

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
화 부위 매핑 및 활용기반 구축”과제의 최종보고서로 제출합니다.



(본과제)총괄연구책임자 : 김 진 형

위탁연구기관명 : 서강대학교

위탁연구책임자 : 이 병 하

위탁참여연구원 : 김 재 연

“ : 김 한 슬

“ : 김 희 진

“ : 배 노 아

“ : 유 경 재

“ : 이 령

보고서 초록

위탁연구과제명	남극 산술이끼(<i>Polytrichastrum alpinum</i>)의 극한적응 우수 유전자의 기능 활성화 부위 매핑 및 활용기반 구축				
위탁연구책임자	이병하	해당단계 참여연구원수	7	해당단계 연구비	120,000,000원
연구기관명 및 소속부서명	서강대학교 생명과학과		참여기업명	-	
국제공동연구	상대국명 : - 상대국연구기관명 : -				
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	33
○ 환경스트레스 관련 남극 산술이끼와 애기장대 plastocyanin 과발현체 표현형 비교 분석하여, 남극 산술이끼 plastocyanin(PaPC)의 우수성을 확립하였다. ○ 남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 활성화 부위 맵핑을 시도하여, PaPC 우수기능을 갖게 하는 아미노산기를 특정하였다. ○ 남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 아미노산기 도입 애기장대 plastocyanin (AtPC2)를 만들고, 이를 발현하는 애기장대 식물체를 제작하였다. ○ PaPC 우수아미노산기 도입 AtPC2의 기능분석을 위해 PaPC화 AtPC2 과발현 애기장대의 광합성 효율과 스트레스 저항성 표현형 비교하였다. ○ PaPC외 기발굴되어 그 우수기능이 확인된 남극 산술이끼 PaMBF1c 활성화 부위 유전자 교정 AtMBF1c 식물체 선별을 수행하였다. ○ 남극 산술이끼 plastocyanin 유전자의 작물내 기능 활용을 위한 기반 구축 그리고 신규 남극식물유래 유용 유전자 발굴을 수행하였다.					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	극지식물유전자, 남극산술이끼, 환경스트레스, 광합성, 플라스토시아닌			
	영 어	Polar plant gene, <i>Polytrichastrum alpinum</i> , Abiotic stress, Photosynthesis, Plastocyanin			

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

- 남극 산솔이끼 유용유전자, plastocyanin과 PaMBF1c 유전자의 환경스트레스 저항성 기능 분석과 이들 단백질 내 우수기능 활성화 부위 매핑하고 특정한다.
- 온대 식물 유전자에 남극 산솔이끼 유용유전자 활성화 부위를 도입하여 그 환경스트레스 저항성 기능을 분석하고, 작물 적응의 활용기반을 구축한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- Plastocyanin를 대상으로, transient expression 시스템을 활용하여 후보 유전자들의 기능을 스크리닝하였다.
- 남극 산솔이끼 plastocyanin (PaPC)의 주요 아미노산기와 transit peptide의 기능을 분석하고, transient assay 기반 기능 맵핑을 통해 광합성 및 스트레스 저항성과 연관된 우수기능 활성화 부위를 규명하였다.
- 담배 잎 transient assay를 이용하여 우수 아미노산 치환이 도입된 애기장대 plastocyanin의 광합성 효율을 검증하고, 기능 향상이 확인된 후보를 선별하였다.
- 우수 아미노산 치환 plastocyanin 과발현 애기장대를 제작하여 광합성 효율과 다양한 스트레스 조건에서의 표현형을 분석하고, 남극 산솔이끼 plastocyanin과의 스트레스 저항성을 비교 평가하였다.
- 우수 아미노산 치환을 도입한 작물용 plastocyanin 유전자를 제작하고, 작물에서 광합성 효율 향상 기반을 구축하였다.
- 우수 아미노산 치환 plastocyanin을 표적으로 하는 유전자 교정 벡터를 제작하고, 형질전환체를 통해 유전자 교정 개체를 탐색하였다.
- PaMBF1c의 우수 형질을 반영한 AtMBF1c 유전자 교정 전략을 수립하고, 동형접합체 대량 선별을 위한 신규 마커를 개발하여 유전자 교정 식물체를 효율적으로 스크리닝하였다.

IV. 연구개발결과

- 남극 산솔이끼 plastocyanin의 transit peptide는 엽록체 수송 효율 증가에 직접적인 영향을 미치지 않음을 규명하였으며, 특정 아미노산 부위가 스트레스 조건에서 광합성 효율을 향상시키는 핵심 우수기능 부위임을 확정하였다.
- 해당 우수기능 아미노산을 애기장대, 담배, 토마토 plastocyanin에 치환한 결과 염 스트레스 조건에서 광합성 효율이 유의미하게 증가하였다.
- Transient expression 시스템을 활용해 신규 극한 환경 적응 남극 식물 저온 신호 유용 유전자를 선별하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 가능하다면, 지속적인 연구를 통해 남극 산술이끼의 유용 유전자 활용 연구를 수행하고자 한다. 본 연구를 통해서 확보된 지식과 기술은 신규 유용 극지 유전자 발굴에 적용 가능할 것이다.



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 analyze the environmental stress-resistance functions of useful genes from the Antarctic haircap moss, specifically plastocyanin and PaMBF1c, and to map and identify superior functional activation sites within these proteins.
- To introduce the functional activation sites derived from Antarctic haircap moss genes into temperate plant genes, analyze the resulting stress-resistance functions, and establish a foundation for crop application.

III. Contents and Extent of R&D

- Using plastocyanin as a target, candidate genes were subjected to primary functional screening using a transient expression system.
- The major amino acid residues and transit peptide function of Antarctic haircap moss plastocyanin (PaPC) were analyzed, and superior functional activation sites associated with photosynthesis and stress resistance were identified through transient assay-based functional mapping.
- The photosynthetic efficiency of *Arabidopsis* plastocyanin variants carrying superior amino acid substitutions was validated using tobacco leaf transient assays, and candidates showing functional enhancement were selected.
- *Arabidopsis* plants overexpressing plastocyanin with superior amino acid substitutions were generated, and their photosynthetic performance and phenotypes under various stress conditions were analyzed and compared with those of Antarctic haircap moss plastocyanin.
- Crop-compatible plastocyanin genes carrying superior amino acid substitutions were constructed, and a foundation for improving photosynthetic efficiency in crops was established.
- Gene-editing vectors targeting plastocyanin with superior amino acid substitutions were constructed, and gene-edited lines were identified through plant transformation.
- A gene-editing strategy for AtMBF1c incorporating the superior traits of PaMBF1c was established, and a novel marker for large-scale selection of homozygous lines was developed to enable efficient screening of gene-edited plants.

IV. R&D Results

- It was demonstrated that the transit peptide of Antarctic haircap moss plastocyanin does not directly increase chloroplast targeting efficiency, and that specific amino acid residues constitute key superior functional sites that enhance photosynthetic efficiency under stress conditions.
- Substitution of these superior functional amino acids into plastocyanin from *Arabidopsis*, tobacco, and tomato resulted in a significant increase in photosynthetic efficiency under salt stress conditions.
- Using a transient expression system, novel cold-responsive and extreme-environment adaptation genes from Antarctic plants were successfully identified.

V. Application Plans of R&D Results

- The current research outcomes will be extended through continued studies to further exploit useful genes from the Antarctic haircap moss. The knowledge and technologies secured through this study will be applicable to the discovery of novel useful genes from polar organisms.



목 차

제 1 장 서론

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌



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 매핑한다.
- 극한 환경 적응을 위한 남극식물 유용 유전자 활용 기반 구축 및 신규 유용 유전자 발굴한다.

나. 연구의 내용

(1) 연구의 필요성

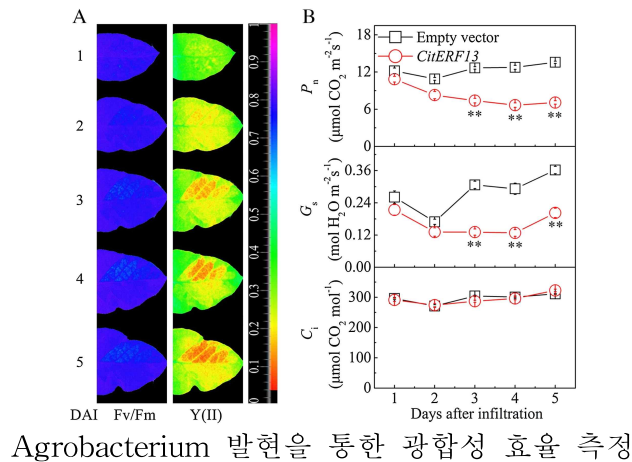
전 지구적 기후변화는 급격한 식물 식생변화와 더불어 식량 생산량의 감소로 이어지고 있다. 특히, 지속적인 세계인구의 증가에 비해 식량 생산량은 이를 따라잡지 못하고 있고, 국제연합 식량농업기구는 식량 생산량이 현재보다 70~85% 증가하지 않으면, 2050년 약 15억명의 세계인구가 식량부족으로 생존의 위협을 받게 될 것으로 예측했다.

