



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년10월29일
(11) 등록번호 10-0990333
(24) 등록일자 2010년10월21일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/64 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0072215
(22) 출원일자 2008년07월24일
심사청구일자 2008년07월24일
(65) 공개번호 10-2010-0011139
(43) 공개일자 2010년02월03일
(56) 선행기술조사문헌
US07244878 B2*
GenBank Accession No.AY461511.1
(2004.12.01.)*
J. Exp. Botany, Vol.55, No.397, pp585-594
(2004.03.)
GenBank Accession No.BAC56698 (2003.02.04.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
전북대학교산학협력단
전라북도 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14 본부
별관 3층
(72) 발명자
윤성중
전북 전주시 덕진구 송천동 서호아파트 201동 70
8호
국희선
전라북도 익산시 동산동 696-35
박명렬
전라북도 전주시 덕진구 송천동2가 대명아파트
101동 1302호
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 장제환

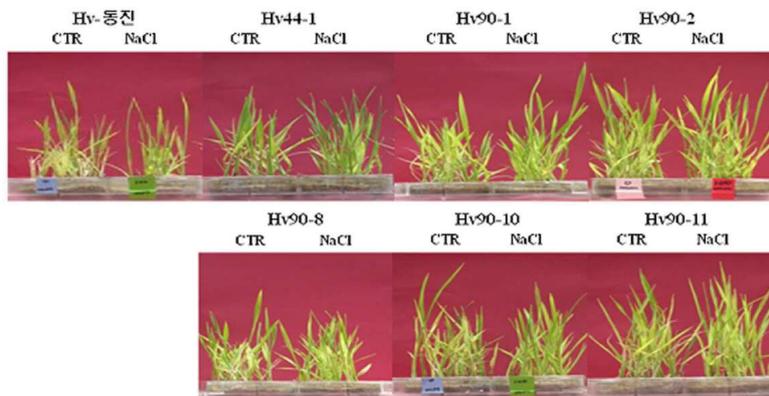
(54) 보리 유래의 NHX 유전자, 이를 이용하여 식물의 내염성을 증진시키는 방법, 및 상기 방법을 이용하여 내염성이 증진된 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 식물세포의 세포질의 나트륨 이온을 액포로 격리시키는 역할을 수행하여 내염성을 증진시키는 보리 (*Hordeum vulgare*) 유래의 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체(Na⁺/H⁺ antiporter) (*HvNHX1*) cDNA 서열, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 효모 및 식물체, 상기 유전자를 이용하여 식물의 내염성을 증진시키는 방법, 상기 방법을 이용하여 내염성이 증진된 식물체 및 이의 종자, 및 상기 유전자를 포함하는 식물체의 내염성 증진용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 방법은 식물체의 나트륨 이온을 세포질에서 액포로 격리시키는 유전자와 이 유전자를 이용하여 세포와 식물체 개체의 내염성을 증가시킴으로써 고염지인 간척지에 재배가 가능하여 작물학적으로 유용성이 크며 환경학적으로도 우수한 식물체를 제조 및 개발할 수 있는 장점이 있어, 생산조건 불리지 이용효율 증대 및 식물 종자 산업분야 등에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ007036201002

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 바이오그린21사업

연구과제명 유전자 발현조절에 의한 내재해성 및 내병성 국화 개발

기여율

주관기관 전북대학교

연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2010년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 보리(*Hordeum vulgare*) 유래의 NHX (Na⁺/H⁺ antiporter) 유전자 *HvNHX1* 을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 내염성이 증진된 식물체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 식물체는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 단자엽 식물은 벼인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 11

제8항에 따른 식물체의 종자.

청구항 12

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 보리(*Hordeum vulgare*) 유래의 NHX (Na⁺/H⁺ antiporter) 유전자 *HvNHX1* 을 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 내염성 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 13

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 보리(*Hordeum vulgare*) 유래의 NHX (Na⁺/H⁺ antiporter) 유전자 *HvNHX1* 을 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환시켜 *HvNHX1* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물체의 내염성을 증진시키는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 식물체는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 단자엽 식물은 벼인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 내염성이 증진된 식물체.

청구항 17

제16항의 내염성이 증진된 식물체를 고염지인 간척지에서 재배하는 방법.

청구항 18

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 보리(*Hordeum vulgare*) 유래의 NHX (Na⁺/H⁺ antiporter) 유전자 *HvNHX1* 을 포함하는 식물체의 내염성 증진용 조성물.

청구항 19

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 식물의 내염성 증진을 가능하게 하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 식물세포의 세포질의 나트륨 이온을 액포로 격리시키는 역할을 수행하여 내염성을 증진시키는 보리(*Hordeum vulgare*) 유래의 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체(Na⁺/H⁺ antiporter) (*HvNHX1*) cDNA 서열, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 효모 및 식물체, 상기 유전자를 이용하여 식물의 내염성을 증진시키는 방법, 상기 방법을 이용하여 내염성이 증진된 식물체 및 이의 종자, 및 상기 유전자를 포함하는 식물체의 내염성 증진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체는 세포질에서 액포 방향으로 액포막을 통과하여 진행되는 나트륨 이온의 수송과 나트륨 이온과 역방향으로 수소 이온의 교환을 촉매하여 세포질의 pH와 나트륨 이온의 수준, 세포의 크기를 조절하는 역할을 한다 (Aronson, P. S., Annu. Rev. Physiol. 1985. 47: 545-560; Orłowski, J., Grinstein, S., J. Biol. chem. 1997. 272: 22373-22376). 특히, 식물세포의 액포막에 존재하는 액포형 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체는 고염 조건에서 식물체 세포의 세포질에 고농도로 존재하는 나트륨 이온을 액포로 격리시켜 세포질의 나트륨 이온을 저하시킴으로써 염해 저항성을 증진시키는 것으로 알려져 있다 (Zhang, H-X and E Blumwald. 2001. Nat. Biotechnol. 19: 765-768).

[0003] 또한, 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체가 결여된 효모 돌연변이의 나트륨 이온과 하이그로마이신 감수성을 억제하기 위한 액포형 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체의 보완 능력에 대한 효모 complementation 연구가 이미 *AtNHX1* (Gaxiola et al. 1999. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 1480-1485), *OsNHX1* (Fukuda et al. 2004. Journal of Experimental Botany, 55:585-594) 그리고 *TaNHX1* (Brini et al. 2004. Plant Physiology and Biochemistry 43: 347-354) 등에서 행하여졌으며, 연구 결과 NHX가 효모 세포질에 유입된 나트륨 이온을 액포 안으로 구획시킴으로써 염 감수성을 억제시키고, 효모 액포에서 독성 양이온에 대한 NHX의 조절에 의해 하이그로마이신의 감수성도 감소시켜 준다는 구체적인 증거들이 밝혀지고 있다.

[0004] 최근에 가는갯능쟁이 식물체의 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체 유전자(AgNHX1)가 형질전환된 벼의 내염성이 증진됨으로써 (Ohta M. et al. 2002. FEBS Letters 26785: 1-4), 기존의 쌍자엽 식물에서의 연구 결과에서 제시된 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체 유전자의 내염성 증진에서의 유용성이 단자엽 식물에서도 확인되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명에서는 보리에서 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체 유전자(*HvNHX1*)를 분리 동정하였고 이 유전자를 액포형 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체 유전자가 결핍된 나트륨 감수성 돌연변이 효모(*Sacchomyces cerevisiae*) 계통 R100($\Delta nhx1$)에 도입시켜서 이중발현에 의한 *HvNHX1*의 염에 대한 기능을 검정하였다. 그리고 상기 유전자를 식물유전자 발현 운반체에 재조합하여 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 이용하여 벼 세포에 삽입하고 유전자가 전이된 세포로부터 완전한 벼 식물체로 분화와 세대진전을 통해 내염성이 증진된 T1 세대 벼 계통을 획득하였다. 상기의 방법과 상기 방법을 이용하여 얻어진 벼 계통은 전통적인 교잡과 선발을 이용하는 방법과 그에 따라 얻어지는 다수의 유전자가 조합되는 품종과 그 특성이 다르다. 즉, 본 발명에 의하여 얻어진 벼 품종은 본 발명에 사용한 재료 품종의 우수한 형질을 그대로 유지하면서 단지 내염성만 증진된 것으로 벼에서 염에 대한 내성이 향상된 것이다.
- [0006] 본 발명은 지금까지 알려진 유전자 중 내염성 증진에 가장 효과가 있는 NHX 유전자를 보리에서 분리하여 생산조건 불리지 적응성 개량용 유용유전자로써 환경학적으로 우수한 식물체를 제조 및 개발할 수 있는 장점이 있어, 간척지등 염이 많이 포함된 생산조건 불리지의 이용효율을 높일 수 있고, 식물종자 산업분야 등에 유용하게 이용될 수 있다.

