

환경스트레스 내성 관련 남극이끼 유전자의
건조 스트레스에 대한 반응 연구

Study of environmental stress related *Sanionia
uncinata* genes in response to drought stress



연세대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “포스트 극지유전체 프로젝트: 극지 유용유전자 발굴을 위한 기능유전체 연구” 과제의 위탁연구 “환경스트레스 내성 관련 남극이끼 유전자의 건조 스트레스에 대한 반응 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



2021 . 01 . 25

(본과제) 총괄연구책임자	:	김진형
위탁연구기관명	:	연세대학교
위탁연구책임자	:	김우택
위탁참여연구원	:	최려화
	:	양희웅
	:	이승은

보고서 초록

위탁연구과제명	환경스트레스 내성 관련 남극이끼 유전자의 건조 스트레스에 대한 반응 연구				
위탁연구책임자	김우택	해당단계 참여연구원수	4	해당단계 연구비	50,000,000 원
연구기관명 및 소속부서명	연세대학교		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	36
<p>본 연구는 남극에서 살아가는 남극이끼 (<i>Sanioina uncinata</i>)의 <i>AP2/ERF</i>-like 유전자를 과다 발현하는 이끼 (<i>Physcomitrella patens</i>)를 이용하여 남극이끼의 환경 스트레스 내성 관련 유전자의 기능 분석을 통해 극지 생물의 환경적응 특성 및 유용 유전자원 개발을 목표로 하고 있음. 건조 스트레스에 대한 반응 연구를 위해서 우선 먼저 건조 스트레스 내성 표현형 스크리닝 시스템을 구축하였고, 남극이끼 <i>AP2/ERF</i>-like 유전자를 과다발현하는 형질전환 이끼들의 건조 스트레스 내성 반응 표현형 분석을 진행하였음. 또한, 건조 스트레스와 유사한 삼투 스트레스, 식물의 건조 스트레스 반응과 관련된 대표적인 식물 호르몬인 ABA 반응 표현형도 관찰하였음. 이끼에 <i>SuAPL1</i> 남극이끼 유전자가 과다발현되었을 때 건조 스트레스 및 염화나트륨에 의한 삼투 스트레스 내성 반응이 약화되는 것을 확인하였음. 또한, 이끼에 <i>SuAPL7</i>, <i>SuAPL13</i>, <i>SuAPL15</i>, 그리고 <i>SuAPL17</i> 남극이끼 유전자가 과다발현되었을 때, ABA에 대한 반응성이 증가한 것을 확인하였음. 남극이끼 유전자를 과다발현하는 이끼의 표현형 분석결과를 통해 극지 유용 유전자원 개발과 극지 생물의 환경적응 특성 규명에 기여할 것으로 기대 됨.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	남극이끼 <i>AP2/ERF</i> like 유전자, 형질전환 이끼, 건조 스트레스, 삼투 스트레스, ABA 반응			
	영 어	The <i>AP2/ERF</i> -like gene from <i>S. uncinata</i> , Transgenic <i>P. patens</i> , Drought stress, Osmotic stress, ABA response			

요 약 문

I. 제 목

환경 스트레스 내성 관련 남극이끼 유전자의 건조 스트레스에 대한 반응 연구

II. 연구개발의 목표 및 필요성

(1) 연구개발의 목표

형질전환 이끼를 이용한 환경 스트레스 내성 관련 남극이끼 유전자의 건조 스트레스에 대한 기능 분석 및 극지생물의 생태환경 적응 특성을 규명함.

(2) 연구개발의 필요성

환경오염과 지구온난화로 인한 기후변화는 작물의 생산에 영향을 미침. 그 중, 가뭄 스트레스는 전 세계 농업 생산량을 감소시키는 주요 원인임. 그에 따라 건조 스트레스에 대하여 내성을 갖는 작물 개발을 통한 작물 생산성 향상과 작물의 경작가능 지역 확대는 세계적 관심사가 되었음. 남극에는 극심한 환경 스트레스 요인들이 복합적으로 존재하고 있음. 남극식물은 극한의 환경에서 생존할 수 있는 적응 메커니즘을 보유하고 있어 여러 유용물질의 개발이나 식물의 환경 스트레스 대응 반응 연구에 있어 좋은 재료로 쓰일 수 있으나 다른 모델식물들에 비해 연구된 바가 극히 부족함. 선대류는 원시적인 형태의 육상식물이므로 선대류의 환경 스트레스 내성 반응을 연구하는 것은 식물의 환경 스트레스 대응 메커니즘의 진화과정을 이해하고 환경 스트레스 내성을 가진 작물 개발 연구의 기반이 될 수 있음.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- (1) 기 확보된 19 종류의 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 라인 확인 및 유지

남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*) 라인의 RNA 추출 및 RT-PCR을 통해 남극이끼 유전자의 과다발현 여부를 확인하고 고체 및 액체배지에서 기 확보된 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)를 배양함.

(2) 건조 스트레스 표현형 스크리닝 시스템 구축

남극이끼의 환경 스트레스 저항성 관련 유전자들을 과다발현하는 형질전환 이끼 (*P. patens*)들의 건조 스트레스 대응 표현형 분석을 위해, 야생종 이끼를 사용하여 건조 스트레스 내성 표현형 분석 조건과 시스템을 구축함.

(3) 남극이끼 유전자과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스 대응 표현형 분석

건조 스트레스에 대한 표현형 분석 시스템을 이용해 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)와 야생종 이끼에 건조 스트레스를 처리하고 표현형을 비교 분석함. 또한, 건조 스트레스와 유사한 삼투 스트레스 (osmotic stress)를 유발하는 높은 농도의 마니톨, 염화나트륨, 그리고 식물의 건조 스트레스 반응과 관련된 대표적인 식물호르몬인 ABA가 첨가된 고체 배지에서 *AP2/ERF*-like 유전자를 과다발현하는 형질전환 이끼 (*P. patens*) 및 야생종 이끼를 배양하여 표현형을 비교 분석함.

IV. 연구개발결과

(1) 기 확보된 19 종류의 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 라인 확인 및 유지

Genomic DNA PCR 및 RT-PCR을 통해 기 확보된 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼의 형질전환 선별 유전자 (*HPT*) 삽입 여부와 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 여부를 확인하였고, 총 11 종류의 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자를 각각 과다발현하는 총 26 라인의 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼를 확보 및 배양하여 유지함.

(2) 건조 스트레스 표현형 스크리닝 시스템 구축

염을 이용하여 상대습도가 일정하게 유지되는 밀폐된 공간에서 일정 시간 건조 스트레스를 처리 가능한 건조 스트레스 표현형 스크리닝 시스템을 구축하였음.

(3) 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스 대응 표현형 분석

건조 스트레스 처리 후 정상 습도 조건에서 다시 이끼를 배양하여 형질전환 이끼의 생존 여부를 관찰함. 그 결과, *SuAPL1* 유전자를 과다발현하는 형질전환 이끼가 야생종 이끼에 비하여 건조 스트레스 내성이 약한 것을 확인함. *SuAPL10*, *SuAPL11*을 과다발현하는 형질전환 이끼는 건조 스트레스 내성이 야생종과 차이가 없었음.

삼투 스트레스를 유발하는 염화나트륨 및 마니톨을 첨가한 배지에서 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼를 배양하고 이끼의 성장 양상을 관찰한 결과, *SuAPL1* 유전자를 과다발현하는 이끼는 야생종에 비해 성장 양상이 느렸고, *SuAPL8*, *SuAPL10*, *SuAPL11*, *SuAPL14* 유전자를 과다발현하는 이끼의 성장 양상은 야생종과 비교하여 차이가 없었음.

식물의 건조 스트레스 반응에 관련된 대표적 식물호르몬인 ABA를 첨가한 배지에서 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼를 배양하고 이끼의 성장 양상을 관찰한 결과, *SuAPL7*, *SuAPL13*, *SuAPL15*, *SuAPL17* 유전자를 과다발현하는 이끼의 ABA에 대한 반응이 야생종과 비교하여 강화된 것을 확인함. *SuAPL1*, *SuAPL8*, *SuAPL14* 유전자를 과다발현하는 이끼의 ABA에 대한 반응은 야생종과 비교하여 차이가 없었음.

V. 연구개발결과의 활용계획

남극이끼 유전자의 식물체 내 기능 분석을 통해 극지식물의 환경 적응 메커니즘을 진화적, 생태적으로 규명함으로써 극지연구에 있어 주요 연구기반을 제공하고, 환경 스트레스에 대한 내성을 부여하는 유전자들의 선별을 통해 새로운 기능성 작물 제작 가능성을 높여 새로운 유전자원 기반을 확립 할 수 있음. 그 결과 환경 스트레스에 대하여 내성을 갖는 형질전환 작물의 개발에 이바지하여 작물 생산성 향상에 기여할 것으로 기대됨.

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

I. Title

Study of environmental stress related *Sanionia uncinata* genes in response to drought stress

II. Purpose and Necessity of R&D

1. Purpose

Screening of drought stress tolerance-related genes of *Sanionia uncinata* (*S. uncinata*) using transgenic *Physcomitrella patens* (*P. patens*) overexpressing *AP2/ERF*-like genes of *S. uncinata* to reveal the environmental adaptation of Antarctic living organism.

2. Necessity of R&D

S. uncinata 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

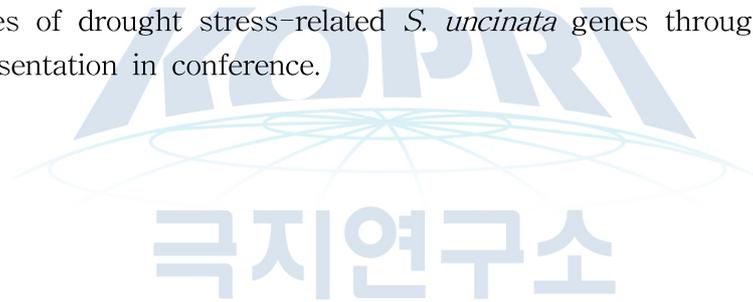
To evaluate the drought tolerance of these transgenic moss, we established drought tolerance screening system using closed chamber of which relative humidity remains constant. We screened drought stress tolerance phenotype of transgenic *P. patens* overexpressing *AP2/ERF*-like genes. For further analysis, we tested osmotic stress responses and ABA responses of the transgenic *P. patens*.

