

남극 산솔이끼(*Polytrichastrum alpinum*)의
극한적응 우수 유전자의 기능 활성화 부위
매핑 및 활용기반 구축

Mapping of active sequences in extreme
condition-adapted genes from *Polytrichastrum alpinum*



서강대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “포스트 극지유전체프로젝트: 극지 유용유전자 발굴을 위한 기능유전체 연구”과제의 위탁연구“남극 산술이끼(*Polytrichastrum alpinum*)의 극한적응 우수 유전자의 기능 활성화 부위 매핑 및 활용기반 구축”과제의 단계보고서로 제출합니다.



(본과제)총괄연구책임자 : 김 진 형

위탁연구기관명 : 서강대학교

위탁연구책임자 : 이 병 하

위탁참여연구원 : 김 재 연

“ : 김 희 진

“ : 방 승 은

“ : 배 노 아

“ : 유 경 재

보고서 초록

위탁연구과제명	남극 산솔이끼(<i>Polytrichastrum alpinum</i>)의 극한적응 우수 유전자의 기능 활성화 부위 매핑 및 활용기반 구축				
위탁연구책임자	이병하	해당단계 참여연구원수	10	해당단계 연구비	100,000,000원
연구기관명 및 소속부서명	서강대학교 생명과학과		참여기업명	없음	
국제공동연구	상대국명 : - 상대국연구기관명 : -				
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	29
<p>○ 극지식물 유전자의 유용성을 확인하고 활용성을 검증하기 위하여, 기발굴된 남극 산솔이끼 유전자를 대상으로 연구를 수행했다.</p> <p>○ 남극 산솔이끼와 애기장대 plastocyanin (PC) 과발현체 표현형 비교 분석하여, 기존의 남극산솔이끼 PC의 염저항성은 삼투스트레스 저항성과 이온스트레스 저항성의 복합 저항성에 의한 것임을 확인했다.</p> <p>○ 또한, 남극산솔이끼 PC 과발현은 고온스트레스에 대해서는 저항성이 없음을 확인했다.</p> <p>○ 다양한 PC 단백질 비교와 단백질 3D 모델링을 통해 남극 산솔이끼 PC에서 우수기능 활성화 아미노산을 선별했으며, 효과적이고 빠른 맵핑을 위해 PC 기능 분석을 위한 transient assay 방법을 확립했다.</p> <p>○ 애기장대 PC에 선별된 남극 산솔이끼 PC 우수기능 활성 아미노산을 도입하여, 이 변형 PC이 식물의 염저항성 증가를 유발함을 확정하였다.</p> <p>○ 아울러, 기존 발굴 남극 산솔이끼 multiprotein bridge factor 1c (MBF1c)의 우수형질 부위가 도입된 AtMBF1c를 가지는 유전자 교정체를 탐색하는 마커를 제작 완료했으며, 대량 스크리닝을 통해 유전자 교정이 발생한 일부 개체를 발굴하였다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	극지식물유전자, 남극산솔이끼, 환경스트레스, 플라스토사이아닌, MBF1c			
	영어	polar plant genes, Polytrichastrum alpinum, abiotic stress, plastocyanin, MBF1c			

요 약 문

I. 제 목

남극 산솔이끼(*Polytrichastrum alpinum*)의 극한적응 우수 유전자의 기능 활성화 부위 매핑 및 활용기반 구축

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 극지식물 유전자의 유용성을 확인하고 활용성을 검정하기 위하여, 개발된 남극 산솔이끼 유전자 plastocyanin (PC)과 multiprotein bridge factor 1c (MBF1c) 유전자의 기능 분석과 우수 기능 활성화 부위 매핑을 목적으로 한다.
- 구체적으로는 (1) 남극 산솔이끼와 애기장대 PC 과발현체 기능 분석 및 활성화 부위 탐색, (2) 남극 산솔이끼 PaMBF1c 활성화 부위 유전자 교정 AtMBF1c 동형접합 식물체 분리 및 검정을 목표로 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 남극 산솔이끼와 애기장대 PC 과발현체 기능 분석 및 활성화 부위 탐색을 위하여, (1) 두 PC 과발현체를 대상으로 환경스트레스 표현형 비교 분석을 하고, (2) 남극 산솔이끼 PC 우수기능 활성화 부위를 매핑하였다.
- 특히, 남극 산솔이끼 PC 우수기능 활성화 부위 매핑을 위하여, 다양한 식물체 기원 PC 비교 및 단백질 3D 구조 분석을 시도했으며, 빠른 PC 기능분석을 위한 transient assay를 확립하였다.
- PaMBF1c 우수기능 활성화 부위가 도입된 AtMBF1c 발현 애기장대 동형접합 식물체 분리를 위해서, 스크리닝용 PCR 마커 개발과 염기서열 분석법을 확립하고, 대량 스크리닝을 진행하였다.

IV. 연구개발결과

- 남극 산솔이끼와 애기장대 PC 과발현체 표현형 비교 분석하여, 기존의 남극산솔이끼 PC의 염저항성은 삼투스트레스 저항성과 이온스트레스 저항성의 복합 저항성에 의한 것임을 확인했다.
- 또한, 남극산솔이끼 PC 과발현은 고온스트레스에 대해서는 저항성이 없음을 확인했다.
- 다양한 PC 단백질 비교, 단백질 3D 모델링, 그리고 PC 기능 분석을 통해 남극 산솔이끼 PC에서 우수 기능 활성화 아미노산을 선별했다.
- 애기장대 PC에 선별된 남극 산솔이끼 PC 우수기능 활성 아미노산을 도입하여, 이 변형 PC이 식물의 염저항성 증가를 유발함을 확정하였다.
- 아울러, 기존 발굴 남극 산솔이끼 multiprotein bridge factor 1c (MBF1c)의 우수형질 부위가 도입된 AtMBF1c를 가지는 유전자 교정체를 탐색하는 마커를 제작 완료했으며, 대량 스크리닝을 통해 유전자 교정이 발생한 일부 개체를 발굴하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 현 시점의 연구 개발 결과는 지속적인 후속 연구를 통해 남극 산솔이끼의 유용 유전자 활용 연구를 수행할 것이며, 본 연구를 통해서 확보된 지식과 기술은 신규 유용 극지 유전자 발굴에 적용할 것이다. 이러한 결과물은 논문 및 특허화로 연결할 예정이다.

S U M M A R Y

I. Title

Mapping of active sequences in extreme condition-adapted genes from *Polytrichastrum alpinum*

II. Purpose and Necessity of R&D

- To explore the functionality and usefulness of polar plant genes, we aimed to analyze the functions of the previously identified plastocyanin (PC) and multi protein bridge factor 1c (MBF1c) from *Polytrichastrum alpinum*(Pa). In addition, we tried to map the functionally important amino acid residues from these proteins.

III. Contents and Extent of R&D

- For the analysis of PaPC, (1) we compared the stress phenotypes of the plants overexpressing either PaPC or *Arabidopsis thaliana* PC (AtPC); (2) we mapped the functionally important amino acid residues from PaPC.
- For the analysis of PaMBF1c, we developed the screening markers and sequenced the CRISPR-edited AtMBF1c that contained the functionally important residues of PaMBF1c.

IV. R&D Results

- After comparing the phenotypes of PaPC- and AtPC-overexpressing plants, we revealed the PaPC-enhanced salt tolerances resulted from the combination of improved osmotic and ionic stress tolerance by PaPC overexpression.
- We also found that PaPC overexpression does not enhance heat stress tolerance.
- Through the sequence comparisons, the PC protein 3D modeling, and the modified PC functional analysis, we identified functionally important amino acid residues of PaPC.
- We found the modified AtPC that contained the mapped amino acid residues of PaPC enhanced salt stress tolerance when overexpressed.
- We developed the molecular markers for CRISPR-edited AtMBF1c with PaMBF1c residues, carried out large-scale screening for the plants with edited AtMBF1c and found some plants contained the modified AtMBF1c.

V. Application Plans of R&D Results

- We will continue our studies to verify the functional superiorities of *P. alpinum* genes and apply our knowledge and techniques to identify such genes. Our studies will lead to the research outcomes such as research papers and patents.

목 차

제 1 장 서론	6
제 2 장 국내외 기술개발 현황	11
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	12
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	23
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	25
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	27
제 7 장 참고문헌	28

제 1 장 서론

1. 연구개발 목표 및 내용

가. 연구개발 목표

남극 산술이끼 유용유전자, plastocyanin과 PaMBF1c 유전자의 환경스트레스 저항성 기능 분석과 이들 단백질 내 우수기능 활성화 부위 맵핑

나. 연구의 내용

(1) 연구의 필요성

전 지구적 기후변화는 급격한 식물 식생변화와 더불어 식량 생산량의 감소로 이어지고 있다. 특히, 지속적인 세계인구의 증가에 비해 식량 생산량은 이를 따라잡지 못하고 있고, 국제연합 식량농업기구는 식량 생산량이 현재보다 70~85% 증가하지 않으면, 2050년 약 15억명의 세계인구가 식량부족으로 생존의 위협을 받게 될 것으로 예측했다.

우리나라도 최근 30년 사이 평균 온도가 1.4°C 상승하여 온난화가 가속화되었으며, 이에 따라, 가뭄, 폭염 등과 같은 환경스트레스가 빈번해졌다. 따라서 전지구적 기후변화와 인구증가에 따른 식량 위기에 대처하기 위해서 식물의 환경스트레스 저항성 개선은 필수적인 연구가 되었다.

남극에 서식하는 생물체는 극한의 환경에 적응한 기작을 가지고 있으며 따라서 다른 지역에서는 확보할 수 없는 독특한 형질을 보유하고 있다. 남극의 식물군은 주로 연안에 분포하며 이끼류가 우점하고 있다. 이끼류는 현재 다른 육상 식물들과는 진화적으로 450만 년 전 분지되어 독자적으로 진화와 적응과정을 거쳐왔으므로 차별적인 환경 적응기작과 스트레스 저항성 유전자를 확보할 수 있을 것으로 기대한다.

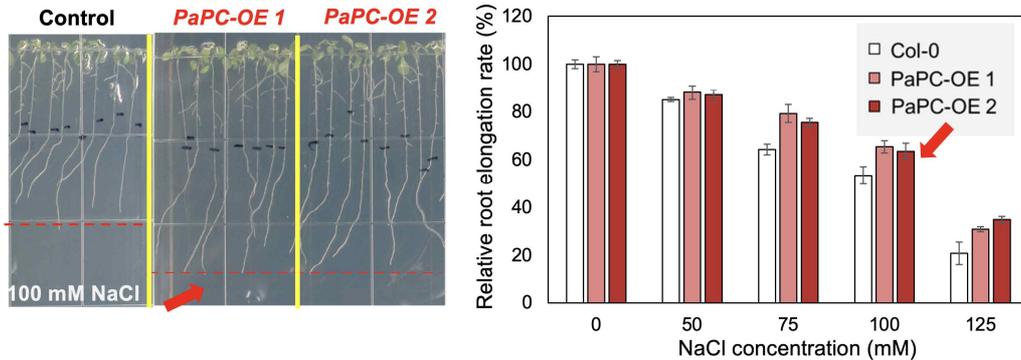
이러한 극한 환경에 생존하는 이끼류에 대한 연구는 매우 초보적인 단계로, 대사과정에 관한 분자기작 연구 또는 환경적응 관련 유용유전자의 기능 연구는 그 무한한 응용성에 비해 국내외적으로 매우 부진하다.

