

환경스트레스 내성 관련 남극좀새풀 유전자를 활용한 신기능 작물 개발

Application of abiotic stress-related *Deschampsia antarctica* genes in development of functional crops



연세대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “ 남극 고유생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발견에 관한 연구(본과제명)” 과제의 위탁연구 “환경스트레스 내성 관련 남극종새풀 유전자를 활용한 신기능 작물 개발에 관한 연구(위탁과제명)” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



2016. 01. 31

(본과제) 총괄연구책임자 : 박 현

위탁연구기관명 : 연세대학교

위탁연구책임자 : 김 우 택

위탁참여연구원 : 변 미 영

“ : 최 려 화

보고서 초록

위탁연구과제명	환경스트레스 내성 관련 남극초새풀 유전자를 활용한 신기능 작물 개발				
위탁연구책임자	김우택	해당단계 참여연구원수	3명	해당단계 연구비	50백만원
연구기관명 및 소속부서명	연세대학교		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 : 상대국연구기관명 :				
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	30
극지식물은 극한 환경에 적응할 수 있는 기작을 보유하고 있어 식물의 다양한 환경에 대한 반응 연구에 좋은 재료로 쓰일 수 있는 가능성이 높지만 다른 모델 식물들에 비해 연구된 바가 극히 부족함. 또한 지구온난화로 인한 기후변화는 해마다 작물생산에 큰 피해를 주고 있어 환경 스트레스에 대한 저항성이 높은 작물을 개발하는 것이 현시대 많은 사람들의 관심사가 되고 있음. 따라서 본 연구는 극지 환경에서 생존하는 벼과 다년생 식물인 남극초새풀(Antarctic hair grass, <i>Deschampsia antarctica</i>)의 유전자원을 활용하여 환경 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 벼 형질전환 식물체를 개발하여 작물 생산성 향상과 작물의 경작 가능 지역 확대에 기여하는 것을 목표로 하고 있음. 신기능 벼 형질전환 식물체를 실제 경작지에서 재배함으로써 남극초새풀 유전자의 과다발현에 따른 생장, 종자 수확률 등의 농업적 형질 변화가 있는지를 관찰하였음. 그 결과 농업적으로는 야생종과 비슷한 생장, 종자 수확률을 유지하였음. 형질전환 벼 식물체의 환경스트레스에 대한 저항성 기능을 분석하기 위하여 건조, 저온 등의 스트레스에 대한 저항성 변화를 야생종과 비교 분석하였으며 반복 실험을 통해 건조, 저온 등 스트레스에 대한 저항성 변화를 통계 처리하였음. 그 결과 <i>DaCBF4</i>의 과다발현 형질전환 벼 식물체는 저온 스트레스에 대해 야생종보다 강한 저항성을 나타내는 반면 건조 스트레스에 대해서는 야생종에 비해 낮은 생존률을 나타내었음. <i>DaADF</i> 과다발현 형질전환 벼 식물체는 저온 스트레스에 대해 야생종보다 강한 저항성을 나타내었음. 그 외, <i>DaGolS</i> 과다발현 형질전환 벼 식물체는 건조 스트레스에 대해 야생종보다 강한 저항성을 나타내었음. 남극초새풀 유전자 과다발현 식물체에서의 스트레스 관련 기작을 분석하고자 qRT-PCR을 통해 전사인자로 작용할 수 있는 <i>DaCBF4</i>의 기능을 확인하였음.					
색인어 (각 5개 이상)	한글	남극초새풀, 벼 형질전환 식물체, 저온반응성 전사인자, 스트레스 저항성 신기능성 작물, 환경 스트레스			
	영어	Abiotic stress-tolerant plants, Antarctic hair grass <i>Deschampsia antarctica</i> , <i>DaCBF4</i> , <i>DaADF</i> , <i>DaGolS</i> , Environmental stress, Transgenic rice plants			

요 약 문

I. 제 목

환경스트레스 내성 관련 남극좁새풀 유전자를 활용한 신기능 작물 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

(1) 연구개발의 목적

형질전환 벼 식물체를 이용한 남극좁새풀 환경스트레스 내성 관련 유전자의 기능 분석 및 기능성 작물 개발을 통한 극지생명자원의 응용 가능성 검증.

(2) 연구개발의 필요성

극지식물은 혹독한 환경에 적응할 수 있는 기작을 보유하고 있어 식물의 환경에 대한 반응 연구에 좋은 재료로 쓰일 수 있는 가능성이 높음. 하지만 다른 모델 식물들에 비해 연구된 바가 부족하며 또한 지구온난화로 인한 기후변화는 해마다 작물생산에 큰 피해를 주고 있어 환경 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 작물을 개발하는 것이 현대 중요한 관심사가 되고 있음. 따라서 극지 환경에서 잘 자라는 벼과 다년생 식물인 남극좁새풀(Antarctic hair grass, *Deschampsia antarctica*)을 활용하여 환경스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 벼 형질전환 식물체를 개발하고, 이를 통해 작물 생산성 향상과 작물의 경작가능지역 확대에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

III. 연구개발의 내용 및 범위

(1) 포장재배를 통한 형질전환 벼 식물체의 농업적 형질 분석 및 세대 진전

실제 경작지 조건에서 야생종과 성장을 비교하고 생장과 발달에서의

차이, 종자 수확률 등을 분석하기 위하여 모내기를 수행함. 또한 경작지를 통해 종자를 얻음으로서 형질전환 벼 식물체의 세대진전을 진행함.

(2) 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 관련 기능 분석

건조, 저온 등의 스트레스에 대한 저항성 변화를 야생종과 비교 분석함. 또한 반복 실험을 통해 건조, 저온 등 스트레스에 대한 저항성 변화를 통계 처리함.

(3) 환경 스트레스 관련 남극곰새폴 단백질의 특성 분석

전사인자로 작용할 수 있는 특성을 qRT-PCR 분석을 진행함. 또한 관련 단백질의 생화학적 특성을 분석하기 위해 여러 가지 클로닝 및 샘플 준비를 진행함.

IV. 연구개발결과

(1) 포장재배를 통한 형질전환 벼 식물체의 농업적 형질 분석 및 세대 진전

형질전환 벼 식물체의 농업적 형질 분석을 위하여 *DaCBF4*, *DaADF*, *DaGolS* 등 남극곰새폴 유전자를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체들을 야생종과 함께 포장지에서 포장작업을 실행한 결과 농업적으로 크게 차이가 없는 것을 관찰하였음. *DaCBF4* (T4), *DaADF* (T4), *DaGolS* (#1-T2, #2-T5) 등 남극곰새폴 유전자를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체를 포장 재배하여 세대진전을 통해 *DaCBF4* (T5), *DaADF* (T5), *DaGolS* (#1-T3, #2-T6) 종자들을 확보하였음. 새로 확보된 *DaGolS* 유남극곰새폴 유전자를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체의 #1라인과 #2라인에 대해 전사수준에서 과다발현됨을 확인함.

