



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0047244

(43) 공개일자 2015년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 5/00 (2006.01) *A01H 1/06* (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0127073

(22) 출원일자 2013년10월24일

심사청구일자 2013년10월24일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김우택

경기 고양시 일산서구 대산로 142, 304동 601호
(주엽동, 문촌마을3단지아파트)

황제환

서울 서대문구 연희로11길 107, (연희동)

서동혜

경기 용인시 기흥구 신갈로 102, 103동 1203호 (신갈동, 원대마을한신아파트)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 8 항

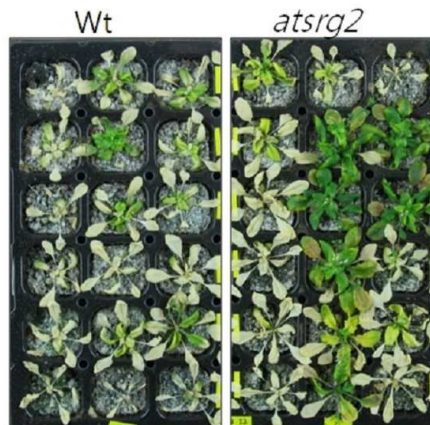
(54) 발명의 명칭 식물체의 염 또는 건조 스트레스 저항성 관련 유전자 및 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 식물체의 염 또는 건조 스트레스 저항성 증진용 조성물, 상기 조성물이 도입된 형질전환 식물체 및 상기 형질전환 식물체의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 식물체의 염 또는 건조 스트레스에 대한 저항성에 관여를 하며, 이를 이용하여 식물체를 형질전환 또는 발현 억제를 함으로써, 염 또는 건조 스트레스에 대한 저항성이 탁월하거나 또는 속성재배가 가능한 신기능 식물체로서 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4

5 weeks plants salt stress treated



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0078317

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 중견연구자지원사업(도약연구사업)

연구과제명 고등식물에서 U-box/RING E3 ubiquitin ligase 기능 분석을 통한 건조 스트레스 내성 반응
네트워크 규명 및 친환경 유용 형질전환체 개발 연구

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008152

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 작물의 ARM-U-box 도메인 유전자 기능 분석을 통한 환경스트레스 내성 신기능 GM 작물 개
발 연구

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열목록 제3서열, 제4서열 또는 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는 식물체의 염 또는 건조 스트레스 저항성 증진용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 서열목록 제3서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 식물체의 염 또는 건조 스트레스 저항성 증진용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 식물체의 염 또는 건조 스트레스 저항성 증진용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 T-DNA, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 T-DNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된 식물 세포.

청구항 7

상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된 식물체.

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계; 및

(b) 상기 식물세포로부터 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물체의 염 또는 건조 스트레스 저항성 증진용 조성물, 상기 조성물이 도입된 형질전환 식물체 및 상기 형질전환 식물체의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고등식물은 이동이 불가능하기 때문에 그들의 일생동안 다양한 환경 요인들인 가뭄, 고염(high salt), 중금속, 냉해, 열충격 및 오존과 같은 스트레스에 직면하게 된다. 이러한 비생물학적 스트레스는 작물의 생장과 발달의 제한 요인이 되며 이들 스트레스 중에서 수분 부족은 작물생산 감소의 주요 원인으로 여겨지는 가장 심각한 환경 요인이다. 세계적으로 물의 소비는 계속적으로 증가되어 왔으며, 깨끗한 물의 이용가능성은 인간에게 뿐만 아니라 고등식물에게 또한 중요한 문제가 될 수 있다. 식물은 단기적 또는 장기적인 물 부족에 대해 내성을 증가시키기 위해 신호 네트워크 경로를 조절하거나 스트레스-반응성 유전자들을 유도하는 등의 다양한 방어 전략을 작동시킨다. 이러한 수분 스트레스에 대한 세포적 또는 유전적 방어 메카니즘은 널리 알려져 있다 (Shinozaki and Yamaguchi-shinozaki, 2007). 그러나 아직까지 고등식물에 있어서 스트레스에 대한 내성이나 민감성에 관여하는 스트레스-관련 유전자들의 생물학적 기능들에 대한 지식은 여전히 부족한 상태다. 그러므로 작물의 생산성을 증가시키기 위해 스트레스 반응 유전자들에 대한 기능 연구가 중요하다.

[0003] 본 발명자들은 애기장대의 염 또는 건조 스트레스에 의해 발현이 유도되는 *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자를 분리획득 한 후, 이들 유전자의 발현 억제 돌연변이체를 제작하여 이들의 생리적인 표현형을 분석하였다.

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 식물체의 염 또는 건조 스트레스 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열목록 제3서열 또는 제4서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 구체적으로는 서열목록 제1서열 또는 제2서열의 뉴클레오타이드 서열이 상술한 식물체의 형질에 관여를 하고 이들 유전자의 발현을 억제할 경우 상술한 개선된 형질을 갖는 형질전환 식물체를 수득할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명의 완성하였다.

[0006] 따라서 본 발명의 목적은 식물체의 염 또는 건조 스트레스 저항성 증진용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된 식물세포 및 식물체를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제3서열, 제4서열 또는 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제하는 핵산분자를 포함하는 식물체의 염 또는 건조 스트레스 저항성 증진용 조성물을 제공한다.

- [0011] 본 발명자들은 식물체의 염 또는 건조 스트레스 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열목록 제3서열 또는 제4서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 구체적으로는 서열목록 제1서열 또는 제2서열의 뉴클레오타이드 서열이 상술한 식물체의 형질에 관여를 하고 이들 유전자의 발현을 억제할 경우 상술한 개선된 형질을 갖는 형질전환 식물체를 수득할 수 있음을 확인하였다.
- [0012] 본 발명에 따르면, 서열목록 제1서열 및 제2서열의 뉴클레오타이드 서열은 각각 *AtSRG1(At3g49810)* 유전자 및 *AtSRG2(At5g65920)* 유전자의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0013] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.
- [0014] 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈 (예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.
- [0015] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 구체적으로는 70%의 상동성, 보다 더 구체적으로는 80%의 상동성, 가장 구체적으로는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0016] 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 식물체에 염 또는 건조 스트레스를 가할 경우 *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자의 발현이 증가하며, 상기 유전자의 발현을 억제시킬 경우 이러한 스트레스들에 대한 저항성이 증가함을 확인하였다.
- [0017] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 서열목록 제3서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는 식물체는 식물의 발아 시기에 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된다.
- [0018] 본 발명의 다른 구체적인 구현예에 따르면, 상기 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는 식물체는 식물의 성체 시기에 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구체적인 구현예에 따르면, 상기 서열목록 제3서열 및 제4서열의 조합으로 구성된 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는 식물체는 식물의 발아 시기 내지 성체 시기에 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된다.
- [0020] 본 발명에 따르면, 본 명세서에서 용어 “성체 시기”는 종자를 토양에 심어 발아 후 유묘 확립(seedling establishment)이 완료된 이후의 단계를 의미한다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 핵산분자는 T-DNA, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 핵산분자는 T-DNA이다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 "siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와

상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.