IV. R&D Results

SuAPL1-overexpressing transgenic *P. patens* was more sensitive to drought stress, but *SuAPL10* or *SuAPL11*-overexpressing transgenic *P. patens* displayed similar drought stress tolerance to wild-type *P. patens*. *SuAPL1*-overexpressing transgenic *P. patens* was more sensitive to osmotic stress induced by sodium chloride, but *SuAPL8* or *SuAPL14*-overexpressing transgenic *P. patens* showed similar osmotic stress tolerance induced by NaCl or mannitol. *SuAPL7*, *SuAPL13* or *SuAPL15*-overexpressing transgenic *P. patens* was more sensitive to ABA compared to wild-type *P. patens*. The *SuAPL1*, *SuAPL8* or *SuAPL14*-overexpressing transgenic *P. patens* displayed similar sensitivity to ABA compared to wild-type.

V. Application Plans of R&D Results

Overall, our results suggest that it is valuable to isolate new genetic resources of *S. uncinata* for practical purpose. Furthermore, we may preoccupy the resources of drought stress-related *S. uncinata* 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 남극이끼 및 이끼에 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 기술발전의 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 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 제 7 장 참고문헌

제 1 장 서론

제 1 절 연구의 목적

형질전환 이끼를 이용한 환경 스트레스 내성 관련 남극이끼 유전자의 건조 스트레스에 대한 기능 분석 및 극지생물의 생태환경 적응 특성을 규명함.

제 2 절 연구의 필요성 및 본 과제와의 연계성

1. 연구의 필요성

가) 남극식물 연구의 필요성

남극에는 극저온, 강한 자외선, 극심한 광주기 변화, 낮은 강수량 등 타 지역에서 흔히 관찰되지 않는 극심한 환경 스트레스 요인들이 복합적으로 존재하고 있음. 이러한 특수 환경조건에 적응하여 진화한 남극 생물들은 오랜 시간 동안 분자 수준에서 개체군 수준에 이르기까지 다양한 극지환경 적응 메커니즘을 발달시켜 왔음. 따라서 남극식물은 극한의 환경에서 생존할 수 있는 적응 메커니즘을 보유하고 있으므로 여러 가지 유용물질의 개발이나 식물의 환경 스트레스 대응 반응 연구에 있어 좋은 재료로 쓰일 수 있으나 다른 모델 식물들에 비해 연구된 바가 극히 부족함.

나) 선대류 연구의 필요성

진화과정을 살펴보면, 식물은 주변 환경조건의 변화가 비교적 적은 수상에서 변화가 비교적 큰 육상으로 진출함. 수상 환경에 비해 강한 자외선과 건조한 육상 환경 등에 적응하기 위해 육상식물은 다양한 환경 스트레스 내성 반응 메커니즘을 발달시켰음. 선대류는 원시적인 형태의 육상식물로 잘 알려져 있으므로 선대류의 환경 스트레스 내성 반응을 연구하는 것은 식물의 환경 스트레스 대응 메커니즘의 진화과정을 이해하고 환경 스트레스 내성을 가진 작물 개발 연구의 기반이 될 수 있음. 남극 육상 생태계에는 200 여종의 지의류와 109 종의 선대류가 있으며, 그 중 남극이끼 (*Sanionia uncinata*)는 남극 연안지역에 가장 광범위하게 분포하는 선대류 중 하나임. *S. uncinata*는 측과성 이끼 중 한 종류로서 육상의 다양한 수분조건에서 서식할 수 있음. 특히 *S. uncinata*는 수분이 낮은 생태 환경에서 용단모양의 균집을 이룸으로써 수분이 빠져 나가는 것을 막아 습도를 유지하고 결과적으로 건조에 내성을 나타냄. 그러나 아직 이러한 환경 스트레스 내성 반응 메커니즘에 대한 분자 수준에서의 연구는 활발하지 않음.

2. 본 과제와의 연계성

본 과제 「극지 유용유전자 발굴을 위한 기능유전체 연구」는 극지생물의 유전체 정보를 기반으로 활용 가능 유전자원 발굴을 목표로 하고 있음. 본 과제의 목표 달성을 위하여 해당 위탁과제에서는 남극이끼의 환경 스트레스 저항성 관련 유전자를 과다발현시킨 형질전환 이끼 (*P. patens*)를 이용하여 건조 스트레스에 대한 저항성을 검증하고, 기능 유전체 분석을 통하여 해당 유전자들의 기능을 추론함으로써 극지식물의 생명현상을 규명할 것임.

제 3 절 선행 연구 결과 및 당해 연도 연구의 범위

1. 선행 연구 결과

가) 남극이끼 유전자들의 환경 스트레스에 대한 발현 양상

남극이끼 (*Sanionia uncinata*)의 *AP2/ERF*-like gene family들의 저온, 건조, 및 식물의 스트레스 호르몬 ABA에 대한 발현 패턴 변화 양상을 RT-PCR로 확인하였음.

나) 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 저온 스트레스, ABA 및 cytokinin에 대한 표현형 분석

극지연구소에서 제작한 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*) 총 18 종 및 벡터삽입 형질전환 이끼 (*P. patens*)를 이용하여 저온 (4°C) 스트레스, ABA 및 cytokinin에 대한 표현형 분석을 진행하였음.

2. 당해 연도 연구의 범위

가) 남극이끼 유전자들의 환경 스트레스에 대한 발현 양상

(1) 기 확보된 19 종류의 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 라인 확인 및 유지

기 확보된 19 종류의 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*) 라인에 대해 RNA 추출 및 RT-PCR을 통해 남극이끼 유전자의 과다발현 여부를 확인함. 확인된 라인에 대해서 이끼 cell stock을 제작하고 고체 및 액체배지 배양을 통해 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*) 라인들을 유지함.

(2) 건조 스트레스 표현형 스크리닝 시스템 구축

남극이끼의 환경 스트레스 저항성 관련 유전자들을 과다발현하는 형질전환 이끼 (*P. patens*)들의 건조 스트레스 대응 표현형 분석을 위해 염을 이용하여 상대습도가 일정하게 유지되는 밀폐된 공간에서 일정 시간 건조 스트레스를 처리 가능한 건조 스트레스 표현형 스크리닝 시스템을 구축하였음. 이 시스템을 이용해 야생종 이끼를 사용하여 건조 스트레스 내성 표현형 분석 조건을 맞춤.

(3) 남극이끼 유전자과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스 대응 표현형 분석

건조 스트레스에 대한 표현형 분석 시스템을 이용해 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)와 야생종 이끼에 건조 스트레스를 처리하고 표현형을 비교 분석함. 또한, 건조 스트레스와 유사한 삼투 스트레스 (osmotic stress)를 유발하는 높은 농도의 마니톨, 염화나트륨, 그리고 식물의 건조 스트레스 반응과 관련된 대표적인 식물호르몬인 ABA가 첨가된 고체 배지에서 *AP2/ERF*-like 유전자를 과다발현하는 형질전환 이끼 (*P. patens*) 및 야생종 이끼를 배양하여 표현형을 비교 분석함.



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 남극이끼 및 이끼에 관한 연구 현황

1. 남극이라는 극한의 환경에서 자라는 식물들은 일생을 극저온, 강한 자외선, 강한 바람 및 물 부족으로 인한 가뭄 등 다양한 환경 스트레스를 받으면서 살아감 (Robinson, 2003). 남극 이끼 중 *Sanionia uncinata* (*S. uncinata*, 낮깃털이끼) 남극 연안 지역에 가장 광범위하게 분포하는 이끼 중 하나임 (Smith, 1996; Victoria et al., 2009).
2. 극한의 환경에서 자라는 *S. uncinata*에 대해 최근 자외선 UV-B 저항성 연구 (Lud et al., 2002; Fernandes et al., 2011), 건조 스트레스 저항성에 관한 연구 (Pizarro et al., 2019), 비생물학적 스트레스 하에서 기준 유전자들의 전사 변화에 대한 연구 (Park et al., 2018), 항산화 활성에 관한 연구 (Bhattarail et al., 2008)들이 활발히 진행되고 있음.
3. 그 외 *S. uncinata*의 plastome에 존재하는 DNA 서열분석에 관한 보고 (Park et al., 2018)도 있었음.

극지연구소

제 2 절 환경 스트레스 내성 작물 개발에 관한 연구

1. 기후 변화, 인구 증가 등의 요인에 의한 작물 생산량 감소 (Ray et al., 2015; Lesk et al., 2016)로 인하여 여러 환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 기능성 작물 개발에 대한 관심이 높아지고 있음.
2. 환경 스트레스 관련 유전자를 작물에 과다발현시켜 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 남극곰새풀에서 환경 스트레스 관련 유전자를 선별 후 벼 식물체에 도입함으로써 저온 스트레스에 대해 강한 저항성을 지닌 형질전환 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 부정적 영향을 주지 않는 작물의 개

발이 많은 연구자들의 관심이 됨.

제 3 절 본 연구 결과가 국내외 기술개발에서 차지하는 위치

1. 건조 스트레스 관련 유용 유전자의 선점

*S. uncinata*에서 선별한 환경 스트레스 관련 유전자를 과다발현하는 *P. patens* 이끼 식물체를 이용하여 유전자의 건조 스트레스에 대한 기능을 분석 및 규명함으로써 특허등록·학술발표 등을 통해 유용 유전자를 선점할 수 있음.

2. 신기능 작물 개발에 기여

초기 육상식물로 분류된 선대류인 *P. patens*는 육상식물이 육지로 착지하는 초기 진화 과정 중에서 건조 스트레스 내성 반응 메커니즘을 연구하기에 아주 적절한 모델 시스템임. 그리하여 이끼를 이용한 건조 스트레스 관련 유용 유전자의 기능 연구를 통해 극한 환경에서도 적응 및 자랄 수 있는 신기능성 작물 개발에 근거를 제시할 수 있음.



제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 이론적 · 실험적 접근 방법

1. 기 확보된 19 종류의 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 라인 확인 및 유지

남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자를 과다발현시킨 형질전환 이끼 (*P. patens*)를 대장균, 곰팡이 등의 오염을 제거하기 위해 소독 후 배양하였음. 형질전환 이끼 (*P. patens*)에 대해 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 벡터의 삽입 여부는 genomic DNA PCR 방법으로 확인하고, 전사 수준에서 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 발현 여부는 RT-PCR 방법을 통해 확인함.

2. 건조 스트레스 표현형 스크리닝 시스템 구축

남극이끼의 *AP2/ERF*-like 유전자를 과다발현시킨 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스에 대한 표현형 분석을 위해, 여러 가지 염을 이용하여 밀폐된 공간 안에서 습도가 일정하게 유지되는 시스템을 구축함.

3. 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스 대응 표현형 분석

가) 건조 스트레스 대응 표현형 분석

야생종과 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자의 발현이 확인된 형질전환 이끼들을 2주간 함께 배양하여 위에서 구축한 건조 스트레스 시스템을 이용하여 일정 시간 동안 건조 스트레스를 처리한 후 다시 정상조건에서 키움으로써 재생된 정도를 비교하는 방법으로 건조 스트레스 표현형을 분석함.