과제 해결수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 식물세포의 세포질의 나트륨 이온을 액포로 격리시키는 역할을 수행하여 내염성을 증진시키는 보리(*Hordeum vulgare*) 유래의 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체(Na⁺/H⁺ antiporter) (*HvNHX1*) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0008] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 효모 및 식물체를 제공한다.
- [0009] 본 발명은 또한, 상기 유전자를 이용하여 식물의 내염성을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명은 또한, 상기 방법을 이용하여 내염성이 증진된 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 상기 내염성이 증진된 식물체를 고염지인 간척지 또는 생산조건 불리지에서 재배하는 방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 유전자를 포함하는 식물체의 내염성 증진용 조성물을 제공한다.

효과

- [0013] 본 발명에 따르면, 본 발명에서 분리한 cDNA 염기서열이 보리 유래의 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체(*HvNHX1*) cDNA이며, *HvNHX1* cDNA가 액포형 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체가 결여된 효모의 돌연변이의 염에 대한 내성을 회복시켰고, 염 스트레스 조건에서 유묘 단계의 식물체의 내염성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서 보리 유래의 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체 *HvNHX1* cDNA는 내염성 증진에 높은 효과가 있는 유전자로써 식물의 생산조건 불리지 적응성 개량에 유용한 유전자로 환경학적으로 우수한 식물체를 제조 및 개발하여 식물종자 산업분야 등에 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 보리(*Hordeum vulgare*) 유래의 NHX (Na⁺/H⁺ antiporter) 유전자 *HvNHX1* 및 이를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 고염 조건에서 식물체 세포의 세포질에 고농도로 존재하는 나트륨 이온을 격리시켜 세포질의 나트륨 이온을 저하시키는 보리의 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체를 코딩하는 cDNA에 관한 것으로서, 이중 발현에 의한 NHX 기능 검정은 액포형 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체가 결여된 효모 돌연변이 효모 R100 ($\Delta nhx1$)과 대조 계통 K601 (Dr. R. Rao, Johns Hopkins University, USA)을 이용하여 *HvNHX1* cDNA가 효모의 돌연변이 특성을 회복시키는지의 여부를 확인한 내용에 관한 것이다.
- [0016] 바람직하게는 상기 *HvNHX1* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다. 상기 *HvNHX1* 유전자

에 의해 deduced 되는 단백질 서열은 서열번호 2에 표시된 아미노산 서열이다. 또한, 상기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 변이체는 염기 서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기 서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기 서열이다. 구체적으로, *HvNHX1* 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.

- [0017] 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 겹)를 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 따른 재조합 벡터는 효모 발현 벡터일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 벡터는 도 2에 기재된 pMG515 벡터일 수 있다. 효모 발현용 벡터 pMG515는 보리로부터 유래된 식물 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체(*HvNHX1*) cDNA를 분리 동정하여, 이 유전자를 우라실(uracil)을 선발 표지자로 사용하는 pRG410에 재조합하여 구축하였다. 그러나, 본 발명의 재조합 벡터는 도 2에 기재된 벡터에 한정되지 않고, 효모 형질 전환에 유용한 임의의 벡터를 이용할 수 있다.
- [0019] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0020] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다.
- [0021] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 효모를 제공한다. 보다 구체적으로, 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체 유전자가 결합된 효모 R100에 *HvNHX1* cDNA가 재조합된 효모 발현용 벡터 pMG515를 도입시켜 염에 대한 내성이 회복된 Y.PMG515 효모를 제공하는 것이다.
- [0022] 본 발명에 이용할 수 있는 숙주 세포는 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 균주가 바람직하나, 반드시 이에 한정되지 않고, 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*); 한세놀라 폴리모르파 (*Hansenula polymorpha*); 야로위아 (*Yarrowia*); 슈조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스 숙주, 예를 들어 케이. 락티스 (*K. lactis*), 케이. 프라길리스 (*K. fragilis*), 케이. 불가리쿠스 (*K. bulgaricus*), 케이. 위커라미 (*K. wickerhamii*), 케이. 왈티 (*K. waltii*), 케이. 드로스필라룸 (*K. drosophilum*), 케이. 테르모톨레란스 (*K. thermotolerans*) 및 케이. 마르시아누스 (*K. marxianus*)를 이용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 재조합 벡터로 숙주 세포를 형질전환하는 방법은 전기천공법(electroporation) 등의 당업계에서 통상적으로 이용하는 방법을 이용할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 재조합 벡터는 식물 발현 벡터일 수 있다.
- [0025] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 *HvNHX1* 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 케미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환 하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.
- [0026] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자,

카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구현예에 따른 식물 발현 벡터는 하이그로마이신 내성 유전자를 이용하였다.

[0027] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0028] 상기 터미네이터는, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α -아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알고 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 따른 재조합 식물 발현 벡터는 바람직하게는 도 5에 기재된 pMG-HvNHX1 벡터일 수 있다. 상기 pMG-HvNHX1 벡터는 보리로부터 유래된 *HvNHX1* cDNA를 pGA1611에 재조합하여 작성한 식물 유전자 발현용 바이너리 벡터이다. 그러나, 본 발명의 재조합 벡터는 도 5에 기재된 벡터에 한정되지 않고, 식물 형질 전환에 유용한 임의의 벡터를 이용할 수 있다.

[0030] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 내염성이 증진된 식물체를 제공한다. 보다 구체적으로, 식물 형질전환용 벡터 pMG-HvNHX1를 이용하여 HvNHX1를 발현시켜 나트륨 이온에 대한 항상성을 유지시켜 내염성을 증가시킨 형질전환 식물체를 제공한다.

[0031] 본 발명에 따른 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 과, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료작물류일 수 있다. 바람직하게는, 상기 식물체는 벼, 보리, 옥수수, 밀, 호밀, 귀리, 잔디, 마초, 기장, 사탕수수, 라이그라스, 오차드그라스 등의 단자엽 식물일 수 있으며, 가장 바람직하게는, 상기 식물체는 벼이다.

[0032] 본 발명은 또한, 상기 식물체의 종자를 제공한다. 바람직하게는, 상기 종자는 벼의 종자이다.

[0033] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계; 및

[0034] 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 내염성 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0035] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.

[0036] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양

기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다. 바람직하게는, 상기 식물체는 벼이다.

