

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001392-01

비메발론산 터핀 생합성 유전자
과발현을 통한 식물 바이오매스 증대

Increased Biomass Production through Overexpression of
Genes of Non-mevalonic Acid Pathway

서울대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “바이오매스에 관한 연구” 과제(세부과제 “비메탈론산 터핀 생합성 유전자 과발현을 통한 식물 바이오매스 증대에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2012년 4월 9일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 김수연

세부연구책임자 : 김수연

연 구 원 : 강민경

연 구 원 : 권문혁

연 구 원 : 김연복

연 구 원 : 김진희

요 약 문

I. 제 목

비메발론산 터핀 생합성 유전자 과발현을 통한 식물 바이오매스 증대

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

가. 포플러에 비메발론 경로(또는 methylerythritol phosphate 경로) 중 세벌이 존재하는 은행 isopentenyl diphosphate synthase(IDS) 유전자를 과발현하여, 이들이 바이오매스 증진에 기여하는 기능의 차이를 확립한다.

나. IDS 과발현이 포플러, 애기장대, 담배의 isoprene 화합물의 함량에 미치는 영향을 확인한다.

다. IDS 과발현이 isoprene 화합물의 생합성유전자 발현에 미치는 영향을 확인한다.

라. IDS 과발현이 poplar의 성장 (biomass) 증진에 관여하는 메카니즘을 확인한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 화석 탄소원이 고갈됨에 따라 biomass가 중요한 대체물로서 주목 받고 있다.

나. Biomass는 지속가능한 재생자원이므로 green economy에서 중요하다.

다. Biomass 생산을 위하여 유전자 변형 생물을 이용하는 것은 유전자의 무차별적 확산 우려로 제한되고 있다. 그러나 암그루만을 이용한 유전자 변형 poplar는 사막화 방지가 중요한 과제인 중국에서 잘 받아들여지고 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발의 내용

가. 형질 전환이 확립된 poplar에 은행 IDS 유전자들을 과발현하여 정유생산과 건물 중의 biomass를 증대시키는지 확인한다.

나. 이들 유전자가 biomass를 증대시키는 메카니즘을 애기장대와 담배를 이용하여 규명한다.

2. 연구개발의 범위

가. 형질 전환체 poplar 확립

나. 형질 전환체 작물의 특성 규명

IV. 연구개발결과

1. 세 별의 은행 IDS 상동 유전자 GbIDS1, GbIDS2, GbIDS2-1을 poplar에 형질 전환하여 GbIDS1 유전자가 과발현된 형질전환체만이 식물체로 분화하였다. GbIDS2를 과발현한 poplar는 shooting은 되었으나 발근이 이루어지지 않았고, GbIDS2-1의 경우에는 캘러스 유도 후 shooting이 되지 않았다.
2. GbIDS1 형질전환체 poplar의 경우 wild type에 비해 길이가 길며 잎의 수가 많았다.
3. GbIDS1 형질전환체에서 wild type poplar에 비하여 chlorophyll과 carotenoid 함량이 증가하고 이는 광합성 효율의 증가로 나타났다.
4. GbIDS1 형질전환체 poplar와 wild type poplar의 지베렐린 및 터펜 관련 생합성 유전자의 전사 수준을 측정한 결과 형질전환체에서 지베렐린 형성에 관여하는 Kaurene synthase(KS)와 GA20 oxidase(GA20ox)의 전사수준이 지베렐린 분해에 관여하는 GA2 oxidase(GA2ox)의 전사수준보다 10배 이상 높아 지베렐린 합성이 촉진되는 것을 확인 할 수 있었다.

또한, 포플러의 잎에서 발산되는 isoprene의 생합성 유전자인 Isoprene synthase(ISPS)와 carotenoid 생합성의 주요 조절효소인 phytoene synthase(PSY)의 경우에도 전사수준이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

5. 모델 식물인 담배에서 biomass를 증대시키는 유전자는 GbIDS2 형질전환체였다.
6. GbIDS2 형질 전환 담배에서도 포플러 형질전환체와 마찬가지로 광합성효율, chlorophyll 함량 및 carotenoid 함량이 증가되었다.
7. 애기장대에서 GbIDS1 과발현체는 대조식물에 비하여 추대시기가 약 5일 촉진되었다. 개화의 촉진은 개화 촉진에 관여하는 유전자 CO와 SOC1의 전사가 촉진되고 개화제지에 관여하는 FLC의 전사가 저해되는 것에 기인하였다.
8. 애기장대를 이용하여 GbIDS1과 2의 promoter 특성을 GUS 단백질의 발현으로 비교한 결과 각 promoter가 식물체내에서 매우 다른 발현 양상을 나타냄을 관찰 할 수 있었다. GbIDS1 프로모터가 도입 된 애기장대 식물체는 뿌리를 제외한 대부분의 부위에서 GUS 유전자가 강하게 발현 되었고, 이와 대조적으로 GbIDS2 프로모터가 도입 된 애기장대 식물체는 주로 분열조직과 node, 그리고 뿌리에서 약하게 발현됨을 볼 수 있었다.

9. 은행 IDS 유전자의 promoter가 도입된 애기장대에 호르몬 처리를 하여 GUS activity를 측정
결과 각 프로모터별, 조직별, 시기별로 activity가 영향을 받음을 확인 할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 포플러에서 형질전환체 계통을 육성하여 포장실험에서 바이오매스의 증대를 확인하고
품종화한다.
2. 다른 경제 작물에서 바이오매스의 증대를 확인하고 고수확 품종의 육성에 이용할 가
능성을 확인한다.
3. 상기 결과는 바이오매스 증대에 관련된 특허와 개화시기 촉진에 대한 특허로 출원 중
에 있다.
4. 상기 결과는 국내학회와 해외학회에 각 1편씩 보고되었고 SCI(E) 학술지에 투고할 예
정으로 세편의 논문을 작성 중이다.

SUMMARY

I. Title

Increased biomass production through overexpression of genes of non-mevalonic acid pathway

II. Purpose of the Research

1. Aims

- (1) Overexpression of three Ginkgo IDS (isopentenyl diphosphate synthase) genes in poplar to elucidate the function of each isogene.
- (2) Assess how overexpression of GbIDS in poplar, Arabidopsis, and tobacco affects transcription of downstream genes.
- (3) Assess how the above-mentioned overexpression affects biomass production of poplar.

2. Justification of the Proposed Research

- (1) Biomass is regarded as an important source of carbon as fossil carbon resources becomes depleted.
- (2) Biomass is sustainable, renewable bioresource that could play important role in green economy.
- (3) Use of transgenic plant as biomass is currently restricted because of possible gene pollution in the environment. However, clever use of male-sterility plant renders transgenic plant practical.

III. Scope of Research

1. Scope of Research

- (1) Confirm increase of biomass of poplar overexpressing Ginkgo IDS.
- (2) Assess mechanism of biomass increase by using model plants.

2. Extent of the Research

- (1) Establishing transgenic poplar
- (2) Characterize the transgeneic plants.

IV. Results

1. Only GbIDS1-overexpressing poplar transgenic was viable. GbIDS2 transgenic was able to make shoots, but failed to form roots. GbIDS2-1 transgenic failed to develop shoots from calli.
2. GbIDS1-overexpressing poplar cuttings grow faster with more leaves compared to the wild type.
3. GbIDS1 overexpressing poplar had higher content of chlorophyll and carotenoid in the leaves which led to enhanced photosynthetic efficiency.
4. GbIDS1 overexpressing poplar had higher level of kaurene synthase and GA20 oxidase transcripts while GA2 oxidase transcript level remained unchanged. This would result in higher gibberellin in the transgenic. At the same time, isoprene synthase and phytoene synthase transcription also increased, which explains increased carotenoid content in the transgenic.
5. GbIDS2 overexpressing tobacco plant was constructed and found grow taller.
6. Tobacco GbIDS2 transgenic also had higher carotenoid and chlorophyll level which resulted in enhanced photosynthesis efficiency.
7. In the case of GbIDS1 overexpressing Arabidopsis, earlier bolting by 5 days was observed. Enhanced transcription of CO and SOC1 and down regulation of FLC was consistent with promotion of flowering.
8. Role of each GbIDS was assessed by promoter analysis in Arabidopsis. The promoter-driven GUS expression showed that GbIDS1pro caused expression of GUS throughout the plant except for roots. However, GbIDS2pro specifically expressed GUS in young tissues and roots.
9. Treatment of plant hormones to IDSpro-harboring Arabidopsis showed different pattern of effect between kinds of promoters and organs.

V. Utilization the Results

1. Practical poplar line that can be applied in the field test will be established.
2. Possible application of the IDS genes in other crops will be pursued.
3. The current reseach resulted in two Korean patent applications.
4. Three manuscripts are in preparation:

CONTENTS

Chapter 1. Purpose and Scope of the Research	9
Chapter 2. State of the Art	10
Chapter 3. Methods and Results	11
Chapter 4. Achievement and Contribution to the Related Field	41
Chapter 5. Implication and Application of the Results	42
Chapter 6. Overseas Research Information	43
Chapter 7. References	44

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	10
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	11
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	41
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	42
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	43
제 7 장	참고문헌	44

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발의 목적

1. 궁극적으로 IDS의 과다 발현으로 biomass 생산이 증진된 식물을 얻기 위하여,
 - 가. 포플러에 세벌의 은행의 상동 IDS 유전자를 과발현하여, biomass 생산 증진을 확인하고, 세 상동 유전자의 기능차이를 확립한다.
 - 나. IDS 과발현이 포플러와 모델식물에서 어떤 메카니즘으로 바이오매스를 증진하는지 알아 보기 위하여 과발현이 isoprenoid 화합물의 함량과 생합성 유전자의 전사에 어떠한 영향을 미치는지 알아본다.

2절. 연구개발의 필요성

1. 화석 탄소원이 고갈됨에 따라 biomass가 중요한 대체물로서 주목 받고 있다.
2. Biomass는 지속가능한 재생자원이므로 green economy에서 중요할 것이다 [1].
3. Biomass 생산을 위하여 유전자 변형 생물을 이용하는 것은 유전자의 무차별적 확산 우려로 제한되고 있다. 그러나 암그루만을 이용한 유전자 변형 poplar는 사막화 방지가 중요한 과제인 중국에서 잘 받아들여지고 있다. 본 실험에서는 유전자 확산 방지를 위하여 불임성인 삼배체 포플러를 이용한다.

3절. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발의 내용

- 가. 형질 전환이 확립된 poplar에 은행 IDS 유전자들을 과발현하여 정유생산과 건물 중의 biomass를 증대시키는지 확인한다.
 - 나. 이들 유전자가 biomass를 증대시키는 메카니즘을 애기장대와 담배를 이용하여 규명한다.