본 연구는 극지연구소와 협업을 통해 확보한 극지이끼 유래 유용 유전자 plastocyanin과 PaMBF1c의 환경스트레스 저항 기능을 분석하고, 이에 대한 활용 기반을 구축하는 연구를 통해, 극지 유전자원의 유용성과 활용성을 확장하고자 한다.

(2) 연구내용

(가) 남극 산솔이끼 plastocyanin 유전자 기능 분석

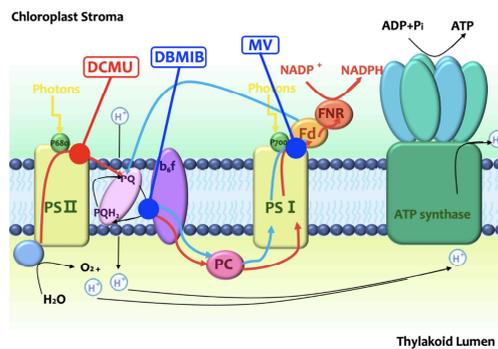
남극 산솔이끼 유전자 plastocyanin (PaPC)는 식물 스트레스 저항성에 관여한다.



PaPC가 애기장대 plastocyanin (AtPC)의 스트레스 저항성 기능을 비교 분석하기 위해서, PaPC 과발현체와 AtPC과발현체를 다양한 스트레스 조건에서 비교한다. 현재, 과약된 PaPC의 스트레스 저항성은 염스트레스 저항성 증가이다. 본 연구에서는 PaPC의 다양한 스트레스 저항성을 AtPC와 비교 분석하고자 한다. 분석할 스트레스는, (1) 저온스트레스, (2) 고온스트레스, (3) 삼투스트레스, (4) 이온스트레스, (5) 건조스트레스 (5) 스트레스호르몬 ABA처리 등의 조건으로 한다.

Plastocyanin은 광합성의 전자전달에 관여하는 단백질이므로, 이들 스트레스를 빛조건과 암조건에서 부여하여, 광합성 효율성 증가에 따른 스트레스 증가인지를 확인한다.

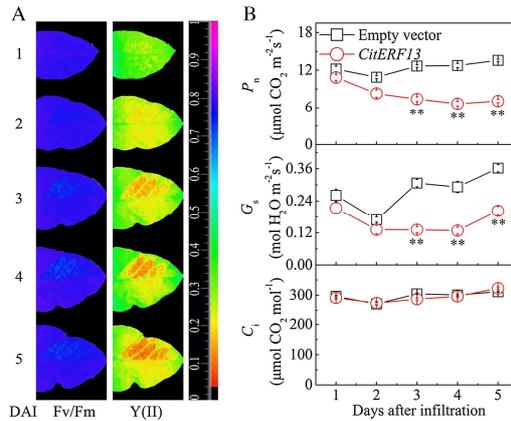
또한, 광합성 전자전달 저해제를 처리하여, 마찬가지로 광합성의 스트레스 저항성 증가에의 기능을 검증한다. 전자전달 저해제는 광합성 전자전달에서 각각 다른 지점에 작용하는 MV (methylviologen), DBMIB (2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone), DCMU (3-(3' 4' dichlorophenyl)-1, 1 dimethylurea)를 사용하여, 각 저해 단계에 따른 PaPC의 스트레스 저항성에의 기능을 확인한다.



애기장대에는 2개의 plastocyanin 유전자가 존재한다. 현재 각 과발현체에서 과약된 PaPC의 AtPC에 비해서 우수한 염스트레스 저항성은 2개 plastocyanin이 모두 과발현되지 않아서 일 가능성을 확인하기 위하여, AtPC1과 AtPC2를 각각 과발현한 과발현체를 교배하여 AtPC1 AtPC2 모두 과발현이 된 이중과발현체를 확보하여 PaPC와 AtPC1/AtPC2의 스트레스 저항성 활성을 비교한다. 물론, 이 스트레스 저항성 분석에는 광조건과 암조건, 그리고 광합성 전자전달 저해 조건에서 모두 비교하여 광합성 효율이 스트레스 저항성 증진에 중요한 지 여부를 검증한다.

(다) Plastocyanin 활성 검정 시스템

Plastocyanin 단백질 내 우수 기능 활성화 부위 탐색을 위해 아미노산 변경이 이루어진 plastocyanin의 활성을 빠르게 검정하는 시스템의 구축은 활성화 부위 탐색의 중요한 단계라고 할 수 있다. 이를 위해, plastocyanin 유전자를 담배잎 (*Nicotiana benthamiana*)에서 *Agrobacterium*-infiltration으로 발현시키고 발현부위에서 광합성 효율을 Fv/Fm 값으로 측정하여, plastocyanin의 활성을 검정하겠다. 이 시스템은 이미 Xie 등이 *Plant Science* 학술지 발표 논문에 적용하여서 본 연구에서 구축하고 적용하는데 어려움이 없으리라고 예상된다. 단, 보다 안정적인 활성 검정을 위하여, 실험을 위한 담배잎의 최적 발달단계, 최적 *Agrobacterium* 배양 수준 등등의 세밀한 조정이 필요하리라 예상된다.



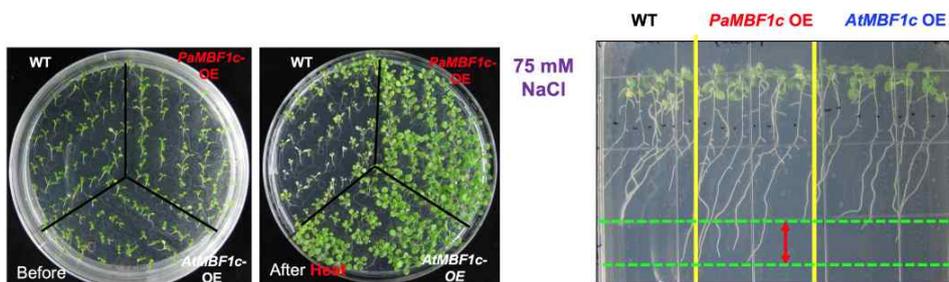
담배잎에 plastocyanin 활성 검정시스템이 구축이 어려울 경우, 애기장대 원형질체 (protoplast)를 사용하여 광합성 활성을 정밀 측정하도록 하겠다. 아울러 필요시 극지연구소의 도움으로 식물 연구팀의 광합성 측정 등의 기술 노하우를 전수받아 광합성 활성 검정 시스템을 완성하겠다.

(라) PaPC 우수기능 활성화 부위 도입 유전자 기능 검정

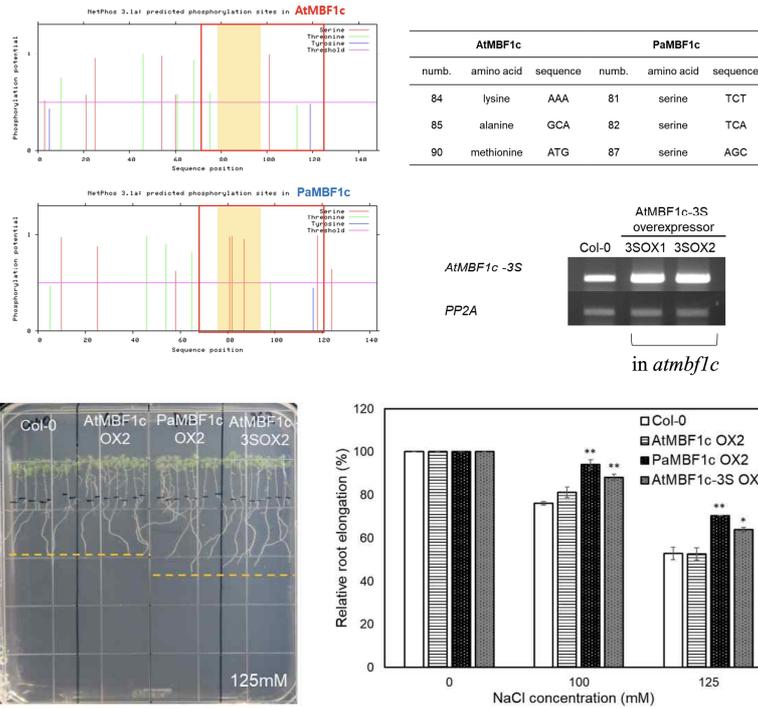
남극 산솔이끼 유전자 PaPC의 우수기능 활성화 부위가 확정이 되면, 이를 PaPC의 우수활성화 부위가 도입된 AtPC 유전자를 제작하고 이 PaPC 우수기능 도입 AtPC (PaPC>AtPC) 유전자를 애기장대에서 과발현시킨다. 이 PaPC>AtPC 과발현체의 기능을 각종 스트레스 환경에서 검정 확인한다. 이때, PaPC 및 AtPC 과발현체를 대조구로 사용하여, 이들 과발현체와 PaPC>AtPC 과발현체의 기능을 정성, 정량적으로 비교한다.

(마) 남극 산솔이끼 Multiprotein Bridging Factor1c 유전자 기능 분석

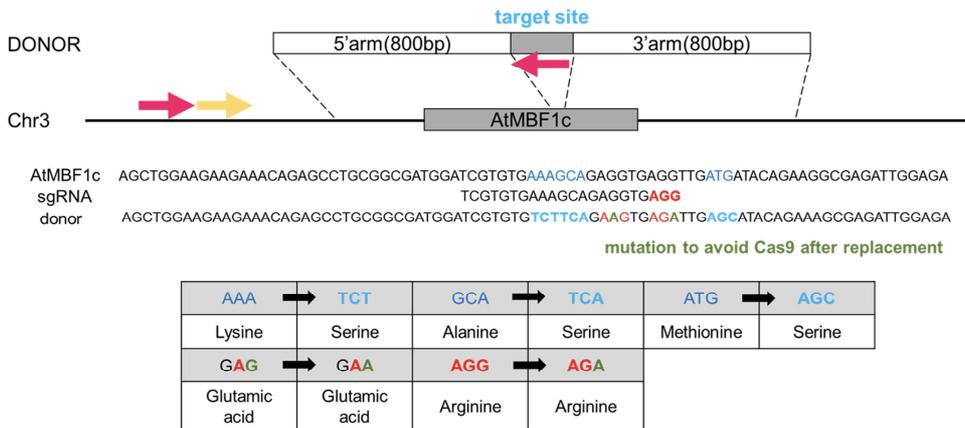
남극 산솔이끼 Multiprotein Bridging Factor1c (PaMBF1c) 유전자는 과발현시 식물에 고온 스트레스 저항성 뿐만 아니라, 염스트레스 저항성도 증진시킨다. 애기장대 MBF1c (AtMBF1c) 과발현체가 주로 고온스트레스 저항성 증진만 시키는 것에 비교하면 PaMBF1c 과발현체가 더 우수한 스트레스 저항성을 보유하고 있다고 할 수 있다.



PaMBF1c와 AtMBF1c의 아미노산 서열을 비교하였을 때, PaMBF1c에만 존재하는 인산화 가능 부위가 존재한다. 이 PaMBF1c 특이 인산화 부위를 가지는 AtMBF1c 유전자 (AtMBF1c-3S)를 *atmbf1c* 애기장대 돌연변이체에 과발현시키면, AtMBF1c-3S 과발현체는 PaMBF1c 과발현체 만큼의 염스트레스 저항성이 증가한다.