- [0037] "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(*in planta*)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 의해 매개될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서는 보리 유래 *HvNHX1* cDNA를 식물 유전자 발현용 운반체인 pGA1611에 재조합하여 작성한 유전자 재조합체(pMG-HvNHX1)를 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 도입하고, 유전자 재조합체가 도입된 아그로박테리움 투메파시엔스를 벼의 1-2mm 지름의 캘러스(callus)와 공동배양하여 식물체 내의 세포 질로 유입되는 고농도의 나트륨 이온 독성으로부터 나트륨 이온 항상성을 증가시킨 형질전환 벼 계통을 개발하였다. 상기 형질전환 벼는 염 농도가 높은 간척지 및 생산조건 불리지에 이용이 가능한 고효율의 환경학적으로 우수한 벼 식물체이므로, 간척지 및 생산조건 불리지의 이용효율을 최대화시키는 뛰어난 실질적 효과가 있으며, 동 발명을 이용하여 벼 이외의 식물체에서도 내염성이 증가한 품종을 개발할 수 있는 방법을 제공함으로써 식물 종자산업의 발전에도 유용할 수 있다.
- [0040] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환시켜 *HvNHX1* 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물체의 내염성을 증진시키는 방법을 제공한다. 식물체의 형질전환 방법, 형질전환에 이용되는 재조합 벡터 및 숙주 세포로 이용될 수 있는 식물은 전술한 바와 같다.
- [0041] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 내염성이 증진된 식물체를 제공한다. 내염성이 증진된 식물체는 바람직하게는 벼, 보리, 옥수수, 밀, 호밀, 귀리, 잔디, 마초, 기장, 사탕수수, 라이그래스, 오차드그래스 등의 단자엽 식물일 수 있으며, 가장 바람직하게는, 상기 식물체는 벼이다.
- [0042] 본 발명은 또한, 상기 내염성이 증진된 식물체를 고염지인 간척지 또는 생산조건 불리지에서 재배하는 방법을 제공한다. 일반적인 식물체는 고염지인 간척지 또는 생산조건 불리지에서는 정상적으로 성장할 수 없으나, 본 발명의 내염성이 증진된 식물체는 상기 지역에서도 정상적으로 성장할 수 있기 때문에, 간척지 및 생산조건 불리지의 이용효율을 최대화시킬 수 있다.
- [0043] 본 발명은 또한, 보리(*Hordeum vulgare*) 유래의 NHX (Na⁺/H⁺ antiporter) 유전자 *HvNHX1* 을 포함하는 식물체의 내염성 증진용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물에서, 상기 *HvNHX1* 유전자는 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다. 본 발명의 식물체의 내염성 증진용 조성물은 유효 성분으로서 보리(*Hordeum vulgare*) 유래의 NHX (Na⁺/H⁺ antiporter) 유전자 *HvNHX1* 을 포함하며, 상기 유전자 *HvNHX1* 을 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 내염성을 증진시킬 수 있는 것이다.
- [0044] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] <실시예 1> 보리 cDNA 라이브러리 스크리닝을 통해 보리(*Hordeum vulgare*) 유래 *HvNHX1* cDNA 염기서열 확보
- [0046] 기본적으로 uni-ZAP cDNA 라이브러리 생합성 키트 (Stratagene, California, USA)을 사용하여 보리(동보리)에서 추출한 mRNA를 이용하여 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 보리 cDNA 라이브러리 (4x10⁶ pfu)를 이미 확보된 보리의 *HvNHX1*의 일부분 유전자 탐침을 이용하여 검색하였다. 보리의 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체 유전자가 삽입되어 있을 것으로 추정되는 람다 파아지들을 분리하여 람다 Zap II 벡터의 고유 특성을 활용하여 플라즈미드 벡터 (pBluscript SK(+)) 클론으로 전환하였다. 확보한 클론의 염기서열은 벡터에 존재하는 T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3'; 서열번호 3) 과 T3 (5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3'; 서열번호 4) 염기서열 결정 프라이머를 이용하여 양쪽 가닥의 염기서열을 염기서열 자동분석기(모델 ABI 3730x1, Macrogen사)로 결정하였다.
- [0047] 염기서열을 결정한 결과, 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체 유전자의 cDNA인 것으로 확인된 클론을 보리의

나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체(Na⁺/H⁺ antiporter)인 *HvNHX1*으로 명명하였다. 결정된 유전자의 염기서열과 관독틀에 맞는 아미노산 서열을 도 1에 표시하였다.

- [0048] 서열의 상동관계는 GenBank에서 DNA 서열에 근거하여 프로그램 BLAST [Altschul et al., Nucleic Acid Res, 25:3389-3402 (1997)]을 사용하여 실행하였고 염기서열과 아미노산 서열 분석은 DNASIS (Hitachi, Yokohama, Japan) 프로그램에 의하여 실행되었다. 소수성 폴리펩티드, 번역후의 변이 자리, 단백질 2차 구조 등을 예측하기 위하여 SIGFIND [Reczko et al., Version 2.10, Lecture Note in Computer Science, 2452:60-67 (2002)], SignalP 3.0 [Bendtsen et al., Proteomics, 4:1633-1649 (2004)], NetPhos 2.0 [Chen et al., J. Mol. Biol. 40:247-260 (2007)], NetNGlyc 1.0 [Blom et al., Proteomics, 4:1633-1649 (2004)], WoLFPSORT (<http://wolfpsort.seq.cbrc.jp>), PREDATOR [Frishman and Argos, Protein Engineering, 9:133-142 (1996)], 그리고 SOPMA [Geourjon and Deleage, Comput. Appl. Biosci., 11:681-684 (1995)] 등 프로그램을 사용하였다. 여러 NHX 서열간의 상동성 분석은 AliBee [Brodsky et al., Biosystems, 30:65-79 (1993)] 프로그램을 사용하여 실행하였다.
- [0049] <실시에 2> 보리(*Hordeum vulgare*) 유래 *HvNHX1* cDNA를 포함하는 효모 발현용 재조합 벡터 pMG515가 도입된 효모 Y.PMG515의 생산 및 이중 발현에 의한 NHX 기능의 확인
- [0050] (제1단계) 보리(*Hordeum vulgare*) 유래 *HvNHX1* cDNA를 포함하는 효모 발현용 재조합체 작성과 효모 세포내로 도입
- [0051] 효모에서 *HvNHX1* cDNA를 발현시키기 위하여, *HvNHX1* cDNA의 관독틀(open reading frame, ORF) 서열을 효모용 유전자 발현 운반체인 pRG410 [미국 University of Connecticut의 Roberto Gaxiola로부터 제공받음]에 삽입하였다. 우선 제한효소 자리를 맞추기 위하여 *HvNHX1*를 주형으로 ORF 영역을 Extaq(Takara, Shiga, Japan)을 사용하여 PCR로 증폭시켰다. 유전자를 증폭하기 위해 사용된 프라이머의 서열은 5'-TTCGGCGCCGCGCAAGGAAGAA-3' (서열번호 5)과 5'-CATCTTCAGTCGACACTCTGAA-3' (서열번호 6)이다. 증폭된 PCR 산물은 pGEM T-Easy 벡터 (Promega, Madison, USA)에 클로닝하여 통상적인 방법에 의해 서열을 분석하였다. 확인된 재조합용 *HvNHX1* cDNA는 각각 NotI-SalI 제한효소 자리로 pRG410 벡터에 삽입되었고 *HvNHX1* 유전자의 재조합 운반체인 pMG515를 작성하였다 (도 2).
- [0052] *HvNHX1* 유전자가 삽입된 pMG515를 전기천공법(electroporation)을 이용하여 액포형 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체가 결여된 효모 돌연변이 균주 R100 ($\Delta nhx1$) 계통에 도입시켜 Y.PMG515 효모 균주를 개발하였다. Y.PMG515 효모가 생산하는 *HvNHX1*이 R100 효모의 돌연변이 특성을 회복시키는지의 여부를 분석하였고, 이때 사용한 효모용 선발 배지는 SD 배지(0.17 % Yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate (AS), 5% (NH₄)₂SO₄, 0.01 % L-leucine, 0.02 % L-tryptophan, 0.02 % L-histidine, 0.02 % uracil, 5 ml 20x Drop-out medium mix, 2% Glucose를 함유)에서 우라실(uracil)을 제거하여 사용하였다.
- [0053] (제2단계) *HvNHX1* cDNA가 도입된 효모 Y.PMG515가 생산하는 NHX 활성을 하이그로마이신이 첨가된 배지를 이용하여 확인
- [0054] pMG515를 도입하여 획득한 효모 Y.PMG515이 생산하는 *HvNHX1* cDNA가 효모의 돌연변이 특성을 회복시키는지의 여부를 확인하였다.
- [0055] 야생형 대조구 효모인 K601과 돌연변이 효모 R100, *HvNHX1* cDNA가 형질전환된 효모 Y.PMG515를 각각 5ml YPAD 배지(1% Bacto yeast extract, 2% Bacto peptone, 0.0075% Adenine hemisulfate, 2% Glucose 함유)에 접종하여 28°C에서 250rpm으로 24시간 배양하여 OD₆₀₀의 측정치가 1.0~1.8이 되도록 하였다. 하이그로마이신(Hygromycin)은 전기화학적 양성자 구배에 반응하여 세포질에 축적되는 독성의 고분자량 알칼리성 양이온으로 *nhx1* 효모 돌연변이주 R100은 하이그로마이신에 초감수성을 나타낸다 (McCusker et al., (1987) Mol. Cell. Biol. 11, 4082-4088). 하이그로마이신이 0.05mg/ml 첨가되었거나 또는 첨가되지 않은 YPAD 고체 배지에 OD₆₀₀ 값이 0.3이 된 균을 2.5 μ l씩 접종한 후 28°C에서 48시간 동안 암배양하였다. 배양 후 0.05mg/ml 하이그로마이신이 첨가된 선발 배지 상에서 효모들의 성장력을 분석하는 것으로 *HvNHX1* cDNA가 효모의 하이그로마이신 초감수성을 보완하는지의 여부를 확인하였다.