나) 삼투 스트레스 대응 표현형 분석

건조 스트레스와 유사한 삼투 스트레스를 유발하는 염화나트륨 또는 마니톨을 첨가한 배지에서 protonema 상태 또는 gametophore 상태의 *AP2/ERF*-like 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼를 야생종과 함께 배양하여 형질전환 이끼의 삼투 스트레스 대응 반응을 야생종과 비교하는 방법으로 표현형을 분석함.

다) ABA 반응 표현형 분석

환경 스트레스 대응 내성 반응에 관여하는 대표적 식물 호르몬인 ABA를 첨가한 배지에서 protonema 상태 또는 gametophore 상태의 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼와 야생종을 함께 배양하여 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼의 ABA 반응을 야생종과 비교하는 방법으로 표현형을 분석함.

제 2 절 연구 내용

1. 기 확보된 19 종류의 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 라인 확인 및 유지

남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 여부를 확인하기 위해, 형질전환 벡터의 삽입 여부를 형질전환 선별 유전자인 *HPT* 유전자의 genomic DNA PCR을 통해 확인하였음. 또한, 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자의 mRNA 발현 여부를 RT-PCR을 통하여 확인하였음. *SuAPL1*, *SuAPL3*, *SuAPL4*, *SuAPL7*, *SuAPL8*, *SuAPL10*, *SuAPL11*, *SuAPL13*, *SuAPL14*, *SuAPL15*, *SuAPL17* 총 11 종의 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자가 발현되는 28 라인의 남극이끼 *AP2/ERF*-like 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)를 선별함.

2. 건조 스트레스 표현형 스크리닝 시스템 구축

남극이끼의 *AP2/ERF*-like 유전자를 과다발현시킨 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스에 대한 표현형 분석을 위해, 여러 가지 염을 이용하여 밀폐된 공간 안에서 습도가 일정하게 유지되는 시스템을 구축한 후 야생종 이끼를 사용하여 건조 스트레스 내성 표현형 분석 조건을 맞춤.

3. 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스 대응 표현형 분석

가) 건조 스트레스 대응 표현형 분석

야생종과 남극이끼 *AP2/ERF*-like 과다발현 형질전환 이끼를 정상조건에서 2주간 배양한 후, 염을 이용하여 상대습도가 일정하게 유지되는 밀폐된 공간에서 건조 스트레스를 며칠간 동일하게 처리함. 처리 후 정상조건에서 다시 배양하며 건조 스트레스 처리 후 생존 정도를 사진 촬영을 통해 분석함.

나) 삼투 스트레스 대응 표현형 분석

정상조건에서 2주간 배양한 야생종과 남극이끼 *AP2/ERF*-like 과다발현 형질전환 이끼를 갈아서 건조 스트레스와 유사한 삼투 스트레스를 유발하는 염화나트륨 및 마니톨이 첨가된 배지에서 배양함. 배양 후 이끼의 성장 양상을 사진 촬영을 통해 분석함.

다) ABA 반응 표현형 분석

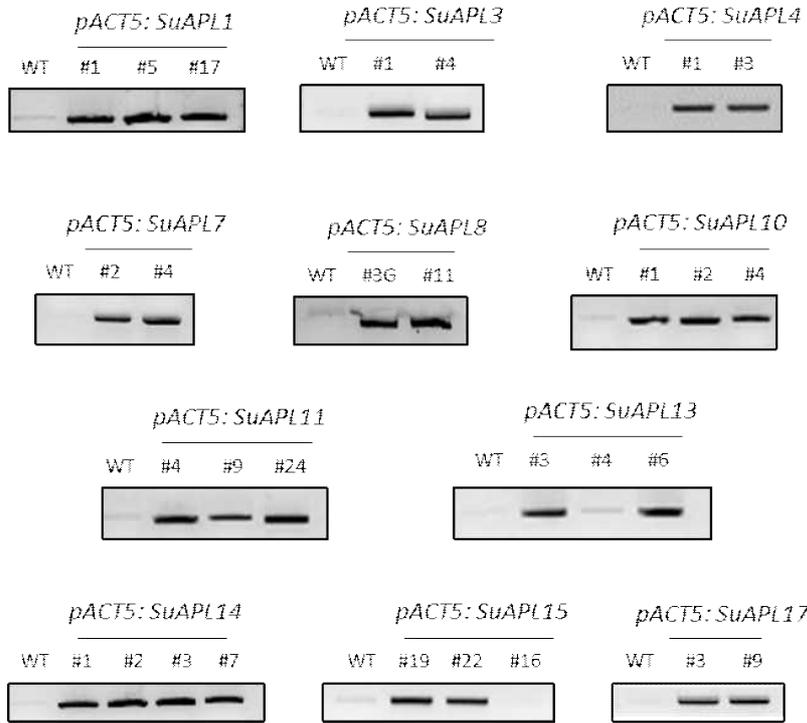
정상조건에서 2주간 배양한 야생종과 남극이끼 *AP2/ERF*-like 과다발현 형질전환 이끼를 갈아서 식물의 대표적인 건조 스트레스 호르몬인 ABA가 첨가된 배지에서 배양함. 배양 후 이끼의 성장 양상을 사진 촬영을 통해 분석함.

제 3 절 연구 결과

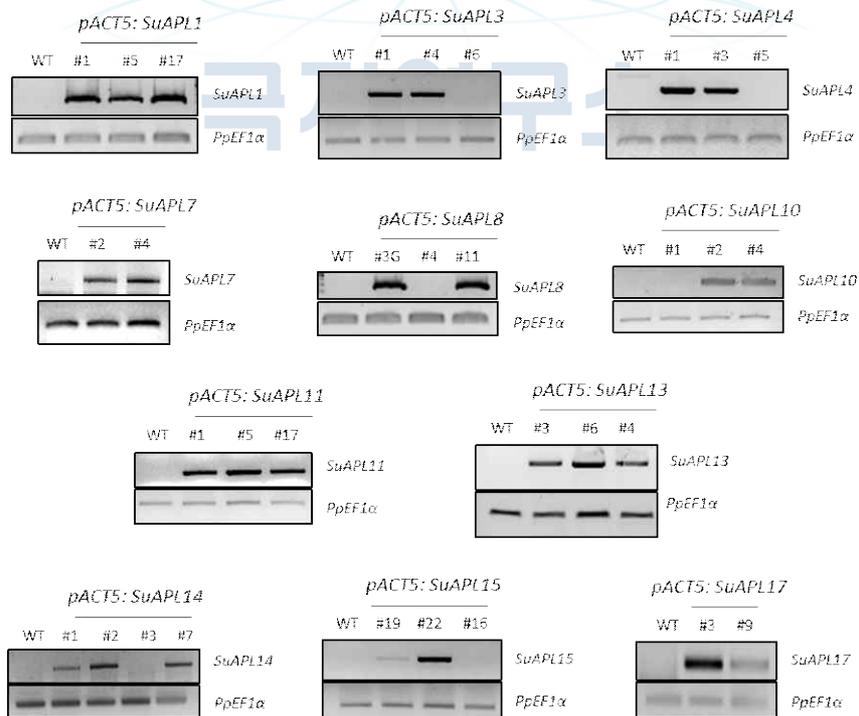
1. 기 확보된 19 종류의 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 라인 확인 및 유지

기 확보된 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 라인 유지를 위해 주기적으로 배양 및 오염 제거를 위한 소독을 진행함. 그 외 소독이 완료된 라인들의 gDNA를 뽑은 후 *HPT* 유전자 PCR을 통해 삽입하려는 벡터의 삽입 여부를 확인함. 그 결과 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼 세 라인 (#1, #5, #17), *SuAPL3* 과다발현 형질전환 이끼 두 라인 (#1, #4), *SuAPL4* 과다발현 형질전환 이끼 두 라인 (#1, #3), *SuAPL7* 과다발현 형질전환 이끼 두 라인 (#2, #4), *SuAPL8* 과다발현 형질전환 이끼 두 라인 (#3G, #11), *SuAPL10* 과다발현 형질전환 이끼 세 라인 (#1, #2, #4), *SuAPL11* 과다발현 형질전환 이끼 세 라인 (#4, #9, #24), *SuAPL13* 과다발현 형질전환 이끼 세 라인 중 두 라인 (#3, #6), *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼 네 라인 (#1, #2, #3, #7), *SuAPL15* 과다발현 형질전환 이끼 세 라인 중 두 라인 (#19, #22), *SuAPL17* 과다발현 형질전환 이끼 두 라인 (#3, #9)에 벡터가 잘 삽입된 것을 확인함 (그림 1).

또한, 기 확보된 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)들의 과다발현 여부를 확인하기 위해 RNA를 추출한 후 cDNA 합성을 통해 RT-PCR를 진행함. 그 결과 *SuAPL1* 형질전환 이끼의 세 라인 (#1, #5, #17), *SuAPL3* 형질전환 이끼의 세 라인 중 두 라인 (#1, #4), *SuAPL4* 형질전환 이끼의 세 라인 중 두 라인 (#1, #3), *SuAPL7* 형질전환 이끼의 두 라인 (#2, #4), *SuAPL8* 형질전환 이끼의 세 라인 중 두 라인 (#3G, #11), *SuAPL10* 형질전환 이끼의 세 라인 중 두 라인 (#2, #4), *SuAPL11* 형질전환 이끼의 세 라인 (#1, #5, #17), *SuAPL13* 형질전환 이끼의 세 라인 (#3, #4, #6), *SuAPL14* 형질전환 이끼의 네 라인 중 세 라인 (#1, #2, #7), *SuAPL15* 형질전환 이끼의 세 라인 중 두 라인 (#19, #22), 그리고 *SuAPL17* 형질전환 이끼의 두 라인 (#3, #9)에서 해당 삽입 유전자들의 과다발현을 확인함 (그림 2).