[0023]

siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음)등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 타겟 유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 짝을 이루는 데 지장이 없는 길이이면 특별히 한정되지 않는다.

[0024]

본 명세서에서 용어 "shRNA"는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드를 의미하며, *in vivo*상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루고 있다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.

[0025]

본 명세서에서 용어 "miRNA(microRNA)"는 유전자 발현을 조절하며, 전장 20-50개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 20-45개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 20-40개 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 20-30개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 21-23개의 뉴클레오타이드로 구성된 단일 가닥 RNA분자를 의미한다. miRNA는 세포 내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드이며, 짧은 스템-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는 2이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며, 상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.

[0026]

본 명세서에서 용어 "리보자임(ribozyme)"은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기 서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 되어 있다.

[0027]

본 명세서에서 용어 "PNA(Peptide nucleic acid)"는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol. 254: pp1497-1500]). PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다. PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.

[0028]

본 명세서에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"이란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

[0029]

상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아로믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당

모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.

[0030] 본 명세서에서 용어 "T-DNA"는 *Agrobacterium* 종의 Ti(tumor-inducing) 플라스미드의 전달(transfer) DNA로서 숙주 식물세포의 핵으로 전달되는 DNA 절편을 말한다. T-DNA의 양 끝 가장자리에는 25 bp의 반복서열이 존재하며, 전달은 왼쪽 경계(border)에서 전달이 시작되어 오른쪽 경계에서 종료된다. 박테리아 T-DNA는 약 20,000 bp 길이로서 이들의 삽입에 의하여 타겟 유전자를 붕괴시킴으로서 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis)를 일으키는 데에 사용되며, 삽입된 T-DNA 서열은 돌연변이를 일으킬 뿐 아니라 타겟 유전자를 표지하기도 한다. 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 Ti 플라스미드의 형질도입을 통하여 *AtSRG1(At3g49810)* 및 *AtSRG2(At5g65920)* 유전자가 발현 억제된 애기장대의 종자(종자번호: *AtSRG1* - salk_012549, *AtSRG2* - salk_054774)를 SIGNAL Salk Institute Genomuc Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/>)에서 구입하였다.

[0031] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 상술한 조성물로 형질전환된 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된 식물세포를 제공한다.

[0032] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 상술한 조성물로 형질전환된 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된 식물체를 제공한다.

[0033] 본 발명의 형질전환 식물세포 및 형질전환 식물체를 제조하기 위하여 당업계에 일반적으로 공지된 방법(*Methods of Enzymology*, Vol. 153, (1987))에 따라 실시될 수 있다. 외래성 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물을 형질전환시킬 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며(Chilton et al. *Cell* 11:263:271(1977)), 직접 외래성 폴리뉴클레오타이드를 식물 세포내로 도입시켜 식물을 형질전환시킬 수 있다(Lorz et al. *Mol. Genet.* 199:178-182;(1985)). 예를 들어, T-DNA 부위를 포함하지 않는 벡터를 이용하는 경우에는 전기천공법(electroporation), 입자충격법(microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake)을 이용할 수 있다.

[0034] 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이 외래성 폴리뉴클레오타이드로 형질전환된 아그로박테리움 투메페이스언스(*Agrobacterium tumefaciens*)로 식물 세포나 종자 등을 감염시키는 방법이다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호). 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물 세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.

[0035] 본 명세서에서, 용어 "식물(체)"는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.

[0036] 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물체는 특별하게 제한되지 않는다. 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물로는 상치, 배추, 감자 및 무를 포함하는 대부분의 쌍자엽 식물(dicotyledonous plant) 또는 벼, 보리, 바나나 등의 단자엽 식물(monocotyledonous plant)을 모두 이용될 수 있으며, 특히 토마토와 같이 과피가 얇아 노화에 따른 품질 저하가 급격히 나타나는 식용 채소 또는 과일 그리고 잎이 주된 상품으로 거래되는 식물 등에 적용할 경우 저장 효율을 높이는 데 효과적이다. 바람직하게는, 본 발명의 방법은 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 툴페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 식물체에 적용된다.

[0037] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다:

[0038] (a) 본 발명에서 개시하는 상기 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계; 및

[0039] (b) 상기 식물세포로부터 염 또는 건조 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

- [0040] 식물발현용 제조합 벡터를 식물세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 실시될 수 있다.
- [0041] 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제(예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물세포는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (npt II) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜드로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).

- [0042] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택된다.