(2) 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 내성 기능 분석

- 건조 스트레스: *DaCBF4* 과다발현 벼 식물체를 건조 스트레스를 처리한 후 생존율을 야생종과 비교하였을 때 야생종보다 약한 표현형을 나타냄. *DaGolS* 과다발현 벼 식물체를 건조 스트레스를 처리한 후 생존율을 야생종과 비교하였을 때 야생종 보다 강한 내성을 나타내는 것을 확인하였음.
- 저온 스트레스: *DaCBF4*, *DaADF* 과다발현 벼 식물체를 저온(4°C) 스트레스 후 생존율을 야생종과 비교하였을 때 저온에 보다 강한 내

성을 나타내는 것을 확인하였음. 또한 *DaCBF4* 과다발현 벼 식물체가 저온 스트레스에 대한 내성 검증을 반복적으로 수행하여 통계 처리를 통해 보다 강한 내성을 나타냄을 확인하였음.

(3) 환경 스트레스 관련 남극종새풀 단백질의 특성 분석

- *DaCBF4* 과다발현 형질전환 식물체에서의 target 유전자에 대한 qRT-PCR 분석을 진행함.
- *DaADF* 단백질 기능 분석을 위한 클로닝 제작 및 RNA-seq 분석을 위해 저온 처리 후 샘플링을 진행함.
- *DaGolS* 단백질 활성 비교를 위한 클로닝 제작함.

V. 연구개발결과의 활용계획

- (1) 환경 스트레스 관련 남극종새풀 유전자의 기능 분석을 통해 신기능성 작물 개발을 위한 유용 자원을 제공할 수 있음.
- (2) 기능성 유전자의 특성 분석 및 형질전환 벼 식물체의 형질 분석을 통해 특허 출원과 학술발표 등을 수행하여 유전자원을 선점할 수 있음.

극지연구소

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

I. Title

Application of abiotic stress-related *Deschampia antarctica* genes in development of functional crops

II. Purpose and Necessity of R&D

1. Purpose

Functional analysis of abiotic stress-related *Deschampia antarctica* genes and application of functional crops to demonstrate the capability of Antarctic living organism resource.

2. Necessity of R&D

Deschampia antarctica is a flowering plant which grows naturally in the Antarctic, where is harsh condition for living organism. The adaptive mechanism that enable them to live in such damaging growth condition is valuable to be studied. Although the necessities were recognized for many years, researches on the Antarctic living things, especially plants, are still rudimentary.

III. Contents and Extent of R&D

To evaluate the agricultural value of these transgenic plants, we fertilized the transgenic plants with wild type plants on the real field. For further analysis of enhanced resistance to abiotic stress in transgenic plants, we treated cold and drought stress on overexpressing plants (*DaCBF4*, *DaADF*, *DaGolS*) and analyzed the stress phenotype with multiple experiments. To investigate the characteristics of stress-related *Deschampia antarctica* proteins in plants, an qRT-PCR analysis were performed.

IV. R&D Results

DaCBF4-, *DaADF*-, and *DaGolS*-over-expressing transgenic rice plants displayed similar morphology to wild type plants in the field under normal growth conditions. Transgenic plants of *DaCBF4* and *DaADF* displayed more tolerant to cold stress and transgenic plants of *DaGolS* displayed more tolerant to drought stress as compared to wild type rice plants. The qRT-PCR analysis showed that expression levels of *OsBI-1*, *Cytoplasmic malate dehydrogenase*, *CCDC53*, *Os03g02470*, *Os10g22630*, and *TLP* were markedly upregulated in *Ubi:DaCBF4* transgenic rice plants than in the wild-type plants under both normal and cold-treated conditions. These results suggested that stress-related antarctic hair grass genes played an important role in response to cold and drought stress.

V. Application Plans of R&D Results

Overall, our results suggest that it is valuable to isolate new resources of *Deschampia antarctica* for practical purpose. Furthermore, we may preoccupy the resources of stress-related *Deschampia antarctica* genes through patent application and presentation in conference.

목 차

제 1 장 서론

제 1 절 연구의 목적

제 2 절 연구의 필요성 및 본 과제와의 연계성

1. 연구의 필요성

2. 본과제와의 연계성

제 3 절 선행 연구 결과 및 당해 연도 연구의 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 남극곰새풀에 관한 연구 현황

제 2 절 환경 스트레스 내성 작물 개발에 관한 연구

제 3 절 본 연구 결과가 국내외 기술개발에서 차지하는 위치

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 이론적·실험적 접근 방법

제 2 절 연구 내용

제 3 절 연구 결과

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

제 2 절 본 연구의 관련분야 기술발전예의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

제 2 절 타 연구에서의 응용

제 3 절 기업화 추진방안

제 6 장 참고문헌

제 1 장 서론

제 1 절 연구의 목적

벼 형질전환 식물체를 이용한 남극초새풀 환경스트레스 내성 관련 유전자의 기능 분석 및 기능성 작물 개발을 통한 극지생명자원의 응용 가능성 검증.

제 2 절 연구의 필요성 및 본 과제와의 연계성

1. 연구의 필요성

가. 극한 환경에서 서식하는 극지식물은 다양한 환경에 적응할 수 있는 기작을 보유하고 있어 식물의 여러 환경에 대한 반응 연구에 좋은 재료로 쓰일 수 있는 가능성이 높지만 다른 모델 식물들에 비해 연구된 바가 극히 부족함.

나. 기후변화가 일으키는 지구온난화는 해마다 작물생산에 큰 피해를 주고 있어 환경 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 작물을 개발하는 것이 세계 여러 학자들의 관심을 불러일으키고 있음.

다. 극지 환경에서 잘 자라는 벼과 다년생 식물인 남극초새풀 (Antarctic hair grass, *Deschampsia antarctica*)의 스트레스 관련 유전자를 활용하여 환경 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 벼 형질전환 식물체를 개발하고, 이를 통해 작물 생산성 향상과 작물의 경작가능지역 확대에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

2. 본 과제와의 연계성

가. 본 과제 「남극 고유생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발굴」은 극지생물의 생명정보 확보와 저온적응 기작 해석을 근거로 남극 고유생물 유래 신생명자원의 활용가치 발굴을 목표로 하고 있음.