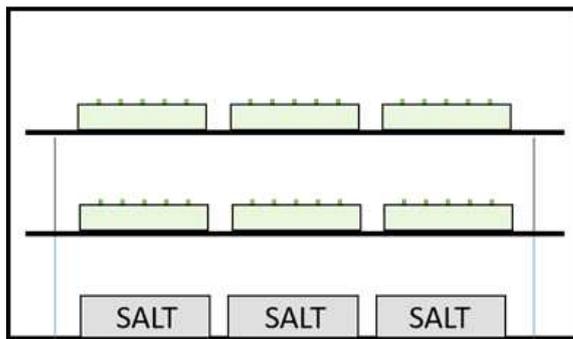
(그림 1) 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼 *HPT* 유전자 PCR



(그림 2) 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼 RT-PCR

2. 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스 대응 표현형 스크리닝 시스템 구축

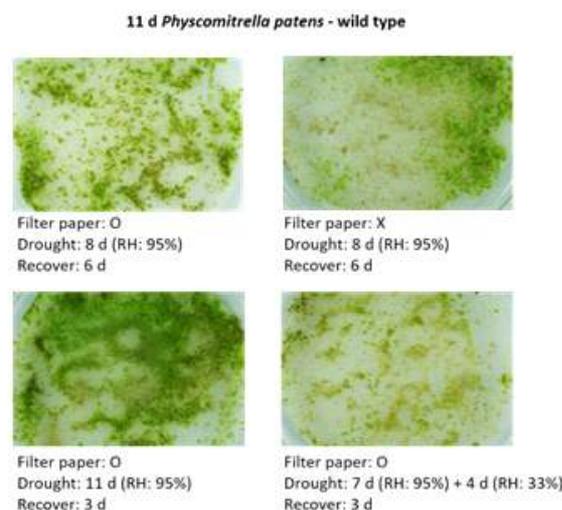
남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스 대응 표현형을 분석하기 위해, 우선 일정하게 이끼에 건조 스트레스 처리가 가능한 시스템을 구축하였음. 염을 이용하여 상대습도 (relative humidity)를 일정하게 유지 가능한 밀폐된 공간을 제작하였음 (그림 3).



Salt solution	RH
K_2SO_4	97%
KNO_3	95%
$MgSO_4$	91%
KCl	86%
NaCl	75%
NH_4NO_3	68%
$MgCl_2$	33%
LiCl	13%

(그림 3) 건조 스트레스 처리 시스템 및 포화 염 용액을 이용한 상대습도의 정도

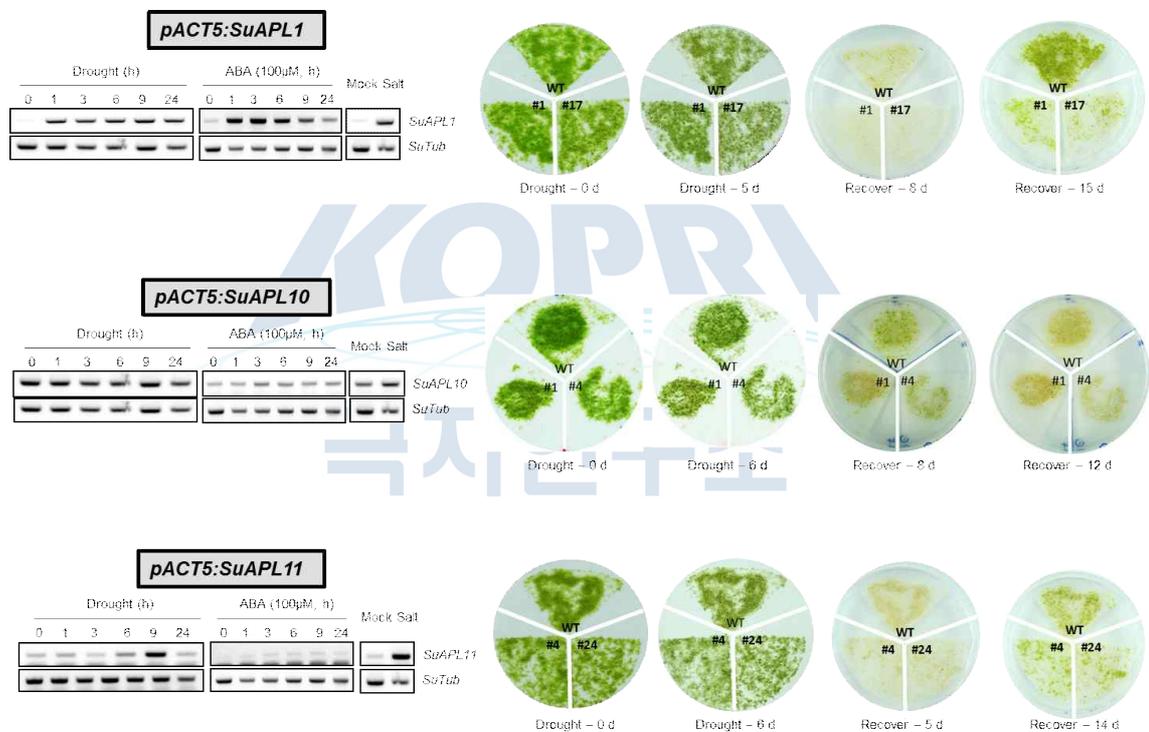
구축된 건조 스트레스 처리 시스템에서 1-2 주 된 protonema 상태의 야생종 이끼 (*P. patens*)를 이용해 물에 적셔진 filter paper의 유무, 상대습도의 변화 등 조건에서 건조를 진행한 후, 정상 조건에서 다시 재생시켜 생존 정도를 확인함. 그 결과, filter paper가 없는 조건에서 상대습도 95% 또는 filter paper가 있는 조건에서 상대습도를 33%로 낮추었을 때 50% 정도의 생존율을 보이는 것으로 확인됨 (그림 4).



(그림 4) 야생종을 이용한 건조 스트레스 조건 확인

3. 남극이끼 *AP2/ERF*-like 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스 대응 표현형 분석

구축된 건조 스트레스 처리 시스템을 이용하여 3 종류의 남극이끼 *SuAPL1*, *SuAPL10*, *SuAPL11* 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스 대응 표현형을 분석하였음. 건조 스트레스, 고염 스트레스 및 ABA를 처리하였을 때 유전자 발현이 증가한 *SuAPL1* 과다발현 형질전환체, 유전자 발현의 변화는 없지만 선행 연구 결과 ABA를 처리한 조건에서 야생종에 비해 강화된 ABA 표현형을 나타낸 *SuAPL10* 과다발현 형질전환체, 그리고 건조 스트레스 및 고염 스트레스를 처리 하였을 때 유전자 발현이 증가한 *SuAPL11* 과다발현 형질전환체를 야생종과 함께 2주간 정상조건에서 배양한 후 건조 스트레스 대응 표현형을 야생종과 비교하여 분석함 (그림 5).

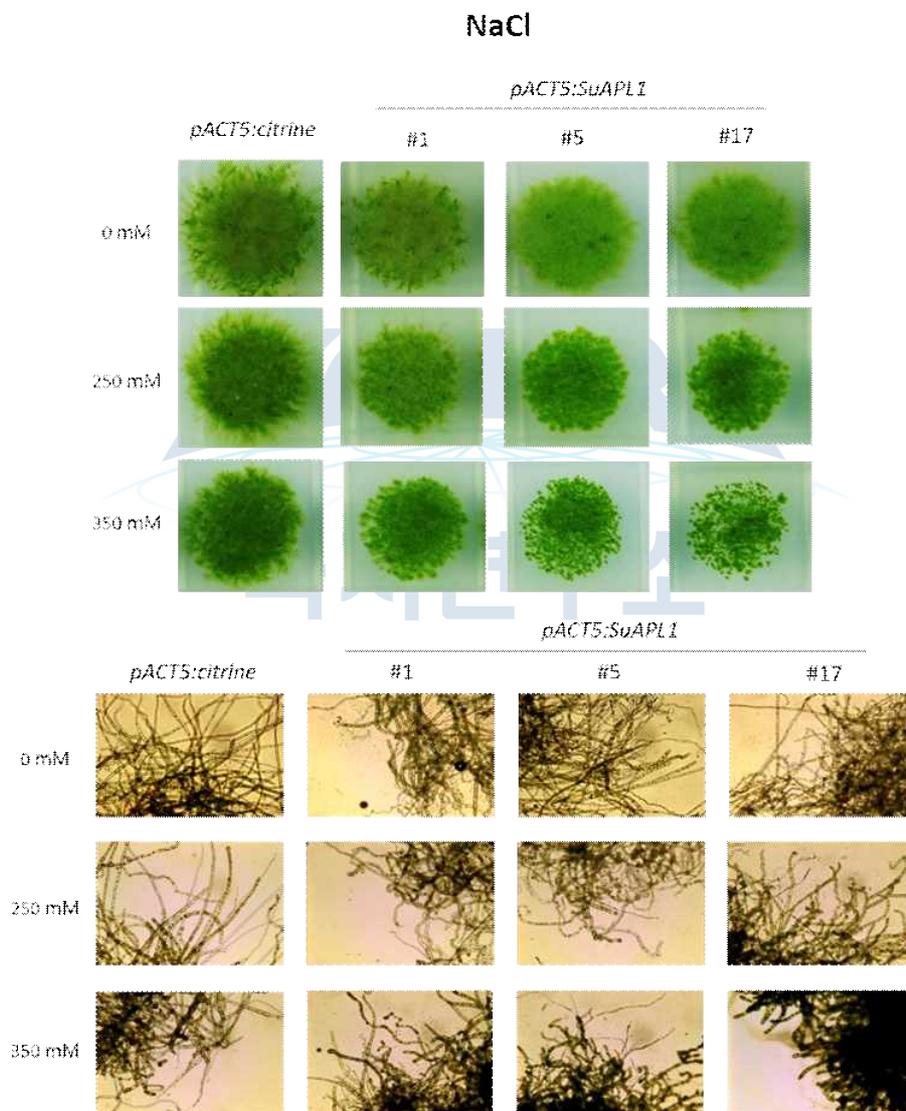


(그림 5) *SuAPL1*, *SuAPL10*, *SuAPL11* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스 대응 표현형 분석

야생종과 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)에 건조 스트레스를 처리하고 정상조건으로 옮겨 배양하며 이끼의 성장을 관찰한 결과 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼는 야생종에 비해 약화된 건조 스트레스 내성 반응을 보였음. 5일간 건조 스트레스를 처리한 후 정상조건으로 옮겼을 때, 야생종에 비하여 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼 #1, #7 두 라인 모두 이끼 성장의 회복이 더딤을 확인하였음 (그림 5).

SuAPL10, *SuAPL11* 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)는 건조 스트레스 처리 후 정상 조건에서 다시 해당 식물체들을 배양하며 이끼의 성장을 관찰한 결과 야생종과 비교하여 건조 스트레스 내성 반응 정도에 차이가 없었음. *SuAPL10* 유전자 과다발현 형질전환체 두 라인 (#1, #4)과 *SuAPL11* 유전자 과다발현 형질전환체 두 라인 (#4, #24) 모두 6일간의 건조 스트레스를 처리한 후 정상조건에서 약 2주간 배양하였을 때, 야생종과 비슷한 수준의 성장 정도를 나타내었음 (그림 5).