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 plastocyanin의 환경스트레스 저항 기능을 분석하고, 이에 대한 활용 기반을 구축하는 연구를 통해, 극지 유전자원의 유용성과 활용성을 확장하고자 한다.

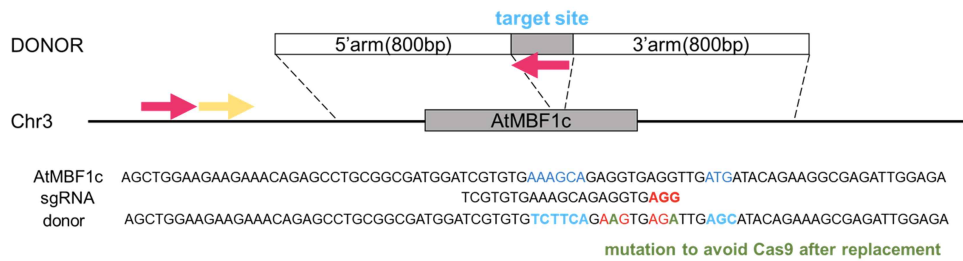


남극 산술이끼 유전자 PaPC의 우수기능 활성화 부위가 확정이 되면, 이를 PaPC의 우수활성화 부위가 도입된 plastocyanin 유전자를 제작하고 이 PaPC 우수기능 도입 유전자를 식물체에서 과발현시키고자 했다. 우수기능 아미노산 도입 유전자들이 과발현 된 식물체 앞에서 스트레스 환경에 따른 광합성 효율을 검증하고자 했다.

(다) PaPC 및 PaMBF1c 우수기능 활성화 부위 도입 유전자 교정

본 연구에서는 성공적으로 수행된 남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 아미노산 교정 식물체를 동형접합 식물체로 분리해내고자 했다. 이를 위해서 CRISPR/Cas9 시스템을 통한 HDR, prime editing 벡터를 제작하여 형질전환체를 제작하고자 했다. 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, 남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 아미노산 교정 동형접합 식물체를 분리하고자 했다. 많은 식물체를 대상으로 스크리닝을 해야하므로, 96 well-PCR 등을 통해 빠른 속도로, 그리고 nested PCR 및 염기서열 분석을 통해 정확히 동형접합체를 확보하고자 했다.

또한, 본 연구에서는 성공적으로 수행된 AtMBF1c의 유전자 교정 식물체를 동형접합 식물체로 분리해내고자 하였다. PaMBF1c에만 존재하는 인산화 가능 아미노산 serine 3개 residue를 AtMBF1c에 도입하고자 하였다. 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 확보하고자 했다.



AAA	→	TCT	GCA	→	TCA	ATG	→	AGC
Lysine		Serine	Alanine		Serine	Methionine		Serine
GAG	→	GAA	AGG	→	AGA			
Glutamic acid		Glutamic acid	Arginine		Arginine			

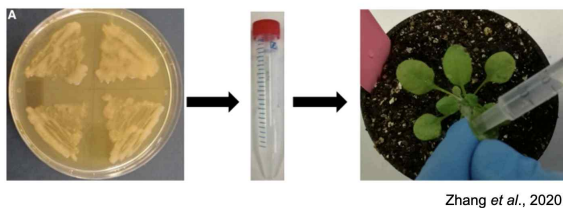
우수기능 활성화 부위 도입 유전자 교정

(라) 신규 극한 환경 적응 남극 식물 유용유전자 탐색 및 신규 유전자 발굴

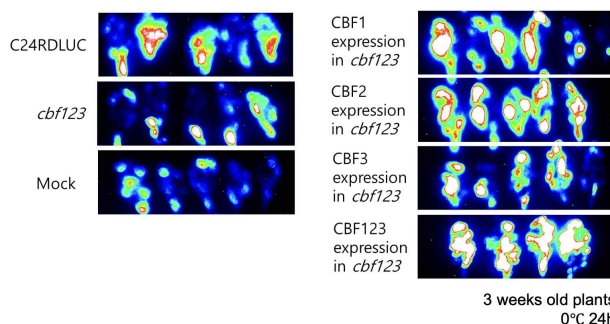
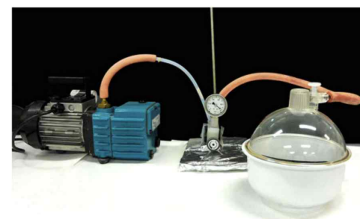
환경스트레스 반응성 유전자 조절 남극 식물 유전자 발굴은 스트레스 반응성 유전자 (RD29A) 프로모터에 의해 조절되는 luciferase 리포터 시스템을 갖춘 애기장대 형질전환체 (RD29Ap-LUC)를 활용한 스크리닝 기법을 적용하여 남극 식물에서 온대식물의 CBF와 기능적으로 동일한 CBF homolog 유전자를 발굴하고자 했다. 특히, 본 연구팀은 RD29A-LUC 애기장대에 저온신호전달의 핵심 전사인자인 CBF1, CBF2, CBF3 유전자를 CRISPR/Cas9으로 결실시킨 식물체 유식물에 남극 식물 후보 유전자를 도입하고, 본 연구팀의 luminescence imaging system을 이용하고자 했다.

Agrobacterium-Infiltration for Transient Gene Expression in *cbf123*

① to Leaves



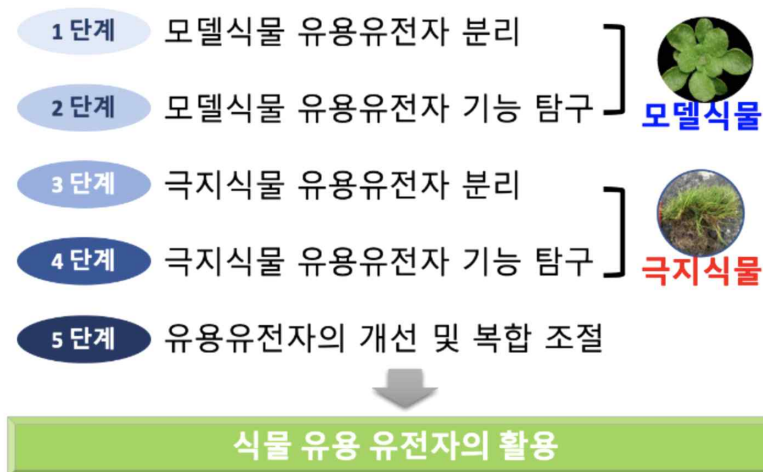
② to Whole Seedlings



Luciferase 리포터 시스템을 통한 스크리닝 기법

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



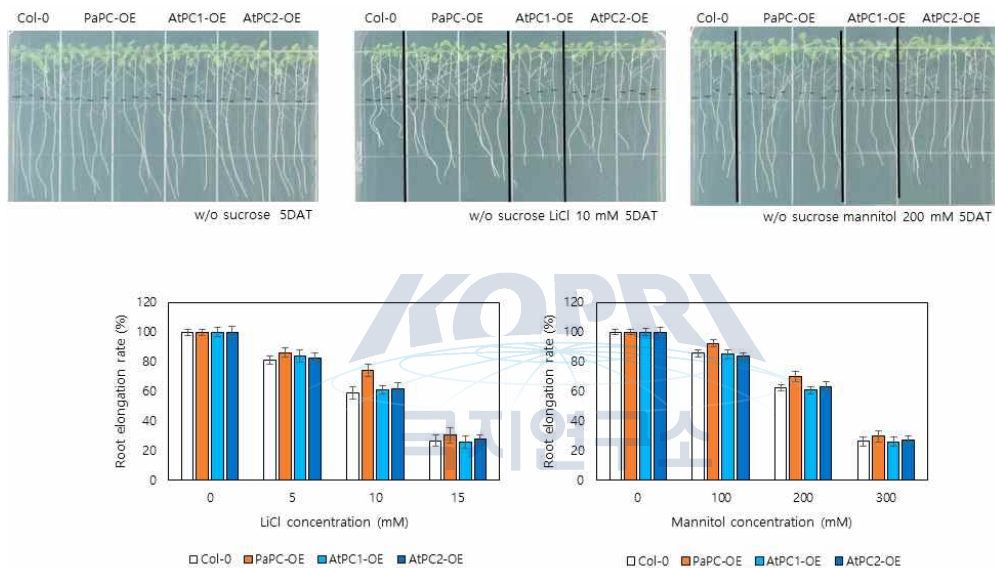
극한 식물의 일례로, Salt Cress라 불리는 *Thellungiella halophila*가 존재하며, 이 극한식물체는 500 mM NaCl (바다는 약 600 mM)에도 염 저항성을 보인다. Bressan 등은 모델식물에서의 염 저항성 연구 한계를 극복할 식물로 *Thellungiella halophila*을 제시하기도 했다 (Bressan et al., 2001; Inan et al., 2004). 따라서 현재 국제 연구 추세는 위 그림의 2단계에서 3단계와 4단계로 변화하고 있다. 극한 식물체는 (1) **유전자 프로모터의 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 plastocyanin의 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