2. 연구개발의 범위

- 가. 형질 전환체 식물체 확립
- 나. 형질 전환체 작물의 특성 규명

2 장 국내외 기술개발 현황

1. Biomass란 주어진 면적에 존재하는 전체 생물체의 양이라 정의되고, 더욱 친근하게는 단위 면적당 생산되는 생물 또는 작물의 건물중이라고 나타낼 수 있다.
2. Biomass 증대를 통한 식물의 생산성 향상은 지구온난화를 방지하기 위하여 탄산가스의 저장 목적으로, 또는 bioenergy의 한 형태로서, 또는 탄소의 제공원으로서 현대 식물과학의 중요한 과제가 되었다. Biomass는 탄산가스를 흡수저장하였다가, 이용시에 다시 방출하므로 소위 “carbon-neutral energy”로서 주목받고 있다.
3. Biomass의 증대를 위한 다양한 시도들이 가능하나, 형질전환체를 이용하는 방법이 주목을 받고 있다. 식물의 생장은 본래적인 형질이외에도, 영양가나 주위의 환경인자에도 영향을 받으므로 biomass의 증진에는 이들 요인을 유리한 방향으로 이끌 수 있는 다양한 유전자가 이용된다. 식물의 생장에 관여하는 단일 유전자를 과발현하거나, 식물의 생장을 조절할 수 있는 전사인자를 조절하거나, 식물의 stress 방어에 관여하는 유전자를 과발현하여 식물의 biomass 증진에 이용할 수 있다. 최근의 일례로서 protein phosphatase C의 과발현을 통하여 biomass를 8-15% 증진시킬 수 있었다 (United States Patent Application 20120005787).
4. Methylerythritol phosphate (MEP) 경로는 터펜생합성 원료인 isoprene 단위를 공급하는 경로로서, 비교적 최근인 1990년대 후반에 들어와서야 밝혀진 기존의 mevalonate 경로와는 전혀 다른 경로를 취한다. 이 경로는 식물에서 plastid에 존재하며 thiamine의 생합성과 식물의 광합성에 필수 불가결한 chloroplast의 발달에 필요하다. MEP 경로의 유전자를 knock-out하면 식물은 백화현상이 일어나 결국 죽게 된다. 그러나 MEP 경로의 주요 유전자인 DXS나 DXR를 과발현하면 엽록소와 카로틴의 함량이 증가한다고 알려져 있다.
5. 은행에서는 특이하게 MEP 경로의 마지막 유전자인 IDS가 세벌 존재하며, 이들 각각의 기능은 IDS1이 household 기능을, IDS2가 이차대사에 관련된 기능을 수행하는 것이 제안되어 있을 뿐 명확하지 않다.
6. MEP 경로 유전자를 미생물에서 과발현하면 미생물의 생장에 나쁜 영향을 미치는 경우가 많은데, 이는 과도한 MEP 경로 중간산물의 축적에 기인한다고 알려져 있다. 그러나 IDS는 MEP 경로의 마지막 단계를 촉매하기 때문에 이 효소가 과발현되더라도 생성물인 isopentenyl diphosphate (IPP)와 dimethylallyl diphosphate (DMAPP)는 terpene 최종산물로 쉽게 전환되므로 생물에 대한 피해는 그다지 크지 않을 것으로 예상된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절. 실험 재료 및 방법

가. 식물 재료 및 생장 조건

(1) 포플러

본 실험에서 사용된 포플러 식물체는 삼배체인 *Populus alba* × *glandulosa* BH1형으로 임업연구원의 수목 유전자원과로부터 얻었다. WPM (woody plant medium: WPM salt, WPM 비타민, Zeatin 10 mM, Naphthaleneacetic acid 1.0 mM, 6-Benzylaminopurine 0.1 mM) (Lloyd and McCown,1981)에서 Agrobacterium과 함께 줄기 부분을 형광등 아래에서 26°C에서 배양하고, 배양된 식물체를 SIM 배지(shoot induction media:1/2 MS, 2% sucrose, and 0.8% agar와 RIM(root induction medium: MS, 3% sucrose, agarose 1.5%, 2,4-D 10 mM, Naphthaleneacetic acid 1.0 mM, Benzylaminopurine 0.1 mM)로 순차적으로 옮기고 형광등 아래에서 25°C, 60% 상대습도에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 식물체를 화분으로 옮기고 7일 간격으로 물을 공급하였다.

(2) 담배

본 실험에 사용된 담배 식물체(*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*)는 상토나 1/2 MS 고체 배지(pH 5.7)에서 23°C, 60% 습도, 16/8 hr 광조건의 생육상에서 키웠다. 상기 배지에서 담배 식물체를 얻기 위해 종자를 70% ethanol (1분)과 2% NaClO (5분)에서 소독을 하고 물로 잘 헹군 후 물기를 제거한 후 1/2 MS 고체 배지(vitamins를 포함한 MS salt 2.2g/L, sucrose 15g/L, MES monohydrate 0.5g/L, agar 8g/L pH 5.7)에 파종하였다.

(3) 애기장대

본 실험에 사용된 애기장대 식물체는 야생종인 Col-0 ecotype (Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA; stock number CS3176)을 사용하였고 종자를 70%(v/v) 에탄올 (15분)과 100%(v/v) 에탄올 (washing 3번)로 소독하고 말린 후 1/2 MS 고체 배지(pH 5.8)에 파종하였다. 2일간 4°C, 암상태를 거친 후 23°C, 16/8 hr 광조건의 식물 생장상에서 키운 후 아래 실험에 사용하였다.

나. 형질전환 식물체의 제작

(1) 벡터의 제작

pBI121 벡터(Clontech, USA)에 *Xba*와 *Bam*H1 인지 부위를 붙인 은행나무(*Ginkgo biloba*)에서 유래된 IDS1 cDNA(GbIDS1, DQ251631) 또는 IDS2 cDNA(GbIDS2, DQ251633) 또는 IDS2-1 cDNA(GbIDS2-1, DQ251632) open reading frame을 삽입하여 벡터 컨스트럭트를 제작하였다. 상기 IDS 유전자가 삽입된 pBI121 벡터의 개열지도를 Fig 1에 보였다.

구체적으로, IDS1, 2와 2-1 cDNA의 ORF(open reading frame)에서 5' 말단 또는 3'말단 각각에 *Xba*I 또는 *Bam*H1 제한 효소 부위를 삽입하기위하여 디자인한 프라이머 (Table 1)를 이용하여 94℃(5분) 1cycle, 94℃(1분), 60℃(1분) 72℃(1분)를 35cycle, 그리고 최종적으로 72℃(5분) 처리한 조건하에서 PCR로 증폭하고 증폭산물을 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S 프로모터가 있는 pBI121 벡터에 삽입하였다 (Fig. 1).

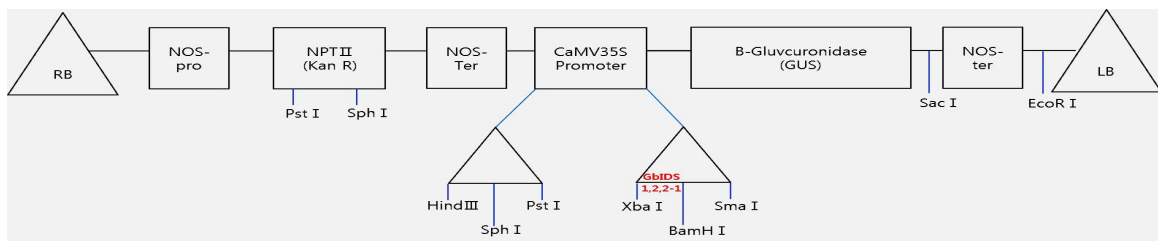


Fig. 1. pBI121-GbIDS vector construct

(2) 식물체 형질전환 방법

(가) 포플러

포플러를 무균상태로 5 mm 길이로 식물 줄기 마디 사이를 잘랐다. 잘려진 단편을 멸균된 칼로 상처를 내고 GbIDS1과 2 유전자가 삽입된 벡터가 삽입된 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404의 액체 배지에 20분 동안 담그고 멸균된 여지에 2번 정도 블랏한 다음 kanamycin 50 mg/l, cefotaxim 100 mg/l 이 함유된 CIM배지(MS medium, Sucrose 3%, agarose 1.5%, 2,4-D 10 mM, Naphthaleneacetic acid 1.0 mM, 6-Benzylaminopurine 0.1 mM)에 2일 동안 26℃로 빛을 조사하면서 배양하였다. 상기 이식체를 CIM2 배지(항생물질을 넣지 않은 CIM)에 빛을 조사하면서 21일 동안 추가 배양하고 2주마다 새로운 배지로 교환하였다. 21내지 28일이 경과한 후, 형질 전환된 캘러스를 SIM 배지(WPM medium, Zeatin 10mM, Naphthaleneacetic acid 1.0mM, 6-Benzylaminopurine 0.1 mM, Sucrose 3%)에 21일

동안 빛을 조사하면서 배양하고 2주마다 2차 배양하였다. 재생된 싹을 RIM배지(MS medium, Sucrose 3%, agarose 1.5%, CIM과 동일한 항생물질 조성)에서 카나마이신 저항성 있는 것만을 스크리닝하여 선택하였다. 35일 내지 40일 정도 후에, 뿌리가 형성된 싹을 화분으로 옮기고 폴리에틸렌 백을 덮어 높은 습도를 유지하고 3주 동안 25±1°C를 유지하였다. 3주일 경과 후, 상기 백에 구멍을 내고 상기 식물을 온실에 옮겼다.

(나) 담배

담배 잎의 끝을 7 × 7 mm 크기로 잘라내고 상기 잘려진 잎을 GbIDS2 컨스트럭트가 형질 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404의 액체 배지에 15분 동안 담그고, 살균한 필터 페이지에 붙인 후 공배양 배지(30 g/L sucrose, 2.0 mg/L 2,4-D, 및 70 mg/L putrescine, 및 7 g/L Agar를 함유한 MS medium)에서 25°C 암조건으로 배양하였다. 2일 동안 배양한 후, explant를 50 mg/L kanamycin 및 200 mg/L Timentin이 함유된 발아유도 배지(30 g/L sucrose, 2.0 mg/L 6-Benzylaminopurine, 5 mg/L silver nitrate, 및 7g/L Agar가 함유된 MS medium)로 옮긴 다음, 2주마다 배지를 교환하였다. 5주 후에 MS salts 및 vitamins(Duchefa, Netherlands), 30 g/L sucrose, 3 g/L Gelrite, 0.1 mg/L IBA (Indole-3-butyric acid), 50 mg/L kanamycin 및 200 mg/L Timentin이 함유된 뿌리유도 배지에 형질전환된 싹을 옮기고 이를 16시간 주기로 빛을 생장상에서 25±1°C에서 30일 동안 배양하였다. 배양 후, 형질전환된 묘목을 화분으로 옮기고 폴리에틸렌 백으로 덮어 높은 습도를 유지하도록 하고 25±1°C를 유지하여 1 주일 동안 생장상에 보관하였다. 1주일 경과 후, 상기 백에 구멍을 내고 상기 식물을 온실에 옮겼다.

(다) 애기장대

GbIDS 벡터 컨스트럭트를 *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1에 도입 후 floaral dipping 방법[2]을 사용하여 애기장대에 형질전환 하였다. 형질전환된 애기장대로부터 형질전환 4주 이후 수득한 종자를 50 ug/ml 카나마이신이 포함된 1/2 MS 배지 (비타민을 포함한 MS salt) sucrose 15g/L, MES monohydrate (Duchefa, Netherlands) plant agar 8g/L, pH 5.7에 파종하여 형질전환이 일차 확인된 애기장대를 이용하여 실험을 진행하였다.

다. 식물체의 형질전환 여부 확인

(1) 형질전환 식물의 Genomic DNA 추출

액체 질소를 넣어 곱게 간 식물체의 어린 잎 시료 1g에 500 μ l 2 \times CTAB (Cethyl trimethylammonium bromide) 완충액 (2% CTAB, 2% Polyvinyl pyrrolidone, 100 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 2M NaCl, 0.5g/L supermidine)와 2 μ l β -mercapthoethanol을 넣어 볼텍싱으로 잘 섞어 준 후 65 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하였다. 20분 동안 상온에서 식혀준 후 chloroform과 isomyl alcohol이 24 : 1로 혼합된 혼합액 500 μ l을 넣어 볼텍싱으로 잘 섞은 후 상온에서 15분간 5000rpm에서 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 튜브로 옮기고 0.5 ml의 이소프로판올을 넣어서 -20 $^{\circ}$ C에 30분에서 1시간 정도 넣어두고 5000 rpm, 10분간 상온에서 원심분리하여 상층액을 버리고 펠렛을 70% 에탄올로 가볍게 씻어낸 후 말렸다. 100 μ l TE(10mM Tris pH 8.0 and 1mM EDTA pH 8.0) 완충액에 녹이고 1 μ l의 RNAase와 50 μ l TE 버퍼를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후 10 μ l의 sodium acetate와 320 μ l의 에탄올을 넣어 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였다. 샘플을 5000rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 버리고 70% 에탄올로 가볍게 씻어 낸 후 말리고 50 μ l TE 버퍼에 녹여 genomic DNA를 얻었다.

(2) PCR을 통한 형질전환 여부 확인

은행 IDS 유전자의 ORF-PCR의 프라이머로 (Table 1) 94 $^{\circ}$ C(5분) 1cycle, 94 $^{\circ}$ C(1분), 60 $^{\circ}$ C(1분) 72 $^{\circ}$ C(1분) 35cycle, 72 $^{\circ}$ C(5분) 1 cycle의 조건하에서 PCR로 증폭하고, (PCR 조건 - 10 μ l gDNA(100ng), 0.5 μ l Takara Ex tag, 5 μ l dNTP, 5 μ l 10x buffer, 각각 1 μ l primer, 27.5 μ l distilled water) 증폭산물을 0.8% Agarose gel에 loading 하여 UV를 통하여 밴드를 확인하였다 (Fig. 2).