4. 남극이끼 *AP2/ERF*-like 과다발현 형질전환 이끼의 삼투 스트레스 대응 표현형 분석



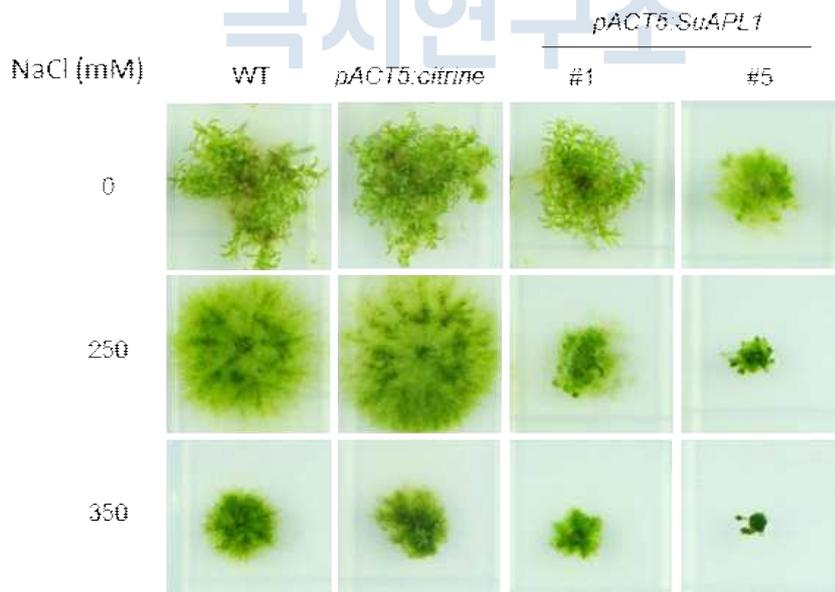
(그림 6) *SuAPL1* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 염화나트륨에 의한 삼투 스트레스 대응 표현형 분석

(가) *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼의 삼투 스트레스 대응 표현형 분석

형질전환 대조군인 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼와 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)를 같이 염화나트륨이 첨가된 배지에서 4주간 배양하여 이끼의 성장을 관찰한 결과 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼는 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비해 조금 약화된 삼투 스트레스 내성 반응을 보였음. *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼 #1, #5, #17 세 라인 모두 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비해 염화나트륨이 첨가된 배지에서 이끼의 성장이 약간 더딘을 확인하였음 (그림 6).

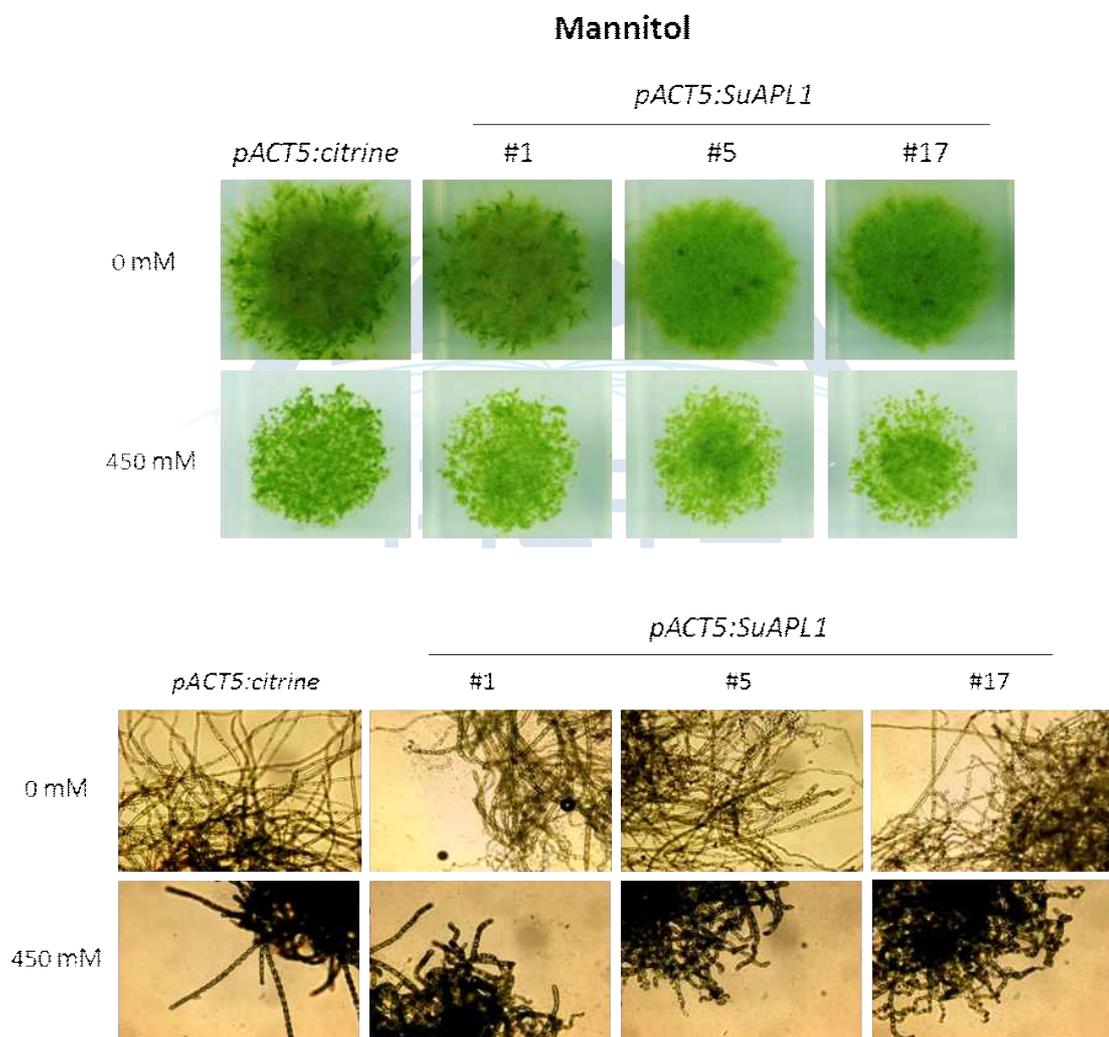
또한, 현미경으로 해당 이끼들의 세포 형태를 관찰한 결과, 대조군인 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비해 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼의 #1, #5, #7 세 라인 모두 세포 형태가 곡선형으로 굽어 있고 protonema가 뻗어나가지 못한 것을 확인하였음 (그림 6).

그러나, 염화나트륨이 첨가되지 않은 배지에서 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼의 성장이 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비하여 조금 더딘 것으로 확인되었음. *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼의 삼투 스트레스에 대한 내성 반응을 추가로 검증해보기 위해 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼 #1, #5 두 라인, 야생종, 그리고 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼의 gametophore를 염화나트륨이 첨가된 배지로 옮겨 이끼의 성장을 관찰하였음. 그 결과, *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼가 야생종 및 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비하여 염화나트륨이 첨가된 배지에서 성장이 더딘을 확인하였음 (그림 7).



(그림 7) *SuAPL1* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 염화나트륨에 의한 삼투 스트레스 대응 표현형 분석

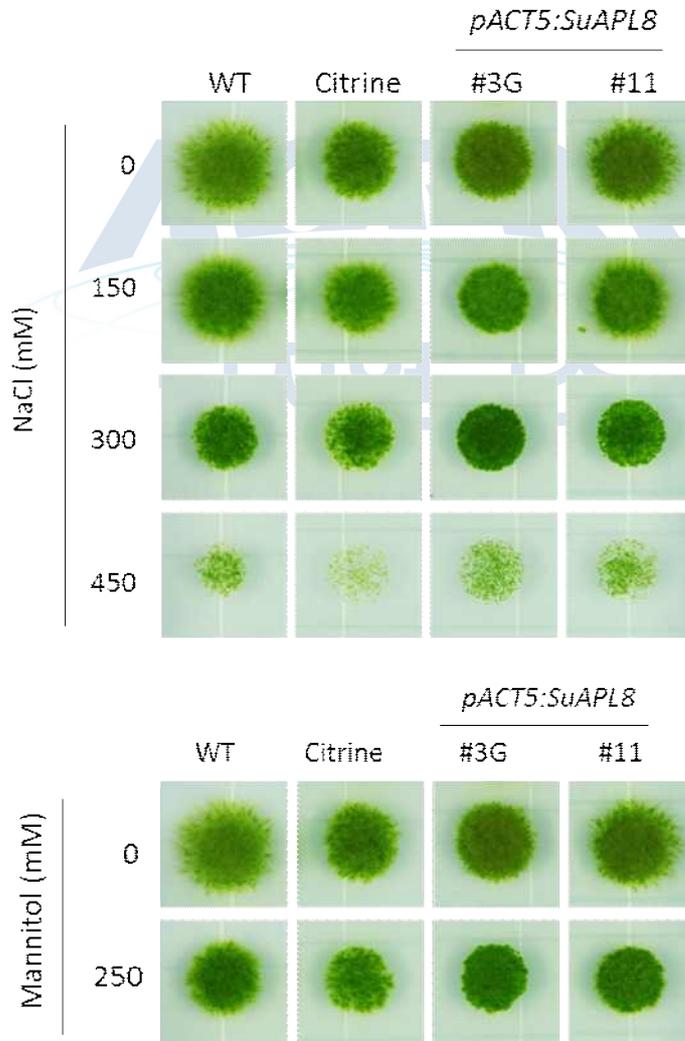
삼투 스트레스를 유발하는 또 다른 물질인 마니톨을 첨가한 배지에서 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼와 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼를 4주간 배양하여 이끼의 성장을 관찰하였음. 그 결과 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼는 대조군인 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼와 비교하여 마니톨이 첨가된 배지에서의 성장에 차이가 없음을 확인하였음. 또한, 현미경으로 세포의 형태를 관찰한 결과 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼와 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼는 세포의 형태나 protonema의 성장 정도에 있어 차이가 없음을 확인하였음 (그림 8). 그러나 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼 #1, #5, #17 세 라인 모두 마니톨이 첨가되지 않은 배지에서의 성장이 *Citrine* 과다발현 이끼보다 더딘 것으로 확인되어, *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼의 마니톨에 의한 삼투 스트레스 내성 반응 표현형 분석에는 추가적인 실험이 필요한 것으로 판단됨.