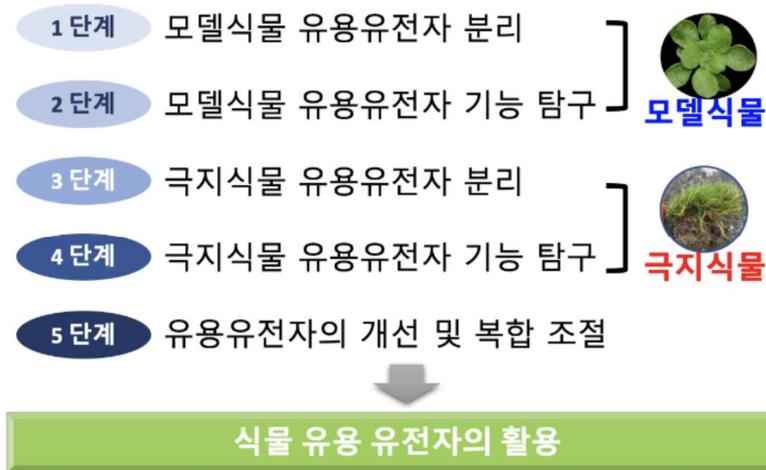
이를 근거로 CRISPR/Cas9 유전자 교정을 AtMBF1c에 대해서 시도하였고, HDR 유도를 통해, PaMBF1c에만 존재하는 인산화 가능 아미노산 serine 3개 residue를 AtMBF1c에 도입하였다.



본 연구에서는 성공적으로 수행된 AtMBF1c의 유전자 교정 식물체를 동형접합 식물체로 분리해내고자 한다. 이를 위해서 현재 확보된 F3 식물체를 대상으로 교정 부위 부분을 (1) 교정부위 특이 프라이머를 사용한 PCR 증폭, (2) 교정부위에 대한 CAPS 또는 dCAPS 마커로 이 해당 부위가 모두 교정된 유전자인지, 아니면 이형접합자인지를 파악, (3) 궁극적으로 염기서열 분석을 통해, AtMBF1c-3S (PaMBF1c 존재 3개 serine이 도입된 AtMBF1c)를 동형접합 식물체를 분리해낸다. 많은 식물체를 대상으로 스크리닝을 해야하므로, 96 well-PCR 등을 통해 빠른 속도로, 그리고 nested PCR 및 염기서열 분석을 통해 정확히 동형접합체를 확보하겠다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재까지 스트레스 저항성 식물의 연구는 모델식물을 중심으로 진행되어왔다. 그러나, 식물 스트레스 신호전달 전문가인, Dr. Ray Bressan (Purdue University, USA)는 스트레스 저항성 식물자원 개발 단계로 아래 그림과 같은 5 단계를 제시하여 (Bressan et al., 2001), 극한 식물체를 활용한 연구의 중요성을 부각시켰다.



Bressan 등이 제시한 식물 유용유전자의 기능분석과 응용을 위한 연구모델

극한 식물의 일례로, Salt Cress라 불리는 *Thellungiella halophila*가 존재하며, 이 극한식물체는 500 mM NaCl (바다는 약 600 mM)에도 염 저항성을 보인다. Bressan 등은 모델식물에서의 염 저항성 연구 한계를 극복할 식물로 *Thellungiella halophila*을 제시하기도 했다 (Bressan et al., 2001; Inan et al., 2004). 따라서 현재 국제 연구 추세는 위 그림의 2단계에서 3단계와 4단계로 변화하고 있다. 극한 식물체는 (1) **유전자 프로모터의 강력한 유전자 발현력** (Dassanayake et al., 2011); (2) **극한 조건에 더 적합하게 진화된 형태의 유전자 및 유전자 생산물**; (3) **다른 식물체에서는 없는 스트레스 내성 유전자를 가지고 있는 것으로 추정된다** (Inan et al. 2004). 현재 극지식물을 이용한 스트레스 저항성 유전자 기능 및 응용성 연구는 국제적으로 아주 부족한 실정이다.

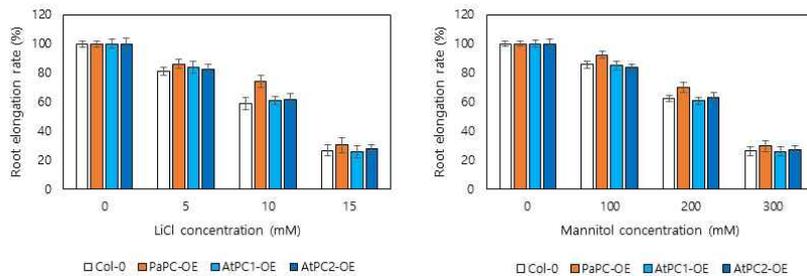
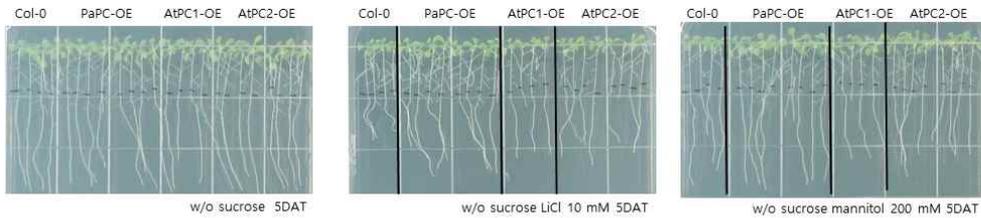
본 연구팀은 극지연구소와의 공동연구로 남극산솔이끼 유래 유전자 중 plastocyanin과 PaMBF1c의 환경스트레스 저항 가능성을 확인한 바 있다. 특히 plastocyanin의 경우 광합성의 전자전달 반응에 관여하는 단백질로 극지이끼 plastocyanin의 과발현이 온대식물인 애기장대 plastocyanin의 과발현에 비해서 과발현 식물의 광합성 효율을 증가시키고 염스트레스 저항성을 더 높인다는 사실을 밝혔다. 이는 기존에 보고되지 않은 독특한 기능으로 극지이끼 유전자의 유용성을 확인한 연구결과라고 할 수 있겠다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 남극 산솔이끼와 애기장대 plastocyanin 과발현체 기능분석 및 활성화 부위 탐색

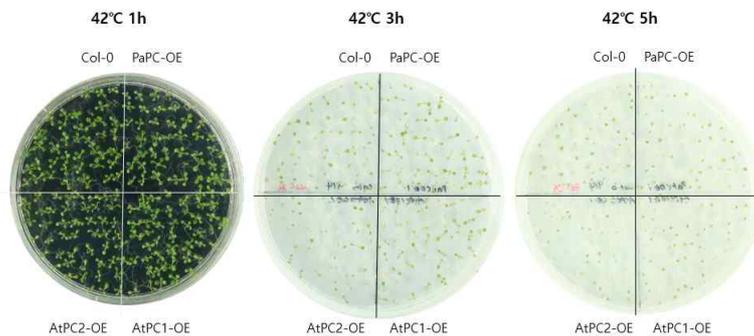
가. 세부목표 1-1: 환경스트레스 관련 남극 산솔이끼와 애기장대 plastocyanin 과발현체 표현형 비교 분석

- 남극 산솔이끼와 애기장대 plastocyanin 과발현체 기능분석을 위해 다양한 스트레스 조건에서 표현형을 비교하였다. 정상 배지에서 자란 식물을 빛 조건 하에 각각 sucrose가 없는 MS 배지, sucrose가 없는 LiCl 스트레스 MS 배지, sucrose가 없는 mannitol 스트레스 MS 배지로 옮겨 뿌리 길이를 관찰하였다. PaPlastocyanin 과발현체(PaPC-OE)가 야생형에 비해 뿌리 생장이 더 길게 나타난 것을 확인하였다. 따라서 PaPC 과발현체가 이온 스트레스와 삼투 스트레스에 대해 내성을 가지는 결론 지을 수 있었다.



sucrose가 없는 스트레스 MS 배지에서 뿌리 성장률 비교

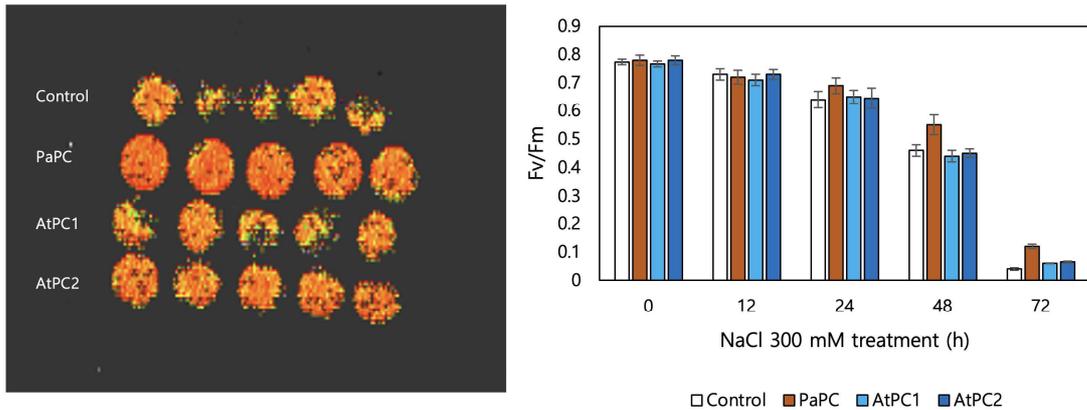
- 그러나 빛 조건에서 고온 스트레스(42°C 1,3,5 시간)를 처리하여 정상 조건에서 3일간 회복시킨 뒤 생존률을 확인한 결과 야생형과 PaPC, AtPC1, AtPC2 과발현체 모두 비슷한 수준의 생존률을 보였다. 따라서 PaPC는 고온 스트레스에 대한 저항성은 없는 것으로 보인다.



고온 스트레스 처리 후 생존률 비교

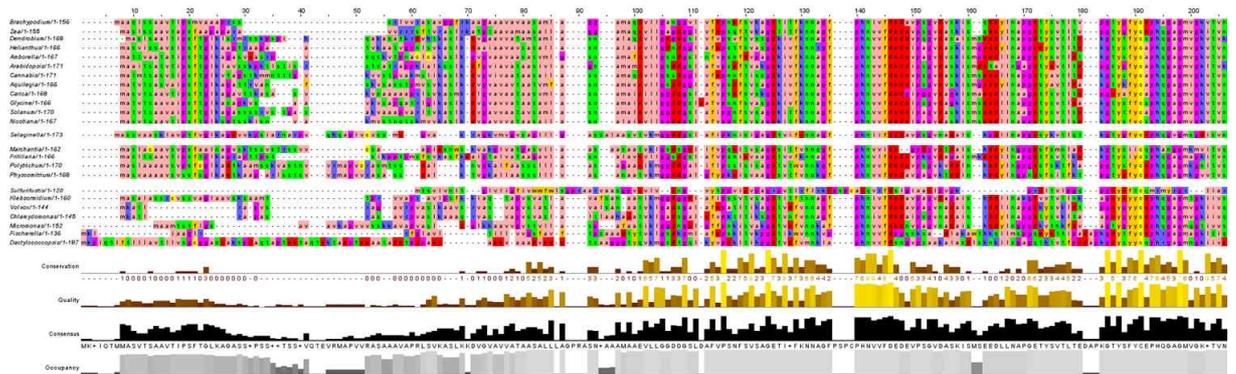
나. 세부목표 1-2: 남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 활성화 부위 맵핑

- PaPC 활성화 부위 도입 유전자 기능 검정 시스템 구축을 위해 담배잎을 이용한 광합성 활성 비교 시스템을 구축하였다. 임시 유전자 발현을 통한 광합성 활성 비교 결과, 염 스트레스 (NaCl) 조건에서 PaPC가 더 높은 광합성 효율을 보여 이전 형질전환체의 경우와 동일한 결과를 나타내어 담배잎을 이용한 transient assay 방법을 확립하였다.