라. 형질전환 포플러의 전사수준 측정

(1) 식물체의 RNA 추출 및 cDNA 합성

액체 질소를 넣어 막자사발에서 1g의 식물체 잎을 곱게 갈았다. 곱게 갈아진 시료를 2ml 튜브에 담고 1ml의 TRIzol(Invitrogen)을 넣어 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양하였다. 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심분리한 후, 상층액을 새로운 튜브로 옮긴 후 동량의 chloroform을 넣고 30초 동

안 vortexing 하여 잘 섞어주고 12,000rpm, 4°C, 15분간 원심 분리하였다. 상정액을 새로운 튜브로 옮겨서 동량의 isopropanol, 1/2 용량의 0.8M sodium acetate와 1.2M sodium chloride를 한 번에 첨가하였다. 12,000rpm, 4°C, 10분간 원심 분리하여 상정액을 버리고 튜브에 남은 펠렛에 1ml의 75% 에탄올을 넣고 같은 조건에서 원심 분리 후 상정액을 제거하고 건조하였다. 50 μ l의 RNase-free water를 튜브에 넣어 pellet을 녹여 RNA를 준비하고, Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo, USA) 기기를 이용해 농도를 측정하였다. 2 μ g의 RNA에 2 μ l의 10 \times 버퍼, 1 μ l의 5Mm dNTP, 2 μ l의 10 μ M oligo (dT)₁₇프라이머, 1 μ l RNase 저해제(inhibitor), 1 μ l Omniscript reverse transcriptase(Qiagen)을 섞어 총 부피를 20 μ l로 맞추고 37°C에서 1시간 95°C에서 5분간을 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

(2) Quantitative real-time PCR (QRT-PCR)

(가) 포플러

형질전환된 포플러와 wild-type 포플러의 지베렐린 관련 유전자의 발현 수준 차이를 비교하기 위하여 KS(*Populus trichocarpa* ent-kaurene synthase; Genbank accession number, XM_002311250), GA2ox(*Populus trichocarpa* gibberellin 20-oxidase; Genbank accession number, XM_002322396), GA2ox 유전자(Genbank accession number, XM_002330540), isoprene synthase (*Populus alba* \times *Populus tremula* isoprene synthase; Genbank accession number: AJ294819)와 PSY (*Populus trichocarpa* phytoene synthase; Genebank accession number: XM_002306718)를 이용하였으며 각 유전자를 특이적으로 증폭하기 위하여 Table 1에 기재된 프라이머를 이용하였다 [3].

QRT-PCR은 Rotor-gene 2000 Real Time Amplification System (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) 기기로 SYBR Green PCR system (Takara)으로 수행하였다. 각 반응은 25 μ l의 2 \times master mix, 각 2 μ l (10 pmol)의 primer, 1 μ l cDNA(100ng), 20 μ l RNase-free water를 섞어 95°C (15분) 1 cycle, 95°C (40초)와 52°C (40초), 72°C (40초)의 40 cycle 조건에서 이루어졌다. 정량 분석(quantification standard)을 위하여, 포플러의 ubiquitin 추정 유전자(XM_002330540.1)을 이용하였으며 프라이머는 다음과 같이 제작하였다 (Table. 1).

Table 1. List of primers used in this experiment

Primer name	Forward primer	Reverse primer
GbIDS1(ORF)	5'-GGATCCAATGGCTTGCAGTTG TAGC-3'	5'-GGATCCTATGTGGCTGCAAGGC ATC-3'
GbIDS2(ORF)	5'-GGATCCAATGGCTCAAGCTTGT GC-3'	5'-GGATCCCGGGATCCCTACGCT-3'
GbIDS2-1(ORF)	5'-GGATCCAATGGCTAATGCTTGC CC-3'	5'-GGATCCTATGCTATTTGCAAAA CTTCTTCC-3'
RTGbIDS2	5'-CAAGCTTGTGCAGTATCAGGC- 3'	5'-CTCAGAATCCGCAGTAGTGGA-3'
RTAtCO	5'-CGGGTCTGCGAGTCATGTGA-3'	5'-GTGAGTAGTGGTCATGGAGCTG AA-3'
RTAtSOC1	5'-GAGCTGCAACAGATTGAGCAA CA-3'	5'-CGTCTCTACTTCAGAACTTGGG CTAC-3'
RTAtFLC	5'-GCATGGGTCGCTCTTCTCGT-3'	5'-CACAAGTTCAAGTAGCTCATAG TGTGAA-3'
RTPopKS	5'-TCGATCGGCATTTTAGGAAG-3'	5'-AGCTCCCGAATCCTTCAAAT-3'
RTPaGA20ox	5'-TTGGGTGATTTCTCTCTGG-3'	5'-TGGCAATTCGAAGAAGGTGT-3'
RTPaGA2ox	5'-ACACTTCTGGCCTGCAAATC-3'	5'-GCTGTTGGTCAAAACCCTGT-3'
RTPaISPS	5'-GGGGGAAAACATTCTTCCAT-3'	5'-GTTTTGAACCACGGCCAAAGT-3'
RTPaPSY	5'-ATGCATCACATATCACACCCAA A-3'	5'-CTCCTAGCATCTTCTCCAACATC TC-3'
RTPopUBQ	5'-CTCCAAAGTGAAAGGCCAGGA TG-3'	5'-ACTGTCAAAGCTCTTGGTGAG-3 ,

(나) 담배

QRT-PCR은 위와 동일한 기기로 수행하였다. 각 반응은 25 μ l의 2 \times master mix, 각 2 μ l (10 pmol)의 primer, 1 μ l cDNA(100ng), 20 μ l RNase-free water를 섞어 95 $^{\circ}$ C (15분) 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C (10초)와 60 $^{\circ}$ C (30초) 40 cycle 조건에서 수행하였다.

(다) 애기장대

QRT-PCR은 Rotor-gene 2000 기기로 SYBR Green PCR system (Takara)으로 수행하였다. 각 반응은 25 μ l의 2 \times master mix, 각 2 μ l (10 pmol)의 primer, 1 μ l cDNA(100ng), 20 μ l RNase-free water를 섞어 95 $^{\circ}$ C (15분) 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C (10초)와 60 $^{\circ}$ C (30초) 72 $^{\circ}$ C (30초) 40 cycle 조건에서 이루어졌다. 각각의 개화 유전자의 프라이머는 Table 1과 같이 제작하였다.

구체적으로 개화 관련 유전자는 SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1(SOC1; GenBank accession No. NM_130128), CONSTANS(CO; NM_001036810)와 FLOWERING LOCUS C (FLC; NM_001161231) 유전자 이다.

마. 형질 전환 식물체의 chlorophyll 및 carotenoid 함량 측정

최소 세 식물체의 잎을 묶어 한 시료로 하고, 세 반복으로 실험하였다. 발아후 15일된 애기장대나, 담배의 갓 펴진 잎 또는 화분으로 옮긴지 8주된 형질전환 포플러 식물체의 잎 1g을 막자사발에 넣고 액체질소를 넣어 곱게 갈아주었다. 50ml의 튜브에 시료를 담고 암 조건에서 40ml의 80% 아세톤을 튜브에 넣어 15~20분 정도 잘 섞어주었다. 4500rpm, 4°C, 15분 동안 원심 분리하여 상정액을 새 튜브로 옮겨주었다. 이 과정은 계속해서 암 조건 하에서 수행하였으며 분리된 상정액을 470, 645, 663 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 chlorophyll과 carotenoid 함량을 다음의 식을 통하여 계산하였다.

$$\text{Chl}_a \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{(12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{Chl}_b \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{(22.9 \times A_{645} - 4.86 \times A_{663}) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{Chl}_{a+b} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{(8.02 \times A_{663} + 20.20 \times A_{645}) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{Carotenoids} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{1000 \times A_{470} - 1.82 \times \text{Chl}_a - 85.02 \times \text{Chl}_b}{198}$$

바. 형질전환 식물체의 광합성량 측정

이식후 10주된 포플러의 갓펴진 잎과 12주된 담배의 갓펴진 잎에서 휴대용 광합성 측정기 (Li-Cor 6400, Li-Cor, Lincoln, NE)를 이용하여 광합성량을 측정하였고 광원은 Red/Blue LED (Li-Cor 6400-02B)이었다. 30분간의 $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광조사 후 엽온이 23°C, CO₂ 농도 $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$ 과 23 mmol mol^{-1} 조건에서 측정이 이루어졌다. 성장상 내의 광도는 $77.7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Li-250 A Light Meter USA)이었다.

사. 은행의 IDS 프로모터 특성 연구

(1) 프로모터 영역 분리 및 염기서열 분석

은행의 IDS1과 2의 프로모터 영역을 TAIL-PCR (Thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction)을 통하여 분리하였다. 50 μ l 반응 시 PCR의 조건은 1차로 100ng의 genomic DNA, 0.2 μ M gene-specific 프라이머, 5 μ l 4x AD 프라이머, 0.5 μ l Ex-Taq polymerase(1unit/0.2 μ l), 5 μ l 10x buffer, 3 μ l dNTP mix를 가하였다. 그리고 2차 반응 시에는 template로 gDNA 대신 1차 반응의 PCR product를 25배 희석하여 첨가 하고 3차 반응 시에는 2차 PCR product를 20배 희석하여 넣어주었다. 좀 더 자세한 PCR 조건과 프라이머 정보는 Table 2와 3에 정리하였다. GbIDS2-1는 약 800 bp를 얻었으며 실험이 진행중이다.

Table 2. Cycling conditions used for TAIL-PCR.

Reaction	Cycle no.	Thermal cycle condition
Primary	1	94°C (5 min)
	2-6	94°C (30 s), 62°C (1 min), 72°C (2.30 min)
	7	94°C (30 s), 25°C (3 min), ramping to 72°C over 3 min, 72°C (2.30 min)
	8-22	94 °C (30 s), 65 °C (1 min), 72 °C (2.30 min) 94 °C (30 s), 65 °C (1 min), 72 °C (2.30 min) 94 °C (30 s), 44 °C (1 min), 72 °C (2.30 min)
	23	72 °C (5 min)
Secondary	1-12	94 °C (30 s), 65 °C (1 min), 72 °C (2 min) 94 °C (30 s), 65 °C (1 min), 72 °C (2 min) 94 °C (30 s), 45 °C (1 min), 72 °C (2 min)
	13	72 °C (5 min)
Tertiary	1-20	94 °C (30 s), 45 °C (1 min), 72 °C (2 min)
	21	72 °C (5 min)

Table 3. Primers for TAIL-PCR

Primer		Sequence
gene-specific primer	GbIDS1-1	5'-AGGTTCTGAGCTGCATACCACAGCA-3'
	GbIDS1-2	5'-CTGTTTCGCAGTCCACATGGCAA-3'
	GbIDS1-3	5'-GGCCTTAGTATCAAACCTCCTCTGCATCTG-3'
	GbIDS2-1	5'-GTGAATGTGAAGCAAGGATGCCTGAT-3'
	GbIDS2-2	5'-CCATGGCACCGTGTATTACATACTCTCC-3'
	GbIDS2-3	5'-AAGTCTCCTTCTTGTGGCCGAACC-3'
promoter region specific primer	GbIDS1pro-1	5'-GCCACTTGGCGAGCTCTCCAA-3'
	GbIDS1pro-2	5'-CCATAATGCAAGATAGGCTCGGTCC-3'
	GbIDS1pro-3	5'-CAAATGTGTGCATTGGATGATGGAGAG-3'
	GbIDS2pro-1	5'-TTGTATACGGATACGTGTAGATAGTGGCG-3'
	GbIDS2pro-2	5'-GTGTGGTGCATAGTGTATACTCGTGGTAT-3'
	GbIDS2pro-3	5'-CGAAGTGACCAAGCTCGGAGCATC-3'
promoter primer	GbIDS1pro forward	5'-AAGCTTAGACAAATCTGCGTTGTT CA-3'
	GbIDS1pro reverse	5'-TCTAGACCAACCGGTTTATAGGAGGA-3'
	GbIDS2pro forward	5'-AAGCTTCATAAATAGTTAAAAACACCTCAA-3'
	GbIDS2pro reverse	5'-TCTAGAGGTTTCAGACAAACTAAACCCAA-3'
AD primer	(AD1)	5'-WGCNAGTNAGWANAAG-3'
	(AD2)	5'-AWGCANGNCWGANATA-3'
	(AD3)	5'-NGTCGASWGANAWGAA-3'
	(AD4)	5'-AGWGNAGWANCAWAGG-3'
	(AD5)	5'-GTNCGASWCANAWGTT-3'
	(AD6)	5'-TGWGNAGWANCASAGA-3'
	(AD7)	5'-WGTGNAGWANCANAGA-3'
	(AD8)	5'-NTCGASTWTSWGTT-3'

(2) GUS 염색 및 activity 측정

은행의 IDS promoter가 삽입된 형질전환 애기장대를 0.1% X-Gluc 용액에서 Jefferson의 논문방법으로 염색과 activity를 측정하였다 [4]. 식물 조직 내 발현의 정확한 위치를 확인하기 위하여 시행되었던 sectioning은 Spurr's resin kit를 이용하여 embedding 하였고 울트라 마이크로톰으로 잘라서 광학현미경으로 관찰하였다.