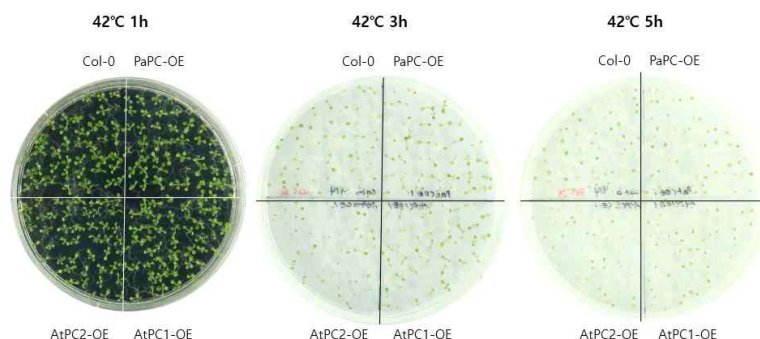
1. 환경스트레스 관련 남극 산솔이끼와 애기장대 plastocyanin 과발현체 표현형 비교 분석

- 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 것으로 생각할 수 있다.



sucrose가 없는 스트레스 MS 배지에서 뿌리 생장률 비교

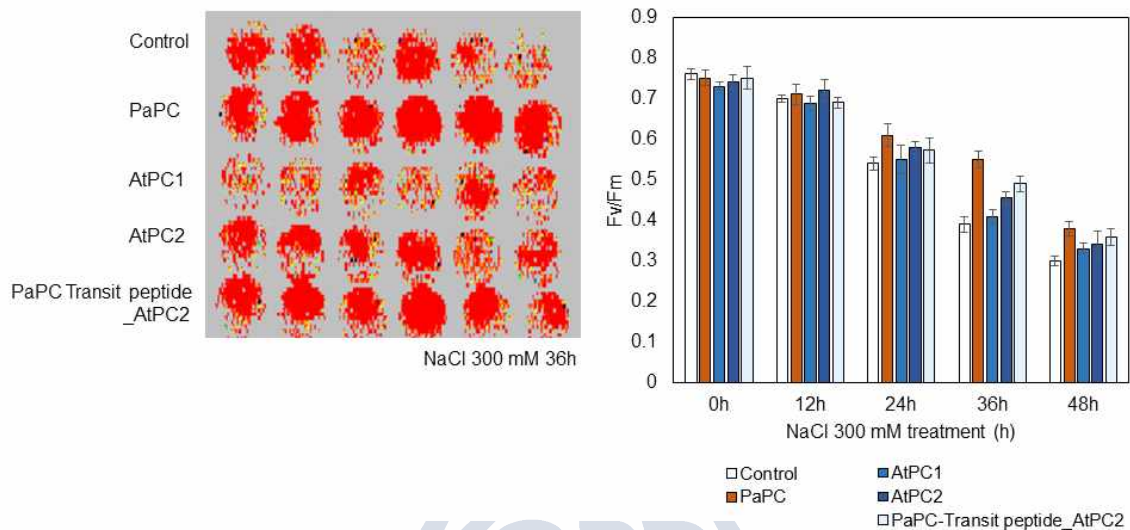
- 그러나 빛 조건에서 고온 스트레스(42°C 1,3,5 시간)를 처리하여 정상 조건에서 3일간 회복시킨 뒤 생존률을 확인한 결과 야생형과 PaPC, AtPC1, AtPC2 과발현체 모두 비슷한 수준의 생존률을 보였다. 따라서 PaPC는 고온 스트레스에 대한 저항성은 없는 것으로 보인다.



고온 스트레스 처리 후 생존률 비교

2. 남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 활성화 부위 맵핑

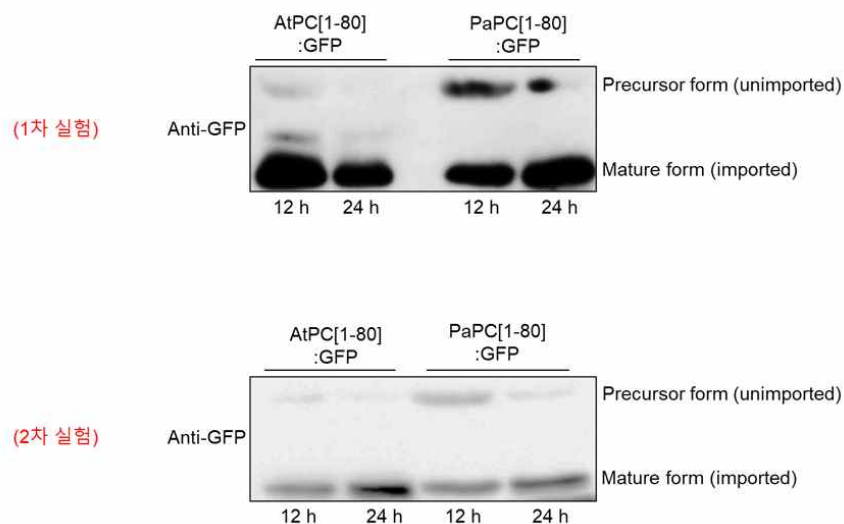
- Transit peptide 서열을 예측하는 프로그램을 통해 PaPC의 transit peptide 서열 확인하고, AtPC2 transit peptide 서열을 PaPC transit peptide 서열로 바꾼 벡터를 제작하였다. 담배잎을 이용한 광합성 활성 비교 시스템을 통해 스트레스 조건에서 광합성 효율을 비교한 결과 PaPC transit peptide 서열로 바꾼 AtPC2을 도입한 담배 잎의 경우 AtPC2 야생형을 도입한 것에 비해 더 높은 광합성 효율을 보임을 확인하였다.



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

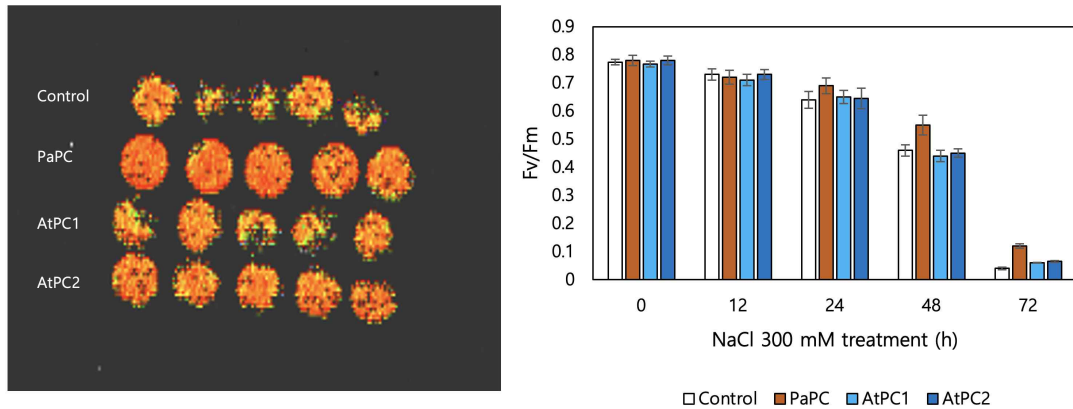
- 따라서 PaPC와 AtPC2 사이에 엽록체로의 수송 효율을 비교하기 위해 GFP를 tagging한 construct를 제작하였다. PaPC transit peptide 73 아미노산, AtPC2 transit peptide 68 아미노산을 모두 포함하도록 각각 PaPC, AtPC2 80 아미노산에 GFP를 tagging 하였다.

- protoplast에 이들 유전자를 전달한지 각각 12시간, 24시간 후 엽록체를 분리하여 GFP 항체로 단백질의 양을 비교하였다. 1차 실험과 2차 실험에서 엽록체로 수송되지 않은 Precursor 형태의 밴드가 AtPC2보다 PaPC에서 더 진하게 나타났다.



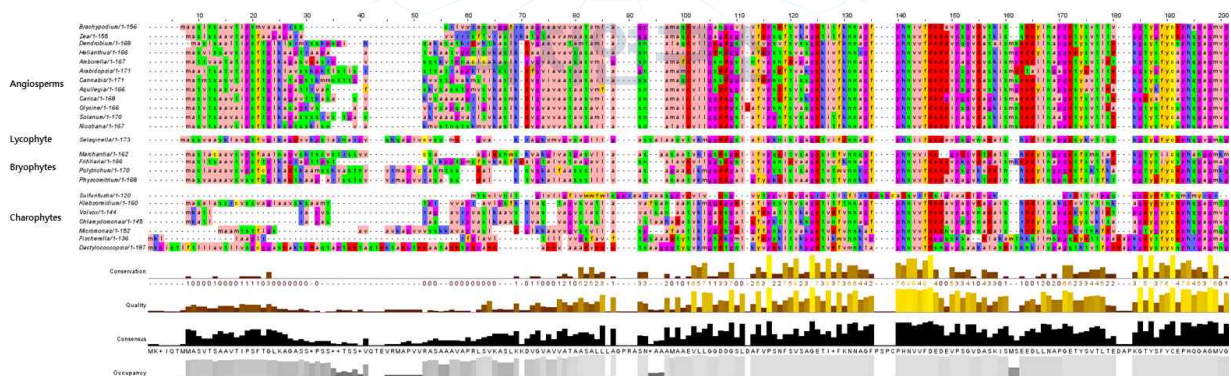
PaPC와 AtPC2 transit peptide의 엽록체 수송 효율 비교

- 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.