발명의 효과

- [0043] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0044] (a) 본 발명은 식물체의 염 또는 건조 스트레스 저항성 증진용 조성물, 상기 조성물이 도입된 형질전환 식물체 및 상기 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0045] (b) 본 발명은 염 또는 건조 스트레스에 대한 저항성이 탁월하거나 또는 속성재배가 가능한 신기능 식물체로서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1은 염분(salt)과 건조(drought) 스트레스 처리시 *AtSRG1* 및 *AtSRG2* 유전자의 발현 분석 결과를 보여준다. 애기장대에 염분 스트레스를 처리한 후 반정량적(semi-quantative) RT-PCR을 통하여 *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자의 발현 정도를 분석하였다. 도 1에서는 염분 스트레스 뿐만 아니라 식물에게 가장 중요한 건조 스트레스에 대해 유전자들의 발현 정도를 분석하였다. 그 결과 건조 및 염분에 대해서 두 유전자 모두 정도의 차이는 있으나 mRNA 발현량이 뿌리조직에서 특이적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 기본적인 발현 정도와 스트레스에 의해 발현이 증가하는 양상이 비슷한 것으로 보아, 이는 두 유전자가 서로 상호 보완적인 기능을 가지고 있을 가능성이 있음을 알려주고 있다.
- 도 2a 및 2b는 *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자의 녹-아웃(knock-out) 돌연변이체 확보 결과를 보여준다. ABRC를 통해서 주문한 *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자가 녹-아웃된 T-DNA가 삽입된 돌연변이체를 확보하고 지노타이핑(genotyping) PCR과 RT-PCR을 통해 두 돌연변이체가 녹-아웃 되었음을 확인하였다. 도 2a에서 볼 수 있듯이, *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자는 ORF 위에 삽입된 T-DNA가 존재한다. 삽입된 T-DNA상의 서열 정보와 두 유전자의 정보를 이용해 프라이머를 제작한 결과, 확실히 녹-아웃 됨을 확인하였다. 또한, 도 2b는 *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자에 대한 기능 손실(loss of function) 연구를 진행하기 위해 상기 두 유전자의 녹-아웃(knock-out) 돌연변이체의 지노타이핑과 RT-PCR을 통해 그 녹-아웃 여부를 확인한 결과를 나타내 그림이다.
- 도 3a 내지 3d는 *AtSRG1* 유전자의 녹-아웃 돌연변이체를 이용한 염분 스트레스 하에서의 표현형 분석 결과를 보여준다. *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자의 생체 내 기능 분석에 구체적으로 접근하기 위하여 우선적으로 확보한 *AtSRG1* 녹-아웃 돌연변이체와 야생종에 염분 스트레스를 준 후 그 표현형의 차이를 관찰하였다. 도 3a는 애기장대 야생종과 *AtSRG1* 유전자의 녹-아웃 돌연변이체를 NaCl이 첨가된 배지(media)에서 2일 동안 키운 후 그 결과에 대한 사진 자료와 그래프이다. 이 실험의 결과 유전자가 기능을 상실할 경우 염분 저항성이 증가하였으며 야생종에 비해 유근(radicle)이 많이 나온 것을 볼 수 있었다. 도 3b는 야생종과 돌연변이체가 유근이 나온 이후 떡잎이 나올 때까지의 발아율을 조사한 실험이다. 사진 자료와 그래프를 보면 돌연변이체의 경우 야생종에 비해 떡잎이 나온 개체가 많음을 볼 수 있었다. 이를 통해 유추해 볼 때에 유근 형성 시기에 보였던

돌연변이체의 염분 저항성이 떡잎이 나오는 시기까지 유지되는 것으로 판단할 수 있었다. 도 3c는 돌연변이체가 애기장대 발아 시기에 염분 저항성을 보임을 확인한 후에 뿌리 형성시 까지 그 저항성이 유지되는지 여부를 확인한 실험이다. 사진 자료를 보면 NaCl 농도가 150 mM 함유된 배지에서 야생종에 비해 돌연변이체의 뿌리 생장이 더욱 많이 일어났음을 볼 수 있었다. 위의 도 3a 및 3b 자료와 종합해 보면, *AtSRG1* 유전자의 녹-아웃 돌연변이체는 초기 발아 시기 애기장대의 전반적인 성장 과정에서 염분 스트레스에 대해 저항성을 가짐을 확인할 수 있었다. 도 3d는 발아 시기에 확인할 수 있었던 돌연변이체의 염분 저항성이 발아 이후의 단계 까지 유지되는지 확인한 실험이다. 그 결과 NaCl 농도가 높은 배지에 씨를 심어 4주가 되기 까지 식물을 키웠으며 생존한 식물체 수를 비교해 보았을 때에 돌연변이체의 생존율이 높은 것을 볼 수 있었다. 이는 돌연변이체의 염분 저항성이 발아시기에서 뿐만 아니라 그 이후의 단계에 까지 유지됨을 보여주는 실험 결과이다.

도 4는 *AtSRG2* 유전자의 녹-아웃 돌연변이체의 염분 스트레스에 대한 녹색 식물(green plant)에서의 표현형 분석 결과를 보여 준다. *AtSRG1*의 녹-아웃 돌연변이체에 대해 표현형을 분석한 이후 *AtSRG2* 녹-아웃 돌연변이체가 염분 저항성을 가지고 있는지 여부를 조사 하였다. 도 4는 녹색 식물에서의 식물체에 염분 스트레스를 처리해 그 저항성이 존재하는지 여부를 조사한 실험에 대한 그림이다. 도 3d와는 다르게 종자(seed) 상태에서부터 염분 스트레스를 처리한 것이 아니라 식물을 3주 동안 키운 후 NaCl을 처리하였으며 사진은 스트레스를 2주 동안 처리한 식물체이다. 도 4를 보면, *AtSRG2* 녹-아웃 돌연변이체는 야생종 식물체에 비해 강한 염분 저항성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

도 3a-3d와 도 4에 걸친 표현형 분석 결과를 종합해 보면 *AtSRG1* 유전자의 경우 초기 발아 시기에 그리고 *AtSRG2* 유전자의 경우 녹색 식물에서 각각 염분 스트레스 반응에 관여함을 알 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험 방법

식물 성장조건 및 시료 채취

AtSRG1(*At3g49810*) 유전자와 *AtSRG2*(*At5g65920*) 유전자의 발현억제 돌연변이 식물체는 *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 애기장대의 종자(종자번호: *AtSRG1* -SALK_012549, *AtSRG2* - SALK_054774)를 SIGNAL Salk Institute Genomuc Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/>)에서 구입하였다.

이러한 *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자 각각이 파괴된 돌연변이체 및 야생형 애기장대 종자를 30% 락스(유한-크로락스)에 6분간 살균 처리한 후 물로 5회 이상 세척하였다. 처리된 종자는 1% 수크로스, B5 비타민(12 mg/L), 0.7% 아가로 구성된 MS 배지(Duchdfe Biochemie)에 수직으로 심은 후 약 2주간 생장 챔버(continuous light)에서 키운 식물을 재료로 하여 수행하였다. 광 조건의 전체 식물체(Green whole plant)를 재료로 사용한 경우는 종자를 Sunshine MIX #5 (Sun GroHorticulture) 흙을 넣어 준 화분에 심어서 약 3주간 생장 챔버(continuous light)에서 성장시킨 식물을 재료로 하여 수행하였다.

스트레스(염, 건조) 처리

AtSRG1(*At3g49810*) 유전자와 *AtSRG2*(*At5g65920*) 유전자는 염분 스트레스 반응에 의해서 유도될 것 이라고 예상되었다. 이러한 가능성을 확인하기 위해서 애기장대에 염분 스트레스와 식물체에 가장 중요하게 작용하는 건조 스트레스를 처리한 후 반정량적 RT-PCR을 통하여 *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자의 발현 정도를 분석하였다.