2절. 연구 결과

1. GbIDS1 형질전환 식물체 확보

가. 포플러

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법을 통하여 Table 4와 같이 Callus 유도부터 Pot로 이식 과정을 통하여 일차로 8개 라인의 GbIDS1 과발현 형질전환체를 확보하였다. GbIDS2 과발현 형질전환체는 shooting 까지는 낮은 수율로나마 가능하였으나, 거의 전부가 발근하지 않았고 발근한 1주도 pot로 이식한 후 성장이 중지되어 고사하였으므로 더 이상 실험할 수 없었다. 이후 IDS1 형질 전환체 획득을 시도하였다. ORF PCR을 통하여 포플러내로 삽입한 GbIDS1 유전자의 도입 여부를 확인하였고 8개의 line에서 ORF size(1425 bp)의 밴드를 확인하고 기본 데이터를 획득하였다 (Fig. 2a). 그러나 2차년도 겨울에 임업연구원의 수원소재 수목유전자원과 GMO 포장으로 이식된 1차 형질전환 포플러 식물체는 흑한과 과시비로 인하여 모두 사멸하여 3차 년도에 2차 형질전환을 시행하였다. 2차 형질전환에서는 GbIDS1과 은행의 또 다른 IDS 유전자인 GbIDS2-1의 형질전환도 병행하였다. 이 과정을 통하여 GbIDS1 형질전환체 9개 라인을 얻었으나, GbIDS2-1의 경우에는 shooting이 되지 않아 완전히 분화된 형질 전환체를 얻을 수 없었다.

이 결과에서 각각의 GbIDS는 촉매하는 화학반응은 동일하지만 poplar 내에서의 발현되었을 때 각 효소의 행동은 다르다는 것을 알 수 있었다. 이들 유전자가 분리된 식물인 은행에서는 GbIDS1은 뿌리를 제외한 식물체 전체에 나타나고, GbIDS2는 뿌리에서 주로 발현되는 것으로 알려져 있으며, 아래에 상술될 프로모터 연구에서도 GbIDS1은 뿌리를 제외한 식물체 전체와 GbIDS2는 뿌리와 생장조직 일부에서만 발현되는 것으로 나타났다 (아래를 보시오). 이 것은 각 동위효소가 고유한 기능을 가지고 있으며, 유전자 전사 수준과 발현 수준 뿐만 아니라 효소 수준에서도 조절을 받는 것에 기인한다고 생각된다. 그러므로 poplar에서 각각의 GbIDS 동위효소 과발현 식물의 표현형 차이는 각 효소 수준의 조절에 기인할 가능성을 보이고 있다. 또한 이전의 발표된 논문에서도 은행의 IDS 유전자들간의 역할이 다르다는 것을 밝힌 바 있다 [5].

나. 담배

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법을 통하여 GbIDS2 형질전환체를 얻었으며 ORF PCR을 통하여 유전자 도입여부를 확인하였다. 형질전환 된 담배의 경우 약 1400 bp의 증폭 산물이 제조되었으며, 이는 GbIDS ORF 의 크기가 1425bp임을 고려하면 IDS2 유전자가 삽입되어 형질전환 되었음을 알 수 있다 (Fig. 2b).

다. 애기장대

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법을 통하여 GbIDS2 형질전환체를 얻었으며 ORF PCR을 통하여 유전자 도입여부를 확인하였다. 형질전환 된 애기장대의 경우 약 1400 bp의 증폭 산물이 제조되어 IDS2 유전자가 삽입되어 형질전환 되었음을 알 수 있다 (Fig. 2c).

Table 4. Summary of poplar transformation.

Gene	<i>GbIDS1</i>	<i>GbIDS2</i>
Callus induction rate	40%	11%
Shoot induction rate	80%	50%
Root induction rate	65%	5%
Pot survival rate	99%	33.3%
Number of transformation trial	4	5
Number of Putative lines	21	5
Number of confirmed lines	8	0

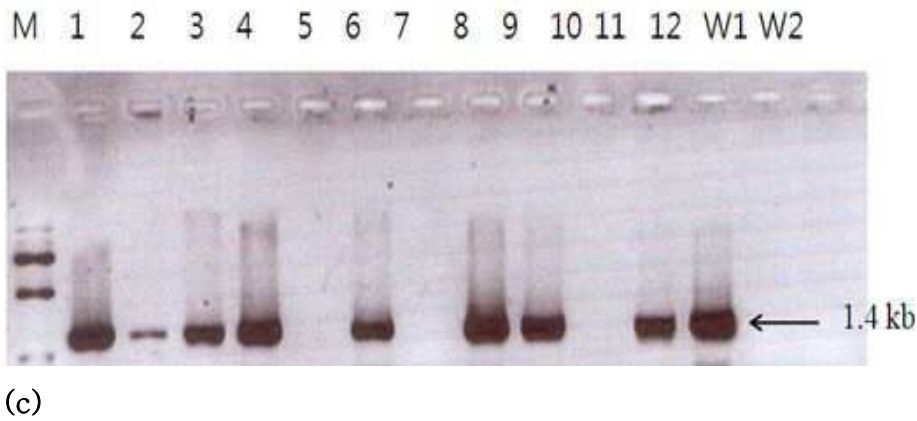
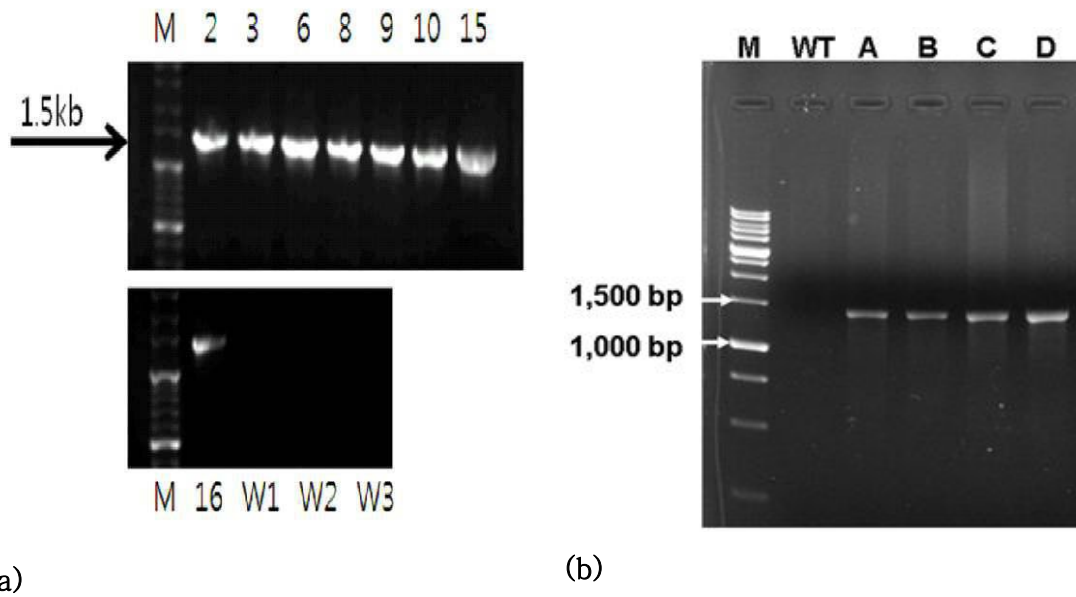


Fig. 2. ORF PCR of GbIDS overexpression plants.

(a) poplar (b) tobacco (c) Arabidopsis

2. GbIDS1 과발현이 식물 성장에 미치는 영향

가. 성장 양상 비교

(1) 포플러

형질전환 포플러 유묘를 pot로 이식 2주와 8주 경과 후에 성장 양상을 비교한 결과 형질전환 포플러가 길이 및 잎의 수가 많아 성장 속도가 wild type에 비해 매우 우수한 것을 확인하였다 (Fig. 3). 온실조건에서의 성장과 실외에서의 성장이 다른 경우가 많기 때문에 이 식물체들은 포장 실험을 위하여 야외 포장에 이식되었지만 전술한 바와 같이 흑한과 시비 문

제로 인하여 3차년도에 포장 실험 데이터를 얻는 데에 실패하였다. 따라서 다시 형질 전환체 식물을 만들어 내기 위하여 2차 형질전환 실험에 착수하여 현재 9개의 라인을 확립하였다.

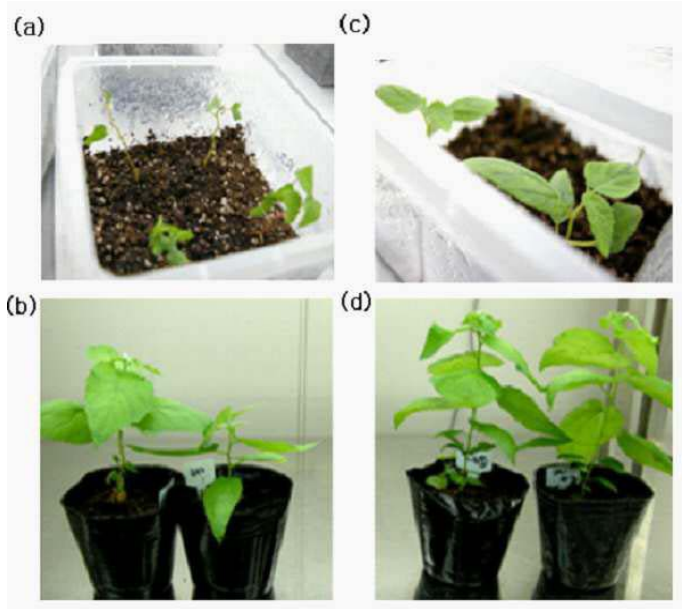


Fig. 3. Phenotype of wild type (a,b) and GbIDS1 overexpressing polpar (c, d).

Upper panel is two weeks after potting and lower panel is eight weeks after potting.

(2) 담배

GbIDS2 형질전환체 담배와 wild-type 담배의 길이 성장 정도를 비교한 결과, 개화에 이른 상태에서 형질전환된 담배는 96cm, wild type 담배는 68cm로, 형질전환체가 약 40% 정도 더 성장하였음을 알 수 있다 (Fig. 4).

(3) 애기장대

GbIDS2 형질전환 애기장대 식물체는 wild type 식물체에 비해, 추대시 형성된 잎 수가 2매 많고 (Table 5), 개화 시기가 약 5일 빠르고 (Fig. 5) 화서 줄기도 길어져 생장이 더 빠르게 일어났다.



Fig. 4. Phenotype of GbIDS2 overexpression transgenic and the wild type tobacco.

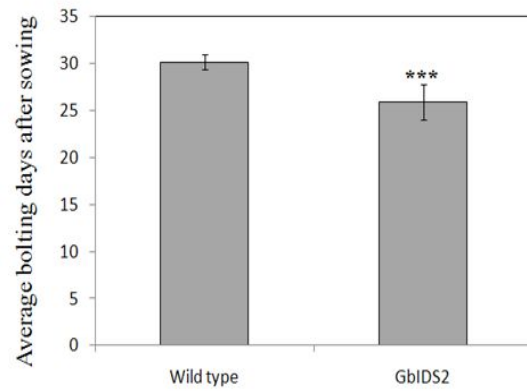


Figure 5. Bolting of GbIDS2 overexpression *Arabidopsis thaliana*.

Table 5. Number of leaves of GbIDS2 overexpression *A. thaliana* at bolting.