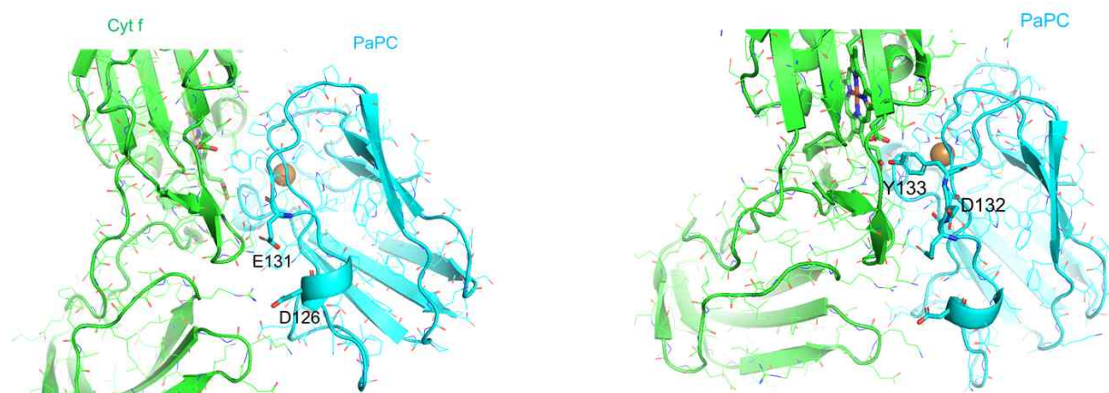


PaPC 활성화 부위 도입 유전자 기능 검정 시스템

- 남극 산솔이끼 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 126 아스파르트산, 131, 132, 133 글루탐산, 아스파르트산, 타이로신 잔기에서 차이를 보였다.

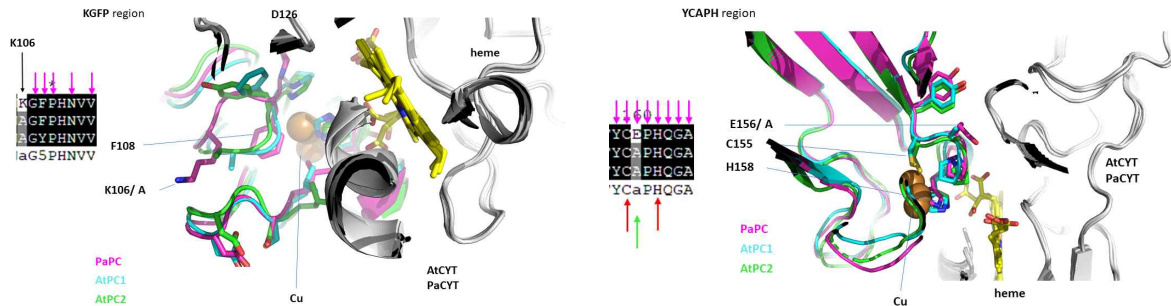


Plastocyanin 염기서열 정렬



Cytochrome (Cyt)와 PaPC의 단백질 3D 모델링

- PaCYT, AtCYT, PaPC, AtPC1, AtPC2의 단백질 3D 모델링을 통해서 PaPC의 일부 아미노산으로 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.



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.

```

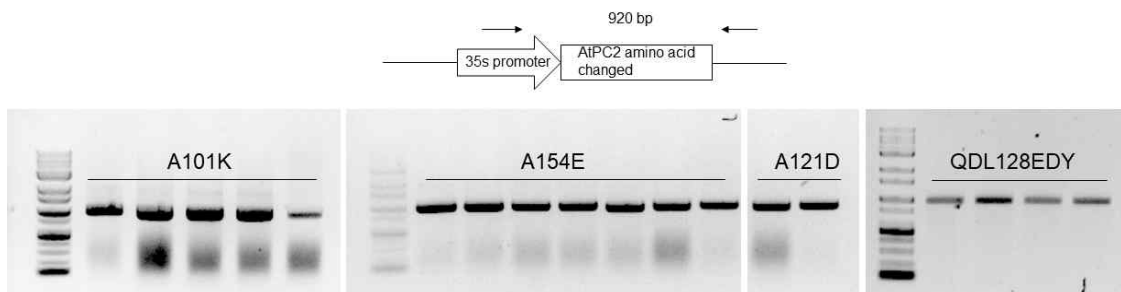
P.alpinum      MASLAAAASVSPFCGLKADTKAAMSSKVAStNVVRMAPVCRASM-TSSDALKNVGKALF  59
A.thaliana_1   MAATTSATVTIPSFTGLKLAVSSKPKTLST-ISRSTSATRAPPKLALK-SSLKDFGVIAV  58
A.thaliana_2   MASVTSTTVPIPSFTGIKASTTRSSAT-----VRTQTAAVASPKLTVK-SSLKNFGVAAV  54

P.alpinum      AASSSLLLAASAGAAEIKMGDDGALIFLPSLSISAGETVTWVNNRGFPHNVVFDEDEV  119
A.thaliana_1   ATAASIVLAGNAMAMEVLLGSDGSLAFVPSEFTVARGEKIVFKNNRGFPHNVVFDEDEI  118
A.thaliana_2   APAASIALAGNAMAIEVLLGGGDSLAFIPNDFSIAKGEKIVFKNNRGYPHNVVFDEDEI  114

P.alpinum      PSGVKVVDLNHE--DYLNPGGESFSKTFKAPGTYSFYCEPHQGAGMKGSIIVS  170
A.thaliana_1   PSGVDASKISMDETALINGAGETYEVTLTPEPGSYGFYCAPHQGAGMVGKLTVK  171
A.thaliana_2   PSGVDVAKISMDEQDLINGAGETYEVALTEPGTYSFYCAPHQGAGMVGKVTVN  167
  
```

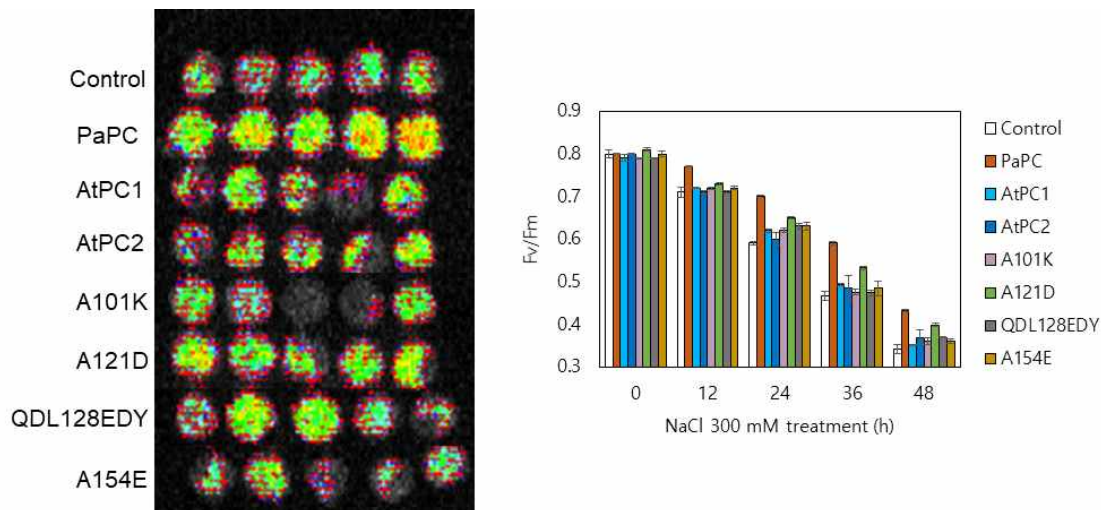
AtPC2							
At 101 th aa	At sequence	At 121 th aa	At sequence	At 128,129,130 th aa	At sequence	At 154 th aa	At sequence
A	GCT	A	GCC	QDL	CAAGATCTA	A	GCG
↓							
Pa aa	Pa sequence	Pa aa	Pa sequence	Pa aa	Pa sequence	Pa aa	Pa sequence
K	AAG	D	GAC	EDY	GAGGACTAC	E	GAG
A101K		A121D		QDL128EDY		A156E	