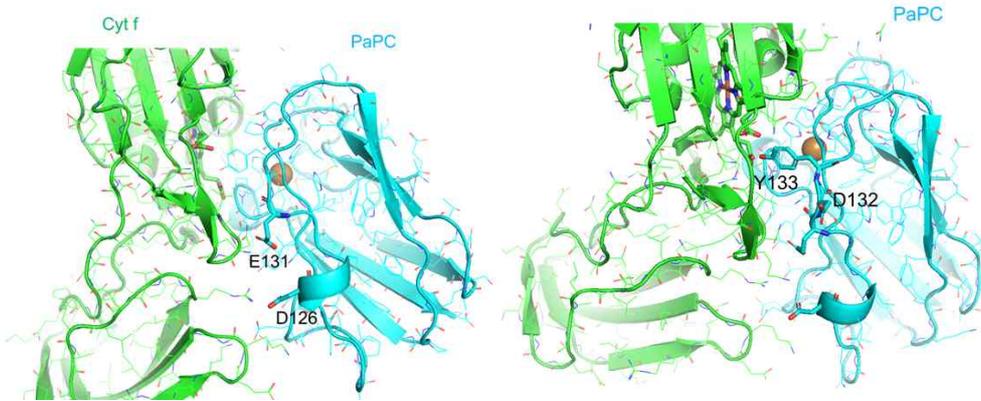
PaPC 활성화 부위 도입 유전자 기능 검정 시스템

- 남극 산술이끼 plastocyanin 우수 활성화 후보 부위 선정을 위해 PaPC, AtPC1, AtPC2 등 여러 식물의 Plastocyanin 염기서열을 정렬, 비교한 결과, 대부분 잘 보존되어 있으나 일부 PaPC와 AtPC1, AtPC2 사이에 차이를 보이는 염기서열이 존재하였다. PaPC의 106 라이신, 126 아스파르트산, 131, 132, 133 글루탐산, 아스파르트산, 타이로신, 156 글루타민 잔기에서 차이를 보였다.

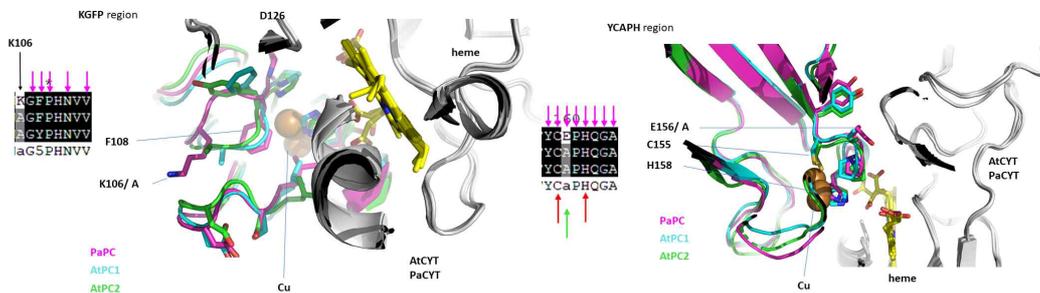


Plastocyanin 염기서열 정렬

- PaCYT, AtCYT, PaPC, AtPC1, AtPC2의 단백질 3D 모델링을 통해서 PaPC의 126 아스파르트산, 131, 132, 133 글루탐산, 아스파르트산, 타이로신으로 인해 구리 또는 시토크롬과의 거리가 가까워짐을 확인할 수 있었다. PaPC의 106 라이신으로 인해 페닐알라닌이 구리와 거리가 가까워지고, 156 글루타민 잔기가 구리와 시토크롬과의 가까운 거리에 위치하고 있음을 확인하였다.



Cytochrome (Cyt)와 PaPC의 단백질 3D 모델링



PaPC, AtPC1, AtPC2, AtCYT, PaCYT의 단백질 3D 모델링

- 위 결과에 따라 PaPC의 염기서열 및 구조 분석을 통해 4가지의 우수 활성화 후보 부위를 선정했으며, PaPC에 존재하는 이들 활성화 후보 아미노산 잔기를 AtPC2에 도입한 유전자를 제작하였다. binary 벡터에 후보 유전자를 각각 도입하여 아그로박테리움에 형질전환하였다.

```

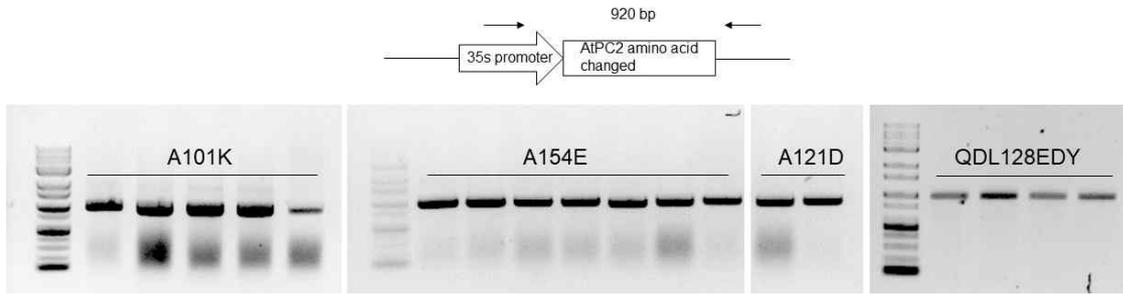
P.alpinum      MASLAAAASVSPFCGLKADTKRAAMSSKVASTNVVRMAPVCRASM-TSSDALKNVKGALF 59
A.thaliana_1  MAAITSATVTIPSPFTGLKLAIVSSKPKTLST-ISRSTSATRAPPKLALK-SSLKDFGVI 58
A.thaliana_2  MASVTSTTVPIPSFTGLKRASTTKSSAT-----VRTQTAAVASPKLTVK-SSLKNFGVA 54

P.alpinum      AASSLLLAASAGAAEIKMGDDGALIFLPSLSISAGETVTVWVNNIGFPHNVVFEDEV 119
A.thaliana_1  ATAASIVLAGNAMAMEVLLGSDGSLAFVPSEFTVAKGEKIVFKNNIGFPHNVVFEDEI 118
A.thaliana_2  APAASIALAGNAMAIEVLLGGDGSALAFIPNDFSIARKEKIVFKNNIGYPHNVVFEDEI 114

P.alpinum      PSGVKVLDLNHE--DYLNPGESFSKTFKAPGTYSFYCEPHQGAGMRGSITVS 170
A.thaliana_1  PSGVDAKISMDETALLNGAGETYEVTLTEPGSYGFYCAPHQGAGMVGKLTVK 171
A.thaliana_2  PSGVDVAKISMDEQDLLNGAGETYEVTLTEPGTYSFYCAPHQGAGMVGKVTVN 167
  
```

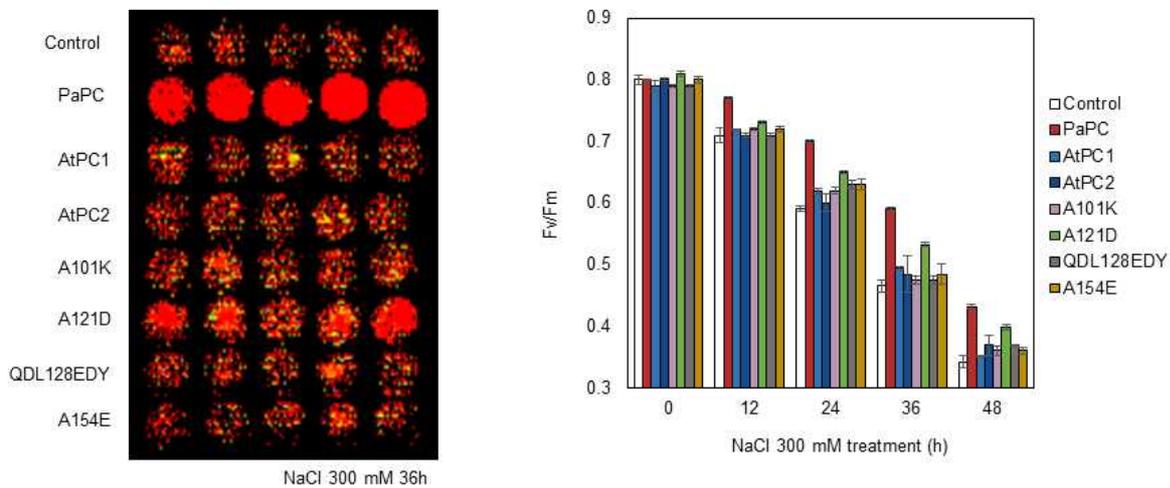
AtPC2							
At 101 th aa	At sequence	At 121 th aa	At sequence	At 128,129,130 th aa	At sequence	At 154 th aa	At sequence
A	GCT	A	GCC	QDL	CAAGACTCA	A	GCG
↓							
Pa aa	Pa sequence	Pa aa	Pa sequence	Pa aa	Pa sequence	Pa aa	Pa sequence
K	AAG	D	GAC	EDY	GAGGACTAC	E	GAG
A101K		A121D		QDL128EDY		A156E	

PaPC 활성화 부위 도입 AtPC2 유전자 제작



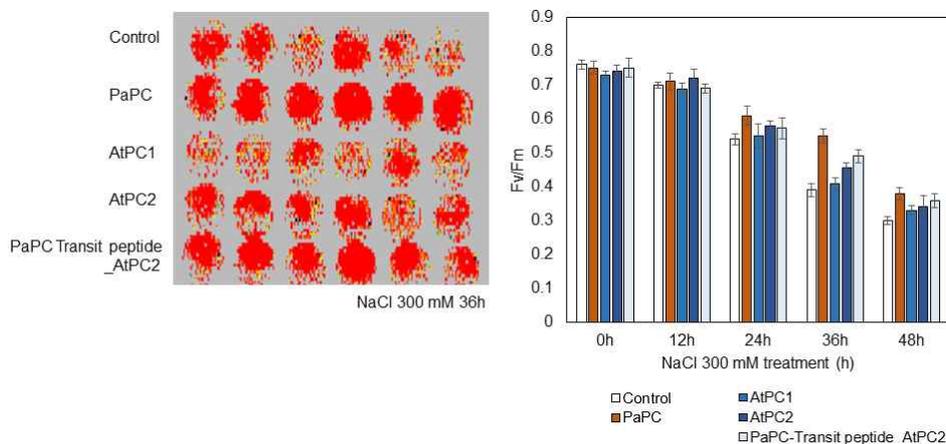
PaPC 활성화 부위 도입 AtPC2 벡터 제작 확인

- PaPC 활성화 부위 도입 AtPC2 벡터를 포함하는 아그로박테리움을 이용하여 담배잎에 임시 유전자 발현을 유도하였다. 광합성 활성 비교 결과, 염 스트레스(NaCl) 조건에서 A121D 발현 벡터가 AtPC2 발현 벡터보다 더 높은 광합성 효율을 보였다. 따라서 126 아스파르트산이 중요한 PaPC 우수 활성화 부위로 예상된다.