나. 해당 위탁과제에서는 남극곰새풀의 유전자들 중 극지환경 적응과정에 관여할 가능성이 높은 유전자들을 선별하고 이를 과다발현 시키는 형질전환 벼 식물체를 제작하여 환경 스트레스에 대한 저항성을 검증함으로써 유전자들의 기능을 추론하는 기능 유전체 분석을 통하여 극지식물 생명현상을 규명할 것임.

다. 국내 대표 작물인 벼를 기본 시스템으로 하여 극지식물 유래 유전자원을 작물 개발에 이용함으로써 극지생물 유전자의 활용성을 높이려 함. 또한 식물 개체 수준에서의 유전자의 기능을 분석을 가능하게 하여 분자 수준의 연구 한계를 극복할 수 있게 함.

제 3 절 선행 연구 결과 및 당해 연도 연구의 범위

1. 선행 연구 결과

가. 유전자의 선택 및 과다발현 벡터를 이용한 식물체 제작

- (1) 건조, 고염, 저온 등의 환경스트레스 특이적 남극곰새풀 유전자 *DaCBF4*, *DaCBF7*, *DaADF*, *DaUKCOR*, *DaGolS1*, *Da51G1* 등 6종을 선별 후 벡터를 제작함.
- (2) *Agrobacterium*을 이용한 조직배양 방법을 이용하여 남극곰새풀 유전자를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체를 제작함.
- (3) Genomic DNA PCR을 통하여 남극곰새풀 유전자가 벼에 삽입되었는지 여부를 확인한 후 genomic Southern blot의 방법으로 과다발현 벼 형질전환 식물체에서 개별라인을 선별함. RT-PCR의 방법으로 형질전환 벼 식물체에서 남극곰새풀 *DaCBF4*, *DaGolS1*, *DaCBF7*, *DaADF*, *DaUKCOR* 등 유전자의 과다발현 여부를 확인함.

나. 남극곰새풀 유전자 과다발현 벼 형질전환 식물체의 스트레스 내성 검증

- (1) *DaCBF7*을 과다발현하는 벼 형질전환 식물체의 건조, 고염, 저온 스트레스 내성을 검증한 결과, 건조 고염 스트레스에 대해 내성 변화 없지만 저

온 스트레스에 대하여 야생종보다 저항성이 증가함을 확인함.

- (2) *DaCBF4* 과다발현 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성을 검증한 결과 야생종보다 저항성 증가함을 확인함.
- (3) *DaUKCOR* 과다발현 벼 식물체의 건조와 저온 스트레스에 대한 내성을 검증한 결과 두 가지 스트레스에 대해 야생종보다 모두 강한 저항성을 나타냄을 확인함.

다. 환경스트레스 내성 관련 단백질의 특성 분석

- (1) 식물체 내에서 대상 단백질의 세포 내 소기관 위치를 파악: *DaCBF7* 단백질 및 *DaCBF4* 단백질의 세포내 위치가 핵임을 대조구와 비교하여 파악함. *DaGolS* 단백질의 세포내 위치가 세포질임을 대조구와 비교하여 파악함.
- (2) 스트레스 관련 단백질의 생화학적 특성을 분석: *DaCBF4*와 *DaCBF7*이 코딩하는 단백질은 AP2 domain을 가지고 있는 전사인자로 작용할 수 있어, 단백질의 DNA 결합력을 gel retardation assay로 파악함.

라. 형질전환 식물체의 농업형질 분석

정상 생장 조건에서 야생종과 형질전환 벼 식물체의 성장을 비교하여 관찰 및 조사한 결과 형질, 종자에서 크게 차이가 없음을 확인함.

마. 형질전환 식물체의 기능적 형질 분석 및 작용 기작 확인

- (1) 남극종새풀 스트레스 관련 유전자(*DaCBF4*)를 도입한 벼 형질전환 식물체의 스트레스 관련 기능적 형질을 분석하고자 건조 스트레스(survival rate, water loss 등 측정)에 대한 표현형을 분석하고, 이를 포장 재배를 이용하여 다각적으로 분석함.
- (2) 남극종새풀 스트레스 관련 유전자(*DaCBF7*)를 도입한 벼 형질전환 식물체의 스트레스 관련 기능적 형질을 분석하고자 저온 스트레스(survival rate, chlorophyll contents 등 측정)에 대한 표현형을 분석하고, 이를 포장 재배를 이용하여 다각적으로 분석함.

2. 당해 연도 연구의 범위

가. 포장재배를 통한 형질전환 벼 식물체의 농업적 형질 분석 및 세대 진전

남극솜새풀 유전자의 과다발현에 따른 생장, 종자 수확률 등의 농업적 형질 변화를 실제 경작지에서의 재배를 통해 관찰함으로써 농업적인 응용가치를 분석함. 또한 경작지를 통해 종자를 얻음으로서 형질전환 벼 식물체의 세대진전을 진행함.

나. 형질전환 벼 식물체의 스트레스 내성 기능 분석

- (1) 건조, 저온 등의 스트레스에 대한 저항성 변화를 야생종과 함께 비교하여 표현형을 분석함.
- (2) 저온 스트레스에 대한 표현형 분석을 반복적으로 진행함으로써 저항성 변화를 통계 처리함.

다. 환경 스트레스 관련 남극솜새풀 단백질의 특성 분석

- (1) 전사인자로 작용할 수 있는 특성을 qRT-PCR 분석을 통해 확인함.
- (2) 환경 스트레스 관련단백질의 생화학적 특성을 분석하기 위해 여러 가지 클로닝 및 샘플 준비를 진행함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 남극곰새풀에 관한 연구 현황

1. 남극곰새풀은 극지생물의 분자생물학적 연구의 재료로 이용되어 성공적으로 저온 환경에서 특이적으로 발현하는 세 가지 유전자를 선별하고 발현을 분석한 보고 (Gidekel et al., 2003)와 남극 자연환경에서 발현하는 EST 분석에 관한 보고가 있었음 (Lee et al., 2008).
2. 식물체 추출물에서 결빙방지 활성 측정 (Bravo and Griffith, 2005), 자외선 처리에 의한 남극곰새풀의 생리적 변화 (Ruhland et al., 2005)등 생리 생태적, 단백질의 기능적 연구 등이 꾸준히 이루어지고 있음.
3. 극한의 환경에서 자라는 남극곰새풀이 환경스트레스 하에 변화되는 전사체의 서열분석에 관한 보고 (Lee et al., 2013)도 있었음.