스트레스에 대한 *AtSRG1* 유전자와 *AtSRG2* 유전자의 발현을 확인하기 위해, 건조 스트레스는 배지에서 2주간 키운 야생형 애기장대 유묘를 공기 중에 노출한 후 1.5시간 및 3시간 후에 샘플링하였다. 염 스트레스는 2주간 키운 애기장대에 300 mM의 염화나트륨을 처리한 후 1.5시간 및 3시간이 경과한 후 샘플링하였다. 샘플링 된 조직을 액체 질소를 사용하여 막자 사발에서 갈아 가루로 만든 다음 2 ml/g의 추출 완충액(4 M 구아니딘-HCl 20 mM, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA(USB), 0.5% 사르코실(SIGMA), pH 9)과 β -머캅토에탄올(SIGMA-ALDRICH)을 이용하

여 추출한 후 코니칼 튜브로 옮긴 다음 이를 동량의 PCI(페놀 : 클로로포름 : 이소아밀알콜 = 25 : 24 : 1)와 혼합하여 5분간 흔들어 준 다음 3,500 rpm에서 25분간 원심분리(한일 원심분리기, HA-1000-3)하였다. 원심분리 후 상층의 유기 용매층을 제거하고, 동량의 PCI를 혼합하여 흔든 다음, 원심분리하는 과정을 2회 반복하여 수행하고, 이때 형성된 아래의 수용액 층을 2회 에탄올 침전 및 1회 LiCl 침전 방법을 사용하여 RNA를 분리하였다.

정량적 역전사효소(RT)-PCR

발현 억제 돌연변이 식물체 및 과발현 형질전환 식물체와 야생종의 잎으로부터 전체 RNA를 추출하여 올리고 dT 프라이머와 MMLV 역전사효소(Fermentas)를 이용하여 단일가닥 cDNA를 합성하였다. PCR 수행을 위해 주형으로 20 ng의 cDNA를 사용하였으며 두 종류의 프라이머를 각각 10 pmole 씩, 10 x Taq 폴리머라제 완충용액(Intron) 2 μ l, dNTP 혼합액(각 1.25 mM) 2 μ l 및 1 유닛의 Taq DNA 폴리머라제(intron)를 넣어 총 부피를 20 μ l로 만들었다. 바이오라드 C-1000 DNA 썬멜사이클러로 PCR을 수행하였다. 먼저 94℃에서 2분간 변성시킨 후, 94℃에서 20초, 52℃에서 20초, 72℃에서 45초를 반복하는 것을 25회 수행하였고, 25회 반복이 끝난 후 72℃에서 4분간 추가로 중합반응을 수행한 다음 -20℃에 냉동 보관하였다. 사용된 유전자의 프라이머는 아래의 표 1과 같다:

표 1

RT-PCR에 사용된 유전자의 프라이머

프라이머	서열	비고
# <i>AtSRG1</i> U3 FW	5'- CAAGCTAGGGTTCATGCTTTG -3'	서열목록 제 5 서열
# <i>AtSRG1</i> 17 RV	5'- CAGACACCTCATCAGACC 3'	서열목록 제 6 서열
# <i>AtSRG2</i> u5 FW	5'- GGTCAAACCTACGAGAGGTCC -3'	서열목록 제 7 서열
# <i>AtSRG2</i> 20 RV	5'- CGATTTGAGCAGCGTTAACG -3'	서열목록 제 8 서열
RD29a FW	5'- CAGGTGAATCAGGAGTTGTT -3'	서열목록 제 9 서열
RD29a RV	5'- CCGGAAATTTATCCTCTTCT -3'	서열목록 제 10 서열
EV136F Act8FW	5'- TACTGATTACCTCATGAAGATCCTTAC -3'	서열목록 제 11 서열
EV137R Act8 RV	5'- AAACGATGTCTCTTTAGTTTAGAAGC -3'	서열목록 제 12 서열

T-DNA가 삽입된 돌연변이체의 지놈 DNA 추출 및 동형접합 돌연변이체 획득

야생형 및 발현 억제 돌연변이 애기장대의 종자를 흙에 심어 2주 동안 키운 뒤 각각의 잎을 샘플링한 후 액체질소를 이용하여 간 후 700 μ l/66 mg의 추출 완충액(2% CTAB, 100 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% PVP40)을 혼합한 후 65℃에서 10분간 배양해줌으로써 추출하였다. 그 다음 570 μ l의 CI(클로로포름 : 이소아밀알콜 = 24 : 1)를 넣고 혼합하여 5분간 흔들어 주었다. 그리고 13,000 rpm에서 10분간 원심분리(eppendorf, 5425R)하였다. 원심분리 후 상층의 수용액 300 μ l를 새로운 EP 튜브에 옮긴 후 100% 에탄올을 700 μ l 첨가하여 게놈 DNA를 분리 하고, 70% 에탄올을 이용하여 세척과정을 거쳐 최종적으로 게놈 DNA를 분리한 후 3차 DW에 녹여서 사용하였다. 이후 T-DNA 보더 프라이머(boder primer)(LBa1)와 T-DNA가 삽입된 부위의 앞, 뒤 부분의 프라이머를 이용하여 지노타이핑 PCR을 진행하였다.

표 2

지노타이핑 PCR에 사용된 프라이머

프라이머	서열	비고
# <i>AtSRG1</i> u3 FW	5'- CAAGCTAGGGTTCATGCTTTG -3'	서열목록 제 5 서열
# <i>AtSRG1</i> u4 RV	5'- TCCCAATGCTTATTGCAAAAC -3'	서열목록 제 13 서열
# <i>AtSRG2</i> u5 FW	5'- GGTCAAACCTACGAGAGGTCC -3'	서열목록 제 7 서열
# <i>AtSRG2</i> u6 RV	5'- ATCCGTTGTGTGATTGTTGACC -3'	서열목록 제 14 서열
LBa1 boder primer	5'- TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG -3'	서열목록 제 15 서열

식물의 발아 시기에 고염 스트레스에 대한 민감도 측정

AtSRG1(*At3g49810*) 유전자와 *AtSRG2*(*At5g65920*) 유전자 각각이 파괴된 돌연변이체 및 야생형 애기장대 종자를

30% 락스(유한-크로락스)에 6분간 살균 처리한 후 물로 5회 이상 세척하였다. 처리된 종자는 1% 수크로스, B5 비타민(12 mg/L), 0.7% 아가로 구성된 MS 배지(Duchefa Biochemie)에 50 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM 및 175 mM의 NaCl을 각각 추가로 첨부한 배지와 NaCl이 들어있지 않은 배지를 만들어 수직 및 수평으로 심은 후 4℃ 챔버(암조건)에서 3일간 임비비션(imbibition)을 거친 후 생장 챔버(continuous light)에서 관찰을 통해 염분 스트레스에 대한 민감도를 측정하였다.