- [0056] 실시예 2의 결과는 도 3에서 보는 바와 같이, 하이그로마이신 초감수성 *nhx1* 효모 돌연변이주 R100를 비롯하여 모든 균주가 하이그로마이신이 첨가되지 않은 YPAD 배지에서는 성장하였지만, 0.05mg/ml 하이그로마이신이 첨가된 YPAD 배지에서는 야생형 대조구 효모 K601과 *HvNHX1* cDNA가 형질전환된 효모 Y.PMG515만 성장하였다. 이와 같은 결과는 *HvNHX1* cDNA의 발현이 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체 결함이 있는 돌연변이 효모의 하이그로마이신 초감수성을 억제시킬 수 있음을 나타내는 것이라 할 수 있다.
- [0057] (제3단계) *HvNHX1* 유전자가 도입된 효모 Y.PMG515의 염에 대한 내성을 NaCl이 첨가된 배지를 이용하여 확인
- [0058] 형질전환된 효모 Y.PMG515와 NHX 돌연변이 효모 R100, 그리고 야생형 효모 K601 계통을 5ml YPAD 배지에 접종하여 28℃에서 OD₆₀₀의 값이 1.0에서 1.8이 되도록 24시간 동안 배양하였다.
- [0059] 0, 300, 600, 1200mM NaCl이 첨가된 YPAD 배지에 OD₆₀₀의 값이 0.12가 된 효모 배양균을 100 μ l씩 접종하여 28℃에서 48시간 동안 배양한 후 각각 OD₆₀₀에서 흡광도를 측정하여 *HvNHX1* cDNA의 발현에 의한 효모 Y.PMG515의 염에 대한 내성 회복을 확인하였다.
- [0060] 상기 결과를 더욱 확고히 하기 위해 0, 300, 600mM NaCl이 첨가된 YPAD 고체 배지에 OD₆₀₀의 값이 0.3이 된 균을 2.5 μ l씩 spotting한 후 28℃에서 48시간 동안 배양하여 *HvNHX1* cDNA의 발현에 의한 효모 Y.PMG515의 염에 대한 내성 회복을 확인하였다.
- [0061] 0과 300mM NaCl이 포함된 YPAD 배지에서는 모든 계통의 균주가 성장하였지만, 600과 1200mM NaCl에서는 야생형 효모 균주 K601 균주와 형질전환된 효모 Y.PMG515만 성장하였다(도 4A).
- [0062] NaCl이 포함되어 있지 않은 YPAD 배지에서는 모든 계통의 효모균주가 성장하였지만, NaCl이 300, 600mM 포함된 YPAD 고체 배지에서 염 감수성 효모 돌연변이 R100은 생장이 억제된 반면, 형질전환된 효모 Y.PMG515와 야생형 효모 K601은 모두 내성을 보이며 성장하였다 (도 4B).
- [0063] 이러한 형질전환된 효모 Y.PMG515가 하이그로마이신과 고염에 대한 감수성 억제 증가의 결과는 보리에서 분리된 *HvNHX1* cDNA가 나트륨 이온/수소 이온 역방향 운반체가 결핍된 효모 돌연변이의 하이그로마이신에 대한 결함을 보완할 수 있고, 염에 대한 내성을 부여하는 유전자임을 입증하는 증거이다.
- [0064] <실시예 3> 보리(*Hordeum vulgare*) 유래 *HvNHX1* cDNA의 벼 세포내 삽입 및 형질전환
- [0065] (제1단계) 식물 유전자 발현용 운반체인 pGA1611에 *HvNHX1* cDNA의 식물 형질전환용 재조합체 작성
- [0066] 식물유전자 발현 운반체인 pGA1611는 포항공과대학(포항, 한국) 안진홍 교수로부터 분양받아 사용하였다. *HvNHX1* cDNA 염기서열과 제한효소 자리를 분석하여 유전자가 정상적으로 발현되도록 전체 관독들이 포함되는 단편을 만들어 pGA1611에 재조합하여 형질전환용 유전자 재조합체(pMG-HvNHX1)를 작성하였다 (도 5).
- [0067] (제2단계) 벼 세포내로 재조합 유전자 운반체의 도입 및 운반체가 도입된 세포의 선발
- [0068] 냉-해동방법(freezing-thawing, An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB, 1988, Plant Molecular Biology Manual A3: 1-19. (Gelvin., S.B., Schilperoort, R., and Verma, D. P., Eds.), Kluwer Academic Pub., The Netherlands)을 이용하여 상기 제1단계에서 제작한 pMG-HvNHX1를 아그로박테리움 투메파시엔스 LBA 4404에 도입하고, 하이그로마이신 배지에서 재조합 유전자 운반체가 도입된 균주를 선발하였으며, 선발된 균주를 배양하여 pMG-HvNHX1를 분리한 다음, 제한효소 처리 등을 통하여 *HvNHX1* 유전자가 균주 내로 도입됨을 확인하였다.
- [0069] pMG-HvNHX1 cDNA 재조합체가 도입된 아그로박테리움 투메파시엔스 LBA 4404를 50 mg/L 하이그로마이신이 포함된 YEP(1% yeast extract, 1% peptone, 0.5% NaCl) 액체배지에 접종한 다음 28℃, 암 상태에서 48시간 이상 250 rpm으로 진탕 배양하였다. 아그로박테리움 배양액의 OD₆₀₀가 0.6일 때 배양액을 AAM 액체배지에 10배 희석하였고 희석액을 이용하여 지름이 1-2mm 크기인 캘러스(callus)를 10분간 접종하였다. 아그로박테리움을 접종한 캘러스는 2,4-D(2 mg/L), 세포탁심(cefotaxime, 250 mg/L), 하이그로마이신(40 mg/L)이 첨가된 N6 기본배지에서 1차 선발한 캘러스(callus)를 다시 2,4-D(2 mg/L), 세포탁심(cefotaxime, 250 mg/L), 하이그로마이신(40 mg/L),

BA(0.5 mg/L)가 첨가된 N6 기본배지에서 2차 선발하였다 (도 6).

[0070] (제3단계) 운반체가 도입된 세포로부터 벼 식물체의 재분화

[0071] 상기 2단계에서 선발하여 분화된 싌초를 NAA(0.1 mg/L), 키네티(2.0 mg/L), 세포탁심(125 mg/L)이 첨가된 MS 기본배지에 이식하여 발근을 유도한 유식물체를 토양에 이식하여 정상적으로 성장 발달하여 개화 결실한 벼 식물체로 육성한 다음(도 6), 채종하여 121 계통의 T0 세대 종자를 확보하였다. T0 세대 종자를 하이그로마이신으로 선발하기 위하여 비형질전환 벼와 형질전환된 벼 종자들을 50 mg/ml 하이그로마이신 조건에서 발아 싌험을 실시하여 50 계통의 하이그로마이신 저항성 T0 세대와 9 계통의 하이그로마이신 감수성 T0 세대를 선발하였다. 선발된 T0 세대 유식물체를 토양에 이식하여 정상적인 벼 식물체로 육성한 다음 중합효소 연쇄반응(PCR) 방법과 서던 블롯 분석 방법을 통하여 전이 유전자의 삽입을 확인하였다 (도 7). 전이 유전자의 삽입이 확인된 계통과 하이그로마이신 선발 계통 모두를 형질전환 식물체 격리 수도 싌험포장에 파종하여 231 계통의 T1 세대 종자를 수확하였다.