제 2 절 환경 스트레스 내성 작물 개발에 관한 연구

1. 이상 기후, 경작지 감소 등 요인으로 인한 작물 생산량 감소는 여러 환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 기능성 작물 개발에 대한 관심도가 높아지고 있다.
2. 환경 스트레스 관련 유용 유전자의 발굴과 이를 이용한 원천 자원의 확보는 많은 연구자들의 관심을 모으고 있으며 또한 이를 위한 연구가 활발히 진행되고 있음.
3. 환경 스트레스 관련 유전자를 작물에 과다발현 시켜 스트레스 관련 기능적 표

현형을 검정 및 분석하는 방법으로, 유용 유전자를 도입시킨 작물을 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있음. 그 중 극한의 환경에서 자라는 남극조생대에서 환경 스트레스 관련 유전자를 선별 후 벼 식물체에 도입함으로써 저온 스트레스에 대해 강한 저항성을 지닌 형질 전환 벼 식물체를 만들어 관련 유전자의 기능 분석에 관한 보고 (Byun et al., 2015)가 있었음. 여러 환경 스트레스 관련 유용 유전자를 연구를 통해 스트레스에 내성을 가지면서 농업적 형질 등과 같은 작물의 생산성에는 영향을 주지 않는 작물의 개발이 많은 연구자들의 관심이 됨.

제 3 절 본 연구 결과가 국·내외 기술개발에서 차지하는 위치

1. 환경 스트레스 관련 유용 유전자의 선점

남극조생대에서 분리한 환경 스트레스 관련 유전자를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체를 이용하여 유전자의 기능을 분석함으로써 유전자의 기능을 규명하고, 특허등록·학술발표 등을 통해 유용 유전자를 선점 할 수 있음.

2. 신기능 작물 개발

환경 스트레스 관련 유용 유전자를 작물에 도입시켜 스트레스에 대한 내성을 가지는 신기능성 작물을 개발할 수 있고 또한 이를 이용하여 건조, 저온 등의 극한 환경에서도 자랄 수 있는 작물을 개발하여 분석함으로써 식량 생산량을 증대시킬 수 있는 근거를 제시할 수 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 이론적 · 실험적 접근 방법

1. 포장재배를 통한 형질전환 벼 식물체의 농업적 형질 분석 및 세대 진전

남극곰새풀 유전자를 과다발현 시킨 형질전환 벼 식물체를 야생종과 함께 포장재배하여 실제 경작지 조건에서 야생종과 성장을 비교하고 생장과 발달에서의 차이, 종자 수확률 등을 분석하기 위하여 모내기를 수행함.

2. 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 내성 기능 분석

가. 건조 스트레스

- (1) 동일한 생장조건에서 야생종과 남극곰새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체를 키운 후 물을 주지 않고 일정 시간동안 키우다가 다시 물을 주었을 때 그 생존율을 비교하여 저항성 증진을 판단하는 방법을 이용함.
- (2) 동일조건에서 건조 스트레스의 반복 처리를 통하여 생존율에 대한 통계처리를 진행함.

나. 저온 스트레스

- (1) 동일한 생장조건에서 야생종과 남극곰새풀 유전자가 과다발현된 형질전환 벼 식물체를 키운 후 4℃로 저온처리를 하고 일정기간이 지난 후 정상조건인 28℃에서 회복, 성장 시켜 그 생존율을 비교함으로써 저온 스트레스에 대한 저항성 증진을 판단하는 방법을 이용함.
- (2) 동일조건에서 저온 스트레스의 반복 처리를 통하여 생존율에 대한 통계처리를 진행함.

3. 환경 스트레스 관련 남극곰새풀 단백질의 특성 분석

전사인자로 작용할 수 있는 특성을 알아보기 위해 qRT-PCR 분석을 진행함.

스트레스 관련 남극곰새풀 단백질의 생화학적 특성 분석을 위해 클로닝 제작 및 샘플링을 진행함.

제 2 절 연구 내용

1. 포장재배를 통한 형질전환 벼 식물체의 농업적 형질 분석 및 세대 진전

남극곰새풀 유전자를 과다발현 시킨 형질전환 벼 식물체를 야생종과 함께 포장재배하여 실제 경작지 조건에서 야생종과 성장을 비교하고 생장과 발달에서의 차이, 종자 수확률 등을 분석함. 그 외, 경작지를 통해 종자를 얻음으로서 형질전환 벼 식물체의 세대진전을 함으로써 새로운 세대를 획득함.

2. 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 저항성 기능 분석

야생종과 과다발현 형질전환 벼 식물체간의 환경스트레스 저항성을 비교하고자, 동일 조건에서 성장한 야생종과 형질전환 벼 식물체에 건조, 저온 등의 환경 스트레스를 처리하고 이에 대한 저항성을 생존을 비교함. 반복 처리를 통한 통계처리를 진행함.

3. 환경 스트레스 관련 남극곰새풀 단백질의 특성 분석

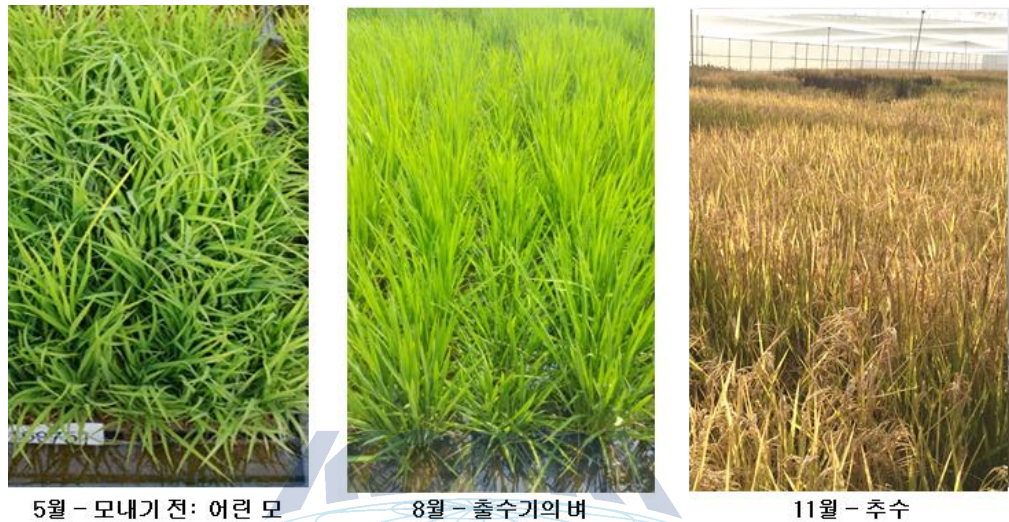
전사인자로 작용할 수 있는 특성을 알아보기 위해 qRT-PCR 분석을 진행함. 또한 트레스 관련 남극곰새풀 단백질의 생화학적 특성 분석을 위해 클로닝 제작함.