Genotype	Total leaf number at bolting	Bolting days after Sowing
GbIDS2	11.15±1.27	20.45
Wild type	9.13±1.64	30.23

한편 추대(bolting) 후 형질전환 식물체의 화서 줄기의 길이를 3주 동안 관찰하였다. 마지막 3주째 형질전환 식물체의 길이는 26cm로 wild type에 비해 4cm가 길었다 (Fig. 6).

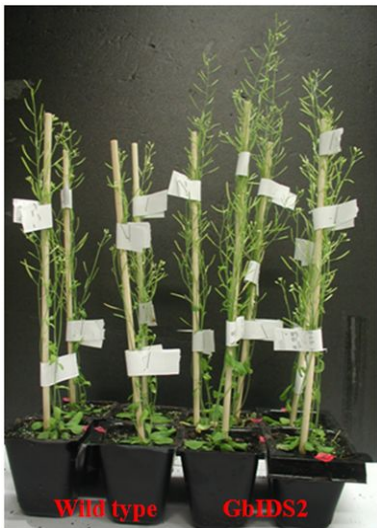


Fig. 6. Phenotype of *GbIDS2* overexpression transgenic and wild type *Arabidopsis thaliana*.

나. 앞에서 chlorophyll 및 carotenoid 함량

(1) 포플러

(가) 1차 형질 전환체 제조

GbIDS1 형질전환 포플러와 wild type 포플러에서 carotenoid와 chlorophyll 함량을 측정하였다. 그 결과 형질전환 포플러에서 wild type 대비 carotenoid는 23%, 총 chlorophyll 함량은 22% (chlorophyll a: 23%, chlorophyll b: 21% 증가) 증가 하였다 (Fig. 7).

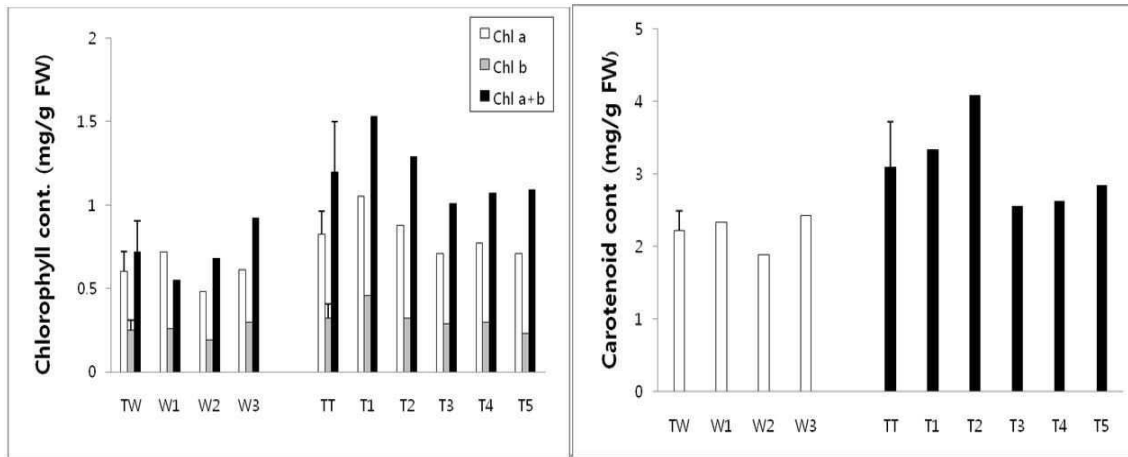
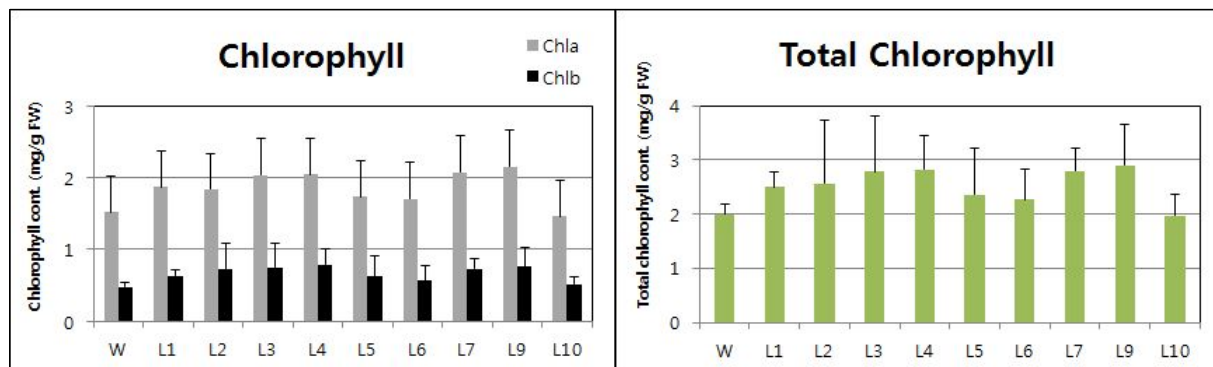


Fig. 7. Chlorophyll and carotenoid contents in the leaves of GbIDS1 overexpression poplar. TW, average of total wild-type (W1-W3); TT, average of overexpression poplar (T1-T5).

(나) 2차 형질 전환체

GbIDS1 형질전환 포플러와 Wild type 포플러에서 carotenoid와 chlorophyll 함량을 측정하였다. 그 결과 일차 형질전환체와 유사하게 형질전환 포플러에서 wild type 대비 총 chlorophyll 함량은 28% (chlorophyll a: 24%, chlorophyll b: 41% 증가) 하였고, carotenoid는 21% 증가 하였다 (Fig. 6).



(a)

(b)

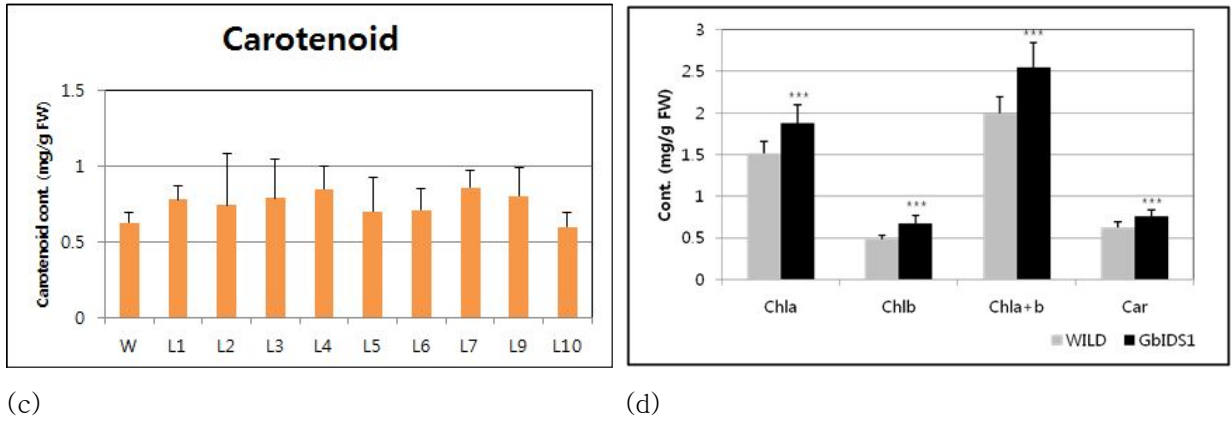


Fig. 8. Chlorophyll and carotenoid contents in the leaves of GbIDS1 overexpressing poplar. W, wild-type; L1-L10, GbIDS1 overexpression poplar. (a) Chlorophyll a and b contents of each line. (b) Total chlorophyll content of each line. (c) Carotenoid content of each line. (d) Combined average of chlorophylls and carotenoid contents. *** $P \leq 0.01$

(2) 담배

형질 전환된 담배의 chlorophyll a와 b함량은 wild type 담배보다 각각 19% 와 7% 높았고, 카로티노이드 함량은 18% 높았다 (Fig. 9).

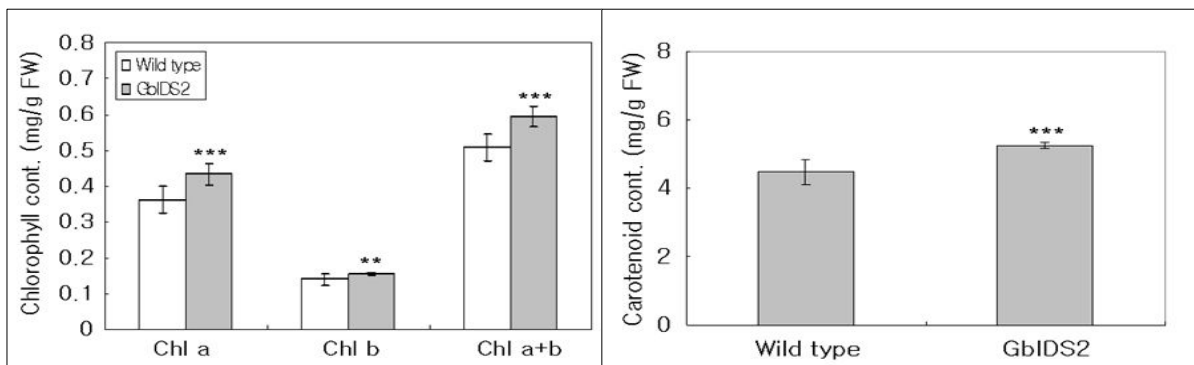


Fig. 9. Chlorophyll and carotenoid contents in wild type and GbIDS2 overexpression tobacco. *** $P \leq 0.01$, ** $P \leq 0.05$ (n=5).

(3) 애기장대

형질전환 식물체와 wild type 식물체의 carotenoid와 chlorophyll 함량을 분석한 결과 carotenoid는 28% 증가하였고, chlorophyll은 총 50% (chlorophyll a 48%, chlorophyll b

45% 증가) 증가하였다 (Fig. 10).

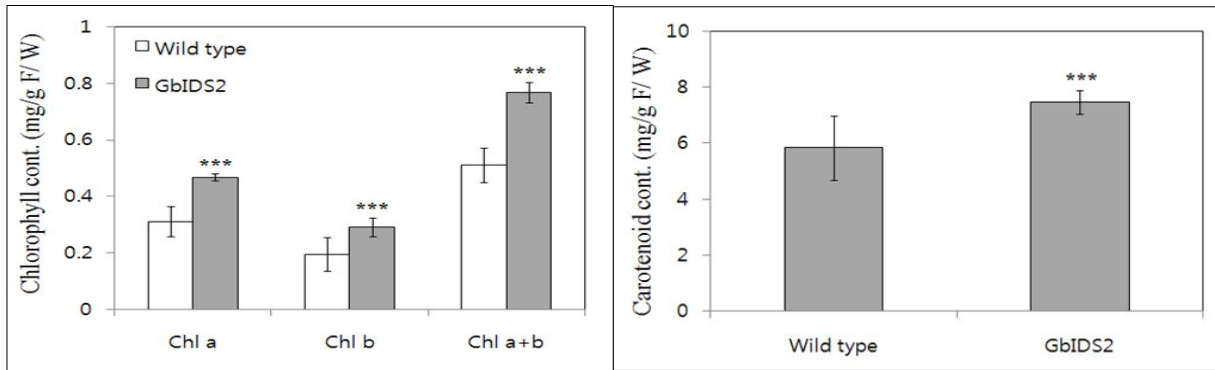


Fig. 10. Chlorophyll and carotenoid contents of wild type and *GbIDS2* over-expression *Arabidopsis* plants. *** $P < 0.001$ (n=7).

다. 광합성을 측정

(1) 포플러

IDS로 형질전환된 식물에서 chlorophyll과 carotenoid 함량이 증가한다는 위의 발견은 이 함량 증가가 결국 광합성율을 증대시킬 것이라는 추측을 가능하게 하였다. 광합성율을 측정한 결과, 형질전환 식물체에는 $3.3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, wild type에서는 $2.3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 으로 형질전환체에서 약 50% 광합성율이 높게 측정되어, 광합성 색소의 증가가 결국 광합성율의 제고로 이어짐을 확인하였다 (Fig. 11).