(그림 8) *SuAPL1* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 마니톨에 의한 삼투 스트레스 대응 표현형 분석

(나) *SuAPL8* 과다발현 형질전환 이끼의 삼투 스트레스 대응 표현형 분석

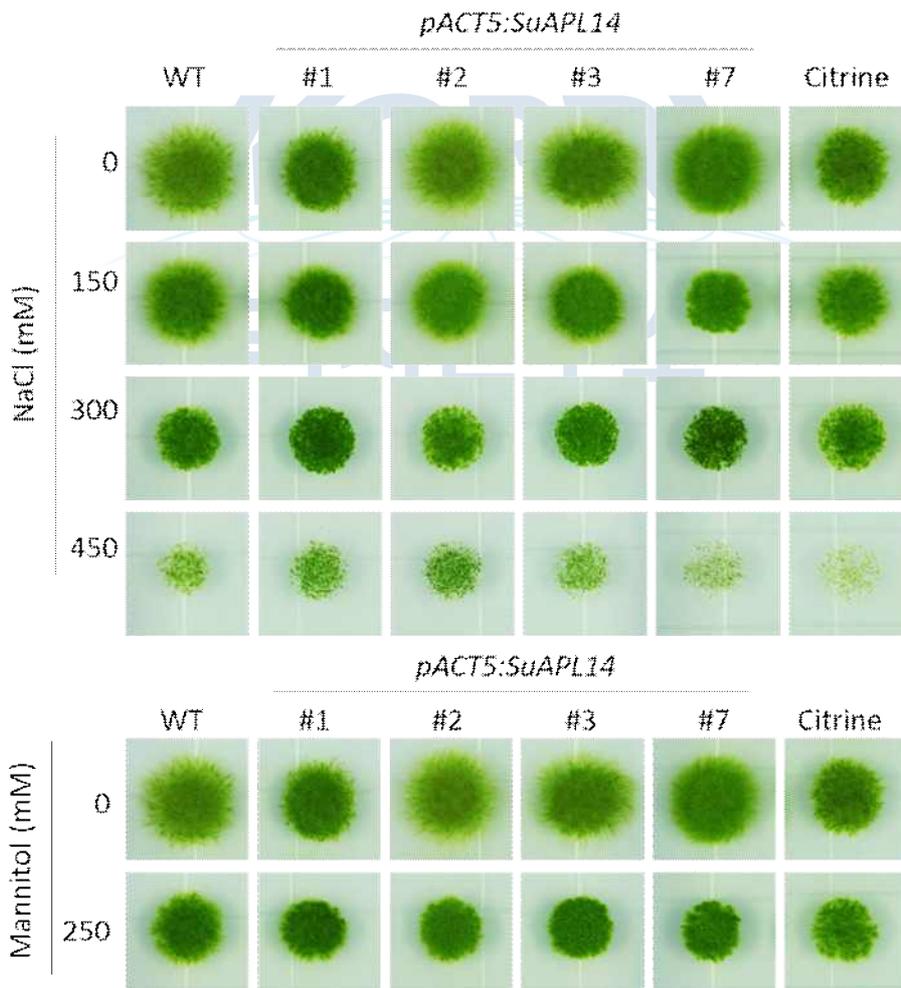
야생종 및 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼와 *SuAPL8* 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)를 같이 염화나트륨 또는 마니톨이 첨가된 배지에서 4주간 배양하며 이끼의 성장을 관찰하였음. 그 결과, *SuAPL8* 과다발현 형질전환 이끼의 #3G, #11 두 라인 모두 삼투 스트레스를 유발하는 염화나트륨 또는 마니톨이 첨가된 배지에서 야생종과 비교하여 이끼의 성장에 차이가 없음을 확인하였음. 염화나트륨 또는 마니톨이 첨가된 배지에서 *SuAPL8* 과다발현 형질전환 이끼의 성장이 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼와 비교하여 좀 더 빠른 경향이 있는 것으로 확인이 되었지만, 염화나트륨 또는 마니톨이 첨가되지 않은 배지에서 배양하였을 때도 마찬가지로 *SuAPL8* 과다발현 형질전환 이끼의 성장이 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼의 성장보다 빠른 것으로 관찰되었음. 따라서 *SuAPL8* 과다발현 형질전환 이끼는 야생종이나 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼와 비교하여 삼투 스트레스 대응 표현형에 차이가 없는 것으로 판단됨 (그림 9).



(그림 9) *SuAPL8* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 염화나트륨 및 마니톨에 의한 삼투 스트레스 대응 표현형 분석

(다) *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼의 삼투 스트레스 대응 표현형 분석

야생종과 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼 및 *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼를 같이 삼투 스트레스를 유발하는 염화나트륨 또는 마니톨이 첨가된 배지에서 4주간 배양하며 이끼의 성장을 관찰하였음. 그 결과 *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼의 #1, #2, #3, #7 네 라인 모두 염화나트륨 또는 마니톨이 첨가된 배지에서 야생종과 비교하여 이끼의 성장에 차이가 없었음. *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼 네 라인의 염화나트륨 또는 마니톨이 첨가된 배지에서의 성장이 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼의 성장보다는 빠른 경향을 나타냈지만, 염화나트륨 또는 마니톨이 첨가되지 않은 배지에서도 *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼의 성장이 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비하여 약간 빠른 경향이 있었음. 따라서 *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼는 야생종이나 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼와 비교하여 삼투 스트레스 대응 표현형에 차이가 없는 것으로 판단됨 (그림 10).

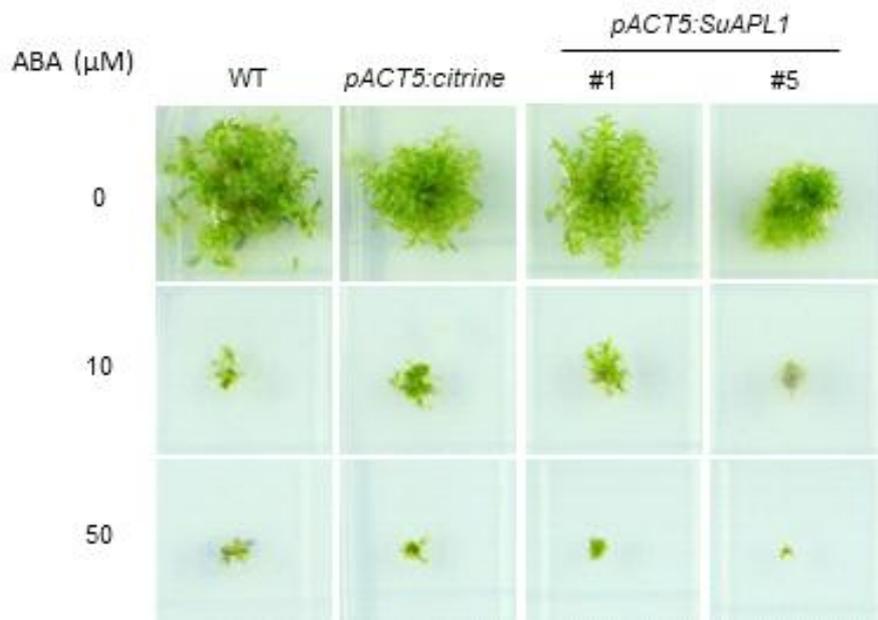


(그림 10) *SuAPL14* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 염화나트륨 및 마니톨에 의한 삼투 스트레스 대응 표현형 분석

5. 남극이끼 *AP2/ERF*-like 과다발현 형질전환 이끼의 ABA 반응성 표현형 분석

(가) *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼의 ABA 반응성 표현형 분석

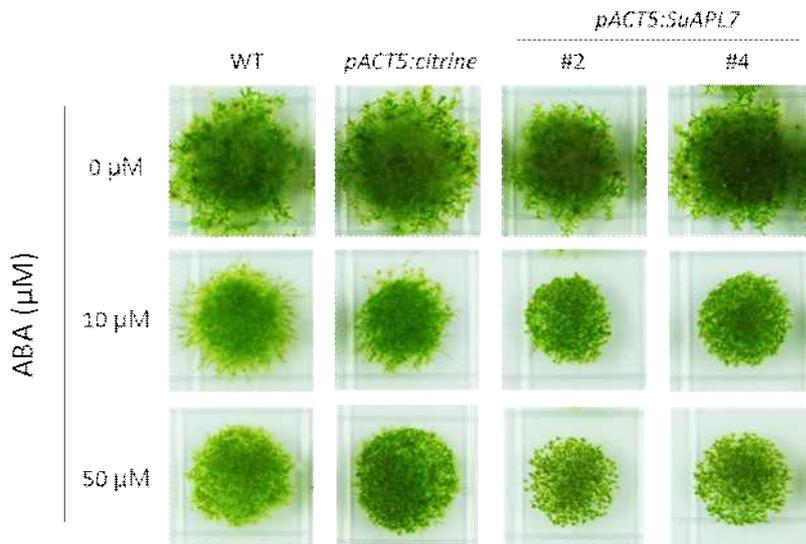
야생종과 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼, 그리고 *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼 #1, #5 두 라인의 gametophore 상태의 조직을 ABA가 첨가된 배지에서 4주간 배양하며 ABA에 대한 반응을 관찰함. 그 결과, *SuAPL1* 과다발현 형질전환 이끼 #1, #5 두 라인 모두 야생종과 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼들이 ABA에 대해 반응하는 정도가 차이가 없음을 확인함 (그림 11).



(그림 11) *SuAPL1* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 ABA에 대한 반응성 분석

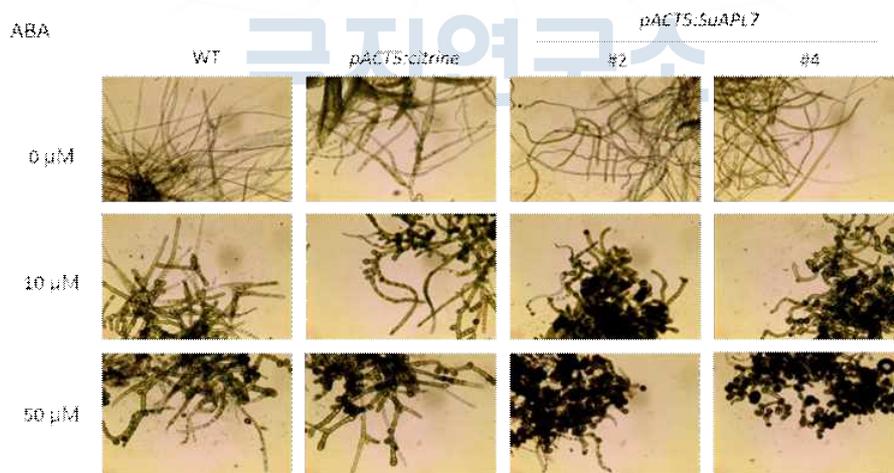
(나) *SuAPL7* 과다발현 형질전환 이끼의 ABA 반응성 표현형 분석

야생종과 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼, 그리고 *SuAPL7* 과다발현 형질전환 이끼 #2, #4 두 라인을 같이 ABA가 첨가된 배지에서 4주간 배양하며 ABA에 의해 성장이 느려지는 양상을 관찰함. 그 결과, *SuAPL7* 과다발현 형질전환 이끼 #2, #4 두 라인 모두 야생종과 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비교하여 ABA에 의해 성장이 저해되는 정도가 큰 것으로 확인되었음 (그림 12).



