# 벼 형질전환식물을 이용한 남극좀새풀 환경스트레스 내성 관련 유전자의 활용가치 분석

Value for practical use of abiotic stress-related *Deschampsia antarctica* genes using transgenic rice plants

KOPRI
극지연구소

연세대학교

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지유전체 101 프로젝트: 극지생물 유전체 정보 분석 및 활용 기반 구축에 관한 연구(본과제명)” 과제의 위탁연구 “벼 형질전환식물을 이용한 남극좀새풀 환경스트레스 내성 관련 유전자의 활용가치 분석에 관한 연구(위탁과제명)” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

KOPRI 극지연구소

2020. 01 .31

(본과제) 총괄연구책임자 : 김 진 형

위탁연구기관명 : 연세대학교

위탁연구책임자 : 김 우 택

위탁참여연구원 : 최 려 화

“ : 민 혜 조

“ : 오 형 근

# 보고서 초록

<table>
<tr><td>위탁연구과제명</td><td colspan="5">벼 형질전환식물을 이용한 남극좀새풀 환경스트레스 내성 관련<br>유전자의 활용가치 분석</td></tr>
<tr><td>위탁연구책임자</td><td>김우택</td><td>해당단계<br>참여연구원수</td><td>2017-2018년: 3 명<br>2019년: 2 명</td><td>해당단계<br>연구비</td><td>3년: 총 130백만원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및<br>소속부서명</td><td colspan="2">연세대학교</td><td>참여기업명</td><td colspan="2">-</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="5">상대국명 : - 상대국연구기관명 : -</td></tr>
<tr><td colspan="4">요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)</td><td>보고서<br>면수</td><td>37</td></tr>
<tr><td colspan="6">극지환경에 살고 있는 식물들은 극한 환경에 적응할 수 있는 메카니즘을 보유하고 있어 식물의 다양한 환경에 대한 반응 연구에 좋은 재료로 쓰일 수 있음. 본 연구는 극지 환경에서 생존하는 벼과 식물인 남극좀새풀의 유전자원을 활용하여 남극좀새풀의 환경스트레스 내성 관련 유전자 분석을 통해 극지생물의 환경적응특성 규명을 목표로 하고 있음. 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체를 실제 경작지에서 재배, 관찰한 결과 남극좀새풀 유전자의 과다발현에 따른 생장, 종자 수확률 등의 농업적 형질 변화가 없음을 확인하였음. 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체들의 건조, 저온 스트레스에 대한 저항성 변화를 야생종과 함께 비교 분석한 결과 *DaADF, DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체 모두 저온 스트레스에 대해 야생종보다 강한 저항성을 나타내었고, *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체는 건조 스트레스에 대해서도 강한 저항성을 나타내는 것을 확인하였음. 남극좀새풀 유전자 과다발현 벼 식물체에서의 스트레스 관련 메카니즘을 분석하고자 해당 단백질의 효소활성을 측정한 결과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 보다 높은 효소활성을 가지고 있음을 확인하였음. 남극좀새풀 환경스트레스 내성 관련 유전자들의 분석 결과가 극지생물의 환경적응의 특성 규명에 기여할 것으로 기대됨.</td></tr>
<tr><td rowspan="2">색 인 어<br>(각 5개 이상)</td><td>한 글</td><td colspan="4">건조스트레스, 남극좀새풀, 스트레스 저항성 신기능성 작물, 저온 스트레스, 형질전환 벼 식물체</td></tr>
<tr><td>영 어</td><td colspan="4">Abiotic stress-tolerant plants, Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica, DaADF, DaGolS2,* Environmental stress, Transgenic rice plants</td></tr>
</table>

# 요 약 문

Ⅰ. 제 목

벼 형질전환식물을 이용한 남극좀새풀 환경스트레스 내성 관련 유전자의 활용가치 분석

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

(1) 연구개발의 목적

형질전환 벼 식물체를 이용한 남극좀새풀의 환경스트레스 내성 관련 유전자 분석을 통해 극지생물의 환경적응 특성을 규명.

(2) 연구개발의 필요성

극지식물은 혹독한 환경에 적응할 수 있는 메카니즘을 보유하고 있어 식물의 환경에 대한 반응 연구에 좋은 재료로 쓰일 수 있는 가능성이 높음. 하지만 다른 모델 식물들에 비해 연구된 바가 극히 부족하며 또한 지구온난화로 인한 기후변화는 해마다 작물생산에 큰 피해를 주고 있어 환경 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 작물을 개발하는 것이 현시대 중요한 관심사가 되고 있음. 따라서 극지 환경에서 잘 자라는 벼과 다년생 식물인 남극좀새풀 (*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 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체의 세대진전

및 농업적 가치 분석

남극좀새풀 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 새로운 세대를 획득 후 과발현 여부를 확인함.

(2) 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 관련 표현형 검증 및 분석

건조, 저온 등의 스트레스에 대한 저항성 변화를 야생종과 비교 분석함. 또한 반복 실험을 통해 건조, 저온 등 스트레스에 대한 저항성 변화를 통계 처리함. 스트레스 전, 후의 이온 용출량, 엽로소 양, 물을 잃는 비율을 등을 비교함으로써 환경스트레스 저항성에 대한 기능을 분석함.

(3) 환경 스트레스 관련 남극좀새풀 단백질의 특성 분석

과다발현 형질전환 벼 식물체와 야생종에서의 활성산소 축적 정도를 과산화수소 및 MDA(malondialdehyde) 측정을 통해 비교 분석함.

환경 스트레스 관련 남극좀새풀 단백질의 특성을 분석하기 위해 저온 및 건조 스트레스 전, 후의 관련 단백질의 효소활성을 측정 및 비교함.

Ⅳ. 연구개발결과

(1) 포장재배를 통한 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체의 세대진전 및 농업적 가치 분석

남극좀새풀 유전자 (*DaADF, DaGolS2*)를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체들을 야생종과 함께 실제 경작지에서 포장작업을 실행한 결과 농업적으로 크게 차이가 없는 것을 관찰하였음. *DaADF, DaGolS2* 등 남극좀새풀 유전자를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체들을 포장 재배하여 세대진전을 통해 *DaADF, DaGolS2* 종자들을 확보하였음. 수확해 온 *DaGolS2* 벼 종자에 대해 panicle number, panicle length, panicle branch, 1000-grain weight, total grain weight 등을 측정하여 해당

식물체의 농업적 가치를 분석하여 야생종과 크게 차이 없음을 확인함. 또한 확보된 *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체에 대해 전사수준에서 과다발현됨을 RT-PCR로 확인함.

(2) 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 관련 표현형 검증 및 분석

- 건조 스트레스: *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체를 건조 스트레스를 처리한 후 생존율을 야생종과 비교하였을 때 야생종보다 강한 내성을 나타내는 것을 확인하였음. 또한 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성 검증을 반복적으로 수행하고 통계 처리를 함으로써 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종보다 건조 스트레스에 대해 강한 내성을 나타냄을 확인하였음. 식물의 잎 조직이 물을 잃는 속도를 비교함으로써 건조 스트레스 저항성의 차이를 재확인한 결과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 잎이 야생종에 비해 물을 잃는 속도가 더 느리다는 것을 통해 건조 스트레스에 저항성을 나타냄을 검증함.

- 저온 스트레스: *DaADF, DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온(4° C) 스트레스 처리 후 생존율을 야생종과 비교하였을 때 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종보다 저온에 강한 내성을 나타내는 것을 확인하였음. 또한 *DaADF, DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성 검증을 반복적으로 수행하고 통계 처리를 함으로써 *DaADF, DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종보다 저온 스트레스에 대해 강한 내성을 나타냄을 확인하였음. 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체와 야생종에 저온 스트레스를 처리한 후 이온 용출량을 측정하여 저온 스트레스에 대한 내성 정도를 비교한 결과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체에서 야생종보다 적은 이온 용출량이 측정되었고 이를 통해 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 저온 스트레스에 대한 저항성이 야생종보다 강함을 알 수 있었음.