제 3 절 연구 결과

1. 포장재배를 통한 형질전환 벼 식물체의 농업적 형질 분석 및 세대 진전

가. 극지유전를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체의 농업적 형질 분석 및 세대 진전을 위한 포장실험

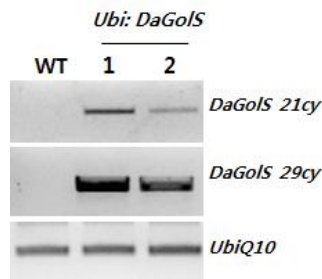
DaCBF4, *DaADF*, *DaGolS* 등 남극곰새풀 유전자를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체들을 야생종과 함께 전주 익산 LMO 포장지에서 세 차례의 출장을 통해 포장작업, 출수기 관찰 및 추수를 진행함 (그림 1). 그 결과, *DaCBF4*, *DaADF*, *DaGolS* 등 남극곰새풀 유전자를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체들이 농업적으로는 야생종과 비슷한 생장, 종자 수확량을 유지하는 것을 확인함.



(그림 1) 형질전환 벼 식물체들의 포장재배

나. RT-PCR로 남극곰새풀 유전자의 과다발현 확인

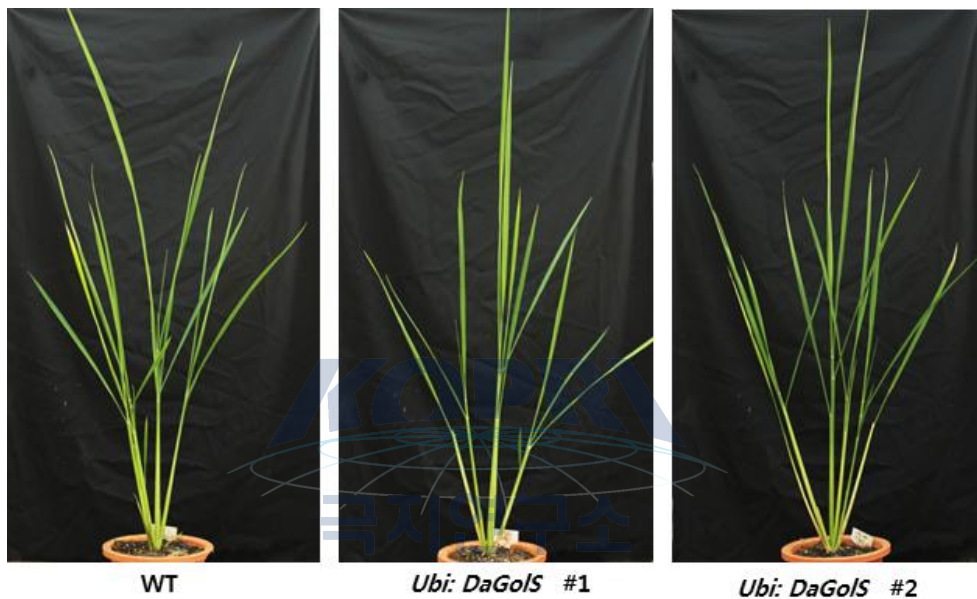
선행 연구를 통해 얻은 새로운 *DaGolS* #2 라인 형질전환 벼 식물체(T2 세대)에서 남극곰새풀 유전자의 발현을 확인하기 위하여 기존의 #1 라인(T5 세대)과 함께 RT-PCR을 수행한 결과 야생종 벼에는 없는 외래 유전자인 *DaGolS*가 과다발현 벼 식물체에서 잘 발현되고 있음을 확인하였음 (그림 2).



(그림 2) RT-PCR을 통한 형질전환 벼에서 *DaGolS* 과다발현 확인

다. *DaGolS* 과다발현 벼 식물체의 농업적 형질 분석

남극춥새풀 유전자 *DaGolS*를 과다발현 시킨 형질전환 벼 식물체의 독립적인 라인 #1 (T5), #2 (T2)을 야생종과 함께 온실에서 성장시킨 후 그 성장상태를 비교해 보았음. 그 결과 *DaGolS* 유전자를 과다발현하는 벼의 영양생장 (vegetative growth)은 야생종 벼와 큰 차이를 보이지 않았음 (그림 3).



(그림 3) 야생종과 *DaGolS* 형질전환 식물체의 성장비교

2. 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 내성 기능 분석

가. *DaCBF4* 과다발현 벼 식물체(T4 세대)의 건조 내성 검증

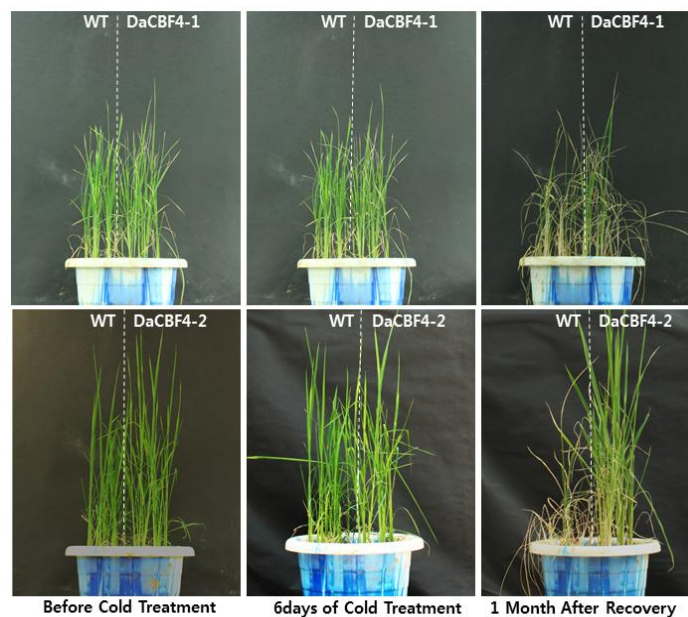
6주된 야생종과 *DaCBF4* 유전자가 과다발현된 형질전환 벼 식물체(T4 세대)를 28℃의 동일한 성장조건에서 키운 후 7일 정도 물을 주지 않는 상태에서 키운 후 다시 물을 주어 회복, 성장시킴. 이런 과정을 반복 진행하여 검증한 결과 *DaCBF4* 과다발현된 식물체가 건조 스트레스에 대한 내성이 야생종에 비해 약한 것을 확인함 (그림 4).