PaPC 활성화 부위 도입 AtPC2 유전자 제작



PaPC 활성화 부위 도입 AtPC2 벡터 제작 확인

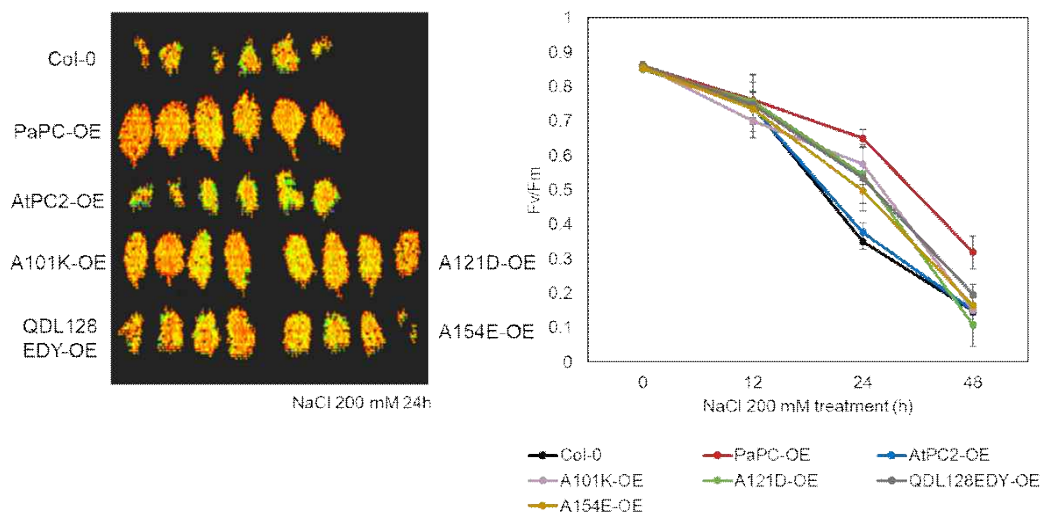
- PaPC 활성화 부위 도입 AtPC2 벡터를 포함하는 아그로박테리움을 이용하여 담배잎에 임시 유전자 발현을 유도하였다. 광합성 활성 비교 결과, 염 스트레스(NaCl) 조건에서 A121D 발현 벡터가 AtPC2 발현 벡터보다 더 높은 광합성 효율을 보였다. 따라서 126 아스파르트산이 중요한 PaPC 우수 활성화 부위로 예상된다.



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

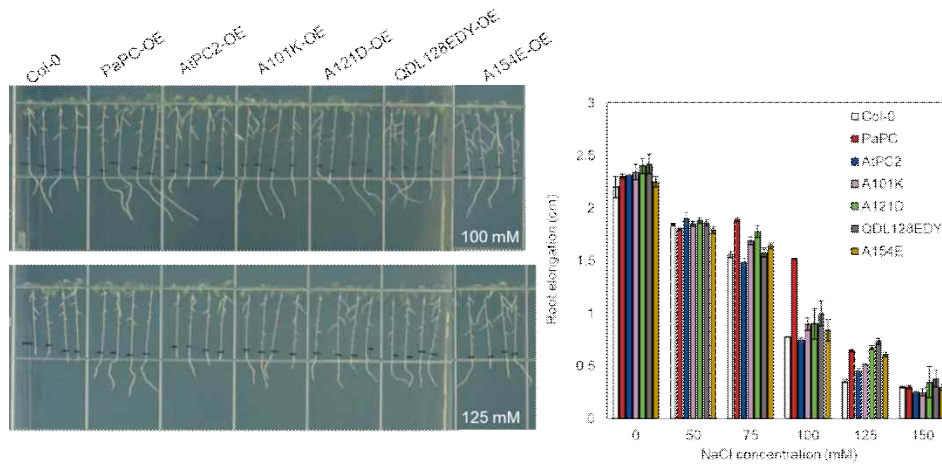
3. 남극 산솔이끼 plastocyanin 우수기능 아미노산기 도입 애기장대 plastocyanin 식물체 기능분석

- 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(200 mM NaCl)에 시간별로 처리 후 광합성 효율을 측정한 결과, PaPC 우수 기능 활성화 후보 아미노산을 치환한 AtPC2 과발현체 모두 야생형뿐만 아니라 비치환 AtPC2 과발현체(AtPC2-OE)에 비해 염 스트레스에서 향상된 광합성 효율을 보였다. 다만, 아미노산 치환 AtPC2 과발현체는 PaPC 과발현체(PaPC-OE)와 비교시에는 다소 덜 향상된 광합성 효율을 보였다.



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

- PaPC 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현체의 염 스트레스 저항성을 조사하기 위해 뿌리 길이를 측정하였다. 종자를 MS 배지에서 5일 동안 성장시킨 후 각각 NaCl 스트레스 배지로 이송하여 뿌리 신장을 관찰하였다. 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 보였다. 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 염 스트레스 저항성이 높지는 않았다.

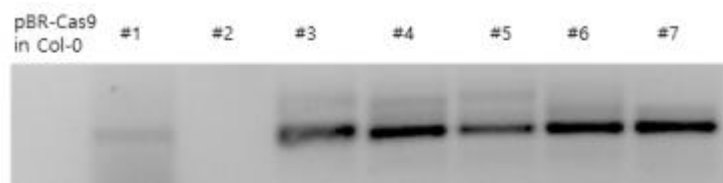


PaPC 우수 기능 후보 아미노산 치환 AtPC2 과발현체의 염 스트레스 하 뿌리 신장

4. 우수기능 부여 아미노산 치환 plastocyanin 유전자 치환 유전자 교정체 제작

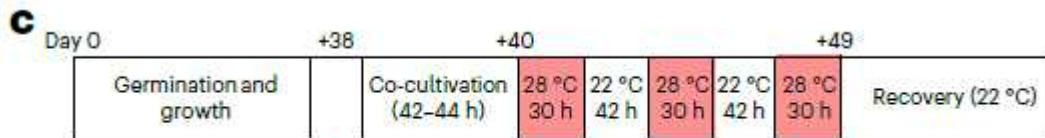
- 애기장대 형질전환체와 담배 일시적 발현에서 각각 광합성 효율을 증가시킨 A121D 아미노산 치환 유전자 교정체를 우선 탐색하였다. Cas9은 모두 생식 세포에서 Ribosomal protein S 5A (AtRPS5A) 프로모터 제어 하에 발현되도록 제작하였다. Cas9이 삽입된 애기장대에 Homology Directed Repair (HDR) 벡터를 형질전환하여 A121D 아미노산 치환 형질전환체 제작을 완료하였다.

- T1 세대에서 A121D 아미노산 치환 유전자 교정체를 선별하였고, HDR 벡터가 삽입되었음이 확인된 개체는 #3, #4, #5, #6, #7이다. 해당 라인에 대해 후속 세대(T2 세대)에서 A121D 아미노산 치환 교정 유무를 계속 확인하여 A121D 아미노산 치환 동형접합 식물체를 확보할 계획이다.

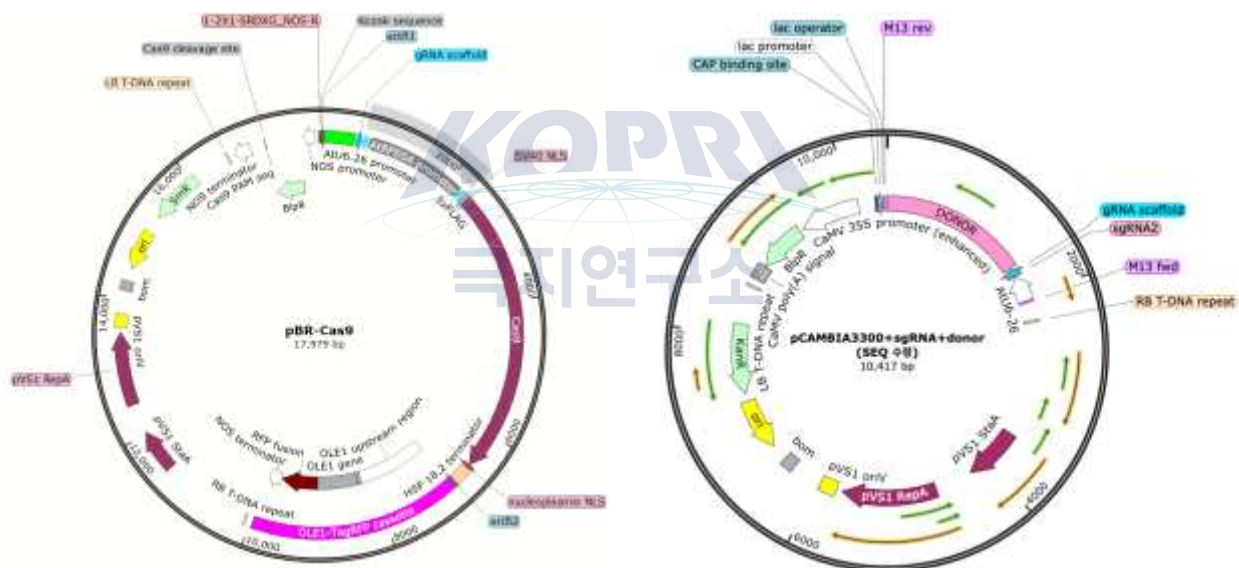


T1 세대에서 A121D 아미노산 치환 교정체 탐색 결과

- Prime editing (PE)는 동물과 식물에서 거의 모든 유형의 정밀한 게놈 편집을 가능하게 한다. 그러나 쌍자엽 식물에는 효율이 낮은 것으로 알려져 있다. 열 처리 후에는 prime editing 활성도를 향상시킬 수 있다는 것이 보고된 바 있어, 유전자 치환 효율을 높이기 위해 형질전환 후 아래와 같이 열 처리를 수행하였다.
- 열 처리를 통해 prime editing 활성도를 증대시킴으로써 유전자 교정체의 발생 빈도를 높이고, 이후 dCAPS marker 등 분자마커를 활용하여 교정체를 신속하고 정밀하게 선별하고자 한다.
- 이러한 전략은 낮은 PE 효율로 인해 발생하는 탐색상의 한계를 보완하고, 실제 유전자 교정체를 확보할 성공 확률을 크게 향상시킬 것으로 기대된다.