(3) 환경 스트레스 관련 남극좀새풀 단백질의 특성 분석

*DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체와 야생종에서의 활성산소 축적 정도를 과산화수소 및 MDA(malondialdehyde) 측정을 통해 관찰한 결과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체에서 야생종보다

적은 양이 활성산소가 축적됨을 확인하였음.

*DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체와 야생종의 galactinol synthase 효소활성을 측정 및 비교한 결과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종보다 높은 효소활성을 가지고 있음을 확인하였음. 또한 건조 또는 저온 스트레스를 처리한 후에도 야생종보다 높은 활성차이를 보이는 것을 통해 해당 단백질 기능이 건조, 저온 스트레스 대응 기작에 있어서도 중요한 역할을 하고 있다는 것을 알 수 있었음.

## Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

(1) 환경 스트레스 관련 남극좀새풀 유전자의 기능 분석을 통해 환경스트레스 내성 작물 개발을 위한 유용 자원을 제공할 수 있음.

(2) 기능성 유전자의 특성 분석 및 형질전환 벼 식물체의 환경스트레스에 대한 표현형 분석 및 특허 출원을 통해 유전자원을 선점 할 수 있음.

(3) 남극좀새풀 환경스트레스 관련 유전자의 기능 분석을 통해 극지생물의 환경적응 특성을 규명하여 국내외 학술발표 및 논문게재를 진행함.

# S U M M A R Y

# (영 문 요 약 문)

## I. Title

Value for practical use of abiotic stress-related *Deschampsia antarctica* genes using transgenic rice plants

## II. Purpose and Necessity of R&D

### 1. Purpose

Analysis of abiotic stress-related *Deschampia antarctica* genes using transgenic rice plants to reveal the environmental adaptation of Antarctic living organism.

### 2. Necessity of R&D

*Deschampia antarctica* is a flowering plant which grows naturally in the Antarctic, where is a 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, research on the Antarctic living things, especially plants, is 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 rice 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 (*DaADF, DaGolS2*) and analyzed the stress phenotype with multiple experiments. To investigate the characteristics of stress-related *Deschampia antarctica* proteins in plants, an galactinol synthase assay was performed.

## IV. R&D Results

*DaADF*-, and *DaGolS*-overexpressing transgenic rice plants and seeds displayed similar morphology to wild type plants in the field under normal growth conditions. Transgenic rice plants of *DaADF* and *DaGolS2* displayed more tolerant to cold stress as compared to wild type rice plants in terms of cold stress phenotype and ion leakage analysis. *DaGolS2*-overexpressing transgenic rice plants also displayed more tolerant to drought stress as compared to wild type rice plants in terms of drought stress phenotype and water loss rates. The galactinol synthase assay showed that GolS enzyme activities were higher in the *DaGolS2*- overexpressing progeny than in the wild-type rice plants under both normal and stress conditions. These results suggested that stress-related antarctic hair grass genes played an important role in response to cold and drought stresses.

## V. Application Plans of R&D Results

Overall, our results suggest that it is valuable to isolate new genetic 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 남극좀새풀에 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 기술발전에의 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

KOPRI 극지연구소

# 제 1 장 서론

## 제 1 절 연구의 목적

형질전환 벼 식물체를 이용한 남극좀새풀의 환경스트레스 내성 관련 유전자 분석을 통해 극지생물의 환경적응 특성을 규명.

## 제 2 절 연구의 필요성 및 본 과제와의 연계성

### 1. 연구의 필요성

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

나. 지구온난화를 비롯한 기후변화는 해마다 작물생산에 큰 피해를 주고 있어 환경 스트레스에 대한 저항성이 증진된 작물을 개발하는 것이 세계 여러 학자들의 관심사가 되고 있음.

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

### 2. 본 과제와의 연계성

가. 본 과제 「극지유전체 101 프로젝트: 극지생물 유전체 정보 분석 및 활용 기반 구축에 관한 연구」은 극지생물의 생명정보 확보와 저온적응 기작 해석을 근거로 남극 고유생물 유래 신생명자원의 활용가치 발굴을 목표로 하

KOPRI 극지연구소

고 있음.

나. 해당 위탁과제에서는 남극좀새풀의 유전자들 중 극지환경 적응과정에 관여할 가능성이 높은 유전자들을 선별하고 이를 과다발현 하는 형질전환 벼 식물체를 제작하여 환경 스트레스에 대한 저항성을 검증함으로써 유전자들의 기능을 추론하는 기능 유전체 분석 및 관련 단백질의 기능을 분석하고 궁극적으로 극지식물 생명현상을 규명할 것임.

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

## 제 3 절 선행 연구 결과

1. 유전자의 선택 및 과다발현 벡터를 이용한 식물체 제작

가. 건조, 고염, 저온 등의 환경스트레스 특이적인 남극좀새풀 유전자 *DaCBF4, DaCBF7, DaADF, DaUKCOR, DaGolS2, Da51G1* 등 6종을 선별 후 벡터를 제작함.

나. *Agrobacterium*을 이용한 조직배양 방법을 이용하여 남극좀새풀 유전자를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체 5종 (*DaCBF4, DaCBF7, DaADF, DaUKCOR, DaGolS2*)을 제작 및 확보함.

다. Genomic DNA PCR을 통하여 남극좀새풀 유전자가 벼에 삽입되었는지 여부를 확인한 후 Genomic southern blot 방법으로 과다발현 형질전환 벼 식물체에서 개별라인을 선별함. RT-PCR 방법으로 형질전환 벼 식물체에서 남극좀새풀 *DaCBF4, DaGolS2, DaCBF7, DaADF, DaUKCOR* 등 유전자의 과다발현 여부를 확인함.

2. 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체의 스트레스 내성 검증

가. *DaCBF7* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 건조, 고염, 저온 스트레스에 대한 내성을 검증한 결과, 야생종과 비교하여 건조, 고염 스트레스에 대한 내성 변화는 없지만 *DaCBF7*을 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성은 야생종보다 증가함을 확인함.

나. *DaCBF4* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성을 검증한 결과 *DaCBF4* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성이 야생종보다 증가함을 확인함.

다. *DaUKCOR* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 건조, 저온 스트레스에 대한 내성을 검증한 결과 두 가지 스트레스에 대해 *DaUKCOR* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종보다 강한 저항성을 나타냄을 확인함.

3. 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체의 기능적 형질 분석 및 작용 기작 확인

가. 남극좀새풀 스트레스 관련 유전자(*DaCBF4)*를 도입한 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 관련 기능적 형질을 분석하고자 건조 스트레스(survival rate, water loss 등 측정)에 대한 표현형을 분석하고, 이를 포장 재배를 이용하여 다각적으로 분석함.

나. 남극좀새풀 스트레스 관련 유전자(*DaCBF7)*를 도입한 형질전환 벼 식물체의 스트레스 관련 기능적 형질을 분석하고자 저온 스트레스(survival rate, chlorophyll contents 등 측정)에 대한 표현형을 분석하고, 이를 포장 재배를 이용하여 다각적으로 분석함.

4. 환경스트레스 내성 관련 단백질의 특성 분석

가. 식물체 내에서 대상 단백질의 세포 내 소기관 위치를 파악: DaCBF7 단백질 및 DaCBF4 단백질의 세포내 위치가 핵임을 대조구와 비교하여 파악함. DaGolS2 단백질의 세포내 위치가 세포질임을 대조구와 비교하여 파악함.

나. *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 비교하였음. 그 결과 *DaCBF7* 과다발현 식물체에서 6개 유전자(*OsBI-1, Cytoplasmic malate dehydrogenase, CCDC53, Os03g02470, Os10g22630, TLP*)의 발현양이 야생종에 비해 증가한 것을 확인함.