(그림 12) *SuAPL7* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 ABA에 대한 반응성 분석

또한, 현미경을 이용해 ABA가 첨가된 배지에서 4주간 자란 *SuAPL7* 과다발현 형질전환 이끼의 세포 형태를 야생종 및 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼와 비교하였음. 그 결과 이끼의 ABA 신호전달에 의해 나타나는 brood cell의 형성이 야생종이나 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비하여 *SuAPL7* 과다발현 형질전환 이끼 #2, #4 두 라인에서 더 많이 일어난 것을 확인하였음 (그림 13).

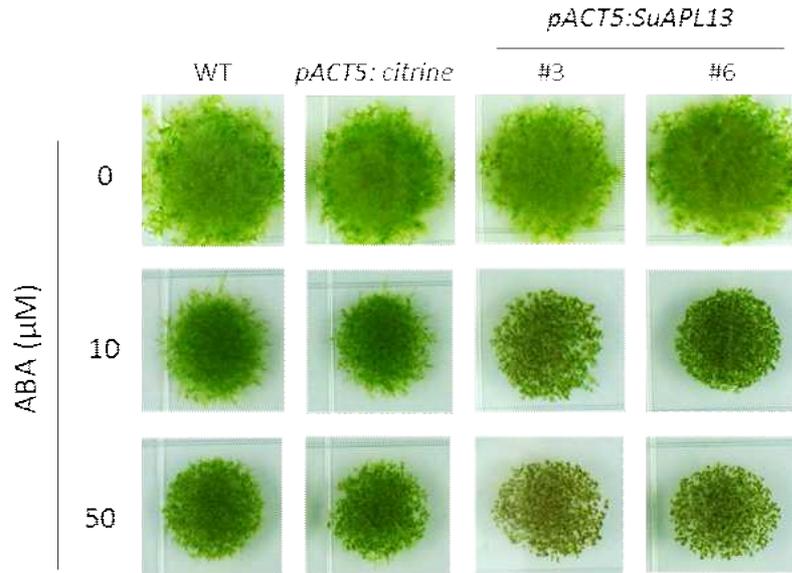


(그림 13) *SuAPL7* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 ABA에 의한 세포 형태 변화 분석

(다) *SuAPL13* 과다발현 형질전환 이끼의 ABA 반응성 표현형 분석

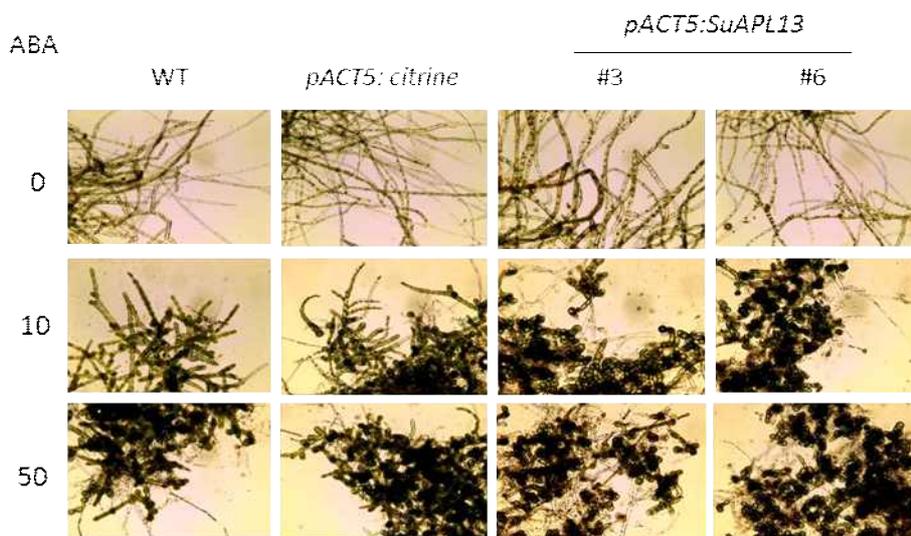
야생종, *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼, 그리고 *SuAPL13* 과다발현 형질전환 이끼 #3, #6 두 라인을 같이 ABA가 첨가된 배지에서 4주간 배양하여 ABA에 의해 이끼의 성장

이 느려지는 양상을 관찰하였음. 그 결과, *SuAPL13* 과다발현 형질전환 이끼의 #3, #6 모두 ABA에 의해 나타나는 이끼 성장 저해의 정도가 야생종 및 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비해 큰 것으로 확인되었음 (그림 14).



(그림 14) *SuAPL13* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 ABA에 대한 반응성 분석

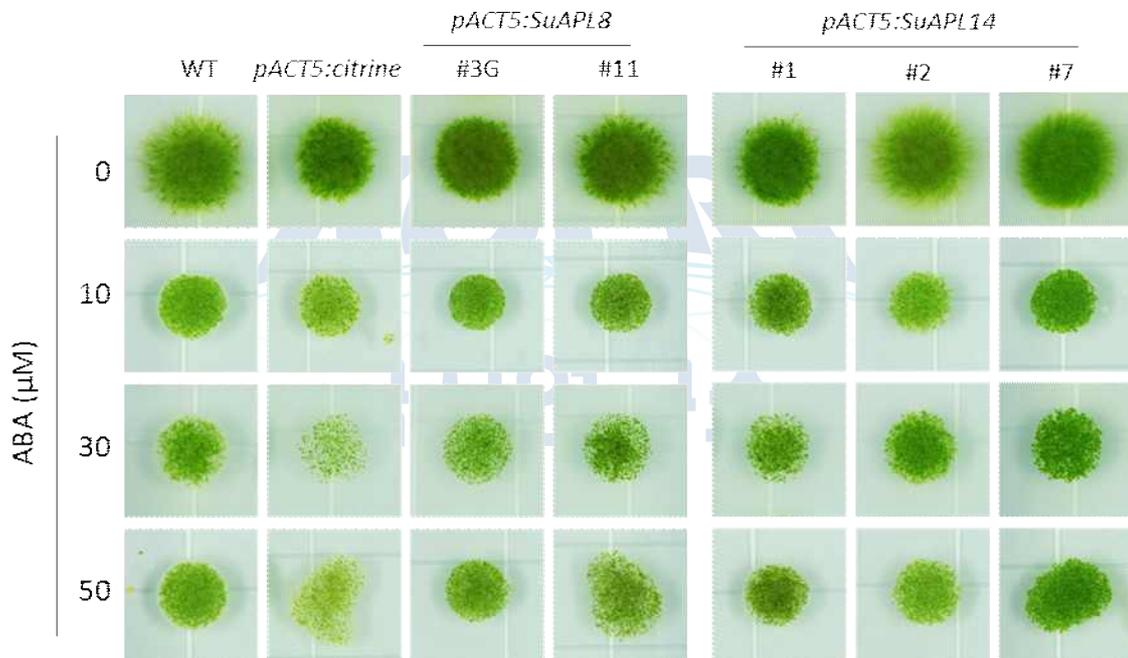
또한 ABA가 첨가된 배지에서 4주간 자란 *SuAPL13* 과다발현 형질전환 이끼의 세포 형태를 야생종 및 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼와 현미경을 통해 비교하였음. 그 결과 야생종이나 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비하여 *SuAPL13* 과다발현 형질전환 이끼 #3, #6 두 라인에서 이끼의 ABA 신호전달에 의해 나타나는 brood cell의 형성이 더 많이 일어난 것을 확인하였음 (그림 15).



(그림 15) *SuAPL13* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 ABA에 의한 세포 형태 변화 분석

(라) *SuAPL8*, *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼의 ABA 반응성 표현형 분석

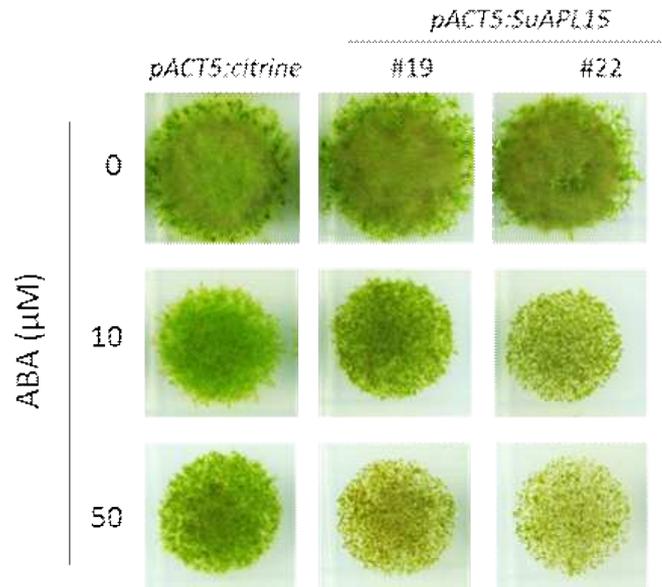
야생종 및 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼, 그리고 *SuAPL8* 과다발현 형질전환 이끼 #3G, #11 두 라인 그리고 *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼 #1, #2, #7 세 라인을 같이 ABA가 첨가된 배지에서 4주간 배양하며 ABA에 대한 반응성을 확인하였음. 그 결과 *SuAPL8* 과다발현 형질전환 이끼 #3G, #11 두 라인, *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼 #1, #2, #7 세 라인 모두 야생종과 비교하여 ABA에 반응하여 성장이 저해되는 것에 차이가 없음을 확인하였음. *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼와 비교하여 *SuAPL8* 과다발현 형질전환 이끼와 *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼의 성장이 ABA가 첨가된 배지에서 더욱 저해되는 현상이 있으나, ABA가 첨가되지 않은 배지에서도 같은 현상이 나타났으므로 *SuAPL8* 및 *SuAPL14* 과다발현 형질전환 이끼와 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼의 ABA에 대한 반응성 차이가 있다고 보기 어려움 (그림 16).