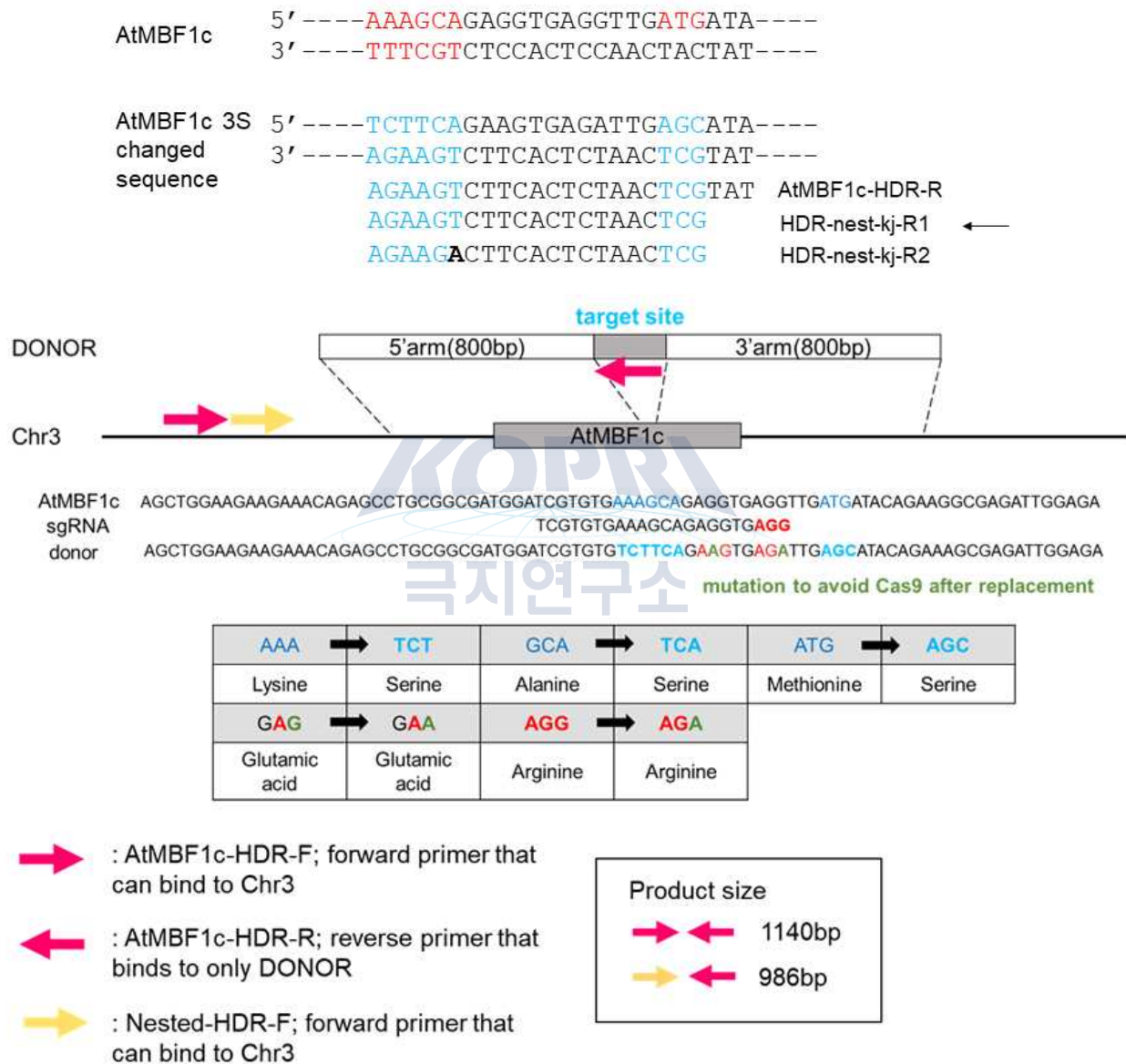
Floral dio transformation
Prime editing 효율 증가를 위한 열 처리 방법



우수기능 아미노산 치환 유전자 교정체 탐색을 위한 Cas9 construct 제작
(좌; pBR-Cas9, 우; PaPC 우수 형질 아미노산 치환 HDR 벡터)

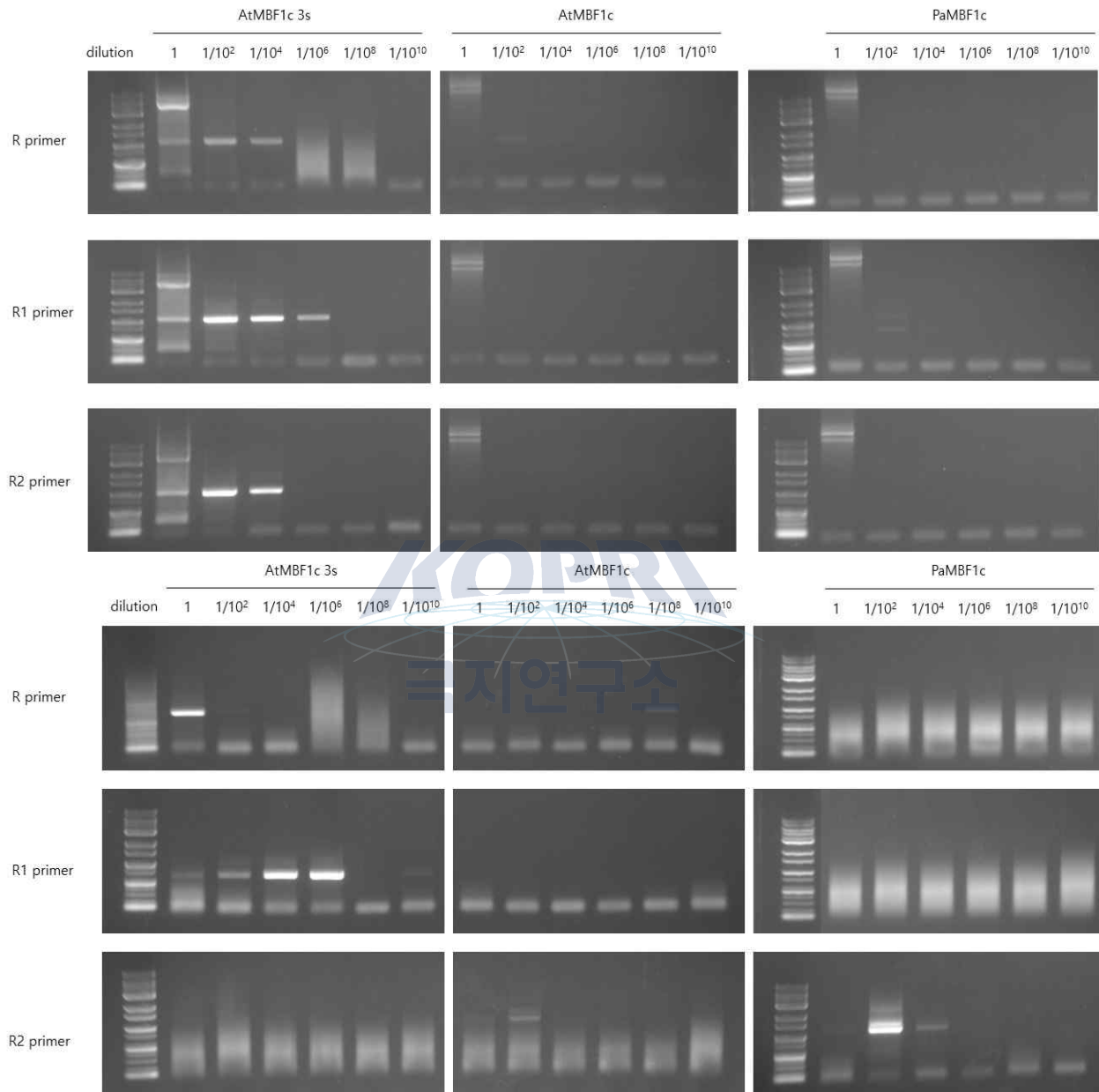
5. 남극 산솔이끼 PaMBF1c 활성화 부위 유전자 교정 AtMBF1c 식물체 선별

- 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.



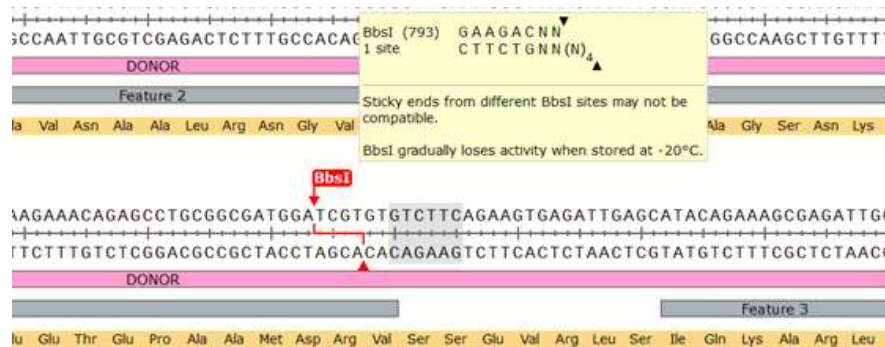
유전자 교정된 AtMBF1c 동형접합 식물체 선별을 위한 신규 마커 제작

- 유전자 교정된 AtMBF1c 동형접합 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.



