRMLKRKIHP     240
EFDWKGNKTD NQNKSGIMDV HISKGNK*                                        268
```

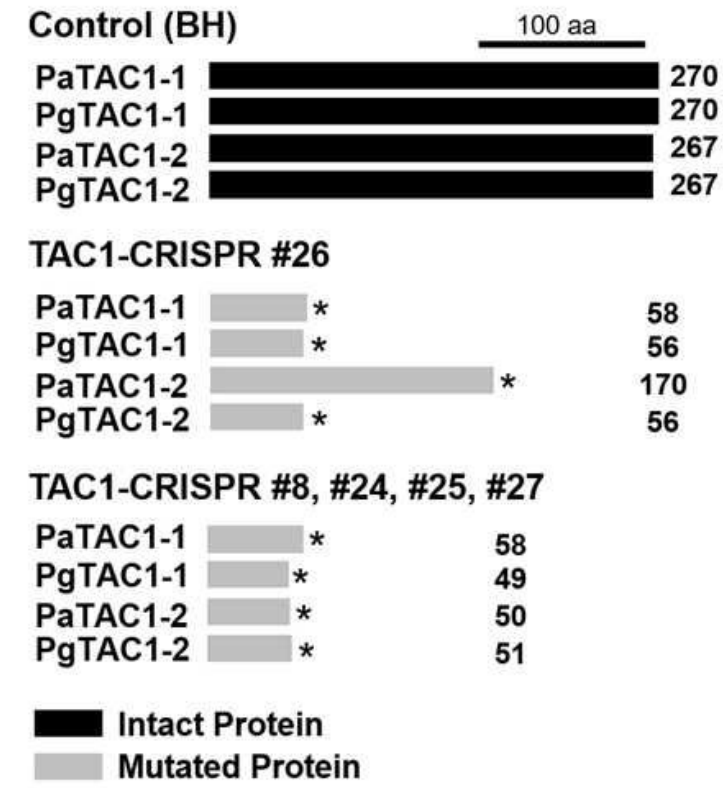
도면5


PagTAC1_pHSE401
15,862 bp
TAC1_sg1
gRNA scaffold
TAC1_sg2
gRNA scaffold
U6-26t
HindIII (1396)
SwaI (2237)
XbaI (2307)
3xFLAG
SV40 NLS
SgrDI (3044)
AbsI (4274)
AhdI (4447)
TspMI - XmaI (4719)
SmaI (4721)
KflI (4803)
MluI (5385)
Eco53kI (6584)
SacI (6586)
EcoRI (7223)
lac operator
CAP binding site
RsrII (8693)
AsiSI (8649)
SacII (9869)
LB T-DNA repeat
BsiWI (12,904)
MreI - SgrAI (12,006)
BstZ17I (11,808)
lac promoter
Hygr
Cauliflower mosaic virus 35S promoter (enhanced)
Cauliflower mosaic virus 35S promoter
nucleoplasmin NLS
Cas9
pVS1 StaA
pVS1 RepA
Ampr
ori

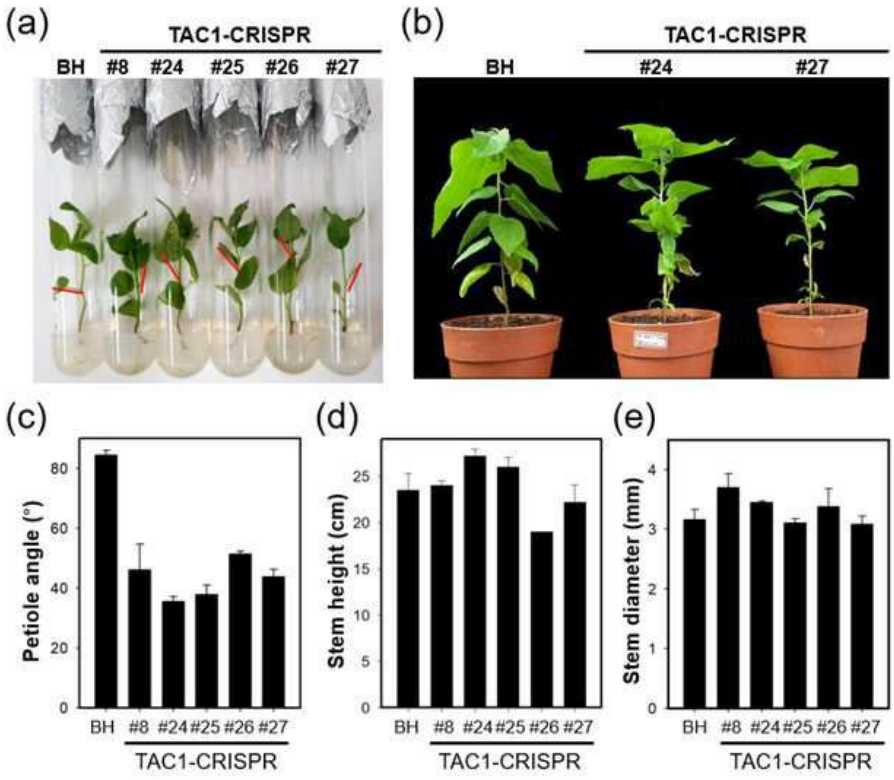
도면6


(a)
PaTAC1-1
PgTAC1-1
PaTAC1-2
PgTAC1-2
ATG
TGA
TAA
sg1
sg2
0.5 kb
(b)
PaTAC1-1
PaTAC1-2
PgTAC1-1
PgTAC1-2
BH
TAC1-CRISPR
#8
#24
#25
#26
#27
d320
d385
d6 / d4, i22
i1 / d2, i43
i1 / i1
d1 / d6, i286
d350, i224