PaPC 활성화 부위 도입 AtPC2 유전자 기능 검정 시스템을 통한 PaPC 우수 활성화 부위 선별

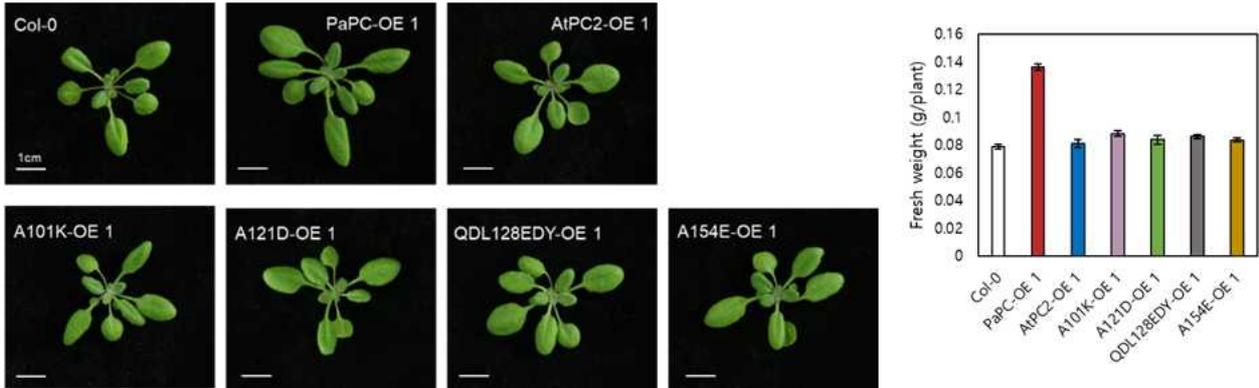
- Transit peptide 서열을 예측하는 프로그램을 통해 PaPC의 transit peptide 서열 확인하고, AtPC2 transit peptide 서열을 PaPC transit peptide 서열로 바꾼 벡터를 제작하였다. 담배잎을 이용한 광합성 활성 비교 시스템을 통해 스트레스 조건에서 광합성 효율을 비교한 결과 PaPC transit peptide 서열로 바꾼 AtPC2을 도입한 담배잎의 경우 AtPC2 야생형을 도입한 것에 비해 더 높은 광합성 효율을 보임을 확인하였다.



담배잎을 이용한 광합성 활성 비교 시스템으로 스트레스 조건에서 광합성 효율을 비교한 결과

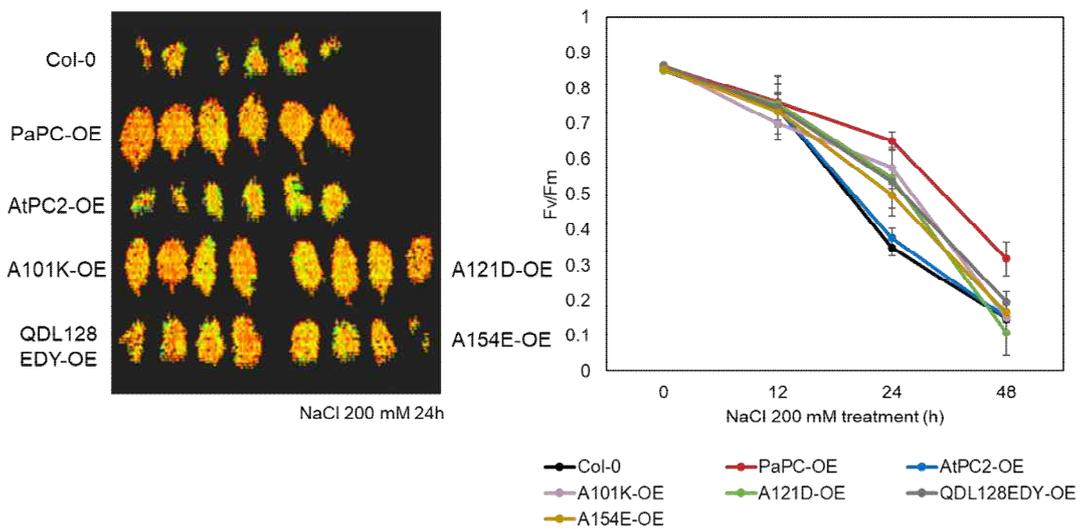
다. 세부목표 1-3: 남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 아미노산기 도입 애기장대 plastocyanin 식물체 기능분석을 위한 스트레스 저항성 표현형 비교

- 정상 조건 하에서 PaPC 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현 애기장대의 표현형을 비교했다. 3주차 식물을 비교한 결과 잎의 크기 및 모양 등 야생형과 PaPC 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현 애기장대는 비슷한 표현형을 보였다. 또한 생중량도 비슷한 수준을 보였다.



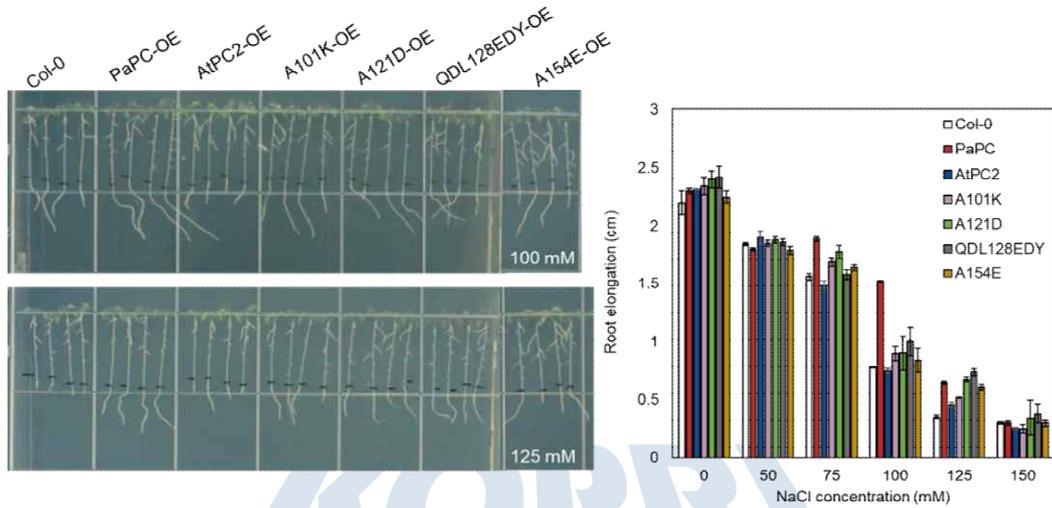
정상 조건에서 PaPC 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현체의 표현형

- PaPC 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현 애기장대의 잎을 염 스트레스 처리한 뒤 광합성 효율(Fv/Fm)을 비교했다. 3주차 식물의 잎을 염 스트레스(NaCl 200 mM)에 시간별로 처리 후 광합성 효율을 측정한 결과, PaPC 우수 기능 활성화 후보 아미노산을 치환한 AtPC2 과발현체 모두 야생형 뿐만 아니라 비치환 AtPC2 과발현체(AtPC2-OE)에 비해 염 스트레스에서 향상된 광합성 효율을 나타내었다. 다만, 아미노산 치환 AtPC2 과발현체는 PaPC 과발현체 (PaPC-OE)와 비교시에는 다소 덜 향상된 광합성 효율을 보인다.



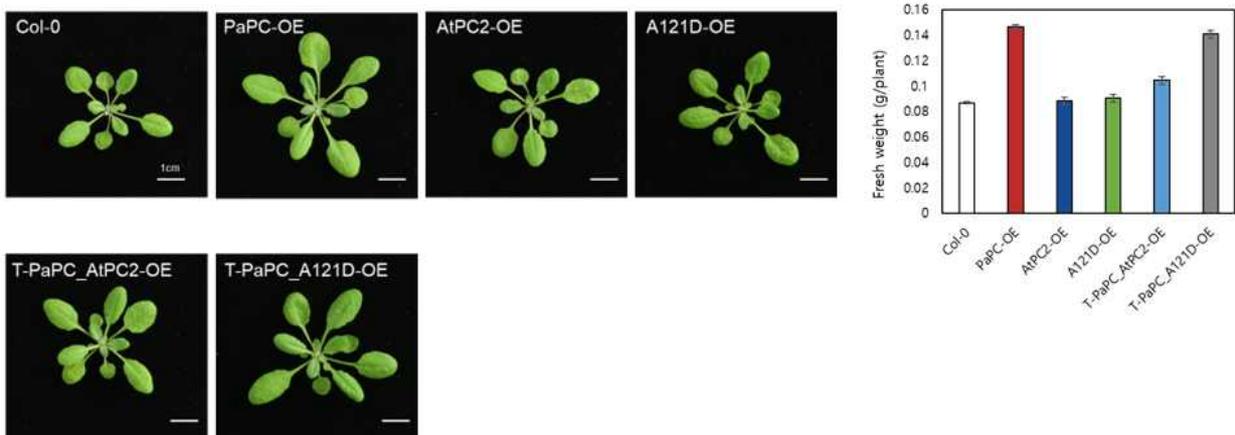
PaPC 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현체의 염 스트레스 하 광합성 효율

- PaPC 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현체 과발현 애기장대의 염 스트레스 저항성을 조사하기 위해 뿌리 길이를 측정했다. 종자를 MS 배지에서 5일 동안 성장시킨 후 각각 NaCl 스트레스 배지로 이송하여 뿌리 신장을 관찰했다. 100, 125 mM NaCl 스트레스 배지에서 PaPC 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현체 모두 야생형뿐만 아니라 비치환 AtPC2 과발현체(AtPC2-OE)에 비해 염 스트레스에서 더 나은 뿌리 신장을 보인다. 이는 아미노산 치환 AtPC2 과발현체가 야생형과 비치환 AtPC2 과발현체(AtPC2-OE)에 비해 염 스트레스에 더 저항성이 있음을 나타낸다. 다만, PaPC 과발현체(PaPC-OE)에 비해서는 PaPC 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현체가 염스트레스 저항성이 높지는 않았다.



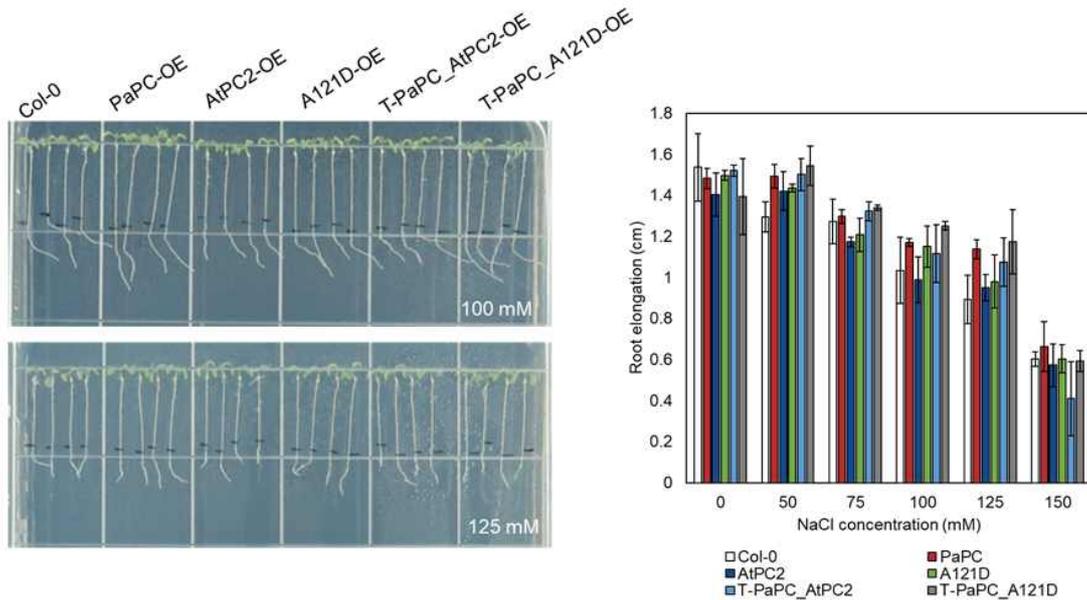
PaPC 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현체의 염 스트레스 하 뿌리 신장

- 정상 조건 하에서 PaPC transit peptide 및 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현 애기장대의 표현형을 비교했다. 3주차 식물을 비교한 결과 잎의 크기 및 모양 등 야생형과 PaPC transit peptide 치환 AtPC2 과발현 애기장대는 비슷한 표현형을 보였다. 그러나 PaPC transit peptide와 A121D를 모두 치환한 경우 PaPC 과발현체와 비슷한 수준으로 AtPC2 과발현체에 비해 잎의 크기와 생중량 모두 증가한 표현형을 보였다.