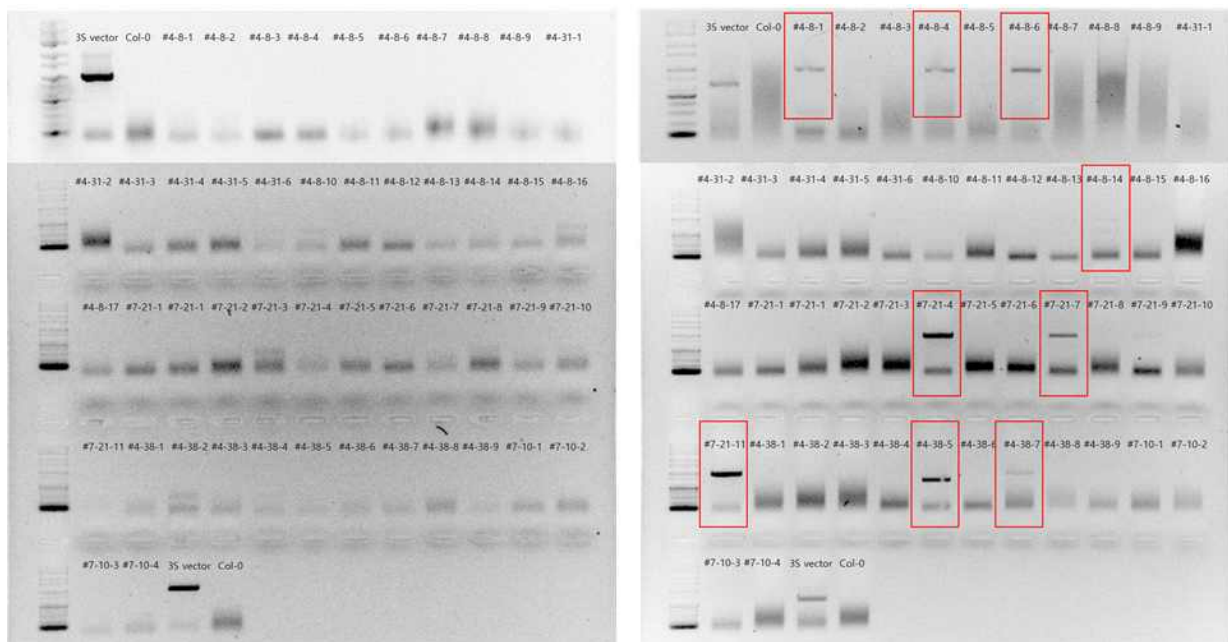
Nested PCR을 통한 신규 선별 마커 확인 (위; 1st PCR 결과, 아래; nested PCR 결과)

- 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.



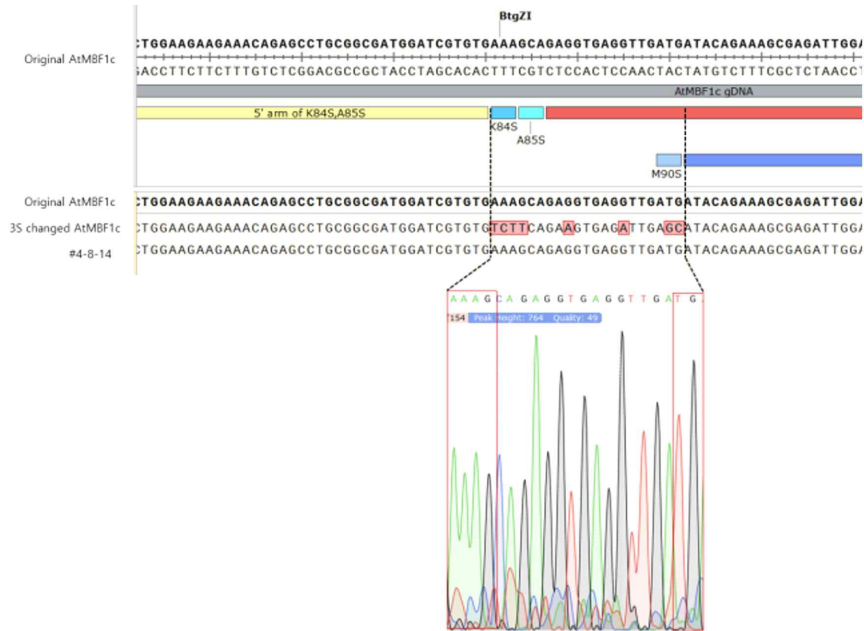
유전자 교정 AtMBF1c 특이적 제한효소(*Bbs*I) 절단 유무 확인 (좌; 제한효소 처리 전, 우; 제한효소 처리 후)

- 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.



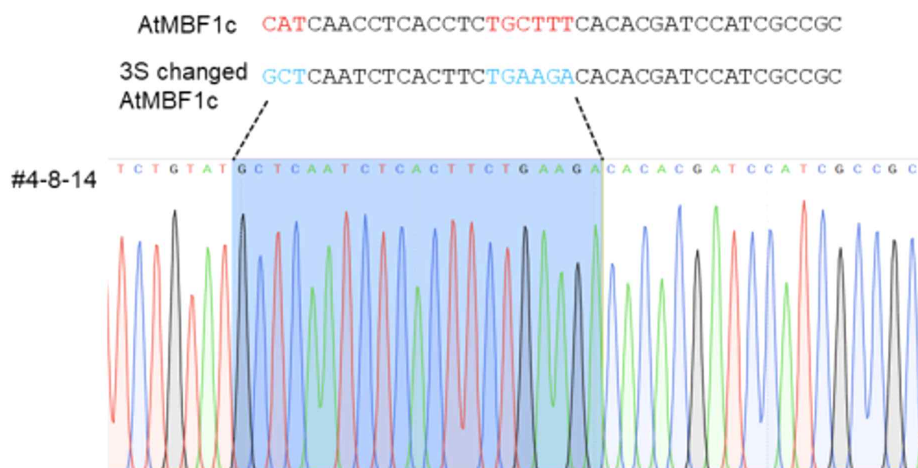
신규 선별 마커를 이용한 유전자 교정 AtMBF1c 식물체 선별 (좌; 1st PCR 결과, 우; nested PCR 결과)

- 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

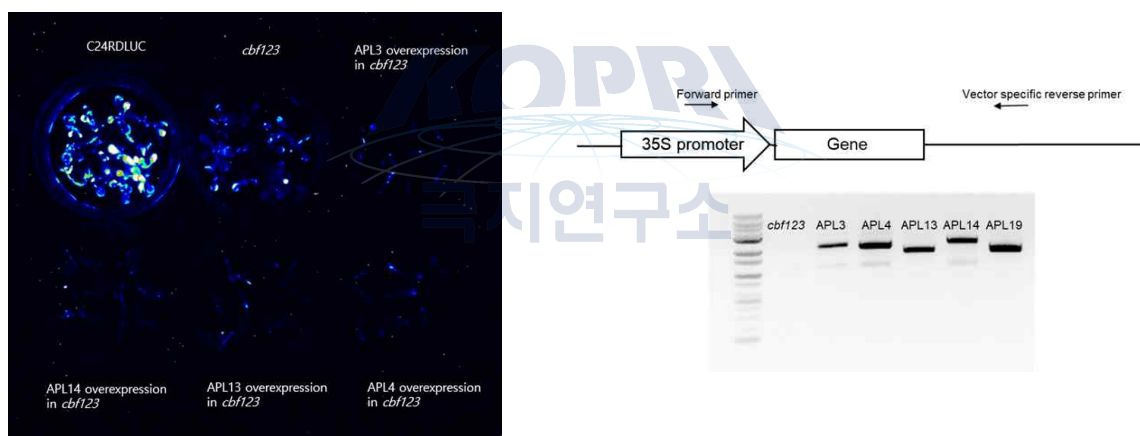
- 유전자 교정 AtMBF1c 후보 식물체 (#4-8-14)의 정확한 염기서열 확인을 위해 PCR 산물을 각각 TA 클로닝하여 시퀀싱을 수행하였다. 그 결과 치환된 AtMBF1c 염기서열을 확인하였다. 따라서 유전자 교정 AtMBF1c 식물체에 일부 치환된 AtMBF1c 염기서열이 존재하는 것으로 생각할 수 있고, 따라서 이 후보 식물체 (#4-8-14)를 키워 종자를 확보할 예정이다.