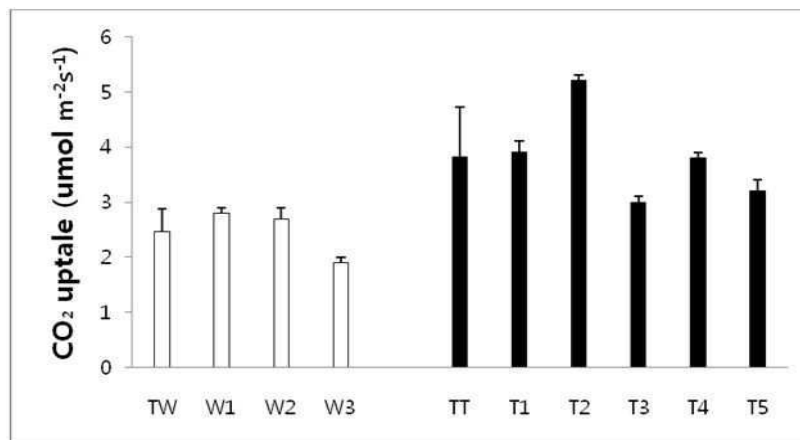


Fig. 11. Enhanced photosynthesis of *GbIDS1* over-expression poplar. TW, average of total wild-type lines (W1-W3); TT, average of

GbIDS1 overexpression poplar lines (T1-T5).

(2) 담배

GbIDS2로 형질전환한 담배 (F1)와 wild type 담배에서 광합성률을 측정한 결과 형질전환 식물체에는 $2.3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, wild type에서는 $1.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 으로 형질전환체에서 약 50% 광합성효율이 높은 것으로 측정되었다 (Fig. 12).

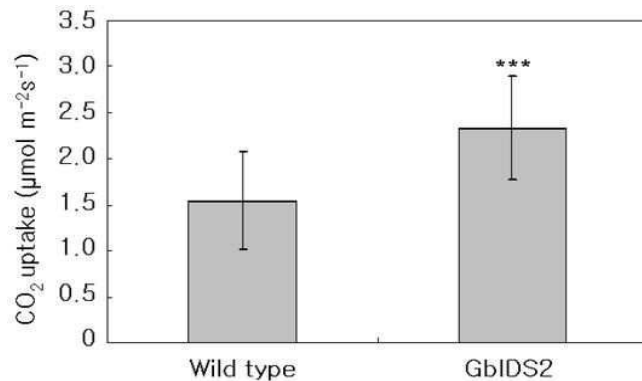


Fig. 12. Photosynthetic efficiency of GbIDS1 overexpression *N. tabacum*.

라. GbIDS1 형질전환 포플러의 지베렐린 및 터펜 관련 유전자의 전사 수준 측정

담배에서 형질전환체의 초장이 더 길다는 관찰은 terpene 대사물의 하나인 식물 호르몬 gibberellin의 합성을 촉진한 결과일 것이라는 가정을 세우게 하였다. 형질전환된 포플러의 지베렐린 관련 유전자의 전사 수준을 측정하여, gibberellin의 합성을 추정하였다 (Fig. 13). 그 결과 형질전환 포플러에서 지베렐린 형성에 관여하는 Kaurene synthase(KS)와 GA20 oxidase(GA20ox)의 전사수준이 wild type에 비해 각각 150%, 100% 증가하였고, 그 반면 지베렐린 분해에 관여하는 GA 2 oxidase(GA2ox)의 전사수준은 단지 9% 정도만이 증가하여 형질전환 포플러에서 분해보다는 합성에 관여하는 유전자의 수준이 10배 이상 높아져 상대적으로 지베릴린 합성이 촉진되는 것을 확인할 수 있었다.

또한, poplar의 자기 방어에 관계한다고 알려진 isoprene 생합성 유전자인 Isoprene synthase(ISPS)의 전사수준도 150% 이상 증가하여 형질전환 포플러의 휘발성 터펜인 isoprene 생합성이 증가함을 확인 하였다 (Fig 14). Carotenoid 생합성의 주요 조절효소인 phytoene synthase (PSY)의 경우에는 분명히 전사 수준이 증가하였으나 개체별 차이가 매우 컸다 (Fig. 14).

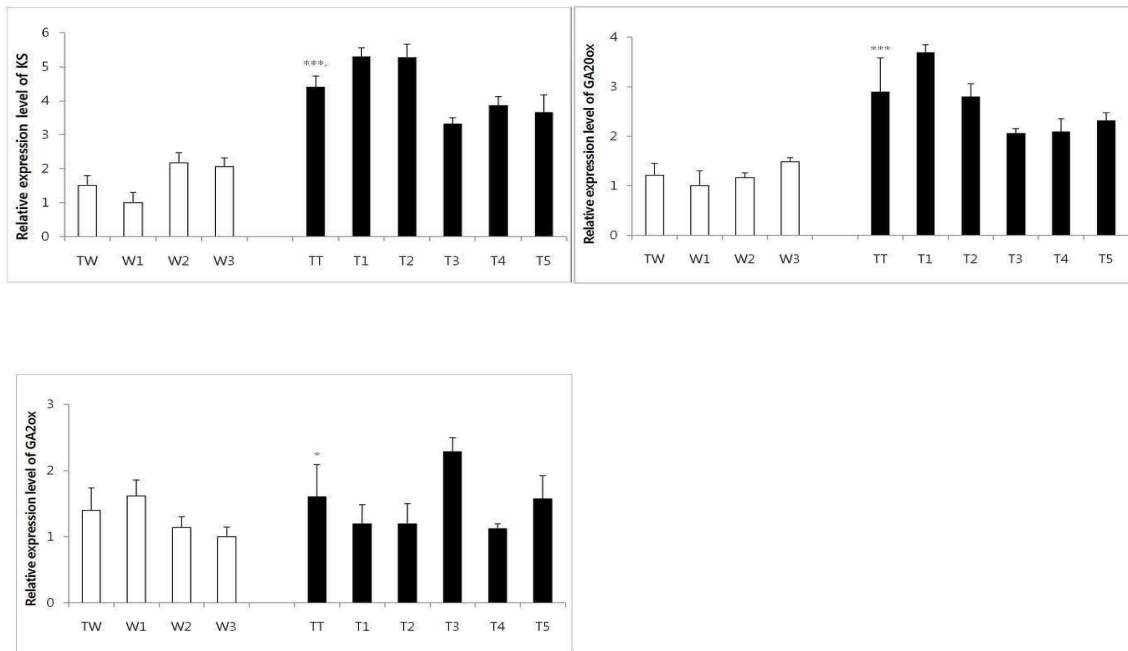


Fig. 13. Levels of gene transcripts involved in gibberellin biosynthesis and degradation. Upper left, kaurene synthase; Upper right, GA 20 oxidase; Lower, GA 2 oxidase. TW, average of total wild-type (W1-W3); TT, average of overexpression poplar (T1-T5).

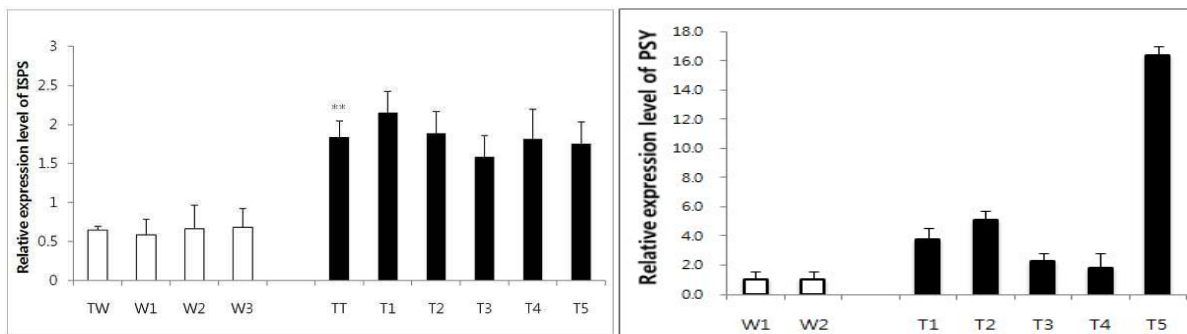


Fig. 14. Transcript level of isoprene synthase (left) and phytoene synthase (right) of GbIDS1 overexpression poplar.

마. 형질전환 담배의 부위별 GbIDS2 유전자의 전사 수준 측정

GbIDS2 과발현 형질전환체 담배에서 각 기관별로 유전자의 전사 수준 (Fig. 15)을 측정 한 결과 다른 기관에 비해 뿌리에서 좀 더 발현이 많이 일어남을 확인 할 수 있었다. 하지만 통계적 유의성은 보이지 않았고, 이는 과발현을 위해 쓰여진 벡터가 35S 프로모터를 가지고 있어 특정 조직에 특이성을

가지고 있지 않았기 때문이라 생각되어진다.

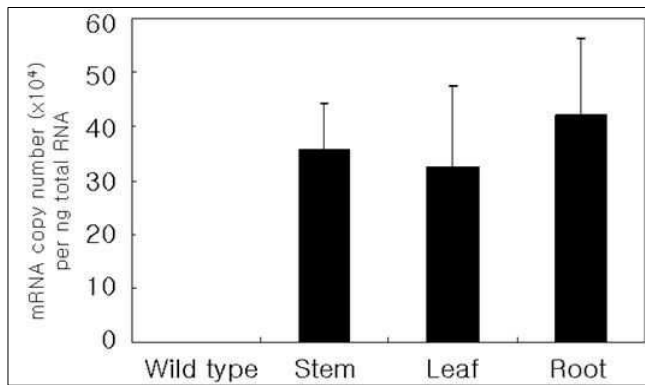


Fig 15. Transcription pattern of GbIDS2 in transgenic tobacco organs. Only wild-type leaves were compared for reference.

바. 형질전환 담배의 다이터펜(diterpene) 함량 분석

형질전환 담배와 wild type 담배 식물체의 다이터펜 함량을 GC-MS를 통하여 확인 하였다. 그 결과 형질전환체의 잎에서 10배 이상 높은 다이터펜 함량을 확인 할 수 있었다 (Fig. 16).

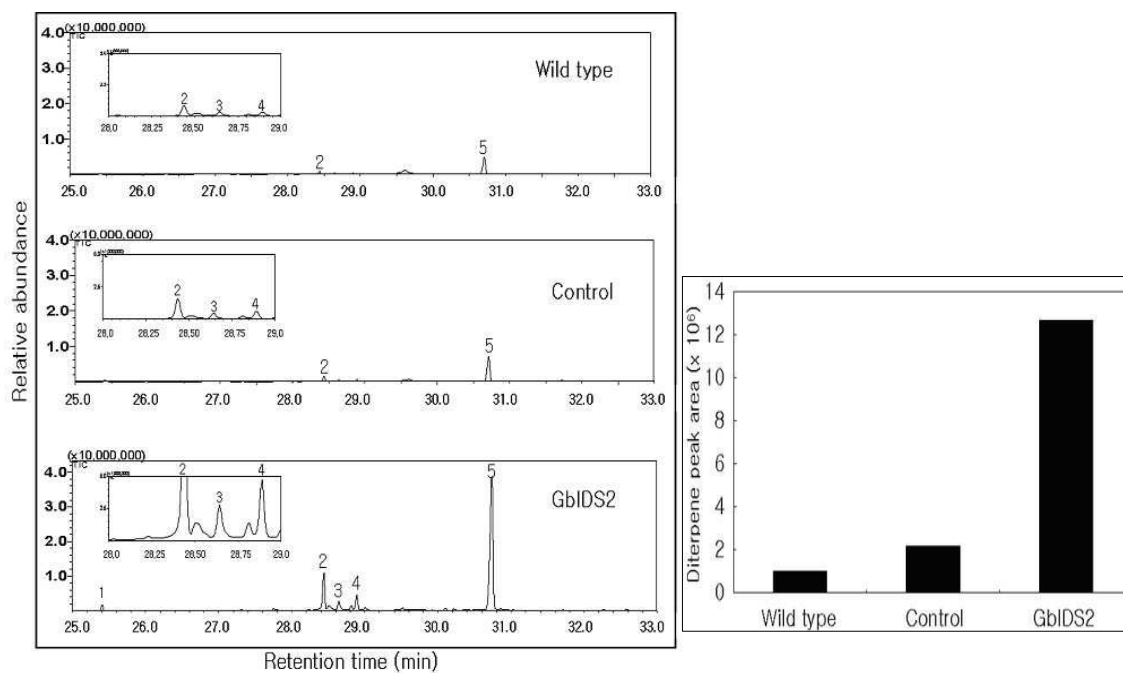


Fig. 16. Analysis of diterpenes in *N. tabacum* over-expressing GbIDS2. Neophytadiene (1), divatrienediol (2), thunbergol (3) divatrienediol (4),

duvatrienediol (5). Right panel represents total diterpenoid contents.