다. 스트레스 관련 단백질의 생화학적 특성을 분석: *DaCBF4*와 *DaCBF7*이 합성하는 단백질은 AP2 domain을 가지고 있는 전사인자로 작용할 수 있어, 단백질의 DNA 결합력을 gel retardation assay로 파악함.

KOPRI
극지연구소

# 제 2 장 국내외 기술개발 현황

## 제 1 절 남극좀새풀에 관한 연구 현황

1. 남극좀새풀은 극지생물의 분자생물학적 연구 재료로 이용되어 저온 환경에서 특이적으로 발현하는 세 가지 유전자를 성공적으로 선별하고 발현을 분석한 보고 (Gidekel et al., 2003)가 있었음.

2. 남극좀새풀 추출물에서 결빙방지 활성 측정 (Bravo, 2001), 자외선 처리에 의한 남극좀새풀의 생리적 변화 (Ruhland et al., 2005), 남극좀새풀의 특이적 형태에 따른 광합성의 특성 (Gielwanowska et al., 2005; Saez et al., 2019) 등 생리 생태적, 단백질의 기능적 연구들이 꾸준히 이루어지고 있음.

3. 극한의 환경에서 자라는 남극좀새풀의 환경스트레스 조건에서 변화되는 전사체의 서열분석에 관한 보고 (Lee et al., 2010; Lee et al, 2013)도 있었음.

## 제 2 절 환경 스트레스 내성 작물 개발에 관한 연구

1. 기후 변화, 경작지 감소 등의 요인에 의한 작물 생산량 감소로 인하여 여러 환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 기능성 작물 개발에 대한 관심도가 높아지고 있음. 환경 스트레스 관련 유용 유전자의 발굴과 이를 이용한 생명 자원 확보는 많은 연구자들의 관심을 모으고 있으며 이를 위한 연구가 활발히 진행되고 있음.

2. 환경 스트레스 관련 유전자를 작물에 과다발현 시켜 환경 스트레스 관련 기능적 표현형을 검정 및 분석하는 방법을 통해, 유용 유전자를 도입시킨 작물을 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있음 (Fleury et al., 2010; Hirayama et al., 2010). 그 중 극한의 환경에서 자라는 남극좀새풀에서 환경 스트레스 관련

유전자를 선별 후 벼 식물체에 도입함으로써 저온 스트레스에 대해 강한 저항성을 지닌 형질 전환 벼 식물체를 제작하고 관련 유전자의 기능을 분석한 보고 (Byun et al., 2015; Byun et al., 2018; Cui et al., 2019)가 있었음. 여러 환경 스트레스 관련 유용 유전자에 대한 연구를 통해 환경 스트레스에 내성을 가지면서 농업적 형질과 같은 작물의 생산성에는 영향을 주지 않는 작물의 개발이 많은 연구자들의 관심이 됨.

## 제 3 절 본 연구 결과가 국내외 기술개발에서 차지하는 위치

1. 환경 스트레스 관련 유용 유전자의 선점

남극좀새풀에서 선별한 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 건조, 저온 스트레스 등 환경 스트레스에 대한 내성을 가짐으로써 극한 환경에서도 자랄 수 있는 신기능성 작물을 개발할 수 있고 또한 해당 유전자를 분석함으로써 식량 생산량을 증대시킬 수 있는 근거를 제시할 수 있음.

KOPRI 극지연구소

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 이론적·실험적 접근 방법

1. 포장재배를 통한 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체의 세대진전 및 농업적 가치 분석

가. 포장재배를 통해 세대진전 및 과다발현 여부 확인

남극좀새풀 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. 또한 경작지 재배를 통해 세대진전이 된 형질전환식물체에 대해 남극좀새풀 유전자 발현 여부를 RT-PCR 진행하여 확인함.

나. 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체의 농업적 가치 분석

수확해 온 벼 종자에 대해 panicle number, panicle length, panicle branch, 1000-grain weight, total grain weight 등을 측정하는 방법으로 해당 식물체의 농업적 가치를 야생종과 비교하여 분석함.

2. 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 관련 표현형 검증 및 분석

가. 건조 스트레스

(1) 동일한 생장조건에서 야생종과 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체를 키운 후 일정 시간동안 물을 주지 않다가 다시 물을 주었을 때의 해당 식물들의 생존율을 비교함으로써 저항성 증진을 판단하는 방법을 이용함.

(2) 동일한 생장조건에서 건조 스트레스 반복 처리를 통하여 생존율에 대한

통계처리를 진행하는 방법을 이용함.

(3) 건조스트레스 처리 전, 후의 야생종과 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체에서 잎을 떼어 엽록소 추출 및 엽록소 양 측정을 통해 생존 정도를 수치화 함.

(4) 동일한 조건에서 키운 야생종과 남극좀새풀 유전자가 과다발현된 형질전환 벼 식물체로부터 잎을 떼어 건조시킬 때, 잎이 물을 잃는 비율을 비교하여 건조 스트레스에 대한 내성 정도를 비교함.

나. 저온 스트레스

(1) 동일한 생장조건에서 야생종과 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체를 키운 후 저온 (4℃)상태에서 일정기간 동안 생장시킨 후 정상조건인 28℃에서 회복, 성장 시켰을 때의 생존율을 비교함으로써 저온 스트레스에 대한 저항성 증진을 판단하는 방법을 이용함.

(2) 동일조건에서 저온 스트레스 반복 처리를 통하여 생존율에 대한 통계처리를 진행함.

(3) 저온 스트레스 처리 전, 후의 야생종과 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체의 잎을 떼어 엽록소 추출 및 엽록소 양 측정을 통해 생존 정도를 수치화 함.

(4) 저온 스트레스 처리 전, 후의 식물에서 용출되는 이온의 양을 측정하여 저온 스트레스에 대한 저항성을 비교함.

3. 환경 스트레스 관련 남극좀새풀 단백질의 특성 분석

환경 스트레스 관련 남극좀새풀 단백질의 특성을 분석하기 위해 저온 및 건조 스트레스 처리 전, 후의 관련 단백질을 각각의 genotype에서 추출하였고 추출된 단백질에 대하여 UDP-galactose가 존재하는 조건에서 효소반응을 진행함. 추출된 단백질의 효소활성은 효소반응의 부산물인 인산의 양을 측정

KOPRI 극지연구소

함으로써 분석함.

환경 스트레스 관련 남극좀새풀 유전자의 특성을 분석하기 위해 건조 및 저온 스트레스 전, 후 활성산소 축적 정도를 과산화수소와 MDA (malondialdehyde)를 측정하는 방법을 이용하여 분석함.

## 제 2 절 연구 내용

1. 포장재배를 통한 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체의 세대진전 및 농업적 가치 분석

실제 경작지 조건에서 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체와 야생종의 성장을 비교하고 생장과 발달에서의 차이, 종자 수확률 등을 분석하기 위하여 모내기를 수행함. 경작지 재배를 통해 세대진전이 된 형질전환 벼 식물체에 대해 남극좀새풀 유전자 (*DaADF*)의 발현 여부를 확인함. 또한 수확해 온 벼 종자에 대해 panicle number, panicle length, panicle branch, 1000-grain weight, total grain weight 등을 측정하여 남극좀새풀 유전자 (*DaGolS2*) 과다발현 벼 식물체의 농업적 가치를 분석함.

2. 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 관련 표현형 검증 및 분석

야생종과 남극좀새풀 유전자 (*DaGolS2*) 과다발현 형질전환 벼 식물체간의 건조 스트레스 저항성을 비교하고자, 동일 조건에서 성장한 야생종과 형질전환 벼 식물체에 건조 스트레스를 처리한 후 생존율, 엽록소, 잎에서의 물을 잃는 비율 등을 측정 및 통계 처리하여 비교함.

야생종과 남극좀새풀 유전자 (*DaADF, DaGolS2*) 과다발현 형질전환 벼 식물체 간의 저온 스트레스 저항성을 비교하고자, 동일 조건에서 성장한 야생종과 형질전환 벼 식물체에 저온 스트레스를 처리한 후 생존율, 엽록소, 이온용출양 등을 측정 및 통계 처리하여 비교함.