(그림 4) 야생종과 *DaCBF4* 과다발현 T4 식물체의 건조 스트레스 내성 검증

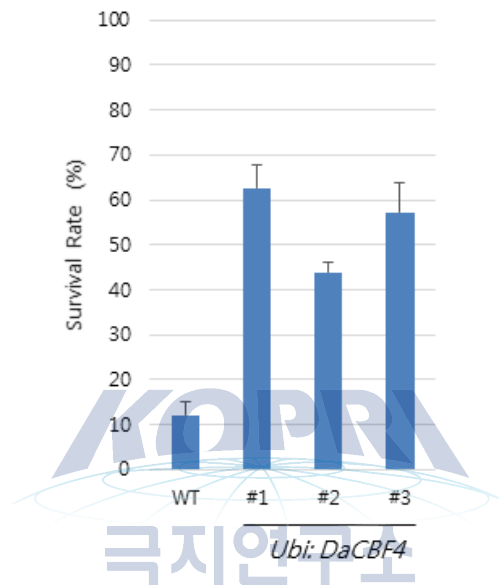
나. *DaCBF4* 과다발현 벼 식물체(T4 세대)의 저온 내성 검증

6주된 야생종과 *DaCBF4* 유전자가 과다발현된 형질전환 벼 식물체(T4 세대)를 28℃의 동일한 생장조건에서 키운 후 4℃로 저온처리를 하고 6일 정도 지난 후 다시 정상조건에서 회복, 성장시킴. 이런 과정을 반복 진행하여 검증한 결과 야생종에 비하여 *DaCBF4* 과다발현된 식물체가 저온스트레스에 대해 야생종에 비해 보다 강한 내성을 나타내는 것으로 확인됨 (그림 5).



(그림 5) 야생종과 *DaCBF4* 과다발현 T4 식물체의 저온 스트레스 내성 검증

DaCBF4 과다발현 식물체(T4 세대) 독립적인 세라인 (*Ubi:DaCBF4* #1, #2, #3) 모두 야생종에 비하여 저온 스트레스에 강한 것을 여러 번의 반복 실험을 통하여 확인하였음. 또한 이런 반복된 실험 결과를 통계처리를 함으로써 저온 스트레스를 처리하였을 때 야생종에 비해 월등한 생존력으로 보이고 있음을 알 수 있었음 (그림 6).

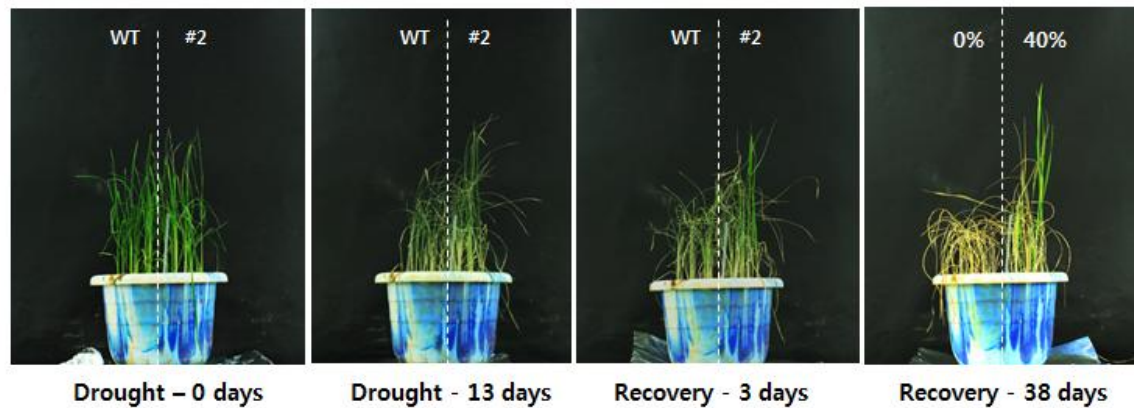


(그림 6) 야생종과 *DaCBF4* 과다발현 식물체(T4 세대)의 저온 스트레스에 대한 생존율 비교

다. *DaGolS* 과다발현 벼 식물체(T2 세대)의 건조 내성 검증

동일한 조건에서 키운 6주된 야생종과 *DaGolS* 과다발현 벼 식물체에 물을 주지 않고 13일 동안 키운 후, 다시 물을 주어 정상적으로 키우면서 회복정도를 비교한 결과 *DaGolS* 과다발현 벼 식물체(T2 세대)들이 야생종 벼 식물체보다 건조 스트레스에 높은 저항성 나타내는 것을 확인함 (그림 7).

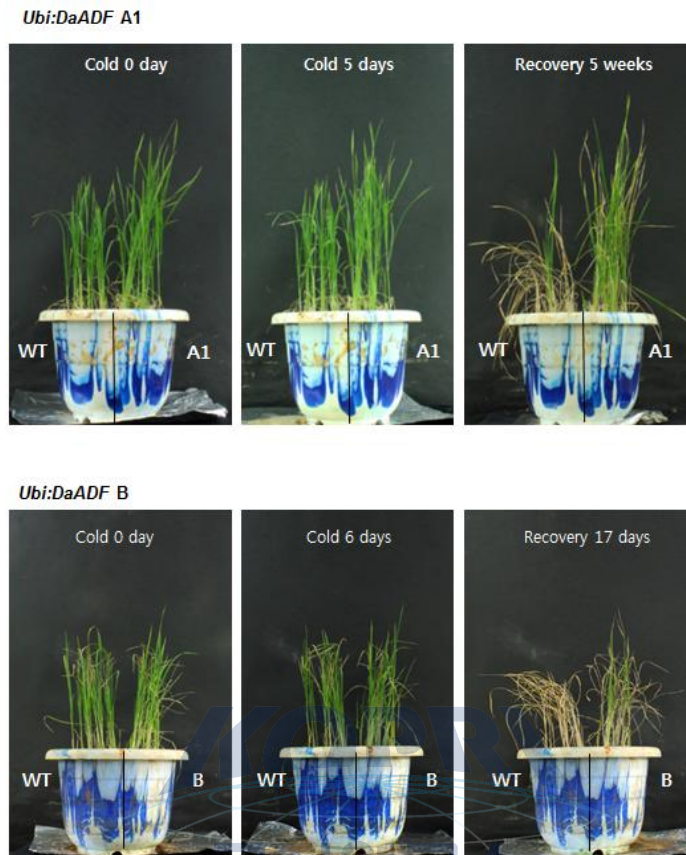
Drought



(그림 7) 야생종과 *DaGolS* 과다발현 T2 식물체의 건조 스트레스에 대한 저항성 비교

라. *DaADF* 과다발현 벼 식물체(T4 세대)의 저온 내성 검증

6주된 야생종과 *DaADF* 유전자가 과다발현된 형질전환 벼 식물체(T4 세대)를 28℃의 동일한 생장조건에서 키운 후 4℃로 저온처리를 하고 5-6일 정도 지난 후 다시 정상조건에서 회복, 성장시킴. 그 결과 야생종에 비하여 *DaADF* 과다 발현된 형질전환 식물체 A, B 두 라인 모두 저온스트레스에 대해 야생종 보다 강한 내성을 나타내는 것으로 확인됨 (그림 8).