바. 형질전환 애기장대의 개화 시기 관련 유전자의 전사수준 측정

개화 유도과 관련된 유전자인 CO의 경우 형질전환 애기장대는 대조군에 비하여 24% 정도 높게 발현됨을 알 수 있으며, 주요 floral integrator인 SOC1 유전자의 경우 57% 정도 높게 발현됨을 알 수 있다. 또한 개화 억제자인 FLC 발현은 억제됨을 알 수 있다 (Fig. 17).

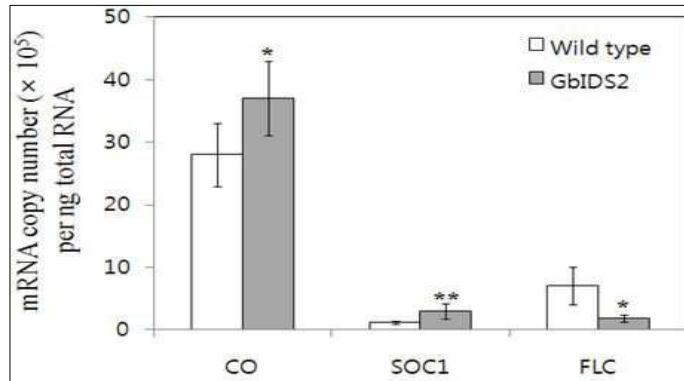


Fig. 17. Transcription levels of CO, SOC1, and FLC in wild type and GbIDS2 overexpression Arabidopsis plants.

사. 애기장대를 이용한 GbIDS1과 GbIDS2의 promoter 특성 비교

GbIDS1 또는 GbIDS2 유전자를 과발현하였을 때 형질전환된 포플러와 담배는 F1 수준에서 wild type에 비해 성장속도가 빠르고 식물체의 크기도 커졌음을 확인하였다. 하지만 각 isogene이 한 식물에서 동일한 효과를 내는 것은 아니었다. 담배는 GbIDS2 유전자가 식물체내로 도입되면서 생장이 촉진되었지만 homozygote인 F2는 정상적인 발아가 불가능하였다 (자료 보이지 않음). 포플러의 경우 GbIDS1은 정상적인 생육을 보였지만, GbIDS2 유전자 과발현체는 식물의 생장이 억제되고 발근이 되지 않아 결국 모두 죽어버려 형질전환체를 얻을 수가 없었다. 이를 통하여 두 유전자 모두 식물체에서 식물 성장을 촉진하는 역할을 도왔지만 식물에 따라 발현 양상이 다를 수 있었다. 이와 같은 사실은 GbIDS1과 GbIDS2가 기원 식물인 은행에서 다른 역할을 수행하여, 유전자 수준에서의 조절 뿐 만이 아니라 효소수준에서의 조절도 받고 있음을 시사한다. 이에 따라 원 식물에서 IDS 상동유전자들이 어떻게 작용하는지 살펴보기 위하여, 이들의 promoter에 의한 GUS 단백질의 발현을 애기장대에서 분석하여 보았다.

(1) 프로모터 서열 분석

은행으로부터 분리된 IDS 유전자들의 프로모터 영역의 염기서열(Figs. 18 & 19)을 PlantCARE 데이터베이스(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)를 이용하여 분석을 하고, 각 프로모터 영역에 존재하는 cis-element들을 Table 6과 7에 나열하였다.

TGAAACTTT

-1260 TCTAGACAAATCTGCGTTGTTACATAAAATT**CAAAATCATCAT**GATTGTTTTTATTAAGT
-1200 GATGTTGCACACAATGCTTTTTGAGGTTTACCAAGCTTACCATAGCTACAATTATG**CTCTTG**
-1140 **TGCTCCGGGGTGCAATGGTTACTAAAAATACCGACAT**TTTTCATCTCCATGTGCAAAGGCC
-1080 TCATTTAATGGATCCAATTAACAACGCTGTTATTTAATGCAAACACTCATCATCGTAGCT
-1020 TGAATAAAGCAAATAAATAAGTTGGCAAGGCCAACTTAACAAATGCGTGTATTGAGTG
-960 CCACATCATTAAGTTTAAACATAATGTTTGACAGAAAGTATGTATACTTACCGAGT**ATACA**
-900 **AAT**TTTTTTTTTAAAGACAAAATCATTTGAAAATCATTTTTGTTAACAAGGATGCATGTAG
-840 ATGGGATAATAGACTCCATGTGATATAAAGAAGACAAAAGGGAG**GTCATA**AAAAGTCAACG
-780 CAAAATATTGAAAGTTGAATATAACAATTTGTATACTCGCACAAATACTCATTTAGGAAT
-720 GAGTATACACCAAAGGTGCCAAAACTCTCCATCATCCAATGCACACATTTGTTAAACCT
-660 TGAAGGGTTGGTAAATGTGTTTTGCACTTGGACCGAGCCTATCTTGCATTATGGATAGAAC
-600 **CACGTT**GAAAACCTTCATTGGTTGTGCTTAATTTCTAAGGCTGTTTGCATTATCTCTTT
-540 TTTGCTTAATATTTCCCCGGATAATTACCAAATAAC**AAAACATTTAG**TTCCACAAATGGT
-480 GAAATTGGGTTGT**ATTAAT**CAGCTACAAAATTGCCAATCTTGAAAACATG**GGTCCATA**
-420 AGTTTTTTGATCAATTCTAATGAATGGATAGAGATTTTTCAGCTTCTTTGGAGAGCT**GCC**
-360 **AAGTGGCA**ACTTCTCAATCATAACGAAAGAACAAAACCAGTCACTACGCTCGGACGCA
-300 AAGACAAAATGTAC**CACGACT**GTGATTTGATCCATGACTGCAG**CAACTGG**TTTGATTCTA
-240 TCCACATATTGCACCATTGGATAAATTCAGATTGCATATTTAAATGTGGCTCCTAAGTTC
-180 ATTGTTTTGCGAGTTTCTGATGAATGTTAATATTGGGAACACCTGAAGCAGCTAGGCTCT
-120 **CAAT**CTTTTAG**TATA**ACCATTTGAATCGGCAAATACTATCGAGTGATTC**TGGTTTT**CA
-60 AGCACTGTAACCTCAGATTGCCATA**CAAAATAAATCA**CTTTGATTTCTCCTTGTCTCCTA
TAAACCGGTTGGATGGCTTGCAGTTGTAGCTTTGCTGTGGTATGCAGCTCAGAACCT

Fig. 18. Sequence of the *GbIDS1* promoter region and its putative cis-elements.

The translation start site (ATG) is in bold and the transcription initiation site is in underlined boldface. Numbers indicate the position relative to the transcription initiation site. The putative TATA box, CAAT box and other important putative cis-elements are shown in bold italics.

Table 6. Putative *cis*-acting regulatory motifs identified in the *GbIDS1* promoter region by *in silico* analysis search against PlantCARE database.

Cis-elements	Motif and position	Putative function
ACE	-1369GACACATATG-1360 -504AAAACATTTA-495	involved in light responsiveness
ARE	-69TGGTTT-64 -253TGGTTT-248	essential for anaerobic induction
AuxRR-core	-428GGTCCAT-422	auxin responsive element
Box 4	-467ATTAAT-462	involved in light responsiveness
DRE	-1112TACCGACAT-1106	involved in dehydration, low-temperature, salt stress
G-Box	-599CACGTT-594 -363GCCAAGTGGCA-353 -286CACGAC-281	light responsive element
I-box	-1146CTCTTGTGCT-1137	light responsive element
MBS	-257CAACTG-252	MYB binding site involved in drought-inducibility
Skn-1_motif	-1460GTCAT-1456 -796GTCAT-792	required for endosperm expression
Circadian	-1229CAAAATCATC-1220 -35CAAATAAATC-26	involved in circadian control
ATGCAAAT motif	-905ATACAAAT-898 -38ATACAAAT-31	associated to the TGAGTCA motif

-1422 CATAAATAGTTAAAAACACCTCAAAGTAATAAGAATAATGT
 -1380 ATATAAATTTGCCAACAAATAGTTGAAAAGTGTGGGCAAATTTTGAAGCCTTTGTACTA
 -1320 AGGTAGAGGGAAAAAAGGTAACCTAACGTGTAACCTCACCATGGCACATAGATTGTGATTT
 -1260 CCTCATAGGGATAGGCCCATATAGGTGTTGTGTCC**TTTCAAACA TCTCCCT**AGAAAAAAT
 -1200 GAAGGAAAGAAAAGAAATTCTCCATGACTTGTGACTACCCCTTGTAAGTCCAA**GTGCC**
 -1140 **AATCATTCAAA**CATTGACACTTTGATCACAAAAAAGTGTGCTTTTGGTTGTGATGTGT
 -1080 CCTTGCCCTTATGAAATACAAACAATGCATATGTAAAGTGTGTTAAATACAAACAATACA
 -1020 TATGTAAAGTGTGAAATGTTAAGTAATGATGCACAAATTTAATTGTTCCCTTTGGAGTA
 -960 TTTTTTGAATGATATATATCTATAGAAATTATATGATGTATGTATAGCTATTA AAAAAG
 -900 GTGGTCTTTGAATATTTGTGCTATGATGAGTAGGCTTGACTACATCATGATAATAC**ATTA**
 -840 **ATGGCATGCACTGC**ACTTATGGAACTCATATCTCCATT**GCCACTTACACT**CACCCTTTT
 -780 ATTGATGAGTATAACCACTTAAGTAAGTTGTGTTGCATTATATATGTATCACATTGACTT
 -720 **GTCAT**CGTACTTAAGAAAATAATGACCCTAAACACGGCTCGAATAAAAACCTTCTAA**ATT**
 -660 **AATTGCCTAATTGTG**GAAAAACCTAGTAATGCATAATTCTTTATATATTGAGTGGTGAGC
 -600 AACAACTCTTCTATAAAATTTAAATTTAGATCCACTAAAGTTGCCATAGGGAGAGTATCC
 -540 TTTAATAATGCCCAAGGTGTGGAATGCAAGATATTA AAAAAAAAAAAAAAAAAACTTTTTGGCT
 -480 TCATAGCATAAGGGGTATTCAACAATAGAACTATATTACCGCCTCACTA**ATTGAAATCAA**
 -420 GGTTAGAG**GTCAT**TAACCAACAATATGATGCTCAAATTTGGACTCATTTGATGAAAGACAA
 -360 AACAAAGAATCGAACACA**AACGAC**AAAATCCTCAAATCTTAAAAGATGCTCCGAGCTTGG
 -300 TCACTTCGAAAAGTATAATTTATATTCATTATCAAGCAAATTATTTGTCACCAATCCATA
 -240 CTATTCATCTTCAAAAATAATACCACGAGTATACACTATGCACCACACTTTACCATCCAT
 -180 TGGGTCTGATTTATATCAAGCGTATATACTATATATGTATCAA**GTCATACGCCACT**ATCT
 -120 **ACACGTATCCGTATA****CAATTGATTGACC**ATGTGG**GTCAT**TTCAGAAGC**TTTTA**AATATTT
 -60 ATGCCCCGACGCCTTCAAATTTGCCGGTTCTGAAACTTTTCTTGTTGGGTTTTCTTCT**TA**
 AATTTATGTAGTTCACATTGGTGCTCTTGAAGAATTGGGTTTAGTTTGTCTGAAACC**ATG**
 GCTCAAGCTTGTGCAGTATCAGGCATCCTTGCTTCACATT**CAC**

Fig. 19. Complete sequence of the *GbIDS2* promoter region and its putative *cis*-elements. The translation start site (ATG) is in bold and the transcription initiation site is in underlined boldface. Numbers indicate the position relative to the transcription initiation site. The putative TATA box, CAAT box and other important putative *cis*-elements are shown in bold italics.

Table 7. Putative *cis*-acting regulatory motifs identified in the *GbIDS2* promoter region by *in silico* analysis search against PlantCARE database.