KOPRI 극지연구소

3. 환경 스트레스 관련 남극좀새풀 단백질의 특성 분석

남극좀새풀 유전자 (*DaGolS2*) 과다발현 형질전환 벼 식물체와 야생종에서의 활성산소 축적 정도를 과산화수소 및 MDA(malondialdehyde) 측정을 통해 비교 분석함.

환경 스트레스 관련 남극좀새풀 단백질의 특성을 분석하기 위해 저온 및 건조 스트레스 전, 후의 관련 단백질(DaGolS2)의 효소활성을 측정하는 방법을 이용함.

## 제 3 절 연구 결과

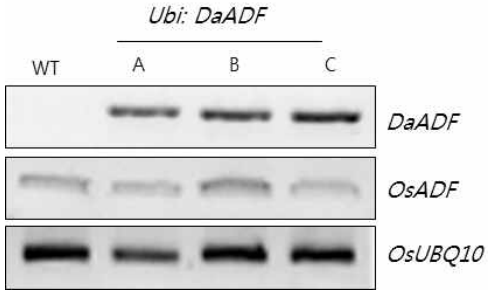
1. 포장재배를 통한 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체의 세대진전 및 농업적 가치 분석

가. 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체의 세대 진전

*DaADF* (T5 세대), *DaGolS2* (T4 세대) 등 남극좀새풀 유전자를 과다발현하는 형질전환 벼 식물체들을 야생종과 함께 2017년 5월에 전주 익산 LMO 포장지에서 포장재배를 진행함.

나. 남극좀새풀 유전자의 과다발현 정도를 RT-PCR로 확인

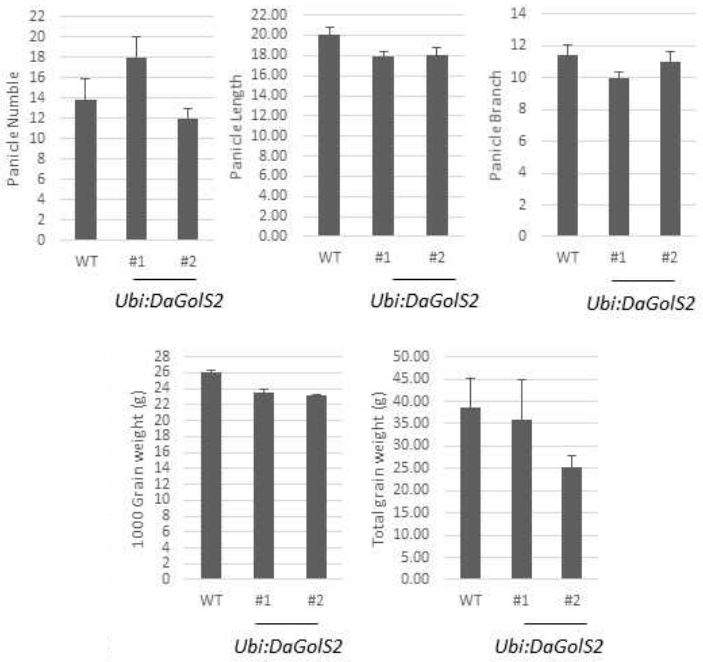
*DaADF* (T5 세대)형질전환 벼 식물체에서 남극좀새풀 유전자의 발현을 확인하기 위하여 세 개의 독립적인 라인으로 추정되는 *DaADF* 형질전환 벼 식물체에서 RT-PCR을 수행한 결과, 야생종 벼에는 없는 외래 유전자인 *DaADF*가 과다발현 벼 식물체에서 잘 발현되고 있음을 확인하였음. 그 외 *DaADF* 유전자의 호모로그인 벼 유전자 *OsADF*의 발현을 확인한 결과, *DaADF*와 달리 야생종과 큰 차이가 없는 것을 확인할 수 있었음 (그림 1).




(그림 1) RT-PCR을 통한 *DaADF* 과다발현 형질전환 벼에서의 *DaADF* 과다발현 여부 확인

다. 남극좀새풀 유전자 과다발현 형질전환 벼 식물체의 농업적 가치 분석

*DaGolS2* 남극좀새풀 유전자를 과다발현하는 T4 세대 형질전환 벼 식물체들을 야생종과 함께 LMO 포장지에서 재배한 후 수확해 온 벼 종자 (T5 세대) 에 대해 panicle number, panicle length, panicle branch, 1000-grain weight, total grain weight 등을 측정하여 해당 식물체의 농업적 가치를 분석함. 그 결과, *DaGolS2*의 과다발현에 따른 농업적 형질 변화는 없는 것으로 관찰 되었으며 야생종과 비슷한 농업적 가치를 가지고 있음을 알 수 있었음 (그림2).



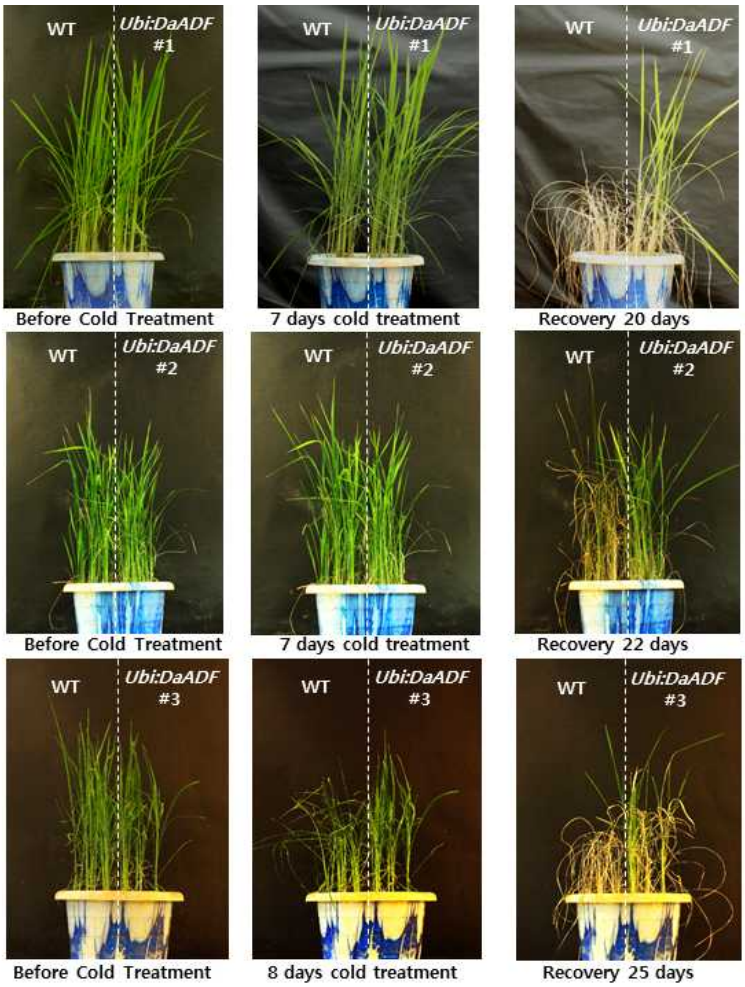

(그림 2) *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 농업적 가치 분석

2. 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체의 환경 스트레스 관련 표현형 검증 및

분석

가. *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 내성 표현형 검증 및 분석

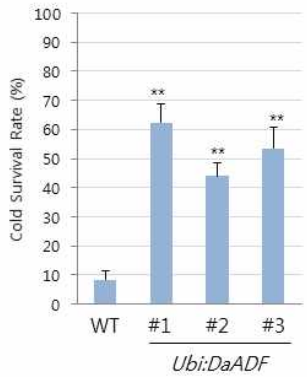
6주된 야생종과 *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체를 28℃의 동일한 생장조건에서 키운 후 7-8일 정도의 저온(4℃) 처리를 한 후 다시 정상조건에서 회복, 성장시킴. 그 결과 야생종에 비하여 *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체 (라인: #1, #2, #3) 세 라인 모두 저온 스트레스에 대해 야생종보다 강한 내성을 나타내는 것으로 확인됨 (그림 3).