(그림 8) 야생종과 *DaADF* 과다발현 T4 식물체의 저온 스트레스 내성 검증

DaADF 과다발현 식물체(T4 세대) 독립적인 세라인 모두 야생종에 비하여 저온 스트레스에 강한 것을 여러 번의 반복 실험을 통하여 확인하였음. 또한 이런 반복된 실험 결과를 통계처리를 진행함으로써 저온 스트레스를 처리하였을 때 야생종에 비해 월등한 생존력으로 보이고 있음을 알 수 있었음 (그림 9).

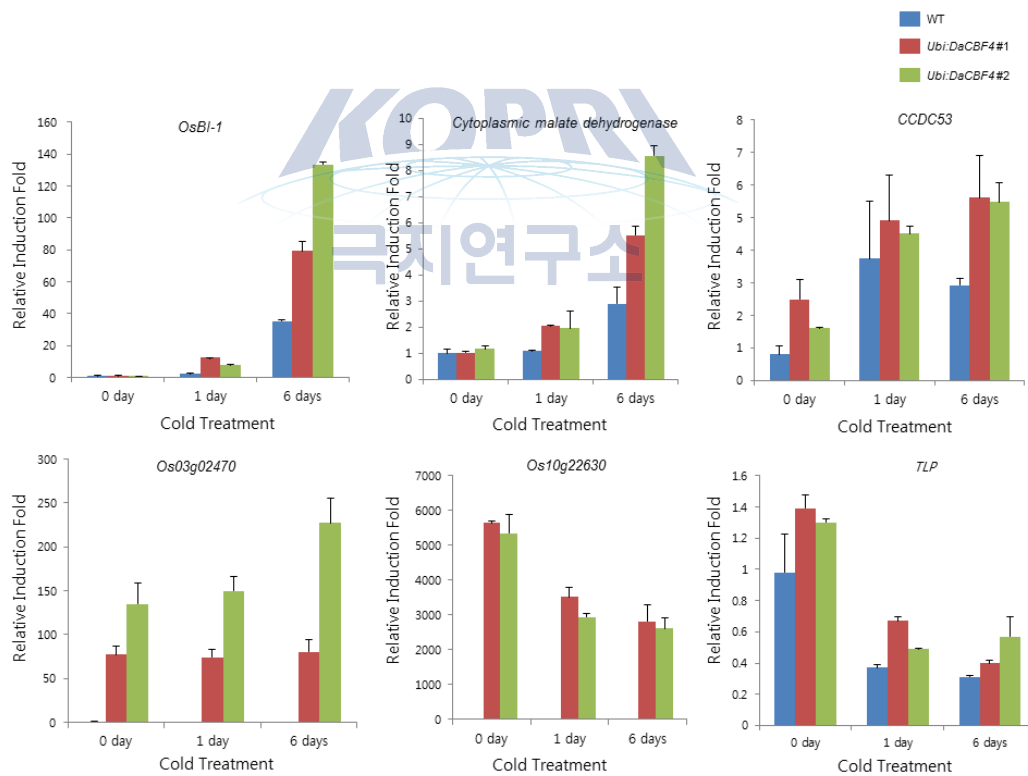
Genotype	Survival rate (%)
Wild Type	8.8
<i>Ubi:DaADF A</i>	62.3
<i>Ubi:DaADF B</i>	44.1

(그림 9) 야생종과 *DaCBF4* 과다발현 식물체(T4 세대)의 저온 스트레스에 대한 생존율 비교

3. 환경 스트레스 관련 남극종새풀 단백질의 특성 분석

가. 남극종새풀 유전자 과다발현 식물체에서의 스트레스 관련 기작 분석

*DaCBF4*가 전사인자로 작용할 수 있는 특성을 가지고 있으므로 그 하위의 기작을 real-time qRT-PCR로 분석하였음. 벼에서 DRE/CRT cis-acting element를 가지고 있는 다양한 유전자들의 발현 정도를 야생종과 *DaCBF4* 과다발현 식물체에서 qRT-PCR로 확인하였음 (그림 10). 그 결과 6개 유전자 (*OsBI-1*, *Cytoplasmic malate dehydrogenase*, *CCDC53*, *Os03g02470*, *Os10g22630*, *TLP*)가 야생종에 비해 *DaCBF4* 과다발현 식물체에서 발현이 증가한 것을 확인함.



(그림 10) 야생종(WT)과 *DaCBF4* 형질전환 식물체에서의 target 유전자 qRT-PCR 분석

나. 남극곰새풀 단백질의 스트레스 관련 기작 분석

남극곰새풀 단백질 DaADF, DaGolS 의 기능을 유추하고자 관련 클로닝 제작 및 RNA-seq 분석을 위한 샘플링 작업을 완료하였음.



제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도 (%)
형질전환 벼 식물체의 기능 분석 및 남극곰새풀 단백질의 특성 분석	1 형질전환 벼 식물체의 농업적 형질 분석	- 실제 경작지 조건에서 야생종과 남극곰새풀 유전자 (<i>DaCBF4</i>, <i>DaADF</i>, <i>DaGolS</i>) 를 과다발현 시킨 형질전환 벼 식물체의 성장을 비교하여 성장과 발달에서의 차이를 분석하고자 포장 재배를 수행함. - <i>DaGolS</i> 과다발현 형질전환 식물체의 과다발현 정도를 전사 수준에서 확인함.	100%
	2 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 저항성 기능 분석	- <i>DaCBF4</i> 과다발현 형질전환 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 검증을 진행함. - <i>DaCBF4</i> 과다발현 형질전환 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성 검증을 진행 후 반복적으로 수행하여 통계 처리함. - <i>DaADF</i> 과다발현 형질전환 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성 검증을 반복적으로 수행하여 통계 처리함. - <i>DaGolS</i> 과다발현 형질전환 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 검증을 수행함.	100%
	3 환경 스트레스 관련 남극곰새풀 단백질의 특성 분석	- 전사인자로 작용할 수 있는 <i>DaCBF4</i> 특성을 qRT-PCR 분석을 진행함. - 환경스트레스 관련 <i>DaADF</i> 단백질 기능을 확인하고자 관련 기능 분석을 위해 저온 처리 후 샘플링을 진행함. - <i>DaGolS</i> 단백질의 활성 비교를 위한 클로닝을 제작함.	100%

제 2 절 본 연구의 관련분야 기술발전에의 기여도

1. 환경 스트레스 관련 유용 유전자원의 확보

남극곰새끼에서 환경 스트레스 관련 유용 유전자를 분리·동정하여 이에 대한 연구를 하고 특허출원 등을 통하여 이를 선점함으로써 환경스트레스 저항성 관련 유전자원을 확보할 수 있는 기회를 마련할 수 있음

2. 환경 스트레스 관련 유용 유전자의 기능 분석 및 유전자원으로서의 활용 가치 규명

가. 환경 스트레스 관련 유용 유전자의 기능을 분석하고 이를 관련 학술회의에 보고하는 활동을 통하여 스트레스 관련 유전자 연구에 큰 도움을 줄 수 있음

나. 극지 유용 유전자를 이용한 연구로써 학술발표 등을 수행하여 극지생물 연구에 있어서 중심적 역할로 자리매김 할 수 있음.