정상 조건에서 PaPC transit peptide 및 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현체의 표현형

- PaPC transit peptide 및 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현체 과발현 애기장대의 염 스트레스 저항성을 조사하기 위해 뿌리 길이를 측정했다. 종자를 MS 배지에서 5일 동안 성장시킨 후 각각 NaCl 스트레스 배지로 이송하여 뿌리 신장을 관찰했다. 100, 125 mM NaCl 스트레스 배지에서 PaPC transit peptide 치환 AtPC2 과발현체가 야생형뿐만 아니라 비치환 AtPC2 과발현체(AtPC2-OE)에 비해 염 스트레스에서 더 나은 뿌리 신장을 보인다. 이는 transit peptide 치환 AtPC2 과발현체가 야생형과 비치환 AtPC2 과발현체(AtPC2-OE)에 비해 염 스트레스에 더 저항성이 있음을 나타낸다. 특히, PaPC transit peptide와 우수 기능 후보 아미노산을 모두 치환한 과발현체는 PaPC 과발현체 수준의 뿌리 신장을 보여서 염 스트레스 저항성이 PaPC 과발현체 수준으로 증가함을 알 수 있다.

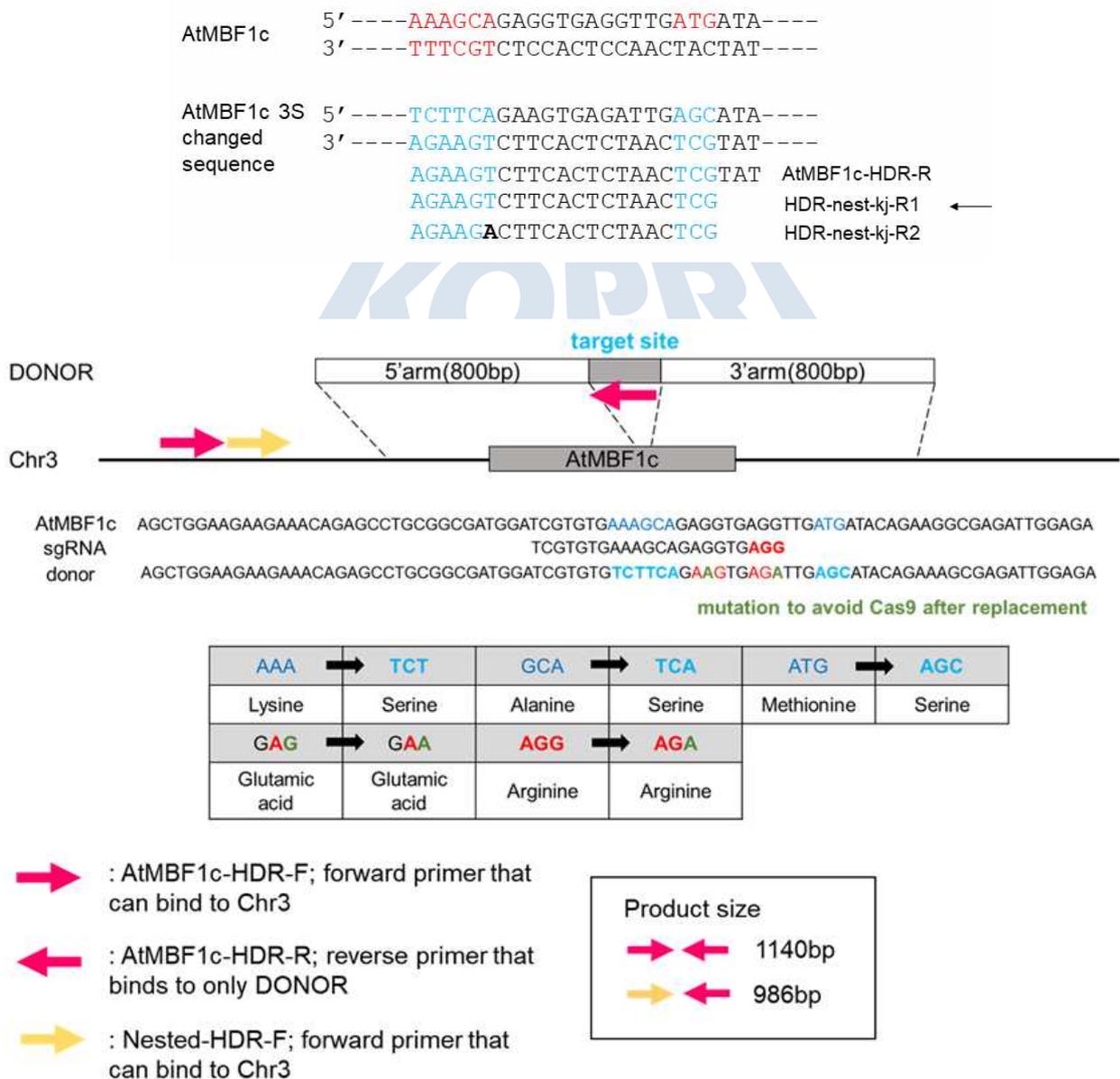


PaPC transit peptide 및 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현체의 염 스트레스 하 뿌리 신장

2. 남극 산솔이끼와 PaMBF1c 활성화 부위 유전자 교정 AtMBF1c 동형접합 식물체 기능 검정

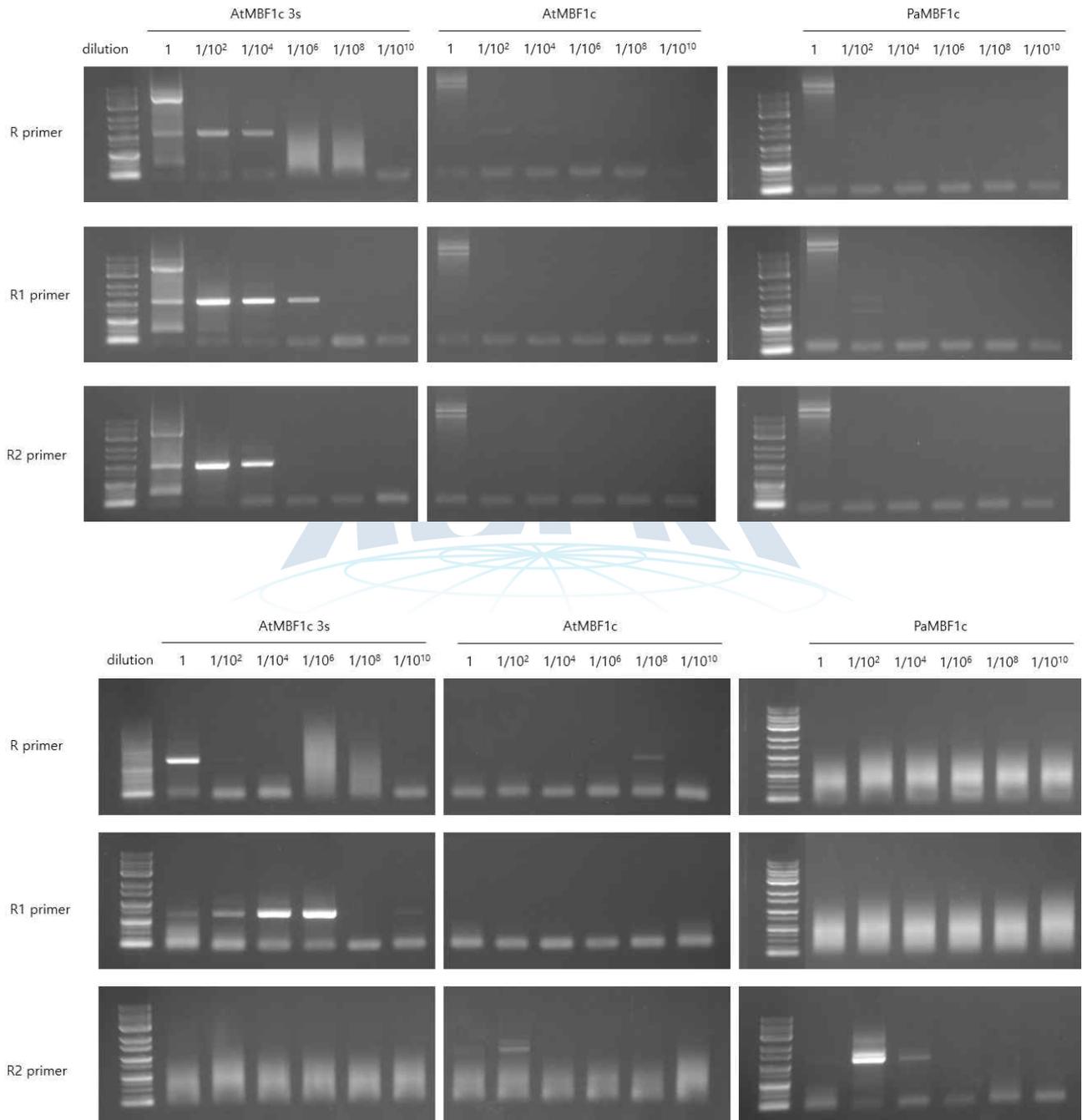
가. 세부목표 2-1:PaMBF1c의 우수 형질을 가지게 유전자 교정된 AtMBF1c 유전자를 가지는 동형접합 식물체 대량 스크리닝용 신규 선별 마커 완성

- PaMBF1c의 우수 형질을 가지게 유전자 교정된 AtMBF1c 유전자를 가지는 동형접합 식물체의 스크리닝이 해당 부위 선별 마커가 일부 부정확하게 작동되었다. 많은 식물 스크리닝을 했음에도 불구하고 동형접합 식물체를 선별하지 못하였다. 따라서 확실하게 작동할 것으로 예상하는 신규 선별 마커를 제작하였다.