(그림 3) 야생종과 *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스 내성 검증

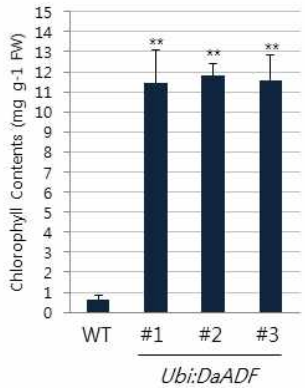
저온에 대한 표현형 분석을 여러 번의 반복 실험을 통해 확인하였고, 추후

통계처리를 진행함으로써 저온 스트레스를 처리하였을 때 *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체들이 야생종에 비해 4-6배 높은 생존율을 보이는 것을 알 수 있었음. 이를 통해 *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종보다 저온에 대해 높은 저항성을 가지는 것을 다시 한 번 확인할 수 있었음 (그림 4).




(그림 4) 야생종과 *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스에 대한 생존율 비교

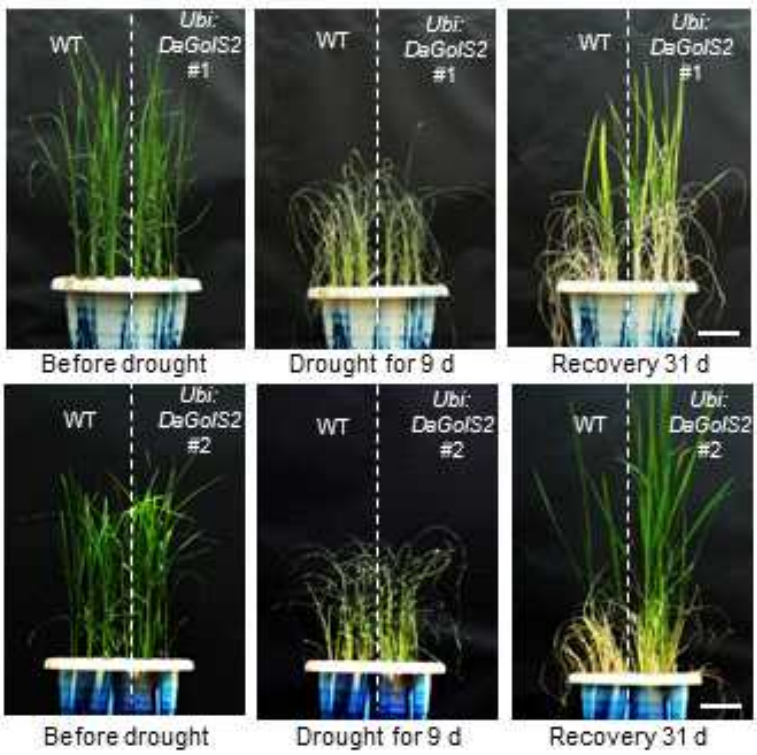
또한 저온 스트레스 처리 후 잎의 엽록소 양을 측정함으로써 저온 스트레스에 대한 생존 정도를 정량화하였음. 그 결과 위에서의 표현형 분석과 마찬가지로 *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종보다 많은 엽록소 양을 보존하고 있음을 통해 *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종보다 저온 스트레스에 대해 증진된 저항성을 나타낸다는 것을 알 수 있었음 (그림 5).




(그림 5) 야생종과 *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스 처리 후 엽록소 양 비교

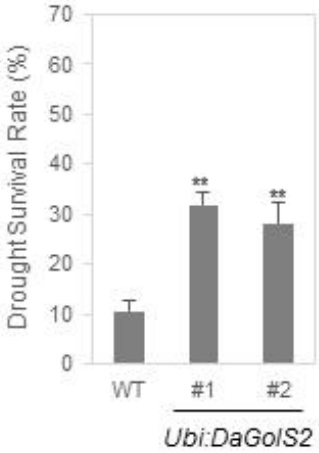
나. *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 건조 내성 표현형 검증 및 분석

동일한 조건에서 5주간 키운 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체에 9일간 물을 주지않은 후, 다시 물을 주어 정상적으로 키우면서 회복 정도를 비교한 결과, *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체들이 야생종 벼 식물체보다 건조 스트레스에 대하여 강한 저항성 나타내는 것을 확인함 (그림 6).



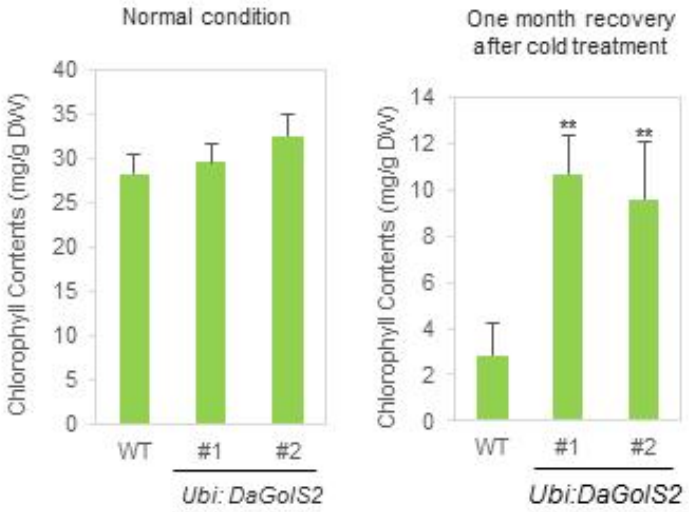

(그림 6) 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 건조 스트레스 내성 검증

*DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종에 비하여 건조 스트레스에 대해 강한 내성을 보이는 것을 여러 번의 반복 실험을 통하여 검증하였으며, 해당 생존율을 통계처리 한 결과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체 (라인: #1, #2)들이 야생종보다 3배 높은 생존율을 보였음 (그림7).



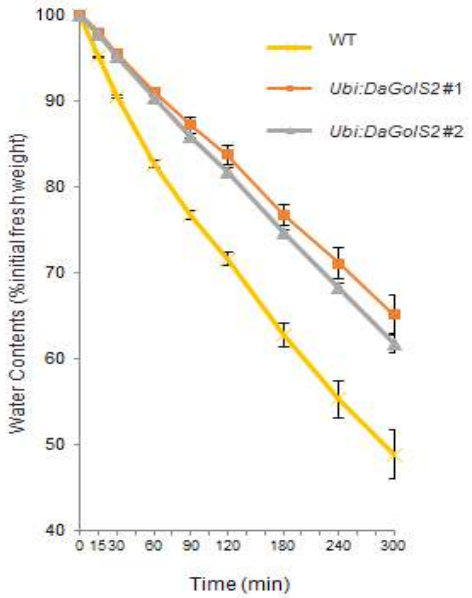

(그림 7) 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 건조 스트레스에 대한 생존율 비교

또한 건조 스트레스 처리 후 잎의 엽록소 양을 측정함으로써 건조 스트레스에 대한 생존 정도를 정량화하였음. 그 결과 위에서의 표현형 분석과 마찬가지로 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종보다 4배 많은 엽록소 양을 보존하였고, 이를 통해 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종에 비해 건조 스트레스에 대한 증진된 저항성을 나타낸다는 것을 알 수 있었음 (그림 8).