[0066]

성체 식물의 고염 스트레스에 대한 민감도 측정

[0067]

애기장대 야생종과 *AtSRG1(At3g49810)* 유전자와 *AtSRG2(At5g65920)* 유전자의 녹-아웃 돌연변이체를 Sunshine MIX #5 (Sun Gro Horticulture) 흙을 넣어 준 화분에 심어서 약 3주간 생장 챔버(continuous light)에서 성장시킨 식물에 200 mM, 250 mM 및 300 mM의 NaCl이 함유되어있는 물을 3일 간격으로 준 후 그 뒤 NaCl이 함유되지 않은 물을 주어 처음 고염 스트레스를 처리한 후 2일이 되는 시점에 지상부의 백화현상을 통해 고염 스트레스에 내성을 갖는 정도를 측정하였다.

[0068]

실험결과

[0069]

고염 스트레스 및 건조 스트레스 처리에 따른 유전자 발현변화

[0070]

애기장대에 고염 스트레스와 건조 스트레스를 처리한 후 반정량적 RT-PCR을 통하여 *AtSRG1(At3g49810)* 유전자와 *AtSRG2(At5g65920)* 유전자의 발현정도를 분석하였다. 염분 스트레스 하에서 *AtSRG1* mRNA와 *AtSRG2* mRNA 발현이 뿌리 조직에서 특징적으로 증가하는 것을 확인할 수 있다(도 1). 또한 건조 스트레스에 대해서도 염분 스트레스 만큼은 아니지만 뿌리조직에 특징적으로 mRNA 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(도 1). 두 유전자의 기본 발현 정도의 양과 고염과 건조 스트레스에 대한 발현 증가 양상이 유사한 것으로 보아 서로 상호 보완적으로 기능할 가능성이 있음을 유추할 수 있었다.

[0071]

식물의 발아 시기에 고염 스트레스에 대한 민감도 측정

[0072]

AtSRG1(At3g49810) 유전자와 *AtSRG2(At5g65920)* 유전자의 생체 내 기능 분석에 구체적으로 접근하기 위하여 앞서 제작한 녹-아웃 돌연변이체와 야생종에 고염스트레스를 준 후 그 표현형의 차이를 관찰하였다.

[0073]

우선적으로 두 상동 유전자 중에서 *AtSRG1* 유전자가 고염 스트레스 반응에 관여하는지 여부를 알기 위하여 애기장대 야생종과 *AtSRG1* 유전자의 녹-아웃 돌연변이체를 기본배지와 NaCl이 함유되어있는 염분 배지에 심어 고염 스트레스를 주어 표현형을 분석하였다(도 3a-3d). 그 결과 *AtSRG1* 유전자가 녹-아웃된 돌연변이체에서 발아 시기에 고염 스트레스 저항성이 증가함을 확인할 수 있었으며 그 저항성은 발아 이후의 시기에 까지 유지됨을 확인할 수 있었다.

[0074]

이러한 발아 시기 고염 스트레스 반응에 대한 표현형 분석 결과 발아 시기에는 *AtSRG1*이 고염 스트레스 반응에 관여함을 확인할 수 있었다.

[0075]

성체 식물의 고염 스트레스에 대한 민감도 측정

[0076]

돌연변이 식물체가 발아 이후 성체가 된 식물체에서 고염 스트레스에 대해 어떻게 반응하는지 분석하기 위해, 앞서 제작한 녹-아웃 돌연변이체 및 야생종에 고염 스트레스를 준 후 표현형 차이를 관찰하였다.

[0077]

애기장대 야생종과 *AtSRG2(At5g65920)* 유전자의 녹-아웃 돌연변이체를 약 3주간 키운 후 200 mM, 250 mM 및 300 mM의 NaCl이 첨가된 물을 3일 간격으로 처리 후 3일 후 다시 맹물을 주어 처음 고염 스트레스를 처리한 지 2주가 되는 시점에 관찰을 하였다(도 4). *AtSRG2*의 녹-아웃 돌연변이체의 고염 스트레스에 저항성이 있음을 확인할 수 있었다.

[0078]

발아 시기와 성체 시기 각각에 대해 실시한 고염 스트레스 처리 후 표현형 관찰 결과를 통해 *AtSRG1(At3g49810)*과 *AtSRG2(At5g65920)* 두 유전체는 각각 발아 시기와 성체 시기에 고염 스트레스 반응에 관여함을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 이중 녹-아웃 식물체의 경우 발아 이후 전 시기에 걸쳐 고염 스트레스 저항성이 증진된다

는 사실을 확인할 수 있다.

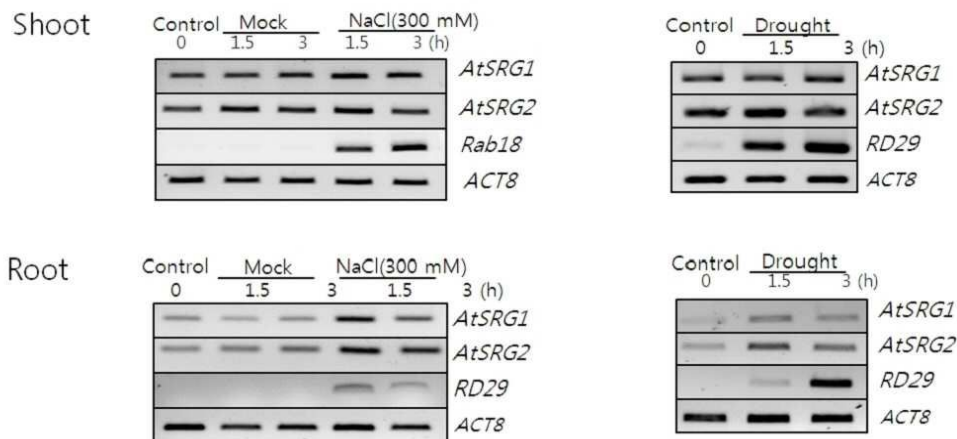
[0079]