다. 환경 스트레스 관련 유용 유전자를 활용한 신기능성 작물 개발함으로써 극지생물 유래 유전자원의 활용가능성을 제시할 수 있음.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

1. 포장재배를 통한 형질전환 벼 식물체의 농업적 형질 분석 및 통계처리

실제적인 농업가치를 위하여 남극솜새풀 유전자를 과다발현 시킨 형질전환 벼 식물체를 야생종과 함께 포장재배하여 실제 경작지 조건에서 야생종과 성장을 비교하여 생장과 발달에서의 차이를 통계 분석함으로써, 작물인 벼의 농업적 가치의 변화를 수치화하여 확인할 수 있음.

2. 다양한 스트레스에 대한 표현형 분석 및 통계 처리

가. 건조, 저온 스트레스 등 대표적 환경 스트레스 외에도 지역별, 기후별로 나타나는 특이적인 다양한 스트레스가 있음.

나. 다양한 스트레스에 대한 형질전환 벼 식물체의 표현형 검정을 통해 남극솜새풀 과다발현 벼 식물체의 활용 가능 범위를 확대할 수 있음.

다. 여러 환경 스트레스에 대한 저항성 변화의 기작을 통합적으로 분석함으로써 복합적인 스트레스 적응기작에 대한 연구를 할 수 있음.

제 2 절 타 연구에의 응용

1. 유용 유전자원의 선점 및 작물로의 활용가능성 규명

가. 남극솜새풀 유전자의 기능을 형질전환 벼 식물체를 이용하여 확인하고 이를 특허 출원 및 학술회의 발표 등을 통해서 선점할 수 있음.

나. 유용 유전자원을 이용한 스트레스 저항성 작물 개발을 통하여 새로운 유전자원의 작물로의 활용가치를 규명할 수 있음.

2. 남극좁새풀의 환경적응 기작 규명

가. 남극의 극한 환경에서 서식하는 벼과의 다년생 식물인 남극좁새풀 유전자의 기능을 분석함으로써 단자엽식물이 서식할 수 있는 특성을 확인할 수 있음.

나. 벼와 남극좁새풀의 유전자의 특성 차이를 확인하여 진화적인 측면에서 남극좁새풀의 극한 환경에의 적응기작에 대한 단서를 제공할 수 있음.

제 3 절 기업화 추진방안

본 연구는 남극좁새풀 유전자를 이용한 신기능 작물 개발을 최종 목표로 연구를 진행함. 그동안의 연구를 통해서 남극좁새풀의 환경스트레스 관련 유전자를 과다발현 하는 형질전환 벼 식물체를 제작하여 스트레스 관련 표현형 분석을 하였고 또한 유전자의 기능을 유추하고자 분자수준에서 분석을 통하여 유전자의 기능을 밝혔음. 추후 보다 심층적인 연구를 통하여, 유용 유전자의 도입이 실제 경작지에서의 재배 가능성 또한 스트레스 내성 관련 기능의 향상성을 파악하고 이러한 도입 유전자의 식물체내에서의 기능도 밝히고자 함. 이를 통해 남극좁새풀 유전자원을 활용한 신기능성 작물 개발을 위한 기업화를 추진하고자 함.

제 6 장 참고문헌

- Agrawal G.K., Rakwal R., Jwa N.-S., Agrawal V.P., Effects of signaling molecules, protein phosphatase inhibitors and blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) on the mRNA level of a rice (*Oryza sativa* L.) phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (OsPHGPX) gene in seedling leaves, *Gene* 283 (2002) 227-236.
- Bae H., Kim S.K., Cho S.K., Kang B.G., Kim W.T., Overexpression of *OsRDCP1*, a rice RING domain-containing E3 ubiquitin ligase, increased tolerance to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Science* 180 (2011) 775-782.
- Byun M.Y., Lee J., Cui L.H., Kang Y., Oh T.K., Park H., Lee H., Kim W.T., Constitutive expression of DaCBF7, an Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* CBF homolog, resulted in improved coldtolerance in transgenic rice plants, *Plant Science* 236 (2015) 61-74.
- Choi J.Y., Seo Y.S., Kim S.J., Kim W.T., Shin J.S. Constitutive expression of CaXTH3, a hot pepper xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, enhanced tolerance to salt and drought stresses without phenotypic defects in tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Dotaerang). *Plant Cell Rep.* 30 (2011) 869-877.
- Fleury D., Jefferies S, Kuchel H, Langridge P., Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat, *Journal of Experimental Botany* 61 (2010) 3211 - 3222
- Hirayama T. and Shinozaki K., Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future, *Plant J.* 61 (2010) 1041 - 1052
- Jang I.-C., Oh S.-J., Seo J.-S., Choi W.-B., Song S.I., Kim C.H., Kim Y.S., Seo H.-S., Choi Y.D., Nahm B.H., Kim J.-K., Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth, *Plant Physiol.* 131 (2003) 516-524.
- Jeong D.H., An H., Kang H.G., Moon S., Han J.J., Park S., Lee H.S., An K., An

- G., T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice, *Plant Physiol.* 130 (2002) 1636-1644.
- Jeon J.S., Lee S., Jung K.H., Jun S.H., Jeong D.H., Lee J., Kim C., Jang S., Yang K., Nam J., T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice, *Plant J.* 22 (2000) 561-570.
- Lee J, Noh EK, Choi HS, Shin SC, Park H, Lee H., Transcriptome sequencing of the Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* Desv. under abiotic stress, *Planta* 237 (2013) 823-836
- Moons A., Prinsen E., Bauw G., Van Montagu M., Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots, *Plant Cell* 9 (1997) 2243-2259.
- Saijo Y., Hata S., Kyoizuka J., Shimamoto K., Izui K., Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants, *Plant J.* 23 (2000) 319-327.
- Yang L., Zheng B., Mao C., Yi K., Liu F., Wu Y., Tao Q., Wu P., cDNA-AFLP analysis of inducible gene expression in rice seminal root tips under a water deficit, *Gene* 314 (2003) 141-148.

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.