[0072] (제4단계) 재조합 유전자의 삽입이 확인된 형질전환 벼 식물체의 염 스트레스 조건에서의 유묘 성장 및 회복 증가율을 관찰하여 염에 대한 내성 확인 및 독특한 특성을 갖는 계통 선발

[0073] 재조합 유전자의 도입에 의해 재분화된 벼 식물체에 염 저항성을 부여하는지를 확인하기 위해, 형질전환된 계통들의 T1 세대 종자와 비형질전환 벼의 종자를 70% 에탄올에 5분 동안 표면 소독을 한 다음, 0.1% 소디움하이포클로라이트에서 20분 동안 종자 표면 소독을 한 뒤 수돗물과 증류수를 이용하여 3회 이상 세척하였다. 비형질전환 벼(동진벼)와 형질전환된 계통(44-1, 44-3, 44-4, 44-6, 90-1, 90-2, 90-8, 90-10, 90-11, 96-1, 96-2, 96-4, 100-3)의 벼 종자들을 각각 12립씩 3반복으로 25℃ 암 조건에서 3일간 최아 후 5일(암 조건에서 2일 처리한 뒤 광 조건에서 3일 처리)동안 100mM NaCl를 처리하여 성장을 관찰하였다. 염처리 후 15일간 정상관수하여 식물체의 회복 증가율을 관찰하였으며, 회복 증가율은 지상부의 크기를 측정된 뒤 NaCl을 처리하지 않은 비형질전환 대조구 벼를 기준으로 하는 백분율로 환산하여 분석하였다.

[0074] 5일간 염 스트레스 처리 후 생육 상태는 형질전환계통들의 벼 유묘가 비형질전환 벼 식물체보다 양호하였다 (도 8). 5일간 염 스트레스 처리 이후 15일간 정상관수 후의 생육 상태도 형질전환계통들의 벼 유묘가 양호하였으며, 스트레스를 받은 후의 회복 증가율도 높았다 (도 9). 특히 염의 스트레스를 받은 44-1, 90-1, 90-2, 90-8, 90-11 계통의 지상부는 정상관수 15일 후에 다른 계통의 유묘들 보다 현저하게 빠른 성장을 보였으며 비형질전환 벼의 유묘에 비하여 각각 47.3, 85.5, 92.4, 91.5, 83.1% 증가하였다. 전체 형질전환된 벼의 회복 증가율은 NaCl을 처리하지 않은 비형질전환 대조구 벼에 비해 평균 45.8% 증가하였다(표 1).

[0075] 표 1. 100mM NaCl 스트레스 처리(5일)한 다음, 15일간 정상관수한 후 유묘의 지상부 길이와 회복 증가율

[0076]

계통	지상부의 길이(cm)		회복 증가율(%)	
	H ₂ O	H ₂ O + NaCl	H ₂ O	H ₂ O + NaCl
비형질전환체 (동진벼)	4.52±0.84	3.95±1.45	0.00	0.00
44-1	4.36±2.48	5.82±0.65	3.57	47.27
44-3	6.39±0.76	4.89±1.27	41.29	23.73
44-4	6.61±1.83	5.37±1.00	46.07	35.74
44-6	5.48±0.97	4.78±1.38	21.14	20.99
90-1	6.65±1.57	7.33±0.52	47.05	85.50
90-2	6.83±1.72	7.61±1.11	51.04	92.44
90-8	5.62±1.24	7.57±0.15	24.26	91.49
90-10	5.49±0.34	5.73±0.13	21.50	44.88
90-11	6.11±0.25	7.24±0.76	35.01	83.10
96-1	5.07±0.35	4.85±0.09	12.19	22.68
96-2	6.54±3.52	4.40±0.72	44.57	11.30
96-4	5.24±0.55	4.40±0.25	15.91	11.29
100-3	6.02±0.20	4.92±1.29	33.12	24.57
형질전환계통 평균	5.88±1.21	5.76±1.72	29.97	45.77

[0077] 상기 결과는 염 스트레스에 대한 내성은 *HvNHX1* cDNA의 발현을 통하여 능동적으로 이루어짐을 의미하며, *HvNHX1* cDNA를 이용하여 형질전환되는 모든 식물체의 경우에도 내염성을 증가시킬 수 있음을 증명하는 결과이다.

도면의 간단한 설명

- [0078] 도 1은 보리 cDNA 라이브러리(cDNA library) 스크리닝을 통해 확보한 보리(*Hordeum vulgare*) 유래 *HvNHX1* cDNA의 염기서열과 아미노산 서열을 보여준다. 화살표; NHX1 단백질 신호 펩타이드 열개 위치
- [0079] 도 2는 *HvNHX1* cDNA의 발현 구조를 포함하는 효모 발현용 벡터(pMG515)의 구성도이다. PMA1, promoter from pRS699: *HvNHX1*, *Hordeum vulgare* Na⁺/H⁺ antiporter: CYC1, terminator: URA3, yeast selection marker (uracil): Amp, ampicillin.
- [0080] 도 3은 염에 대해 내성을 갖는 효모의 대조 계통 K601과 염에 대해 감수성인 효모 돌연변이 계통 R100, 효모 R100에 *HvNHX1* cDNA가 재조합된 운반체 pMG515가 도입된 효모 Y.PMG515 균주 등을 50ug/ml 하이그로마이신이 포함된 또는 포함되지 않은 YPAD 배지에서 3일 동안 배양한 결과이다.
- [0081] 도 4는 염에 대해 내성을 갖는 효모의 대조 계통 K601과 염에 대해 감수성인 효모 돌연변이 계통 R100, 효모 R100에 *HvNHX1* cDNA가 재조합된 운반체 pMG515가 도입된 효모 Y.PMG515 균주들을 부동의 NaCl 농도에서 각 균주들의 성장량을 흡광도 600nm에서 측정된 결과(A)와 각 균주들을 부동의 NaCl 농도의 고체 YPAD 배지에서 24시간 동안 배양한 결과(B)이다.
- [0082] 도 5는 *HvNHX1* cDNA의 발현 구조를 포함하는 식물유전자 발현용 바이너리벡터(pMG-HvNHX1)의 부분 구성도이다. pUbi, maize ubiquitin promoter: *HvNHX1*, *Hordeum vulgare* Na⁺/H⁺ antiporter: Tnos, polyadenylation signal of the nopaline synthase gene: p35S, 35S promoter: Hyg, Hygromycin phosphotransferase: 7', polyadenylation signal of the gene 7 of pTiA6: RB, T-DNA right border: LB, T-DNA left border.
- [0083] 도 6은 무균발아 배양 질편의 *HvNHX1* 재조합 유전자 벡터 함유 아그로박테리움과의 공동배양 후 항생제 하이그로마이신이 함유된 배지에서 유전자가 도입된 세포의 선발(A), 선발된 세포로부터 신초(B)와 뿌리의 재분화 식물체(C), 재분화 식물체의 영양액(D), 토양 포트 및 온실(E) 순화과정, 그리고 형질 전환된 T1 세대의 형질전환체(F), 및 격리 수도 시험포장에서의 성장 과정(G)을 나타낸다.
- [0084] A: 항생제 선발
- [0085] B: 재분화
- [0086] C: 발근
- [0087] D: 포트 순화
- [0088] E: 온실순화
- [0089] F, G: 형질전환 격리 수도 시험포장 재배
- [0090] 도 7은 비형질전환 벼(동진벼)와 *HvNHX1* cDNA가 형질전환된 계통들의 T1 세대 벼 식물체로부터 추출한 DNA 내에 *HvNHX1* 전이유전자 유무를 서던 블롯 분석을 통하여 확인한 결과이다.
- [0091] 레인 1: 비형질전환 벼.
- [0092] 레인 2: 1-1, 레인 3: 11-1, 레인 4: 44-1, 레인 5: 46-1, 레인 6: 47-1,
- [0093] 레인 7: 49-1, 레인 8: 62-1, 레인 9: 64-1
- [0094] 레인 10: 비형질전환 벼
- [0095] 레인 11: 66-1, 레인 12: 70-1, 레인 13: 76-1, 레인 14: 77-1, 레인 15: 81-1, 레인 16: 82-1, 레인 17: 87-1, 레인 18: 90-1, 레인 19: 96-1, 레인 20: 97-1, 레인 21: 99-1, 레인 22: 100-1
- [0096] 도 8은 비형질전환 벼(동진벼)와 형질전환 계통(형질전환 계통 44-1, 90-1, 90-2, 90-8, 90-10, 90-11)의 T1 세대 종자들을 최아 시킨 후 100mM NaCl 조건에서 5일 동안 유묘의 염에 대한 식물체들의 성장을 관찰한 결과이다.