시퀀싱을 통한 유전자 교정 AtMBF1c 후보 식물체의 염기서열 확인

6. 유전자 활성 검정 이미징 시스템을 이용한 신규 극한환경적응 유용유전자 탐색

- 남극 식물에서 온대식물의 CBF와 기능적으로 동일한 CBF homolog 유전자를 발굴하기 위해 애기장대 CBF1, CBF2, CBF3 유전자 돌연변이체(*cbf123*)를 활용하였다.
- 앞서 기술한 *cbf123*은 스트레스 반응성 유전자(RD29A) 프로모터에 의해 조절되는 luciferase 리포터 시스템을 갖춘 애기장대 형질전환체(RD29Ap-LUC)에 CBF1, CBF2, CBF3 유전자를 CRISPR/Cas9으로 결실시킨 식물체(RD29Ap-LUC *cbf123*)로 저온 스트레스 처리 후 luminescence 측정을 통해 CBF homolog 후보 유전자를 선별할 수 있다.
- 극지 이끼의 CBF homolog 후보 유전자들을(APL3, APL4, APL14, APL13 그리고 APL19) *cbf123*에 일시적으로 과발현 시킨 뒤 저온 스트레스를 처리하여 luminescence를 측정하였다. 그러나 APL3, APL4, APL14, APL13 및 APL19의 유전자 삽입이 확인되었음에도 불구하고 luminescence가 정상체(C24RDLUC) 수준으로 회복된 개체는 확인되지 않았다.
- 애기장대 CBF1, CBF2, CBF3 유전자를 양성 대조군으로 활용하여 CBF homolog 후보 유전자를 탐색할 계획이며 각각의 유전자 발현 확인을 추가로 할 계획이다.



극지 이끼의 CBF homolog 후보 유전자 일시적 발현 후 저온 스트레스 처리하여 luminescence 측정(좌측) 및 유전자 삽입 확인 결과(우측)

- 신규 극한 환경 적응 남극 식물 유용 유전자 탐색 및 신규 유전자 발굴을 위해 극지 이끼의 광합성 관련 유전자들을 후보로 선정했다. (PaLHCA1, PaLHCA3, PaPSAG1 그리고 PaPETA)
- 광합성 관련 유전자들은 각각 과발현 벡터에 클로닝 되어 애기장대에 일시적으로 과발현시켜 다양한 스트레스 조건 하에서 광합성 효율을 비교했다.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1. 연구개발 목표 및 주요 연구 결과

남극 산술이끼 plastocyanin 유전자 기능 작물 확인 및 활용 그리고 신규 남극 식물 유래 유용 유전자 발굴

연구 내용	연구 결과
환경스트레스 관련 남극 산술이끼와 애기장대 plastocyanin 과발현체 표현형 비교 분석 및 남극 산술이끼 plastocyanin의 우수기능 활성화 부위 매핑	- PaPC 과발현체가 AtPC 과발현체에 비해서 높은 염스트레스 저항성을 가지고 있음 - PaPC 과발현체의 염스트레스 저항성은 PaPC 과발현체의 높은 이온 스트레스와 삼투 스트레스에 대해 내성에 기인한 것으로 보임 - PaPC 활성화 부위 도입 유전자 기능 검정 시스템 구축을 위해 담배잎을 이용한 광합성 활성 비교 시스템을 구축함 - PaPC와 AtPC 서열 비교 및 단백질 구조 모델링 후 우수기능 부여 아미노산 후보 부위 확정함
남극 산술이끼 plastocyanin의 우수기능부여 아미노산/신규 부위 치환 PC 유전자 제작 및 기능 검정	- PaPC 우수기능 부여 아미노산 부위 치환 PC 과발현 벡터 및 과발현 식물체 제작 - PC 기능 검정 시스템 활용 광합성 기능 및 스트레스 조건에서 아미노산 치환 PC기능 검증을 통해, PaPC 우수 아미노산 치환 PC의 기능 활성화 확정
PaPC 우수기능 부여 아미노산 치환 PC 유전자 교정 및 PaMBF1c 활성 부위 도입 AtMBF1c 교정	- 남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 아미노산 기반 애기장대 plastocyanin 유전자 교정 전략 수립하고, CRISPR/Cas9 매개 Homology Directed Repair 유도 벡터 제작함 - 남극 산술이끼 plastocyanin 우수기능 아미노산 치환 유도 HDR 벡터 형질전환체 제작함 - 생식세포 특이 프로모터 (AtRPS5A) 기반 prime editing 벡터 제작함 - PaPC 및 PaMBF1c 우수기능 아미노산 치환 교정체 선별을 수행함
신규 극한 환경 적응 남극 식물 유용유전자 탐색	- 남극 식물 유용유전자 대량 탐색 시스템 확립함 - Luminescence 기반 저온 신호전달 남극 식물 유용유전자 후보를 탐색함 - 광합성 효율 기반 남극 식물 유용유전자 기능 분석하고 우수기능 후보 유전자를 탐색함

2. 연구 개발 목표 달성도

성과목표	세부목표	달성 중요 내용	달성도 (%)
남극 산술이끼 plastocyanin 유전자 기능 작물 확인 및 활용	환경스트레스 관련 남극 산술이끼와 애기장대 plastocyanin 과발현체 표현형 비교 분석	- PaPC 과발현체의 높은 염스트레스 저항성 확인 - PaPC 과발현체의 높은 이온 스트레스와 삼투 스트레스에 대해 내성 확인	100
	남극 산술이끼 plastocyanin의 신규 우수기능 부여 부위 확정	- 남극 산술이끼 plastocyanin의 신규 우수기능 부여 주요 아미노산 잔기 확정	100
	남극 산술이끼 plastocyanin의 우수기능부여 아미노산/신규 부위 치환 PC 유전자 제작 및 기능 검정	- 남극 산술이끼 plastocyanin의 우수기능 부여 아미노산 치환 작물 유전자 제작의 성공 - 남극 산술이끼 plastocyanin의 우수기능 부여 아미노산 치환 PC의 높은 염스트레스 저항성 확정	100
	우수기능 부여 아미노산 치환 PC 유전자 및 MBF1c 유전자 교정체 탐색	- 우수기능 부여 아미노산 plastocyanin 유전자 치환 (HDR) 벡터 및 prime editing 벡터 제작 및 형질전환체 확보 성공 - 우수기능 부여 아미노산 PC 및 MBF1c 유전자 교정체 탐색	100
신규 남극식물유래 유용유전자 발굴	신규 극한 환경 적응 유용유전자 탐색 대상 유전자군 확정 및 라이브러리 제작	- 신규 극한 환경 적응 유용 광합성 및 저온 신호전달 유전자 탐색 대상 유전자군 확정 및 식물 벡터 라이브러리 제작의 성공	100
	유전자 활성 검정 이미징 시스템을 이용한 신규 극한 환경 적응 유용유전자 탐색	- 이미징 시스템을 이용한 저온신호 전달 우수 유전자 활성 검정 스크리닝 기법 확립 및 수행완료 - 남극식물 광합성 유전자 중 우수 광합성 유전자 후보 확보	100

제 5 장 연구개발결과와 활용계획

현 시점의 연구 개발 결과는 여건이 허락하는 경우, 향후 아래와 같은 추진전략 및 체계, 연구개발 목표와 연구내용으로 극지이끼의 유용 유전자 활용 및 신규 유용 유전자를 발굴하여 논문 및 특허화 등의 후속 조치를 진행을 계획하고 있다.

1. 추진전략 및 체계



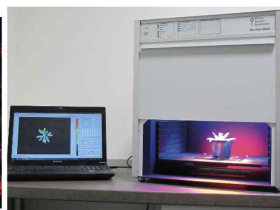
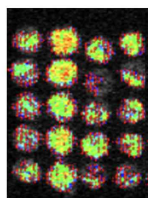
2. 연구개발 목표 및 연구내용

가. 목표

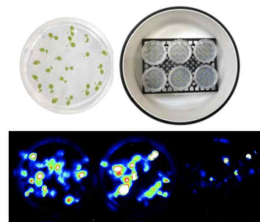
신규 남극식물유래 유용 유전자를 발굴한다.

나. 연구내용 요약

본 연구 과정에서 확립된 (1) 광합성 FluorCam Imaging System 기반 광합성 활성화 유전자 탐색 시스템과 (2) 저온신호전달 Luminescence Imaging System 기반 저온 저항성 강화 유전자 탐색 시스템으로 신규 남극식물유래 유용 유전자를 신속, 대량 발굴한다.



FluorCam Imaging System



Luminescence Imaging System

신규 유용유전자 발굴을 위한 Transient Expression system 및 광합성 Imaging System

3. 활용계획

가. 학술적 활용

- (1) 발굴된 남극 식물 유전자의 구조와 기능에 대한 연구를 통해 남극 식물 유전자 우수 기능성을 탐구하고 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.
- Jadidi, O., Etminan, A., Azizi-Nezhad, R., Ebrahimi, A., & Pour-Aboughadareh, A. (2022). Physiological and molecular responses of barley genotypes to salinity stress. *Genes*, 13(11), 2040.

- 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.
- Vu, T. V., Nguyen, N. T., Kim, J., Song, Y. J., Nguyen, T. H., & Kim, J. Y. (2024). Optimized dicot prime editing enables heritable desired edits in tomato and *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 10(10), 1502-1513.

Yolcu, S., Alavilli, H., Lee, B.-h.(2020) Natural Genetic Resources from Diverse Plants to Improve Abiotic StressTolerance in Plants. Int J Mol Sci. 21(22):8567. doi: 10.3390/ijms21228567.