(그림 8) 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 식물체의 건조 스트레스에 대한 엽록소 양 비교

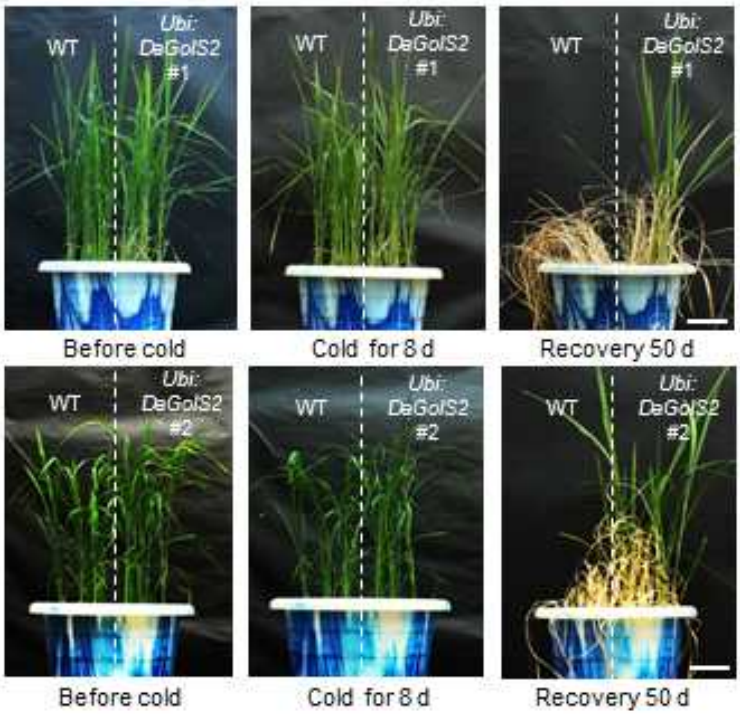
*DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체와 야생종에서 각각 잎을 떼어 건조 스트레스를 처리하였을 때 잎의 무게를 시간대 별로 측정하였고, 식물 잎 조직이 물을 잃는 속도 (water loss rate)를 수치화하여 비교함으로써 저항성의 차이를 재확인하였음. 그 결과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체는 건조 스트레스를 처리하였을 때 야생종에 비해 물을 잃는 속도가 더 느린 것을 확인할 수 있었음 (그림 9). 이를 통하여 *DaGolS2*가 과다발현형질전환 벼 식물체의 건조스트레스에 대한 저항성이 야생종에 비해 높은 것을 재확인할 수 있었음.




(그림 9) 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체 잎 조직의 water loss 비교 그래프

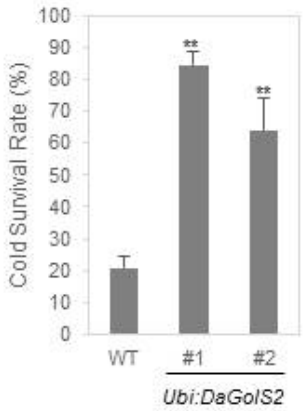
다. *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 내성 검증

6주된 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체를 28℃의 동일한 생장조건에서 키운 후 8일 간 4℃로 저온 처리를 한 뒤, 다시 정상조건에서 회복, 성장시킴. 그 결과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체 (라인: #1, #2)가 저온스트레스에 대해 야생종보다 강한 내성을 나타내는 것으로 확인됨 (그림 10).



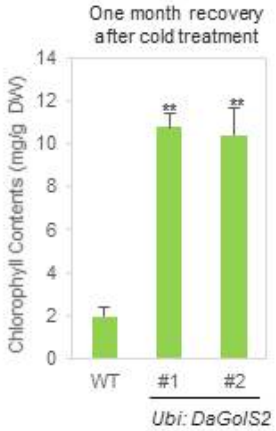

(그림 10) 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스 내성 검증

*DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종에 비하여 강한 저온 스트레스 내성을 보이는 것을 여러 번의 반복 실험을 통하여 검증하였고, 해당 식물체들의 생존율을 통계처리 한 결과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체(라인: #1, #2)의 생존율이 야생종보다 3-4배 높았음 (그림11).



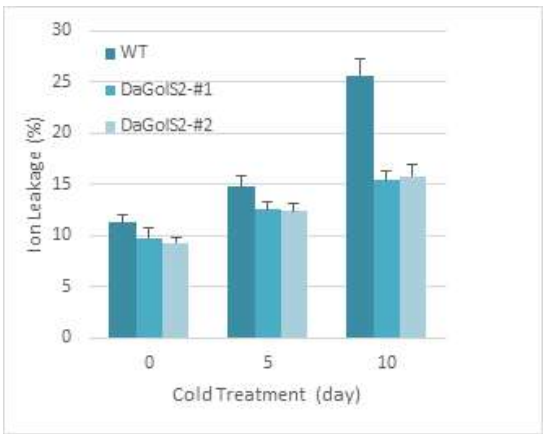

(그림 11) 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스에 대한 생존율 비교

또한 저온 스트레스 처리 후 잎의 엽록소 양을 측정함으로써 저온 스트레스에 대한 생존 정도를 정량화하였음. 그 결과 위에서의 표현형 분석과 마찬가지로 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종보다 5배 많은 엽록소 양을 보존하였고 이를 통해 저온에 대해 증진된 저항성을 나타낸다는 것을 알 수 있었음 (그림 12).




(그림 12) *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스 후 엽록소 양 비교

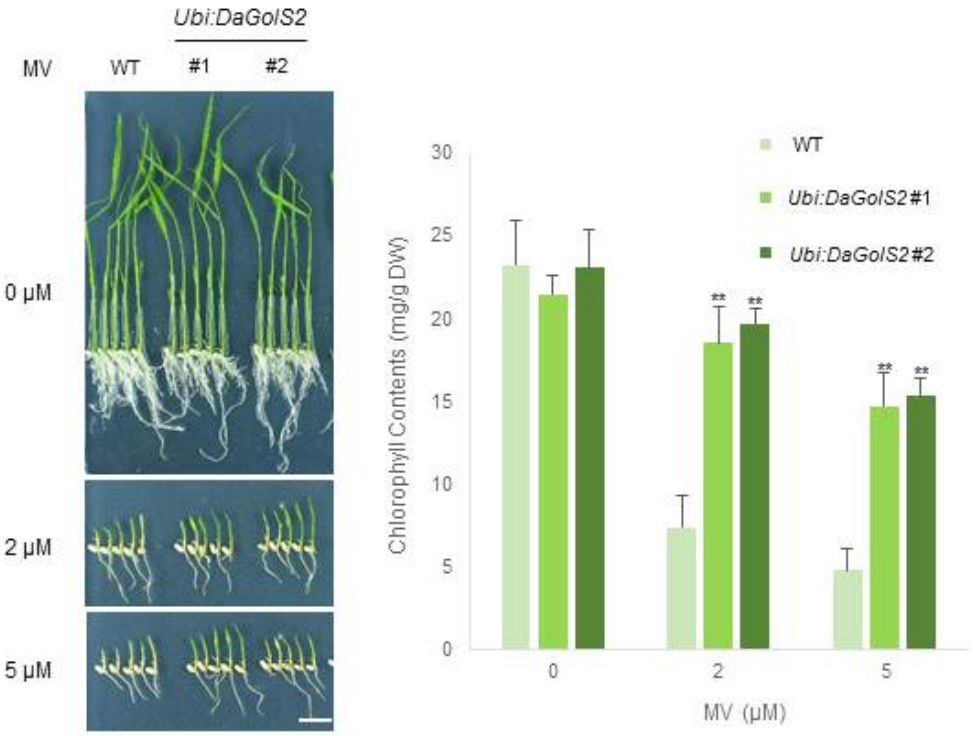
*DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체와 야생종의 저온 스트레스에 대한 내성을 저온 처리 후 이온 용출양 측정을 통해 비교함. 그 결과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체는 저온 처리 전, 후 모두 야생종에 비해 적은 이온 용출양이 측정되었고, 이를 통해 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체가 야생종과 비교하여 저온에 대해 증진된 저항성을 나타낸다는 것을 알 수 있었음 (그림 13).