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

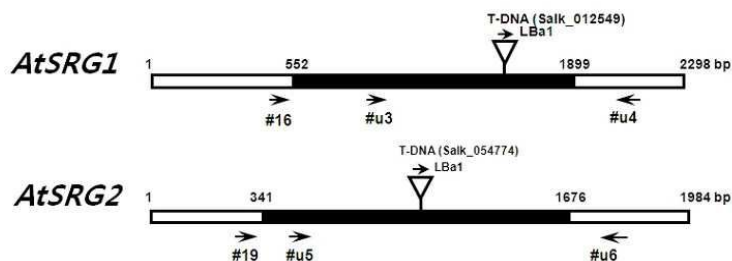
도면

도면1

Semi-quantative RT-PCR

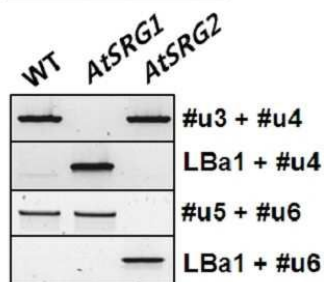


도면2a

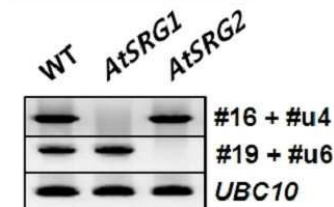


도면2b

Genotyping PCR

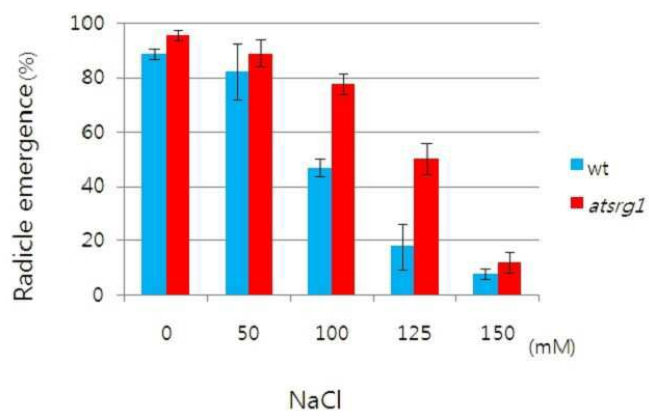
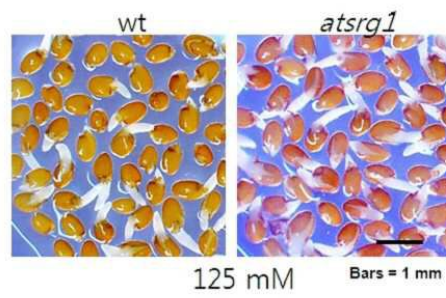


RT-PCR



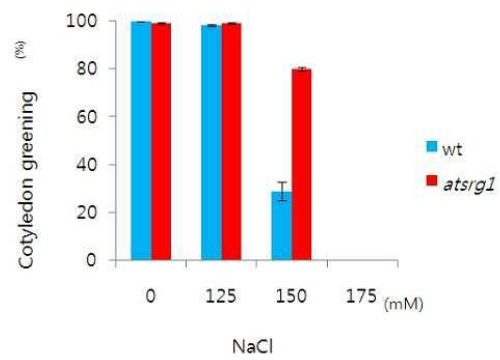
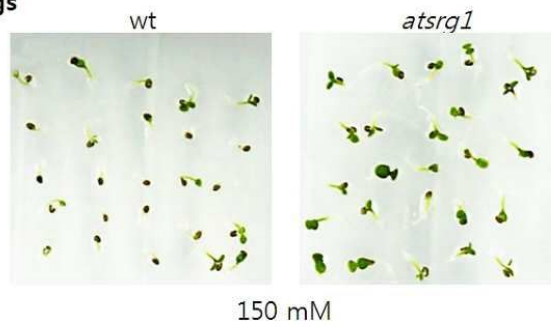
도면3a

2 days seeds



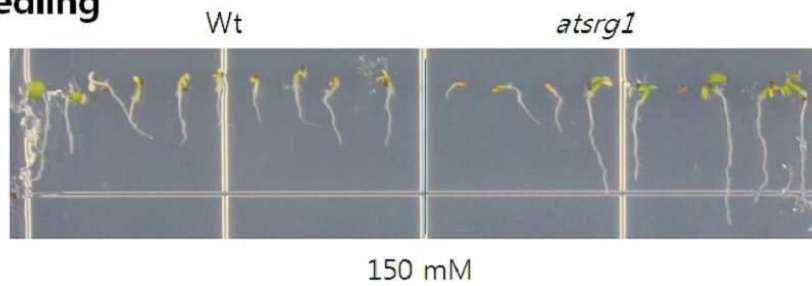
도면3b

4 days seedlings



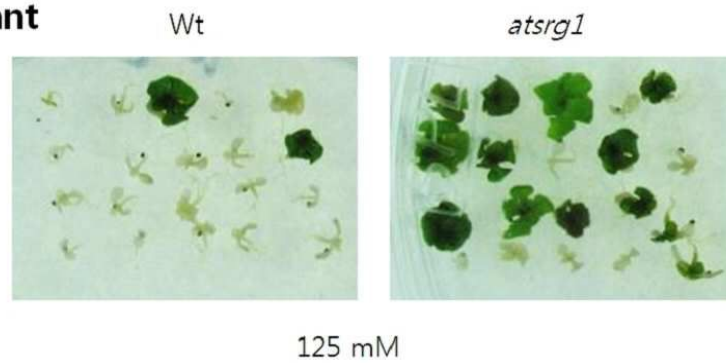
도면3c

7 days seedling



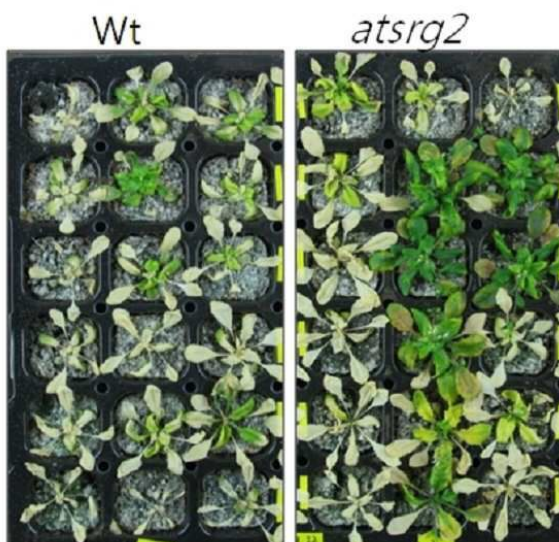
도면3d

4 weeks plant



도면4

5 weeks plants salt stress treated



서열목록

<110> Yonsei University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Genes Related to Salt or Drought Stress Resistances and Transformed Plants with the Same