[0097]

도 9는 비형질전환 벼(동진벼)와 형질전환 계통(형질전환 계통 44-1, 90-1, 90-2, 90-8, 90-10, 90-11)의 T1 세대 종자들을 최아 시킨 후 100mM NaCl 조건에서 5일 동안 생장시킨 후 15일 동안 정상 관수하여 식물체들의 생장과 회복된 식물체의 지상부의 길이를 측정하여 백분율로 환산한 결과이다.

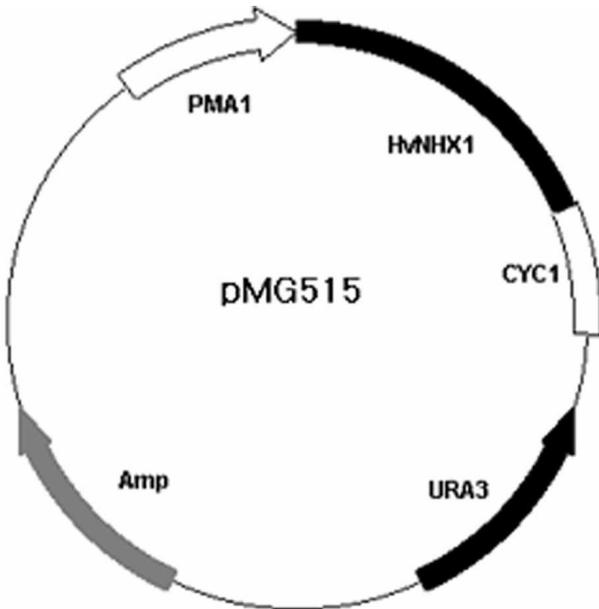
도면

도면1

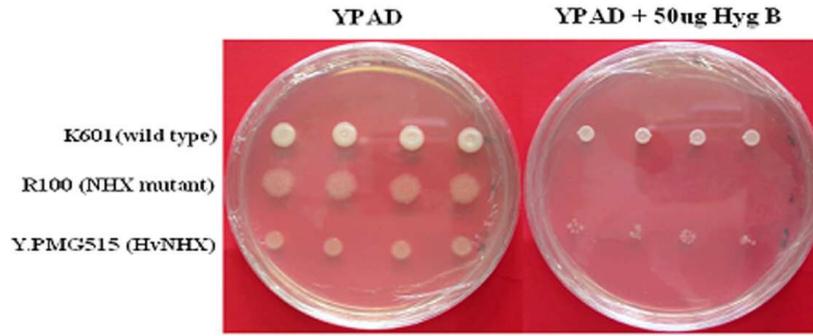
```

1  AA  CCG AAC CTT CTC CAG ATA CCG CCG CCG GAA AAG AAT ABA GAA TCC CCA CCT CCG CCG CCG GGC TGC TCT GCG CCG CCG TCG
96  TTT TCC CTC CTC GCT CCG CAC CCG CCG GGG TTT CCG CTG TCC TTT CCG TCC CCA CCG CCG CCG GCA CCA AGC AGC GGC GGA GAC GAG GCG AGG
192  AAG AGG AGG AGC TCG GCT GTT CTT COT CTC CCG CTC GAT TCG TCT CCG GAT TAG CCG CCG CCG CCG TCC CCG GAG GGC TCC CTC CCG GTT GAT TCG
288  ATC TGA TFG AAA AAG CCG CCG TCT TTC CCG GAG GGC CCG CCG TCG CTC GCG GAA GCT AGC TOT GTC TCG TTC GCG CCG GCT GAA GAA AAG TGA GTA
384  ACG GCG GCG ATG GCG TFG GAA GTG GTG GCG GCG
1  H A F E V V A A Q L A R L S D A L A T S D H A S V V S V T W
28  400 CTC TTC CTC GCG CTG CTC TGC GCG TGC ATC GTC CTC GCG CAC CTC CTC GAG GAG AAC CCG TGG CTC AAC GAG TCC ATC ACC GCG CTC ATC ATC GGG
30  L E V A L L C A C I V L G M L L E E N R W L N E S I T A L I I G
576  CTG TCC ACC GCG GTG ATG CTC ATG ACC ACC AAG GGG AAG AGC TCG CAC GTG CTC CTC TTC AGC GAG GAC CTC TTC TFC ATA TAC CTC CCG
62  L G T D V V I L H T T K Q K S S H V L V F S R D L F R S V L L P
672  CCG ATC ATG TTC AAC CCG GGT TTG CAG GTG AAG AAG CAG TTC TTG CCG AAT TTG ATG ACA ATC ACA TCA TTC GCG GCT CTC GCG ACG ATG ATT
94  P I I F N A G E Q V R K K Q P F R H F K T I T S P G A V G T H I
768  TCA TTC TTC ACA ATC TCT CTT GCT GCG AAT GCG ATA TTC AGC AAG ATG AAC ATT GGG ACA CTG GAT GTA TCA GAT TTT CTC GCA ATT GGA GCG ATC
126  S E F T I S L A A I A X F S K H N S S G Y L D V S D F L A I G A I
564  TTT TCC GCG ACA GAT TGG GTC TCG ACT TTA GAG GTT CTC AAT GAG GAG AGC AGC CCG TTT CTG TAG AGT GTA GTT TTC GGG GAA GGT GTT GTG AAC
180  F S A T D S V G T L G V L W Q D E T F F L V S L V E G E Q V W
960  GAT GCG ACA TCA GTC GTG CTT TTC AAC GCG CTC GAG AAC TTC GAT COT AAC CAA ATC GAT GCA ATC GTC ATT CTG AAG TTC TFG GAA AAC TTC TGC
190  D A T S V U L E N A L Q H F D P N Q I D A I V I L X E L G H F C
1056  TAC TTA TCC GCG TCA AGC ACC TTC CTT GGA GTA TTT TCT GGA TTG CTC AGT GCA TAC ATA ATC AAG AAG TTA TAC ATA GGA AGG GAT TCT ACT GAC
222  F L S V S S T F L G V F S G L L S A Y I I H R L V I G R H S T D
1152  GGT GAG GTT GTG CTT ATG ATG CTC ATG GCG TAC CTC TCA TAT ATG GTA GGT GAG GTG CTT GAT TTG AAT GGC ATC CTC ACC GTG TTC TFG COT GGT
284  R E V V L H H L H A Y L S Y M L A E L L D L S G I L Y V F G S
1248  AAT GTG ATG TCG GAT TAT ACT TGG GAT AAT GTG ACA GAG AGC TCA AGA GTT ACA ACA AAG GAT GCT TTT GCA ACC TTG TCT TTC ATY GTT GAG AGC
206  I V H S H Y T W H M V F E S S R U T T R H A F A T L S F I W E T
1344  TTT CTC TTC CTT TAT GTT GGG ATG GAT GCA CTG ATC GAG AAG TGG ABA TTT GCT AGT GAC AGC COT GGC AAA TCC ATC GGA ATA AGC TCA ATT
318  F L F L Y V G M D A L D I X H W K E A S D S P G K S I G I S S I
1440  TTG CTA GGA TTA GTT GTG GTT GAA AQA GCT GCT TTT GTG TTC CCG GTT TCA TTC TTA TCC AAC CTG ACA AAG AAG ACG GAO CTC GAA AAA ATA AGC
360  L L G L U V G R A A F V F P L S F L S H L T K K T R L R K I S
1536  TGG AGG CAG CAA ATC GTA ATA TGG TGG GCT GGG CTG ATG AQA GGA GCT GTG TCG ATC GCT CTT GCT TAC AAT AAG TTT ACA AQA TCT GGC CAC ACA
392  W R Q Q I V E W F A S L H R G A V S I L A A Y H K T R S G X T
1632  GAG CTA CAC GGC AAC CCG ATA ATG ATC ACC AGC ACC ATC ACT GTC GTT CTG TTT AGC ACT ATG CTG TTT GGC ATA TTG ACA AAG CCT CTG ATC CCG
414  Q L H G N A I K I T S T Y V L F S Y H L F G I L Y K P L I R
1728  TTC GTG GTG CCG GCG TCG AAG AAT GGC GAC CCG TCG GAG CCG TCG TCA CCG AAG TCC CTG CAC TCT COT CTC CTC AQA AAG ATG GTA GAG GCG TCG GAC
446  F L L P A S S W G D P S K P S S P K S L H S P L L T S H L G S D
492  ATG GAG GCG CTT CTC CCG ATC GTC AGG CCG TCC AGC CTC CCG ATG CTC ATC ACC AAG CCG ACC CAC ACC ATC CAC TAC TAC TGG CCG AAG TTC GAC
478  M E A P L P I V R P S S L R K L I T K P T H T I H Y Y W R K F D
1920  GAC CCG GTG ATG CCG COT ATG TTC GCG GCG CCG GCG TCG CCG TAC TCC COT GGA TCA CCG ACC GAT CCA AAC GTA ATC GTG GCA TGA ACG TTG
510  D A L M R F H F D G R G F V P Y S P G S P T D F H V I V A
2016  TGG AQA GAA GAG AQA AGC GAT TAC ATC TTC AAG AQA CAC TCT GAA CTG TTG TAA CTG GAA GAG AAG GAG GTG CTA CAG TTT CCG AAG AAG GCA AAG
2112  TCT CCA TTA CTA TTA TAG TGT TTG GCT GAC TCG GAG GCG CCA AQA AGC CCG CCG TCT GAT GAT GGT TCA GAT GAA CCG TTG GTT GCG GCA CCA ACA
2208  GAA AQA TGA ACC CTA GCA AGC GTG ATG CAA GTA CCA TCC CTT TAT CCG TTA CAA CAA GCG TGT ACA TTT TTG TAT GTA GAT TAA CAA GCG AAT TGT
2304  ACC CTA TGA ACC ATC TCC TCT GCG AAG CAA GCG CAT TTC CTT GCT COT TGG CTA GAA GTC TCT GCG CTC CTG GAT ATC TAC GAO TGC TTA
2400  TTA ATC TCC TCC CCG ACT TTC TAG TGG AAT GAT GTA ATG GTG TGT ACT TTA GCA APT TGT GTG AQA TGA GTG ATG ATC TTG TGG COT GGT TGC TAC
2496  ABA ACA CTC ATC TCA AAG TTA TCT ATC TAT TTT GTA TAT TGA ATT GAA ABA ABA ABA ABA A
    
```