(그림 13) 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스에 대한 이온 용출양 비교

라. *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 산화 스트레스 내성 검증

동일한 조건에서 2일 동안 발아 시킨 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체들을 MV (2uM, 5uM)가 첨가된 배지에 옮긴 후 성장을 비교한 결과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체들이 야생종 벼 식물체보다 산화 스트레스에 대해 높은 저항성 나타내는 것을 확인함 (그림 14).



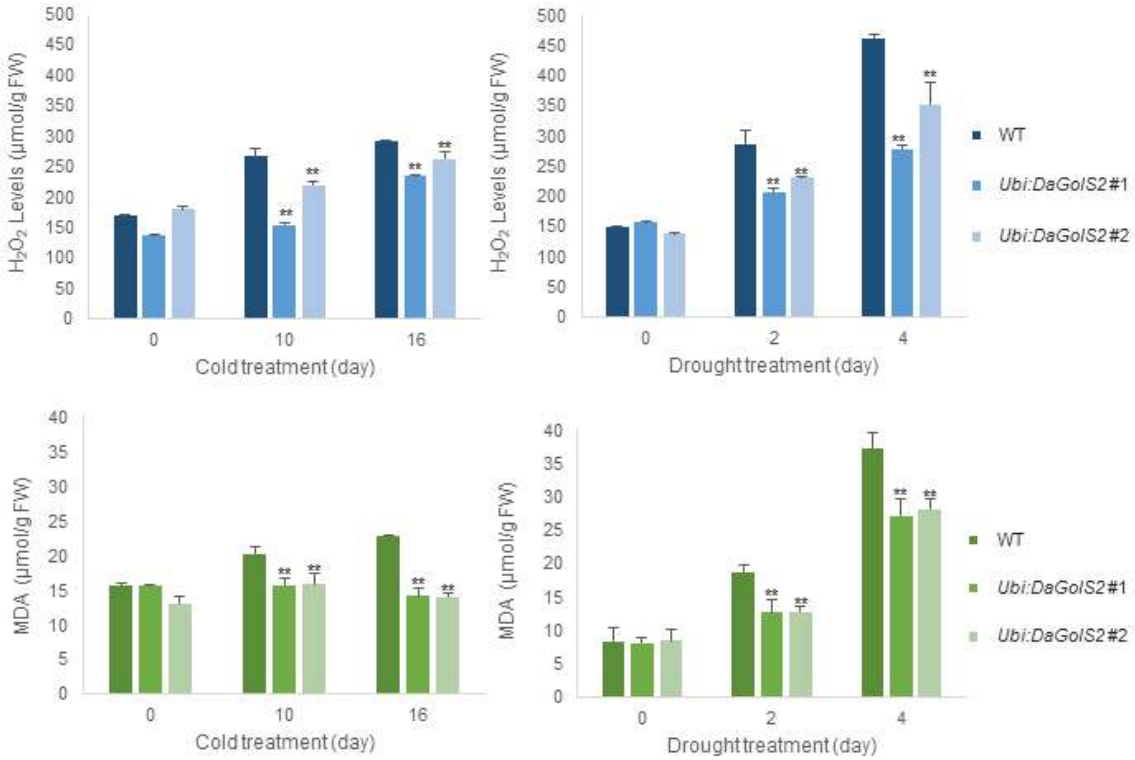

(그림 14) 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 산화스트레스에 대한 저항성 비교

3. 환경 스트레스 관련 남극좀새풀 단백질의 특성 분석

가. *DaGolS2* 과다발현 식물체에서의 산화스트레스 관련 기작 분석

산화스트레스 조건에서 나타난 표현형이 건조 또는 저온 스트레스에 의해 최종 유도된 결과와 연관이 있는지를 알아보기 위해 동일한 조건에서 키운 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체들에 대해 건조 (0, 2, 4 d) 또는

저온 (0, 10, 16 d) 스트레스 처리 후 식물체의 산화스트레스의 산물인 과산화수소와 MDA의 함량을 측정함. 그 결과 건조 또는 저온 스트레스 처리 후 *DaGolS2* 과다발현 벼 식물체에서 야생종보다 낮은 과산화수소와 MDA 함량이 측정됨. 이러한 결과는 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체들이 건조 또는 저온 스트레스에 대해 야생종보다 강한 저항성을 나타내는 것이 결과적으로 식물체내에서의 산화스트레스의 감소와 연관이 있음을 알 수 있음 (그림 15).

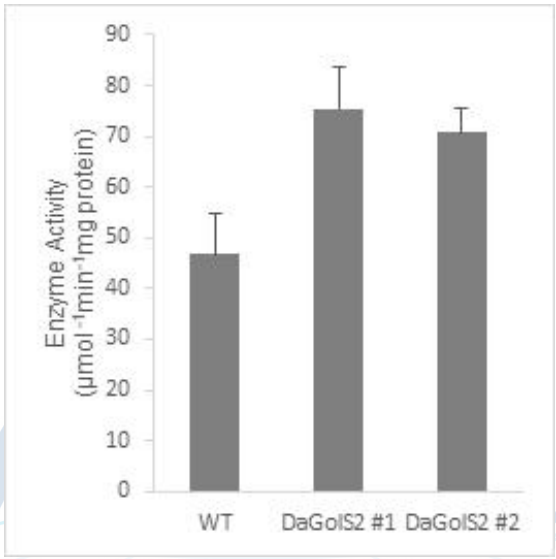



(그림 15) 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 식물체에서 스트레스 전, 후 과산화수소 및 MDA 함량 측정결과

나. *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체에서의 효소 활성 측정

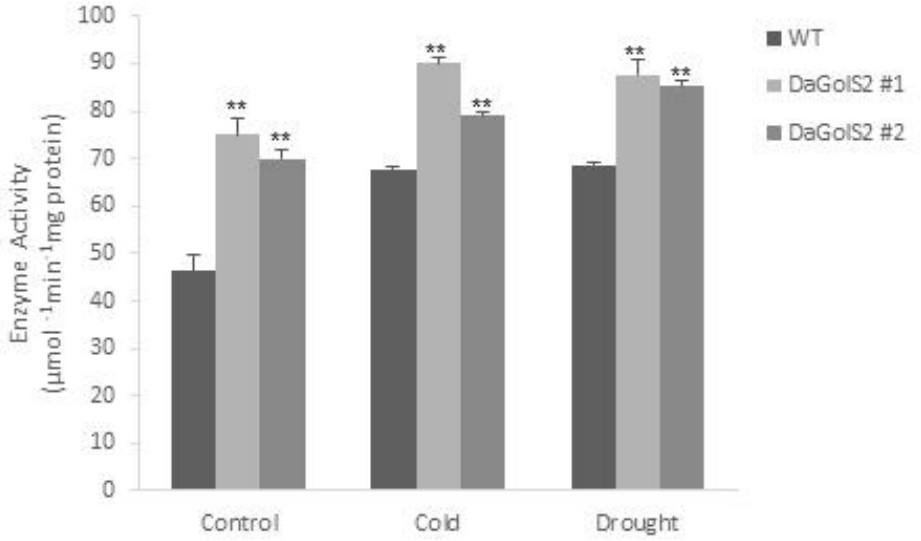
야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 galactinol synthase 효소활성을 측정하기 위해 GolS assay를 진행함. 관련 단백질을 각각의

genotype에서 추출하였고 추출된 단백질에 대하여 UDP-galactose가 존재하는 조건에서 효소반응을 진행함. 추출된 단백질의 효소활성은 효소반응의 부산물인 인산의 양을 측정함으로써 분석함. 같은 시간동안 측정된 인산의 양이 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체에서 추출한 단백질을 넣어 줬을 때 더 많았고 이를 통해 galactinol synthase 효소활성이 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체에서 더 활발하다는 것을 알 수 있었음 (그림 16).