<130> PN130569

<160> 15

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1347

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atgccgatgt ttcagccgtt aaagagagat gggtaatag gatttgaagg tgggtggtgat 60
gggcaagtct tagatctgga tactgcagtg aaagatggag ttctcgttgg tgttaatggt 120
ggtggtgttg gagggtgttg tgagaaattg gatctgaaga agatgataaa ggagctagat 180

ttacaagata taccttctgt tttcatttgt cctatctcct tagagccgat gcaagatcct 240
gtgactttgt gtactggcca aacctatgaa aggttaaaca ttcacaaatg gtttaaccta 300
ggtcacttga cttgtcctac tacaatgcaa gagctttggg atgatacggg aactcctaata 360
aaaactcttc atcatttgat ctatacttgg ttctctcaga agtatgtgtt gatgaagaaa 420
cgttctgagg atgttcaagg acgagctatt gagattttgg ggactttgaa gaaagctaaa 480
ggtcaagcta gggttcatgc tttgagttag cttaaacaga ttgttattgc tcattcttatg 540
gcgaggaaga ctgttgttga agaaggtggg gtctctgtga tctcttctct tttgggtcct 600

tttacttctc atgctgttgg atctgaggtt gttgctattc ttgtgagctt tgatcttgat 660
tctgattcga aatccggtct gatgcaacca gctaagggtt ctttgattgt tgatatgttg 720
aatgatggat ctaatgagac taagatcaat tgtgctagat tgattagagg attggtggaa 780
gagaaagggt ttagagcaga gcttgtttca agtcatagtt tgcttgttgg gttaatgaga 840
ttggttaagg ataagagaca tagaaatgga gtatctcttg cacttcggtt gcttaaaccg 900
atttcggttc ataaacaagt tcgaagcttg atggtttagca ttggagcagt gcctcaatta 960
gttgatatct taccgtcttt agaccgggaa tgtttggagt tagctctgtt tgttcttgat 1020

gctttgtgta cagacgtgga aggaagagtt gctgtcaaag actctgcaaa cacaatacct 1080
tatacagtta ggggtgctgat gaggtgtctt gagaattgca ctaactacgc gctgtcgatt 1140
ctttggtctg tctgcaaatt agctccagaa gaatgttcac cacttgctgt tgagggtggt 1200
cttgctgcaa agctgttact cgtgatccag agcgggtgtg atgcagcgtt gaagcagcgg 1260
tcagcagagc tacttaagct ttgtagtcta cattattcag acaccatgtt tatttccaaa 1320

tgcaaaactca caaggacaat ccaatag 1347

<210> 2

<211> 1335

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

atgccaatgt ttcagccttc taagaacggt gggtttgatg ggcatatctt agatctacac 60

tccggcggta aagacggtgt tcttggcggc ggagatggga aatttctggt ggttgttacc 120

gatgagaaga agaaattgga tttgaaggag atgatttctg agctggaatt acctgaaata 180

ccctctgttt tcatctgtcc tatctctcta gagccgatgc aagatccagt gaccttgtgt 240

actggtcaaa cctacgagag gtccaacatt ctcaaatggt tcaatatagg gcattgtact 300

tgcccaacga cgatgcaaga gctttgggat gatttggtea ctccatacaa gactcttcac 360

caattgatct acacttggtt ttcacagaag tatgttttga tgaagaaacg atctgaagat 420

gtgcaaggac gtgctattga gattctgggt acgttgagaa aggctaaagg gaaagcaaag 480

gttcatgctt taagcgagct taagcaagtt gtgatggctc acgctattgc taagaagact 540

gttgttgatg aagggtggagt ctttgtgac tcttctcttt taagtccttt tacttctcac 600

gctgttggat ctgaggctat agctattctt gttaatcttg agcttgactc tgattccaaa 660

gctggattga tgcaaccagc tagggtctcg ttgatggttg atatgttgaa tgatggttcg 720

attgaaacta agatcaattg tgctagattg attggaaggt tggaggagga gaaaggtttt 780

agagcagagc ttgtttctag tcatagtttg cttgttggat taatgagatt ggttaaagat 840

aggagacgaa gaaacggcgt ttcgcctgcg ttaacgctgc tcaaatcggg ttctgttcat 900

aaacaagtta ggaacttggt ggtaggatt ggtgcagttc ctcaattggt tgatgttttg 960

ccatgttttg atgtggagtg tttagagtca gctcttttcg tgttggattc gttatgttta 1020

gaaagcgaag gcagaattgc tttgaaagat tcggttaaca cgattccgca taccgttagg 1080

ttactgatga aggtatcaga gaaatgcaca aactatgcga tatcgattct ttggtcagtt 1140

tgcaaatag cttctgaaga atgttcatct cttgctgttg aagttggttt ggctgcaaag 1200

cttttgcttg tgatacaaag tggatgtgat ccagctttga agcaacgttc agctgagcta 1260

ttgaagttat gtagtctaca ttattcagac tcaatgttta tctccaaatg taaactcaca 1320

agaactatcc aataa 1335

<210> 3

<211> 448

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

Met Pro Met Phe Gln Pro Leu Lys Arg Asp Gly Leu Ile Gly Phe Glu

1 5 10 15

Gly Gly Gly Asp Gly Gln Val Leu Asp Leu Asp Thr Ala Val Lys Asp

20 25 30

Gly Val Leu Gly Gly Val Asn Gly Gly Gly Val Gly Val Val Asp Glu

35 40 45

Lys Leu Asp Leu Lys Lys Met Ile Lys Glu Leu Asp Leu Gln Asp Ile

50 55 60

Pro Ser Val Phe Ile Cys Pro Ile Ser Leu Glu Pro Met Gln Asp Pro

65 70 75 80

Val Thr Leu Cys Thr Gly Gln Thr Tyr Glu Arg Leu Asn Ile His Lys

85 90 95

Trp Phe Asn Leu Gly His Leu Thr Cys Pro Thr Thr Met Gln Glu Leu

100 105 110

Trp Asp Asp Thr Val Thr Pro Asn Lys Thr Leu His His Leu Ile Tyr

115 120 125

Thr Trp Phe Ser Gln Lys Tyr Val Leu Met Lys Lys Arg Ser Glu Asp

130 135 140

Val Gln Gly Arg Ala Ile Glu Ile Leu Gly Thr Leu Lys Lys Ala Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala His Leu Met Ala Arg Lys Thr Val Val Glu Glu Gly Gly Val Ser