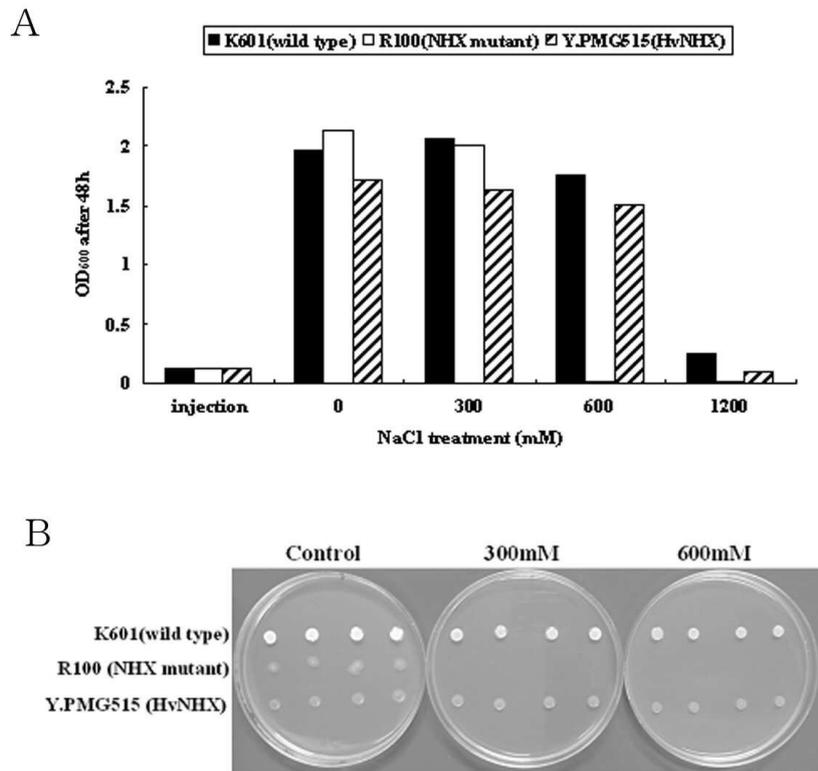
도면2



도면3



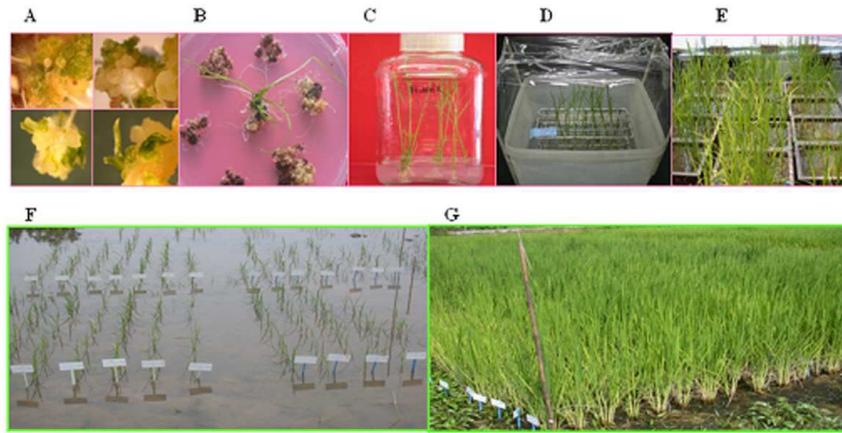
도면4



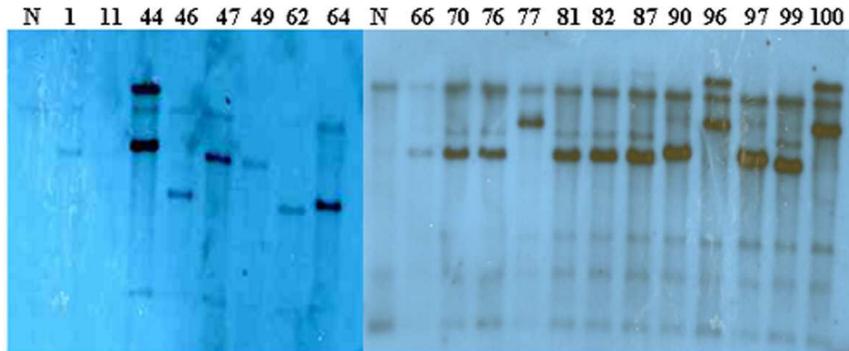
도면5



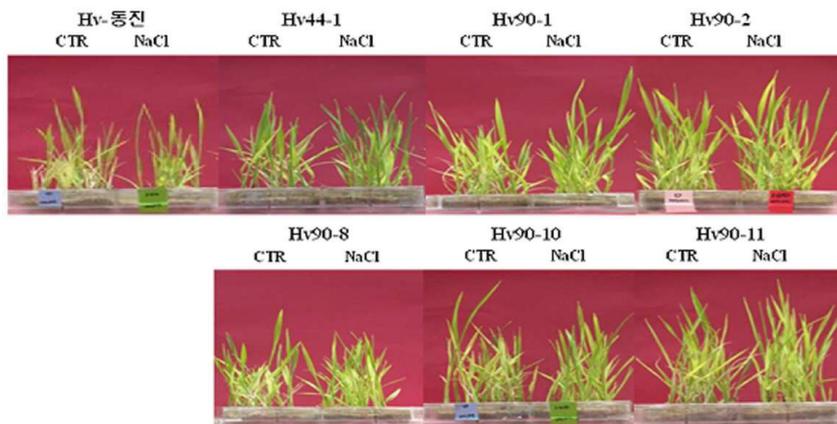
도면6



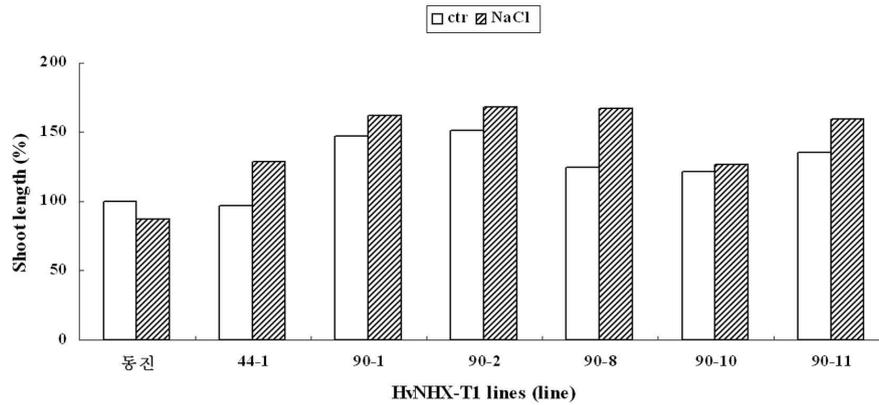
도면7



도면8



도면9



서열목록

<110> INDUSTRIAL COOPERATION FOUNDATION CHONBUK NATIONAL UNIVERSITY
 <120> Hordeum vulgare Na⁺/H⁺ antiporter (HvNHX) gene, method for improving salt tolerance in plants by expressing HvNHX gene and transgenic plants with improved salt tolerance developed by the application of the method