(그림 16) *SuAPL8* 및 *SuAPL14* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 ABA에 대한 반응성 분석

(마) *SuAPL15* 과다발현 형질전환 이끼의 ABA 반응성 표현형 분석

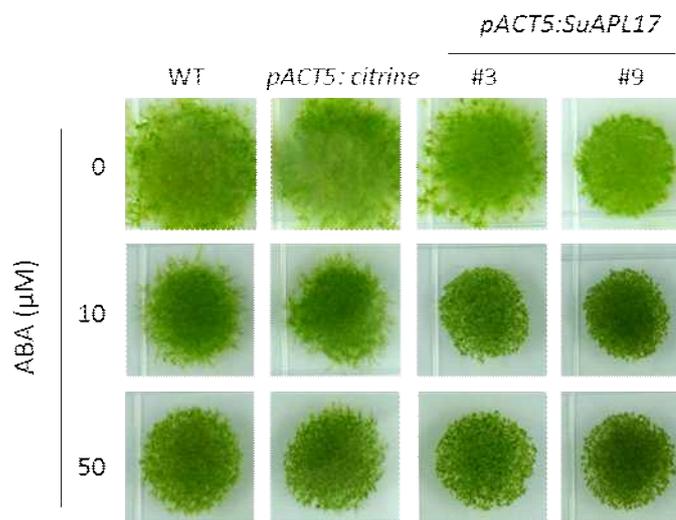
Citrine 과다발현 형질전환 이끼와 *SuAPL15* 과다발현 형질전환 이끼 #19을, #22 두 라인을 같이 ABA가 첨가된 배지에서 4주간 배양하여 ABA반응에 의해 이끼의 성장이 저해되는 정도를 확인하였음. 그 결과 *SuAPL15* 과다발현 형질전환 이끼 #19, #22 두 라인 모두 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비하여 ABA반응에 의해 이끼의 성장이 저해되는 정도가 큰 것을 확인하였음 (그림 17).



(그림 17) *SuAPL15* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 ABA에 대한 반응성 분석

(바) *SuAPL17* 과다발현 형질전환 이끼의 ABA 반응성 표현형 분석

야생종, *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼 그리고 *SuAPL17* 과다발현 형질전환 이끼 #3, #6 두 라인을 같이 ABA가 첨가된 배지에서 배양하여 ABA에 의해 이끼의 성장이 저해되는 정도를 확인하였음. 그 결과, *SuAPL17* 과다발현 형질전환 이끼 #3, #6 두 라인 모두 야생종 및 *Citrine* 과다발현 형질전환 이끼에 비해 ABA에 의한 이끼 성장 저해 정도가 큰 것을 확인하였음 (그림 18).



(그림 18) *SuAPL17* 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 ABA에 대한 반응성 분석

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도 (%)
1. 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (<i>P. patens</i>) 건조 스트레스 표현형 스크리닝 시스템 구축 및 건조 스트레스 저항성 표현형 분석	1-1	- 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (<i>P. patens</i>) 라인 유지 및 확인	- RT-PCR을 통한 이끼 (<i>P. patens</i>)의 남극이끼 유전자 과다발현 여부 확인 - 남극이끼 유전자 과다발현이 확인된 이끼 (<i>P. patens</i>)의 소독 진행 및 라인 유지	100
	1-2	- 이끼 (<i>P. patens</i>)의 건조 스트레스 표현형 분석 시스템 구축	- 습도가 일정하게 유지되는 밀폐된 공간에서 건조 스트레스 처리를 처리하는 시스템을 구축함	100
	1-3	- 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (<i>P. patens</i>)의 건조 스트레스 표현형 분석	- 습도가 일정하게 유지되는 밀폐된 공간에서 건조 스트레스를 처리하여 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (<i>P. patens</i>)의 건조 스트레스 표현형을 분석함	100

제 2 절 본 연구의 관련분야 기술발전예의 기여도

가. 학술적 기여

- 1) 남극이끼 유전자의 식물체 내 기능 분석을 통해 극지식물의 환경 적응 메커니즘을 진화적, 생태적으로 규명함으로써 극지연구에 있어 주요 연구기반 제공.
- 2) 환경 스트레스에 대한 내성을 부여하는 유전자들의 선별을 통해 새로운 기능성 작물 제작 가능성을 높이고, 새로운 유전자원 기반 확립.
- 3) 국내 및 국제 심포지엄에 참석하여 연구결과를 발표하여 국제 연구단체와 결과를 공유함으로써 전 세계 극지연구의 발전에 기여.

나. 경제적 기여

본 연구를 통하여 개발될 유전자원 확보기술과 형질전환 이끼는 추후 효율적인 유전자원 확보와 유용유전자의 산업적 이용을 위한 중요한 기반으로 작용할 것임. 환경 스트레스에 대하여 내성을 갖는 형질전환 작물의 개발에 이바지하여 작물 생산성 향상에 기여할 것으로 기대됨.



제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

1. 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 스트레스 저항성 검증

남극이끼 유전자를 과다발현하는 형질전환 이끼 (*P. patens*)를 야생종과 함께 배양하여 가뭄, 저온 스트레스를 주었을 때 나타나는 형질을 보다 정밀히 관찰 및 분석함으로써 실제 농업에 활용 가능한 작물로 도입할 가치가 있는 유전자를 선별 할 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 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)의 표현형 검정을 통해 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼의 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 연구에서의 응용

1. 유용 유전자원의 선점 및 작물로써의 활용가능성 규명

가) 남극이끼 유전자를 과다발현하는 형질전환 이끼 (*P.patens*)를 이용하여 활용 가능한 유용 자원을 선별하고 이를 특허 출원 및 학술회의 발표 등을 통해서 선점 할 수 있음.

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

2. 남극이끼의 환경적응 기작 규명

- 가) 남극의 극한 환경에서 서식하는 남극이끼 유전자의 기능을 분석함으로써 진화과정상 초기 육상 식물이 극한환경에서 서식할 수 있는 특성을 확인할 수 있음.
- 나) 남극이끼와 이끼 (*P. patens*)의 유전자 특성 차이를 확인하여 남극이끼의 극한환경에서의 적응기작에 대한 진화적인 측면의 단서를 제공할 수 있음.

제 3 절 기업화 추진방안

본 연구는 남극이끼 유전자 과다발현 형질전환 이끼 (*P. patens*)를 이용한 남극이끼의 건조 스트레스 내성 관련 유전자 분석을 통한 환경 스트레스 내성 관련 남극이끼 유전자의 건조 스트레스에 대한 기능 분석 및 극지생물의 생태환경 적응 특성 규명을 최종 목표로 진행됨. 연구 기간 동안 남극이끼의 *AP2/ERF-like* 유전자를 과다발현하는 형질전환 이끼 (*P. patens*)를 활용하여 건조 스트레스 관련 표현형 분석을 위한 시스템을 구축하였고, 해당 시스템을 활용하여 건조 스트레스 관련 표현형을 분석하였음. 추후 보다 심층적인 연구를 통하여 남극이끼 유용 유전자를 선별하고, 남극이끼 유용 유전자의 실제 농작물로의 도입 가능여부 및 유용 유전자의 도입이 농작물의 생산성이나 스트레스 내성 관련 기능을 향상시키는데 미치는 영향을 알아보려고 함. 또한, 해당 유용 유전자의 식물체 내에서의 기능도 밝히려 함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

이끼 (*P. patens*)의 건조 스트레스 대응 표현형을 분석하기 위해 염 과포화 용액을 이용하여 밀폐된 공간에서 상대습도를 일정하게 유지하며 건조 스트레스를 처리하고, 건조 스트레스 처리 후 정상조건에서 다시 이끼를 배양하여 이끼 성장의 회복 정도를 관찰하는 시스템을 사용하고 있음. 또한, 이끼의 ABA 반응을 ABA 처리 후 나타나는 brood cell 형성 및 protonema의 성장 저해를 통해 관찰하고 ABA 처리 여부에 따라 나타나는 삼투 스트레스에 의한 cell death의 차이를 이용하여 ABA 반응을 관찰함.



제 7 장 참고문헌

- Akihisa Shinozawa, Ryoko Otake¹, Daisuke Takezawa, Taishi Umezawa, Kenji, Komatsu, Keisuke Tanaka, Anna Amagai, Shinnosuke Ishikawa, Yurie Hara, Yasuko Kamisugi, Andrew C. Cuming, Koichi Hori, Hiroyuki Ohta, Fuminori Takahashi, Kazuo Shinozaki, Takahisa Hayashi¹, Teruaki Tajiri & Yoichi Sakata (2019) SnRK2 protein kinases represent an ancient system in plants for adaptation to a terrestrial environment. *Communications Biology*. 2, 30.
- Bhattarail H.D., Paudel B., Lee H.S., Lee Y.K., and Yim J.H. (2008) Antioxidant Activity of *Sanionia uncinata*, a Polar Moss Species from King George Island, Antarctica *Phytother. Res.* 22, 1635 - 1639.
- 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*, 61: 88-104.
- Smith R.L. (1996) Introduced plants in Antarctica: Potential impacts and conservation issues. *Biol. Conserv.* 76, 135 - 146.
- Fernandes A.S., Mazzei J.L., Alencar A.S., Evangelista H., Felzenszwalb I. (2011) Effects of *Sanionia uncinata* extracts in protecting against and inducing DNA cleavage by reactive oxygen species. *Redox Rep.* 16, 201 - 207.
- 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
- 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
- Lesk, C., Rowhani, P., and Ramankutty, N. (2016) Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*. 529, 84-87.

- Lihong Xiao, Abou Yobi, Karen L. Koster, Yikun He and Melvin J. Oliver (2017) Desiccation tolerance in *Physcomitrella patens*: Rate of dehydration and the involvement of endogenous abscisic acid (ABA) Plant Cell Environ. 41, 275 - 284.
- Lud D., Moerdijk T., Van de Poll W.H., Buma A.G.J., and Huiskes A.H.L.. (2002) DNA damage and photosynthesis in Antarctic and Arctic *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske under ambient and enhanced levels of UV-B radiation. Plant Cell Environ 25, 1579 - 89.
- Park M., Hong S.G., Park H., Lee B-h., Lee H. (2018) Identification of reference genes for RTqPCR in the Antarctic moss *Sanionia uncinata* under abiotic stress conditions. PLoS ONE 13, e0199356.
- Park M., Park H., Lee H., Lee B-H., Lee J. (2018) The complete plastome sequence of an antarctic bryophyte *Sanionia uncinata* (Hedw.) loeske. Int. J. Mol. Sci.19, 709.
- Pizarro M., Contreras R.A., Köhler H., and Zúñiga G.E. (2019) Desiccation tolerance in the Antarctic moss *Sanionia uncinata*. Biol. Res. 52, 46.
- Ray, D.K., Gerber, J.S., MacDonal, G.K, and West, P.C. (2015) Climate variation explains a third of global crop yield variability. Nat. Commun. 6, 5989.
- Robinson S.A., Tobin A.K., and Wasley J. (2003) Living on the edge—plants and global change in continental and maritime Antarctica. Glob Change Biol. 9, 681 - 717.
- Victoria, F.D.C.; Pereira, A.B.; and da Costa, D.P. (2009) Composition and distribution of moss formations in the ice-free areas adjoining the Arctowski region, admiralty bay, King George Island, Antarctica. Iheringia Ser. Bot. 64, 81 - 91.

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.