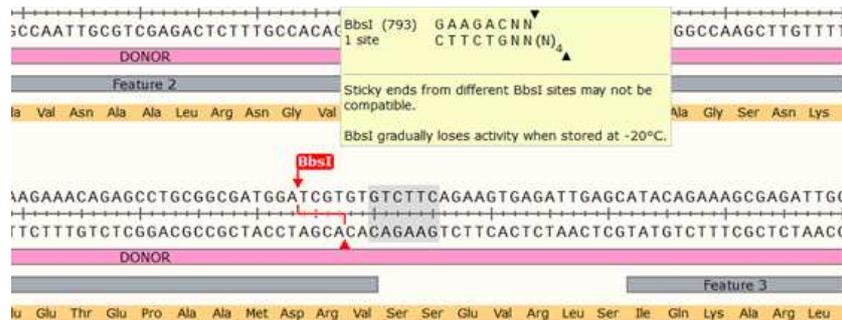
유전자 교정된 AtMBF1c 동형접합 식물체 선별을 위한 신규 마커 제작

- 유전자 교정된 AtMBF1c 동형집합 식물체 선별을 위한 신규 마커를 테스트 하기 위해 각각 유전자 교정된 AtMBF1c, AtMBF1c, PaMBF1c 벡터를 이용해 PCR로 밴드를 확인하였다. 벡터는 0.9 pmole을 각각 1, 1/10², 1/10⁴, 1/10⁶, 1/10⁸, 1/10¹⁰배 희석하여 확인하였다. Nested PCR 결과 R1 프라이머를 사용했을 때 유전자 교정된 AtMBF1c 벡터에만 특이적으로 밴드가 보이는 것을 확인하였다.



Nested PCR을 통한 신규 선별 마커 확인 (위; 1st PCR 결과, 아래; nested PCR 결과)

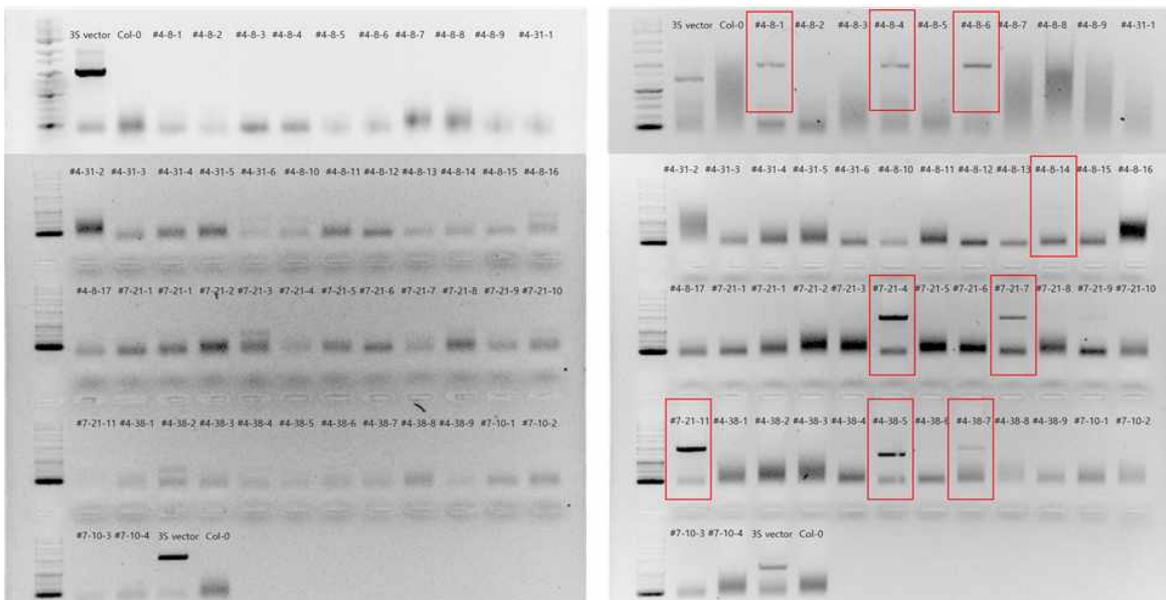
- 아울러, 유전자 교정 AtMBF1c 염기서열만 특이적으로 절단하는 제한효소 Bbs I 를 이용하여 유전자 교정 AtMBF1c 벡터, AtMBF1c 벡터, PaMBF1c 벡터, 야생형 그리고 유전자 교정 AtMBF1c 후보 식물체 (#4-8-14, 아래 결과 참조)의 절단 유무를 확인하였다. 그 결과 유전자 교정 AtMBF1c 벡터와 유전자 교정 AtMBF1c 후보 식물체만 특이적으로 절단되었다. 따라서 유전자 교정 AtMBF1c 후보 식물체에도 일부 치환된 AtMBF1c 염기서열이 존재하는 것으로 예상하였다.



유전자 교정 AtMBF1c 특이적 제한효소(Bbs I) 절단 유무 확인
(좌; 제한효소 처리 전, 우; 제한효소 처리 후)

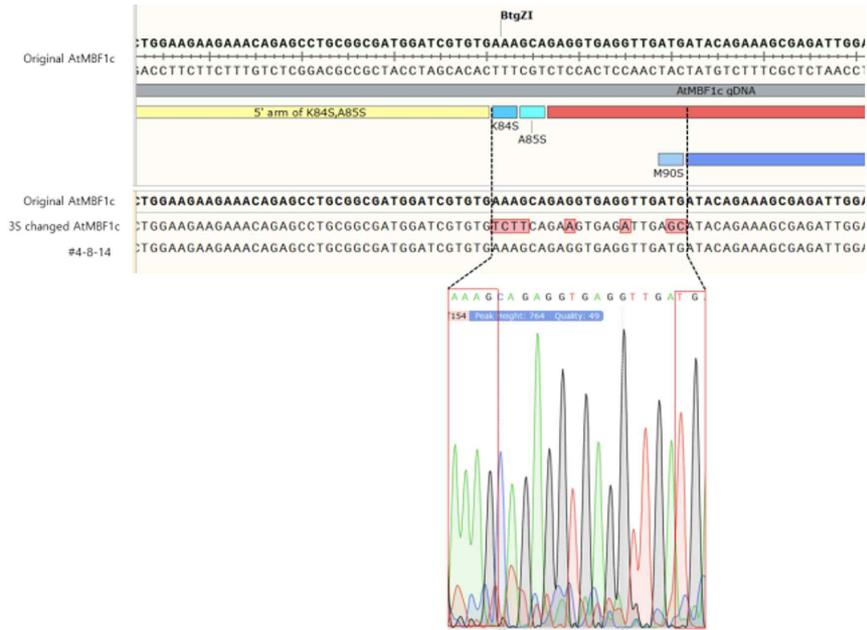
나. 세부목표 2-2:PaMBF1c의 우수 형질을 가지게 유전자 교정된 AtMBF1c 유전자를 가지는 동형접합 식물체 대량 스크리닝

- 앞서 확인한 신규 선별 마커를 이용해 유전자 교정된 AtMBF1c 동형접합 식물을 선별하기 위해 nested PCR을 수행하였다. #4-8-1, #4-8-4, #4-8-6, #4-8-14, #7-21-4, #7-21-7, #7-21-11, #4-38-5, #4-37-7 라인을 선별하였다.



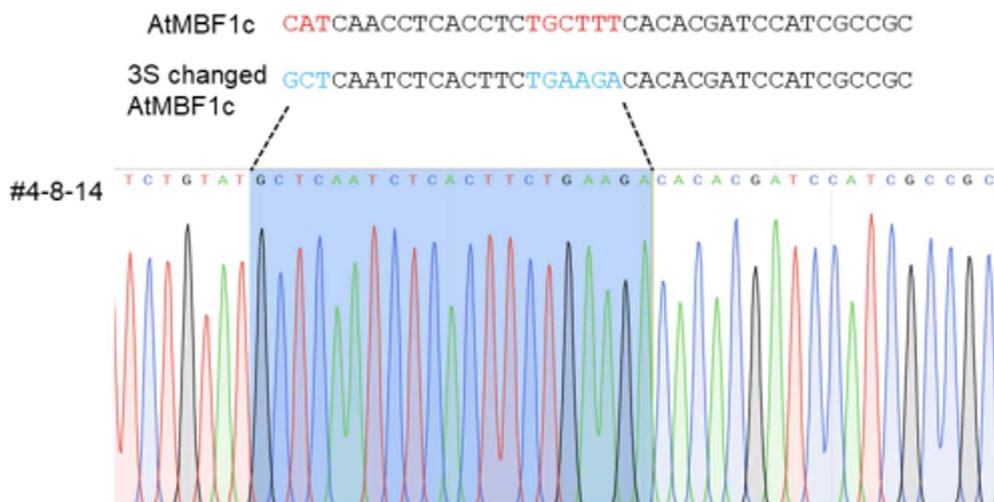
신규 선별 마커를 이용한 유전자 교정 AtMBF1c 식물체 선별
(좌; 1st PCR 결과, 우; nested PCR 결과)

- 시퀀싱을 통해 앞서 선별한 유전자 교정된 AtMBF1c의 염기서열을 확인한 결과, 치환된 AtMBF1c 염기서열이 아니라 야생형 AtMBF1c 염기서열과 일치하였다. 시퀀싱 결과를 확인해보면 여러 피크가 혼합된 형태로 분석되어, 야생형 AtMBF1c 염기서열과 유전자 교정된 AtMBF1c 염기서열이 혼합되어 있을 것으로 예상하였다.



유전자 교정 AtMBF1c 식물체(#4-8-14) 염기서열 확인 결과

- 유전자 교정 AtMBF1c 후보 식물체 (#4-8-14)의 정확한 염기서열 확인을 위해 PCR 산물을 각각 TA 클로닝하여 시퀀싱을 수행하였다. 그 결과 치환된 AtMBF1c 염기서열을 확인하였다. 따라서 유전자 교정 AtMBF1c 식물체에 일부 치환된 AtMBF1c 염기서열이 존재하는 것으로 생각할 수 있고, 따라서 이 후보 식물체 (#4-8-14)를 키워 증자를 확보할 예정이다.



시퀀싱을 통한 유전자 교정 AtMBF1c 후보 식물체의 염기서열 확인

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1. 연구개발 목표 및 주요 연구 결과

남극 산술이끼 유용유전자, plastocyanin과 PaMBF1c 유전자의 환경스트레스 저항성 기능 분석과 이들 단백질 내 우수기능 활성화 부위 맵핑

가. 세부목표 1: 남극 산술이끼와 애기장대 plastocyanin 과발현체 기능분석 및 활성화 부위 탐색

연구 내용	연구 결과
환경스트레스 관련 남극 산술이끼와 애기장대 plastocyanin 과발현체 표현형 비교 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 삼투(mannitol), 이온(LiCl) 스트레스를 각각 처리한 배지에서 야생형, 애기장대 plastocyanin 과발현체, 남극 산술이끼 plastocyanin 과발현체의 뿌리 성장을 비교했을 때 남극 산술 이끼 plastocyanin 과발현체의 뿌리 생장이 더 길게 나타나는 것으로 보아 남극 산술이끼 plastocyanin 과발현체가 삼투와 이온 스트레스에 대해 내성을 가지는 것을 알 수 있음 - 고온 스트레스에 대해서는 야생형과 과발현체 사이에 차이가 없음
남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 활성화 부위 맵핑	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질 3D 모델링 구조적 분석을 통해 남극 산술이끼 우수 기능 활성화 부위를 선별하여 DNA 벡터 제작함 - 효과적인 맵핑을 위해 빠르게 선별할 수 있는 transient assay 방법을 확립함
남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 아미노산기 도입 애기장대 plastocyanin 식물체 기능분석을 위한 스트레스 저항성 표현형 비교	<ul style="list-style-type: none"> - 남극 산술이끼 우수기능 아미노산기 치환 애기장대를 과발현 시켰을 경우 염 스트레스 조건에서 뿌리 생장이 길어지고 광합성 효율이 높아지는 등 염 스트레스에 대한 내성을 보이나, 그 수준이 남극 산술이끼 plastocyanin 과발현체 수준에 미치지 않음 - 남극 산술이끼 transit peptide와 우수기능 아미노산기를 모두 치환한 과발현체를 제작하여 염 스트레스 조건에서 뿌리 성장과 광합성 효율을 비교했을 때 그 수준이 남극 산술이끼 plastocyanin 과발현체 수준을 보임