(그림 16) 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 식물체에서 glactinol synthase 효소 활성 측정 결과

또한 스트레스 전, 후의 효소활성 변화를 관찰해 보기 위해 동일 조건에서 키운 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체들을 건조 또는 저온 스트레스를 처리한 후, 각각의 식물체들에서 단백질을 추출하여 galactinol synthase 효소활성을 측정함. 그 결과 스트레스 후에도 같은 시간 동안 분리된 인산의 양이 *DaGolS2* 과다발현 벼 식물체에서 추출한 단백질을 넣어 줬을 때 더 많았고, 이를 통해 galactinol synthase 효소활성이 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체에서 더 활발히 일어나는 것을 알 수 있었음 (그림 17).




(그림 17) 야생종과 *DaGolS2* 과다발현 식물체에서 건조 및 저온 스트레스 전, 후의 glactinol synthase 효소 활성 측정결과

KOPRI 극지연구소

# 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

## 제 1 절 연구개발 목표의 달성도

| 성과목표 | 세부목표 | | 달성 주요내용 | 달성도 (%) |
|---|---|---|---|---|
| 남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체의 농업적 가치 분석과 스트레스 관련 표현형 심층 분석 그리고 관련 단백질 특성 분석 | 1 | ○남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체에 대한 농업적 가치 분석 | - 실제 경작지 조건에서 야생종과 남극좀새풀 유전자 (*DaADF, DaGolS2*) 를 과다발현 하는 형질전환 벼 식물체의 성장을 비교하여 생장과 발달에서의 차이를 분석하고자 포장 재배를 수행함.<br>- *DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 과다발현 정도를 전사 수준에서 확인함.<br>- 수확해 온 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 종자의 농업적 가치를 분석함. | 100% |
| | 2 | ○남극좀새풀 유전자 형질전환 벼 식물체의 스트레스 저항성 표현형 검증 및 심층 분석 | 건조 스트레스:<br>- *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성을 검증함.<br>- *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 건조스트레스에 대한 내성을 반복적인 실험 수행 및 통계 처리를 통해 검증함.<br>- *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체 잎 조직의 물을 잃는 정도를 야생종과 비교함.<br>저온 스트레스:<br>- *DaGolS2, DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성 검증을 반복적으로 수행하여 통계 처리함.<br>- *DaGolS2, DaADF* 과다발현 형질전환 벼 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성을 반복적인 실험 수행 및 통계 처리를 통해 검증함.<br>- *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체에서 저온 스트레스 처리 전, 후의 이온 용출량을 야생종과 비교함. | 100% |
| | 3 | ○환경 스트레스 관련 남극좀새풀 단백질의 특성 분석 | - 건조 및 저온 스트레스 전, 후의 *DaGolS2* 과다발현 형질전환 벼 식물체에서 과산화수소 및 MDA를 측정함.<br>- DaGolS2 단백질의 효소 활성을 비교함. | 100% |

## 제 2 절 본 연구의 관련분야 기술발전에의 기여도

1. 환경 스트레스 관련 유용 유전자원의 확보

남극좀새풀에서 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 논문게재 등을 수행하여 극지생물 연구에 있어서 중심적 역할로 자리매김 할 수 있음.

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

KOPRI 극지연구소

# 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

## 제 1 절 추가 연구의 필요성

1. 실제 경작지에서의 형질전환 벼 식물체의 스트레스 저항성 검증

남극좀새풀 유전자를 과다발현 하는 형질전환 벼 식물체를 야생종과 함께 포장재배하여 실제 경작지 조건에서 가뭄, 저온 스트레스를 주었을 때 나타나는 형질을 관찰 및 분석함으로써 실제 경작지에서 농업적 가치를 실용화할 수 있음.

2. 다양한 스트레스에 대한 표현형 분석

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 남극좀새풀 과다발현 형질전환 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 작물로써의 활용가능성 규명

가. 남극좀새풀 유전자의 기능을 과다발현 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. 남극좀새풀의 환경적응 기작 규명

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

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

## 제 3 절 기업화 추진방안

본 연구는 형질전환 벼 식물체를 이용한 남극좀새풀의 환경스트레스 내성 관련 유전자 분석을 통해 극지생물의 환경적응 특성 규명 및 신기능 작물 개발을 최종 목표로 진행됨. 연구 기간 동안 남극좀새풀의 환경스트레스 관련 유전자를 과다발현 하는 형질전환 벼 식물체를 제작하여 스트레스 관련 표현형 분석을 하였고 유전자의 기능을 유추하고자 분자수준에서의 분석을 통하여 유전자의 기능을 밝혔음. 추후 보다 심층적인 연구를 통하여, 유용 유전자의 도입이 실제 경작지에서의 재배 가능성이나 스트레스 내성 관련 기능을 향상시키는데 미치는 영향을 파악하고 이러한 도입 유전자의 식물체내에서의 기능도 밝히고자 함. 이를 통해 남극좀새풀 유전자원을 활용한 신기능성 작물 개발을 위한 기업화를 추진하고자 함.

# 제 6 장 참고문헌


Bravo, L.A., Ulloa, N., Zuniga, G.E., Casanova, A., Corcuera, L.J., and Alberdi, M. (2001) Cold resistance in Antarctic angiosperms. *Physiol. Plant.* 111: 55-65.

Byun M.Y., Cui L.H., Lee J., Park H., Lee A., Kim W.T., Lee H. (2018) Identification of rice genes associated with enhanced cold tolerance by comparative transcriptome analysis with two transgenic rice plants overexpressing DaCBF4 and DaCBF7 isolated from Antarctic flowering plant *Deschamsia antarctica*. *Front. in Plant Sci.* 9:601. doi: 10.3389/fpls.2018.00601.

Byun M.Y., Lee J., Cui L.H., Kang Y., Oh T.K., Park H., Lee H., Kim W.T. (2015) Constitutive expression of DaCBF7, an Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* CBF homolog, resulted in improved coldtolerance in transgenic rice plants, *Plant Science* 236 61-74.

Cui L.H., Byun M.Y., Oh H.G., Kim S.J., Lee J., Park H., Lee H., Kim W.T. (2019) Poaceae Type II Galactinol Synthase 2 from Antarctic Flowering Plant *Deschampsia antarctica* and Rice Improves Cold and Drought Tolerance by Accumulation of Raffinose Family Oligosaccharides in Transgenic Rice Plants. *Plant and Cell Physiol*, pcz180, https://doi.org/10.1093/pcp/pcz180

Fleury D., Jefferies S, Kuchel H, Langridge P. (2010) Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 61:3211-3222

Gidekel, M., Destefano-Beltran, L., Garc□a, P., Mujica, L., Leal, P.and Cuba, M. (2003) Identification and characterization of three novel cold acclimation-responsive genes from the extremophile hair grass *Deschampsia antarctica* Desv. *Extremophiles* 7: 459-469.

Gielwanowska, I., Szczuka, E., Bednara, J. and G□recki, R. (2005) Anatomical features and ultrastructure of *Deschampsia antarctica* (Poaceae) leaves from different growing habitats. *Ann. Bot.* 96: 1109-1119.

Hirayama T. and Shinozaki K. (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.* 61: 1041-1052

Lee, H., Kim, J.H., Park, M., Kim, I.C., Yim, J.H. and Lee, H.K. (2010) Reference genes validation for qPCR normalization in *Deschampsia antarctica* during abiotic stresses. *Antarct. Sci.* 22: 477-484.

Lee, J., Noh, E.K., Choi, H.S., Shin, S.C., Park, H. and Lee, H. (2013) Transcriptome sequencing of the Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* Desv. under abiotic stress. *Planta* 237: 823-836.

Ruhland C.T., Xiong F.S., Clark W.D., Day T.A.. (2005) The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of Deschampsia antarctica during Springtime ozone depletion in Antarctica. *Photochem. Photobiol.* 81(5):1086-93.

Saez, P.L., Rivera, B.K., Ramirez, C.F., Vallejos, V., Cavieres, L.A., Corcuera, L.J., et al. (2019) Effects of temperature and water availability on light energy utilization in photosynthetic processes of *Deschampsia antarctica*. *Physiol. Plant.* 165: 511-523.

KOPRI 극지연구소

주 의

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