180 185 190

Val Ile Ser Ser Leu Leu Gly Pro Phe Thr Ser His Ala Val Gly Ser

195 200 205

Glu Val Val Ala Ile Leu Val Ser Leu Asp Leu Asp Ser Asp Ser Lys

210 215 220

Ser Gly Leu Met Gln Pro Ala Lys Val Ser Leu Ile Val Asp Met Leu

225 230 235 240
 Asn Asp Gly Ser Asn Glu Thr Lys Ile Asn Cys Ala Arg Leu Ile Arg
 245 250 255
 Gly Leu Val Glu Glu Lys Gly Phe Arg Ala Glu Leu Val Ser Ser His
 260 265 270
 Ser Leu Leu Val Gly Leu Met Arg Leu Val Lys Asp Lys Arg His Arg
 275 280 285
 Asn Gly Val Ser Pro Ala Leu Arg Leu Leu Lys Pro Ile Ser Val His
 290 295 300
 Lys Gln Val Arg Ser Leu Met Val Ser Ile Gly Ala Val Pro Gln Leu

 305 310 315 320
 Val Asp Ile Leu Pro Ser Leu Asp Pro Glu Cys Leu Glu Leu Ala Leu
 325 330 335
 Phe Val Leu Asp Ala Leu Cys Thr Asp Val Glu Gly Arg Val Ala Val
 340 345 350
 Lys Asp Ser Ala Asn Thr Ile Pro Tyr Thr Val Arg Val Leu Met Arg
 355 360 365
 Val Ser Glu Asn Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Ser Ile Leu Trp Ser Val
 370 375 380

 Cys Lys Leu Ala Pro Glu Glu Cys Ser Pro Leu Ala Val Glu Val Gly
 385 390 395 400
 Leu Ala Ala Lys Leu Leu Leu Val Ile Gln Ser Gly Cys Asp Ala Ala
 405 410 415
 Leu Lys Gln Arg Ser Ala Glu Leu Leu Lys Leu Cys Ser Leu His Tyr
 420 425 430
 Ser Asp Thr Met Phe Ile Ser Lys Cys Lys Leu Thr Arg Thr Ile Gln
 435 440 445
 <210> 4

 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

Met Pro Met Phe Gln Pro Ser Lys Asn Gly Gly Phe Asp Gly His Ile

1 5 10 15

Leu Asp Leu His Ser Ala Val Lys Asp Gly Val Leu Gly Gly Gly Asp

20 25 30

Gly Lys Phe Leu Val Val Val Thr Asp Glu Lys Lys Lys Leu Asp Leu

35 40 45

Lys Glu Met Ile Ser Glu Leu Glu Leu Pro Glu Ile Pro Ser Val Phe

50 55 60

Ile Cys Pro Ile Ser Leu Glu Pro Met Gln Asp Pro Val Thr Leu Cys

65 70 75 80

Thr Gly Gln Thr Tyr Glu Arg Ser Asn Ile Leu Lys Trp Phe Asn Ile

85 90 95

Gly His Cys Thr Cys Pro Thr Thr Met Gln Glu Leu Trp Asp Asp Leu

100 105 110

Val Thr Pro Asn Lys Thr Leu His Gln Leu Ile Tyr Thr Trp Phe Ser

115 120 125

Gln Lys Tyr Val Leu Met Lys Lys Arg Ser Glu Asp Val Gln Gly Arg

130 135 140

Ala Ile Glu Ile Leu Gly Thr Leu Arg Lys Ala Lys Gly Lys Ala Lys

145 150 155 160

Val His Ala Leu Ser Glu Leu Lys Gln Val Val Met Ala His Ala Ile

165 170 175

Ala Lys Lys Thr Val Val Asp Glu Gly Gly Val Phe Val Ile Ser Ser

180 185 190

Leu Leu Ser Pro Phe Thr Ser His Ala Val Gly Ser Glu Ala Ile Ala

195 200 205

Ile Leu Val Asn Leu Glu Leu Asp Ser Asp Ser Lys Ala Gly Leu Met

210 215 220

Gln Pro Ala Arg Val Ser Leu Met Val Asp Met Leu Asn Asp Gly Ser

225 230 235 240

Ile Glu Thr Lys Ile Asn Cys Ala Arg Leu Ile Gly Arg Leu Val Glu

245 250 255
 Glu Lys Gly Phe Arg Ala Glu Leu Val Ser Ser His Ser Leu Leu Val
 260 265 270

 Gly Leu Met Arg Leu Val Lys Asp Arg Arg Arg Arg Asn Gly Val Ser
 275 280 285
 Pro Ala Leu Thr Leu Leu Lys Ser Val Ser Val His Lys Gln Val Arg
 290 295 300
 Asn Leu Leu Val Arg Ile Gly Ala Val Pro Gln Leu Val Asp Val Leu
 305 310 315 320
 Pro Cys Leu Asp Val Glu Cys Leu Glu Ser Ala Leu Phe Val Leu Asp
 325 330 335
 Ser Leu Cys Leu Glu Ser Glu Gly Arg Ile Ala Leu Lys Asp Ser Val

 340 345 350
 Asn Thr Ile Pro His Thr Val Arg Leu Leu Met Lys Val Ser Glu Lys
 355 360 365
 Cys Thr Asn Tyr Ala Ile Ser Ile Leu Trp Ser Val Cys Lys Leu Ala
 370 375 380
 Ser Glu Glu Cys Ser Ser Leu Ala Val Glu Val Gly Leu Ala Ala Lys
 385 390 395 400
 Leu Leu Leu Val Ile Gln Ser Gly Cys Asp Pro Ala Leu Lys Gln Arg
 405 410 415

 Ser Ala Glu Leu Leu Lys Leu Cys Ser Leu His Tyr Ser Asp Ser Met
 420 425 430
 Phe Ile Ser Lys Cys Lys Leu Thr Arg Thr Ile Gln
 435 440

 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AtSRG1 U3 FW primer
 <400> 5
 caagctaggg ttcattgcttt g

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AtSRG1 17 RV primer

<400> 6
 cagacaccct catcagcacc 20

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AtSRG2 u5 FW primer

<400> 7
 ggtcaaacct acgagaggtc c 21

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AtSRG2 20 RV primer

<400> 8
 cgatttgagc agcgtaaagc 20

<210> 9
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RD29a FW primer

<400> 9
 caggtgaatc aggagttgtt 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RD29a RV primer

<400>	10	
ccggaaattt atcctcttct		20
<210>	11	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	EV136F Act8 FW primer	
<400>	11	
tactgattac ctcatgaaga tccttac		27
<210>	12	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	EV137R Act8 RV primer	
<400>	12	
aaacgatgtc tctttagttt agaagc		26
<210>	13	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AtSRG1 u4 RW primer	
<400>	13	
tcccaatgct tattgcaaaa c		21
<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AtSRG2 u6 RW primer	
<400>	14	
atccgttggtg tgattttgac c		21
<210>	15	
<211>	22	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lba1 boder primer

<400> 15

tggttcacgt agtgggccat cg

22