나. 세부목표 2: 남극 산술이끼 PaMBF1c 활성화 부위 유전자 교정 AtMBF1c 동형접합 식물체 기능 검정

연구 내용	연구 결과
PaMBF1c의 우수 형질을 가지게 유전자 교정된 AtMBF1c 유전자를 가지는 동형접합 식물체 대량 스크리닝용 신규 선별 마커 완성	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자 교정된 부위만 인식하는 마커를 디자인함 - 유전자 교정된 부위만 인식하는 제한효소를 통해 선별 마커 제작함 - 야생형과 유전자 교정된 벡터 DNA로 확인한 결과 신규 선별 마커가 효과적으로 작동함을 확인함
PaMBF1c의 우수 형질을 가지게 유전자 교정된 AtMBF1c 유전자를 가지는 동형접합 식물체 대량 스크리닝	<ul style="list-style-type: none"> - 앞서 제작한 신규 선별 마커를 통해 식물체를 대량 스크리닝하였고 일부 개체에서 유전자 교정된 서열을 확인함

2. 연구 개발 목표 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도 (%)
남극 산술이끼 유용유전자, plastocyanin과 PaMBF1c 유전자의 환경스트레스 저항성 기능 분석과 이들 단백질 내 우수기능 활성화 부위 맵핑	1	- 남극 산술이끼와 애기장대 plastocyanin 과발현체 스트레스 저항성 비교	100
		- 우수기능 활성화 부위 맵핑을 위한 transient assay 방법 확립	100
		- 남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 부여 후보 아미노산기 확정 및 DNA벡터 제작	100
		- 우수기능 후보 아미노산기 도입 애기장대 plastocyanin의 광합성 효율 검정	100
	2	- 식물체 대량 스크리닝용 신규 선별 마커 완성	100
		- 동형접합 식물체 대량 스크리닝	100

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 계속 과제로 현 시점의 연구 개발 결과는 아래와 같은 추진전략 및 체계, 연구개발 목표와 연구내용으로 극지이끼의 유용 유전자 활용 및 신규 유용 유전자를 발굴하여 논문 및 특허화 등의 후속 조치를 진행하고자 한다.

1. 추진전략 및 체계



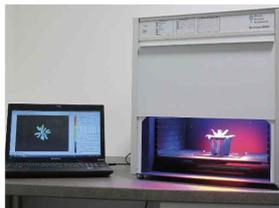
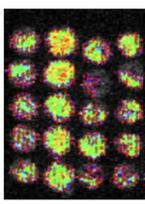
2. 연구개발 목표 및 연구내용

가. 목표

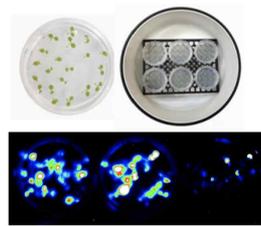
남극 산술이끼 plastocyanin 유전자 기능 작물 확인 및 활용의 기반을 구축하고 신규 남극식물유래 유용 유전자를 발굴한다.

나. 연구내용 요약

- (1) PaPC transit peptide 활성 검정을 통한 남극 산술이끼 plastocyanin의 신규 우수기능 부여 부위를 확정한다.
- (2) 남극 산술이끼 plastocyanin의 우수기능부여 아미노산/신규 부위 치환 작물 유전자 제작 및 작물 세포내 기능을 검정한다.
- (3) 우수기능 부여 아미노산 치환 plastocyanin 유전자 교정체 제작을 개시한다.
- (4) Transient Expression 시스템을 활용한 신규 극한 환경 적응 남극 식물 유용유전자 스크리닝을 수행한다.



FluorCam Imaging System



Luminescence Imaging System

신규 유용유전자 발굴을 위한 Transient Expression system 및 Imaging System

3. 활용계획

가. 학술적 활용

- (1) 극지식물 유전자의 구조와 기능에 대한 연구를 통해 극지이끼 유용유전자 활용을 위한 기반을 구축한다.
- (2) 관련 연구팀과의 교류를 적극 추진하여 미개척 극지식물 유전자원의 공동연구 추진 가능할 것이다.
- (3) 국내 및 국제 심포지엄에 참석하여 연구결과를 발표하고 타 연구자들과의 활발한 교류를 통해 전세계 극지연구 발전에 기여할 것이다.

나. 경제적 활용

- (1) 본 연구를 통하여 개발될 유전자 기능연구 기술과 형질전환체는 유용 유전자의 산업적 이용을 위한 중요한 기반으로 작용할 것이다.
- (2) 광합성 효율 증진 및 환경 스트레스 내성 강화 형질을 작물에 적용함으로써 생산성 및 기능성 향상을 통한 농업 부가가치의 증대 기여할 것으로 기대한다.



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

특이 사항 없음.



제 7 장 참고문헌

- Alavilli, H., Lee, H., Park, M., and Lee, B.-h. (2017). Antarctic moss Multiprotein Bridging Factor 1c overexpression in Arabidopsis resulted in enhanced tolerance to salt stress. *Front. Plant Sci.* 8, 1206. doi: 10.3389/fpls.2017.01206.
- Alavilli, H., Lee, H., Park, M., Yun, D.-J., and Lee, B.-h. (2018). Enhanced multiple stress tolerance in Arabidopsis by overexpression of the polar moss peptidyl prolyl isomerase FKBP12 gene. *Plant Cell Reports* 37:453-465. doi: 10.1007/s00299-017-2242-9.
- Ali, A., Raddatz, N., Aman, R., Kim, S., Park, H.C., Jan, M., Baek, D., Khan, I.U., Oh, D.H., Lee, S.Y., Bressan, R.A., Lee, K.W., Maggio, A., Pardo, J.M., Bohnert, H.J., Yun, D.J. A Single Amino-Acid Substitution in the Sodium Transporter HKT1 Associated with Plant Salt Tolerance. *Plant Physiol.* 2016 Jul;171(3):2112-26. doi: 10.1104/pp.16.00569.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709-1712. DOI: 10.1126/science.1138140.
- Bednarek-Ochyra H, Vána J, Ochyra R, Smith RIL. 2000. The liverwort flora of Antarctica. Polish Academy of Sciences, Institute of Botany, Cracow.
- Bressan RA, Zhang CQ, Zhang H, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Zhu JK (2001) Learning from the Arabidopsis experience. The next gene search paradigm. *Plant Physiology* 127:1354-1360.
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee Bh, Hong X, Agarwal M, Zhu JK. 2003. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes and Development* 17, 1043 - 1054.
- Cho, S., Yu, S.-i., Park, J., Mao, Y., Zhu, J.-K., Yun, D.-J., and Lee, B.-h. (2017). Accession-Dependent CBF gene deletion by CRISPR/Cas system in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 8: 1910. doi: 10.3389/fpls.2017.01910.
- Dassanayake M, Oh DH, Haas JS, Hernandez A, Hong H, Ali S, Yun DJ, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ, Cheeseman JM (2011) The genome of the extremophile crucifer *Thellungiella parvula*. *Nature Genetics* 43:913-U137.
- Dassanayake M, Oh DH, Hong H, Bohnert HJ, Cheeseman JM (2011) Transcription strength and halophytic lifestyle. *Trends Plant Sci* 16:1-3.
- Gidekel M, Destefano-Beltran L, Garcia P, Mujica L, Leal P, Cuba M, Fuentes L, Bravo LA, Corcuera LJ, Alberdi M, Concha I, Gutierrez A. 2003. Identification and characterization of three novel cold acclimation-responsive genes from the extremophile hair grass *Deschampsia antarctica* Desv. *Extremophiles* 7:459-469.
- Inan G, Zhang Q, Li PH, Wang ZL, Cao ZY, Zhang H, Zhang CQ, Quist TM, Goodwin SM, Zhu JH, Shi HH, Damsz B, Charbaji T, Gong QQ, Ma SS, Fredricksen M, Galbraith DW, Jenks MA, Rhodes D, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Joly RJ, Bressan RA, Zhu JK (2004) Salt cress. A halophyte and cryophyte Arabidopsis relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiology* 135:1718-1737.

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. (2012) A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337: 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- Lee, Bh, Lee H, Xiong L, Zhu JK (2002) A Mitochondrial Complex I Defect Impairs Cold-Regulated Nuclear Gene Expression. *Plant Cell* 14:1235–1251.
- Lee SC, Huh KW, An K, An G, Kim SR (2004) Ectopic expression of a cold-inducible transcription factor, CBF1/DREB1b, in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Cells* 18:107–114.
- Ma, Y., Dai, X., Xu, Y., Luo, W., Zheng, X., Zeng, D., Pan, Y., Lin, X., Liu, H., Zhang, D., Xiao, J., Guo, X., Xu, S., Niu, Y., Jin, J., Zhang, H., Xu, X., Li, L., Wang, W., Qian, Q., Ge, S., Chong, K. *COLD1* confers chilling tolerance in rice. *Cell*. 2015 Mar 12;160(6):1209–21. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.046.
- Miki, D., Zhang, W.X., Zeng, W.J., Feng, Z.Y., Zhu, J.-K. (2018) CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in *Arabidopsis* using sequential transformation. *Nature Comm.* 9: 1967. DOI: 10.1038/s41467-018-04416-0.
- Ochyra R. 1998. The moss flora of King George Island, Antarctica. Polish Academy of Sciences, W. Szafer Institute of Botany, Cracow.
- Oh DH, Dassanayake M, Haas JS, Kropornika A, Wright C, d'Urzo MP, Hong H, Ali S, Hernandez A, Lambert GM, Inan G, Galbraith DW, Bressan RA, Yun DJ, Zhu JK, Cheeseman JM, Bohnert HJ (2010) Genome Structures and Halophyte-Specific Gene Expression of the Extremophile *Thellungiella parvula* in Comparison with *Thellungiella salsuginea* (*Thellungiella halophila*) and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 154:1040–1052.
- Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, Kim YK, Nahm BH, Kim JK (2005) *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology* 138:341–351.
- Øvstedal DO, Lewis Smith RI. 2001. Lichens of Antarctica and South Georgia: A guide to their identification and ecology. – Studies in Polar Research, Cambridge University Press, Cambridge, England. 411 pp.
- Rozema J, Bjorn LO, Bornman JF, Gaberscik A, Hader DP, Trost T, Germ M, Klisch M, Groniger A, Sinha RP, Lebert M, He YY, Buffoni-Hall R, de Bakker NV, van de Staaij J, Meijkamp BB. 2002. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems—an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J. Photochem. Photobiol. B.* 66:2–12.
- Rozema J, Boelen P, Blokker P. 2005. Depletion of stratospheric ozone over the Antarctic and Arctic: Responses of plants of polar terrestrial ecosystems to enhanced UV-B, an overview. *Environ. Pollution.* 137:428–442.
- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. *Arabidopsis* Cys2/His2-Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought, Cold, and High-Salinity Stress Conditions. *Plant Physiology* 136:2734–2746.
- Yolcu, S., Alavilli, H., Lee, B.-h. (2020) Natural Genetic Resources from Diverse Plants to Improve Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Int J Mol Sci.* 21(22):8567. doi: 10.3390/ijms21228567.