Exon
Intron
1 kb

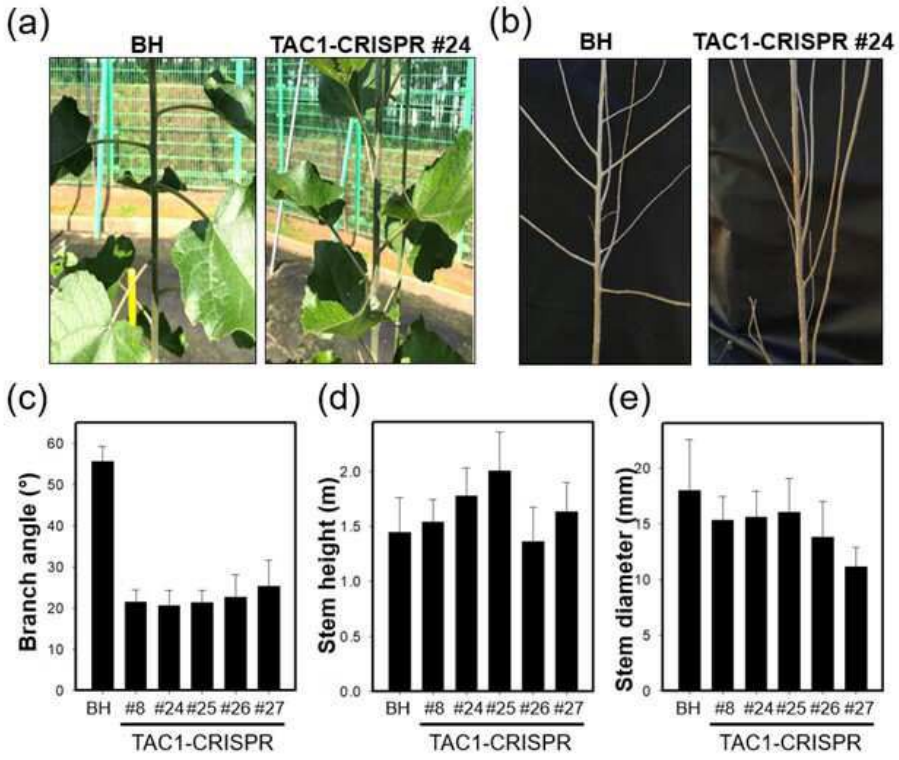
도면7


Control (BH)
100 aa
PaTAC1-1
PgTAC1-1
PaTAC1-2
PgTAC1-2
270
270
267
267
TAC1-CRISPR #26
PaTAC1-1 *
PgTAC1-1 *
PaTAC1-2 *
PgTAC1-2 *
58
56
170
56
TAC1-CRISPR #8, #24, #25, #27
PaTAC1-1 *
PgTAC1-1 *
PaTAC1-2 *
PgTAC1-2 *
58
49
50
51
Intact Protein
Mutated Protein

도면8


(a)
TAC1-CRISPR
BH #8 #24 #25 #26 #27
(b)
TAC1-CRISPR
BH #24 #27
(c)
Petiole angle (°)
0 20 40 60 80
BH #8 #24 #25 #26 #27
TAC1-CRISPR
(d)
Stem height (cm)
0 5 10 15 20 25
BH #8 #24 #25 #26 #27
TAC1-CRISPR
(e)
Stem diameter (mm)
0 1 2 3 4
BH #8 #24 #25 #26 #27
TAC1-CRISPR

도면9


(a)
BH
TAC1-CRISPR #24
(b)
BH
TAC1-CRISPR #24
(c)
Branch angle (°)
0
10
20
30
40
50
60
BH #8 #24 #25 #26 #27
TAC1-CRISPR
(d)
Stem height (m)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
BH #8 #24 #25 #26 #27
TAC1-CRISPR
(e)
Stem diameter (mm)
0
5
10
15
20
BH #8 #24 #25 #26 #27
TAC1-CRISPR

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.