<130> PN08071

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2559

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 1
 aacggaacct tcaccagata ccccgcccg cgcgaaaagaa tagaggagaa tcccgaacct 60

cccgccecg cggetgcgca tetgcccc cctcctttt cctcctcgt ccccacccg 120

ggtttcccg gccattctt cctcctccac cccggcccg ggcacgaagc nncggcggag 180

acggggccag gaggaggagg agctcgctg ttctctgtt ccccgatgat tctctccgg 240

attagcgccg ccggccgttc cccgagggct ccgtccgggt tgattcgatc tgattgaaaa 300
 agccccgctc ttccccgag ggcgcgcgct cgctcgccgg agctagctgt gtctcgttcg 360
 gccgggctca aggaagaaga gtaacgggcg ggatggcggt cgaagtgggt gcggcgcagc 420
 tggcgcggct gagcgacgcg ctggccacct cggaccacgc ctccgtggtc tccatcaacc 480
 tcttcgtcgc gctgctctgc gcctgcatcg tcctcgcca cctcctcgag gagaaccgct 540
 ggctcaacga gtccatcacc gccctcatca tgggctgtg caccggcgtg gtgatcctga 600
 tgaccaccaa ggggaagagc tcgcacgtgc tcgtcttcag cgaggacctc ttcttcatat 660
 acctcctccc tcccatcacc ttcaacgccg gtttccaggt gaggaagaag cagttcttcc 720
 ggaatttcat gacaatcaca tcattcggcg ctgtcgggac gatgatttca ttcttcacaa 780
 tctctcttgc tgccattgcg atattcagca agatgaacat tgggacactg gatgtatcag 840
 attttctcgc aattggagcc atcttttccg cgacagattc ggtctgcaact ttacaggttc 900
 tcaatcagga cgagacgccc tttctgtaca gtctagtttt cggggaaggt gttgtgaacg 960
 atgccacatc agtcgtgctt ttcaacgcgc tccagaactt cgatcctaac caaatcgatg 1020
 caatcgtcat tcigaagttc ttgggaaact tctgctactt atccgtgtca agcaccttcc 1080
 ttggagtatt ttctggattg ctcaagtcat acataatcaa gaagtatac ataggaaggc 1140
 atttactga ccgtgaggtt gtgcttatga tgctcatggc ctaccttca tatatgctag 1200
 ctgagctgct tgatttgagt ggcatcctca ccgtgttctt ctgtgttatt gtgatgtcgc 1260
 attatacttg gcataatgtg acagagagct caagagttac aaaaagcat gcttttgcaa 1320
 ccttgctttt cattgttgag acctttctct tcctttatgt tgggatggat gcaactggata 1380
 tcgagaagtg gaaatttgct agtgacagcc ctggcaaatc catcggata agctcaattt 1440

tgctaggatt agttctggtt ggaagagctg cttttgtctt cccgctttca ttcttatcca 1500
 acctgacaaa gaagacggag ctcgaaaaaa taagctggag gcagcaaatc gtaatatggt 1560
 gggctgggct gatgagagga gctgtgtcga tcgctcttgc ttacaataag ttacaagat 1620
 ctggccacac acagctacac ggcaacgcga taatgatcac cagcaccatc actgtcgttc 1680
 tgtttagcac tatgctgttt ggcatattga caaagcctct gatccggttc ctgctgcccg 1740
 cgtcgagcaa tggcgacccc tcggagccct cgtcaccgaa gtccttgcaac tctcctctcc 1800
 tcacaagcat gctaggctcg gacatggagg cgcctctccc catcgtcagg cctccagcc 1860
 tccggatgct catcaccaag ccgacccaca ccatcacta ctactggcgc aagttcgacg 1920
 acgcctgat gcgcctatg ttccgggggc gcgggttcgt gccctactcc cctggatcac 1980
 ccaccgatcc aaacgtaatc gtggcatgaa cgttgtggag agaagagaaa agccattaca 2040
 tcttcaggag aactctgaa ctgttgtaac tggaagagaa ggaggtgcta cagcttcgga 2100
 agaaggcaaa gtctccatta ctattatagt gtttggctga ctcggagggc cgaagaaggc 2160
 gccctctga tgatggttca gatgaacggt tggttgcggc accaacagga agatgaacct 2220
 tagtaacggt gatgagta ccatgcctt atcggttacg acaagcctgt acattttgt 2280
 atgtagatta acaagcaat tgtacctat gagatgagat ctctctggc aggcaggcag 2340
 gccatttct tctccttgg ctaggagtct ctggcctct gcatactac cagtgttat 2400
 taatctctc cccacttcc tagtggattg gtgtaatggt gtgtacttta ccaagttgtg 2460
 tgagatgagt gatgatcttg tggcctggtt gctacaaaga actcatctca aagttatcta 2520
 tctattttct atattgaatt gaaaaaaaa aaaaaaaaa 2559

<210> 2
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 2
 Met Ala Phe Glu Val Val Ala Ala Gln Leu Ala Arg Leu Ser Asp Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Ser Asp His Ala Ser Val Val Ser Ile Asn Leu Phe Val
 20 25 30

Ala Leu Leu Cys Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn
 35 40 45

Arg Trp Leu Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr
 50 55 60

Gly Val Val Ile Leu Met Thr Thr Lys Gly Lys Ser Ser His Val Leu
 65 70 75 80

Val Phe Ser Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile
 85 90 95

Phe Asn Ala Gly Phe Gln Val Arg Lys Lys Gln Phe Phe Arg Asn Phe
 100 105 110

Met Thr Ile Thr Ser Phe Gly Ala Val Gly Thr Met Ile Ser Phe Phe
 115 120 125

Thr Ile Ser Leu Ala Ala Ile Ala Ile Phe Ser Lys Met Asn Ile Gly
 130 135 140

Thr Leu Asp Val Ser Asp Phe Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ser Ala
 145 150 155 160

Thr Asp Ser Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Asp Glu Thr Pro
 165 170 175

Phe Leu Tyr Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr
 180 185 190

Ser Val Val Leu Phe Asn Ala Leu Gln Asn Phe Asp Pro Asn Gln Ile

Thr Met Leu Phe Gly Ile Leu Thr Lys Pro Leu Ile Arg Phe Leu Leu
 435 440 445

Pro Ala Ser Ser Asn Gly Asp Pro Ser Glu Pro Ser Ser Pro Lys Ser
 450 455 460

Leu His Ser Pro Leu Leu Thr Ser Met Leu Gly Ser Asp Met Glu Ala
 465 470 475 480

Pro Leu Pro Ile Val Arg Pro Ser Ser Leu Arg Met Leu Ile Thr Lys
 485 490 495

Pro Thr His Thr Ile His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asp Ala Leu
 500 505 510

Met Arg Pro Met Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Tyr Ser Pro Gly
 515 520 525

Ser Pro Thr Asp Pro Asn Val Ile Val Ala
 530 535

<210> 3
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T7 primer

<400> 3
 aatagcactc actatag

17

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T3 primer

<400> 4

aattaaccct cactaaaggg 20

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 5
 ttcgggcggc cgcaaggaag aa 22

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 6
 catcttcagt cgacactctg aa 22