Cis-elements	Motif and position	Putative function
ABRE	-801GCCACTTACA-792	involved in the abscisic acid responsiveness
AT-rich element	-431ATTGAAATCAA-421	binding site of AT-rich DNA binding protein (ATBP-1)
CAT-box	-130GCCACT-125	meristem expression
G-Box	-119CACGTA-114	involved in light responsiveness
Skin-1_motif	-720GTCAT-716 -413GTCAT-409 -137GTCAT-133 -86GTCAT-82	required for endosperm expression
TGA-element	-342AACGAC-337	auxin-responsive element
TCCC-motif	-1216TCTCCCT-1210	light responsive element
W-box	-98TTGACC-93	fungal elicitor responsive element
MNF1	-1146GTGCCCAATCATTCAAA-1130	light responsive element
Box I	-1225TTTCAAA-1219	light responsive element
Box 4	-844ATTAAT-840 -663ATTAAT-659	light responsive element

(2) 프로모터의 발현 패턴

이 두 유전자의 프로모터를 GUS가 발현되는 벡터 내로 도입하여 식물체에서 발현을 확인하였을 때 매우 다른 발현 양상을 관찰 할 수 있었다. *GbIDS1* 프로모터가 도입된 애기장대 식물체는 뿌리를 제외한 대부분의 부위에서 GUS 유전자가 강하게 발현 되어 모든 부위가 염색 되어진 것을 확인 할 수 있다 (Fig. 20). 대조적으로 *GbIDS2* 프로모터가 도입 된 애기장대 식물체는 뿌리의 발현이 보였고, 주로 분열 조직과 node에서 약하게 발현됨을 볼 수 있었다 (Fig. 22).

좀 더 정확한 발현 위치를 확인 해 보기 위하여 시행된 섹션 실험 결과(Figs. 21 & 23)를 살펴보면 *IDS1*은 광합성이 일어나는 잎의 조직 전체나 줄기의 표피 조직에서 발현 되었으며, *IDS2*는 식물 표피보다는 광합성이 일어나지 않는 줄기나 뿌리에서 내부에서 발현됨을 확인 할 수 있다.

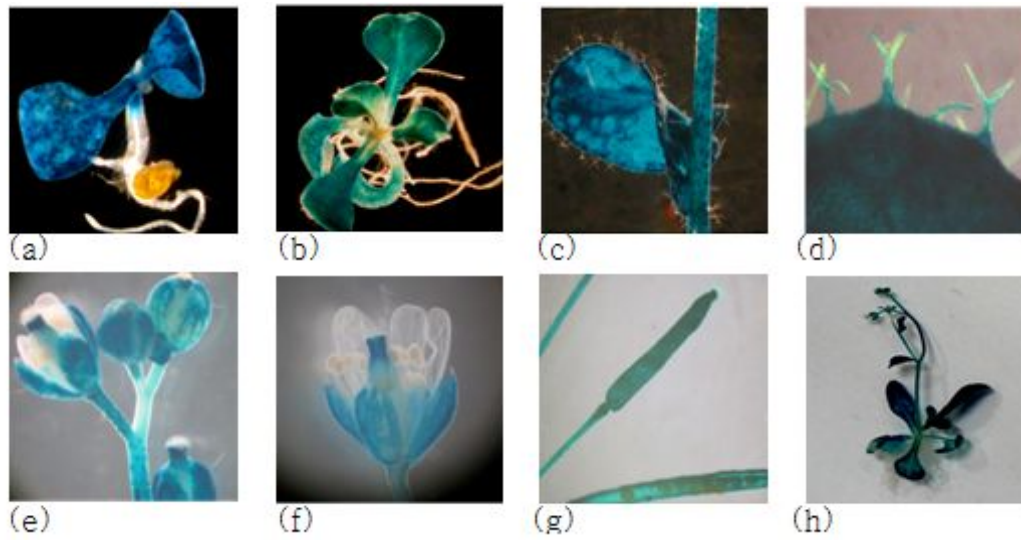
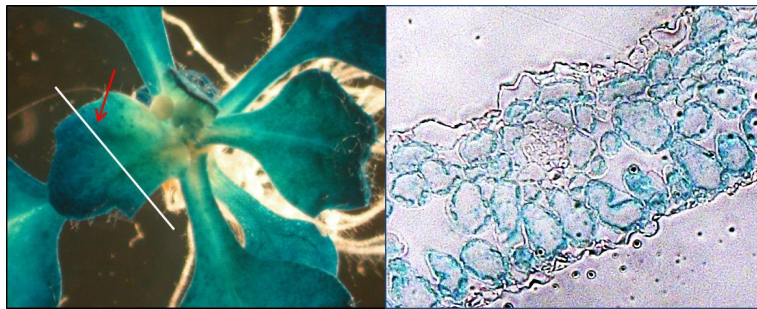
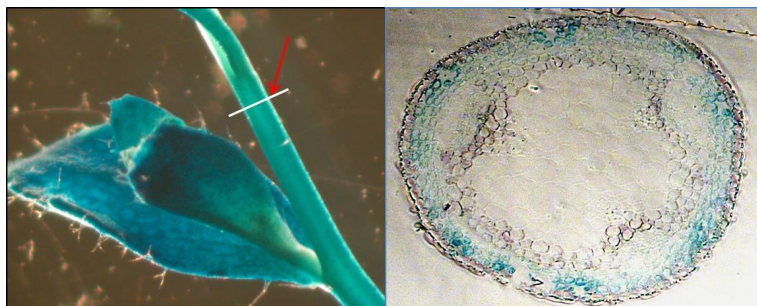


Fig. 20. *GbIDS1*pro-driven GUS expression in *Arabidopsis thaliana*.
 (a) cotyledons (b) four rosette leaves (c) cauline stem and leaf
 (d) trichome (e) flower buds (f) flower (g) silique (h) 6-week-old plant



(a)



(b)

Fig. 21. Expression of the *pGbIDS1*-driven GUS activity in the tissue cross-section of transgenic *Arabidopsis* plants. (a) leaf (b) stem

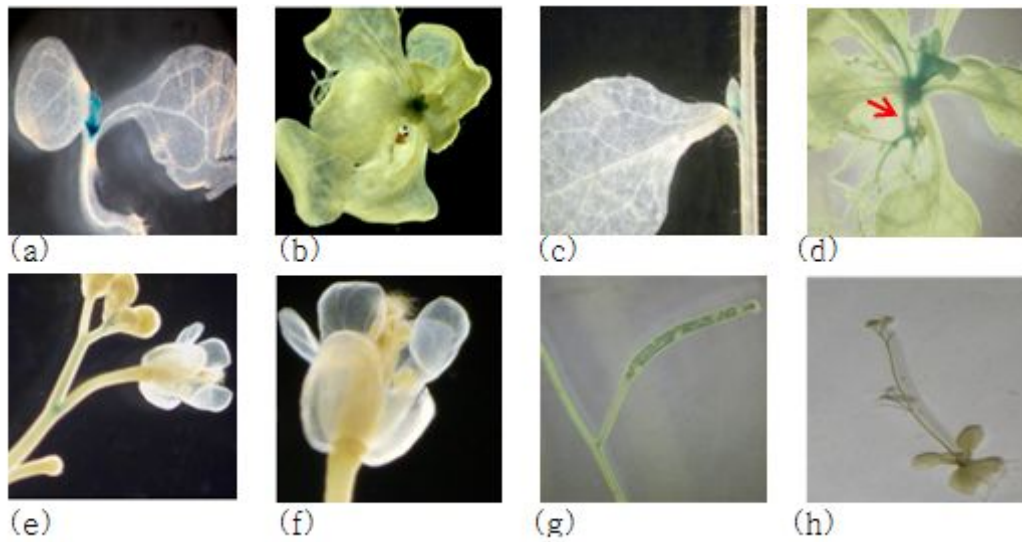


Fig. 22. *GbIDS2pro*-driven GUS expression in *Arabidopsis thaliana*. (a) cotyledons (b) first flower bud visible (c) cauline stem and leaf (d) root : red arrow (e) flower bud and stem (f) flower (g) silique (h) 6-week-old plant

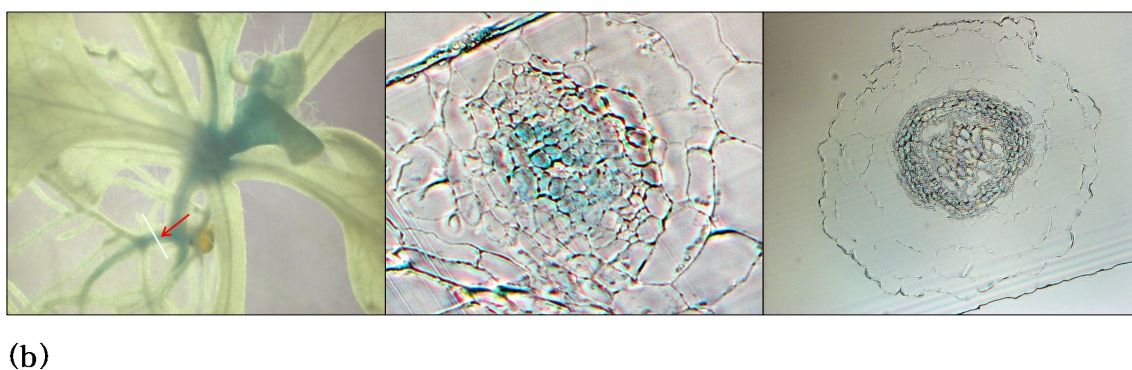
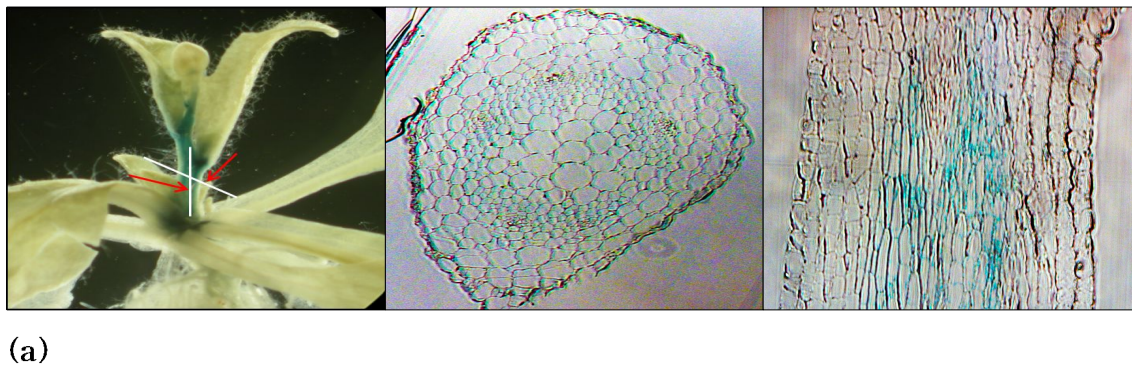


Fig. 23. Expression of the *pGbIDS2*-driven GUS activity in the tissue cross-section of transgenic *Arabidopsis* plants. (a) flower node, (b) root

(3) GUS activity

프로모터의 기관 특이성 패턴을 정량적으로 측정하기 위하여 식물 조직별, 호르몬 처리별로 GUS activity를 측정하였다. 처리 호르몬은 *in-silico* 분석을 통하여 얻은 정보를 활용하여 선택하였다. 이 데이터에서는 나타내지 않았지만 호르몬을 처리했을 때 처리하지 않은 식물과 발현이 일어나는 부위에는 전혀 차이를 보이지 않았다. 하지만, 프로모터 식물체에 호르몬을 처리 후 그 activity를 확인 해 본 결과 유전자별, 조직별로 영향을 주는 호르몬이 다를 수 있었다 (Figs. 24 & 25). 잎에서는 IDS1pro가 특이성을 나타내었으나 뿌리에서는 IDSpro1과 IDSpro2사이에 잎과 같은 차이를 보이지 않았다. 호르몬 처리시에는 뿌리에서는 IDS2pro에 대한 gibberellin과 ABA에 의한 발현 촉진효과가 두드러졌고 약간의 MeJA 효과를 볼 수 있었다. 그러나 잎에서는 뿌리와 같은 극적인 효과를 볼 수 없었다. 또한, 꽃에서도 발현을 보였던 GbIDS1 프로모터가 삽입된 애기장대에서는 잎이나 뿌리에서 각 프로모터 간에 영향을 주는 호르몬의 종류가 상이한 것과 마찬가지로 호르몬 처리별로 꽃의 상태별로 영향을 받는 정도가 다른 것으로 보인다. 이는 각 프로모터가 식물체내에서 서로 다른 작용을 할 뿐만 아니라 식물 생장에 따라서도 하는 역할이 다를 것임을 시사해 준다.

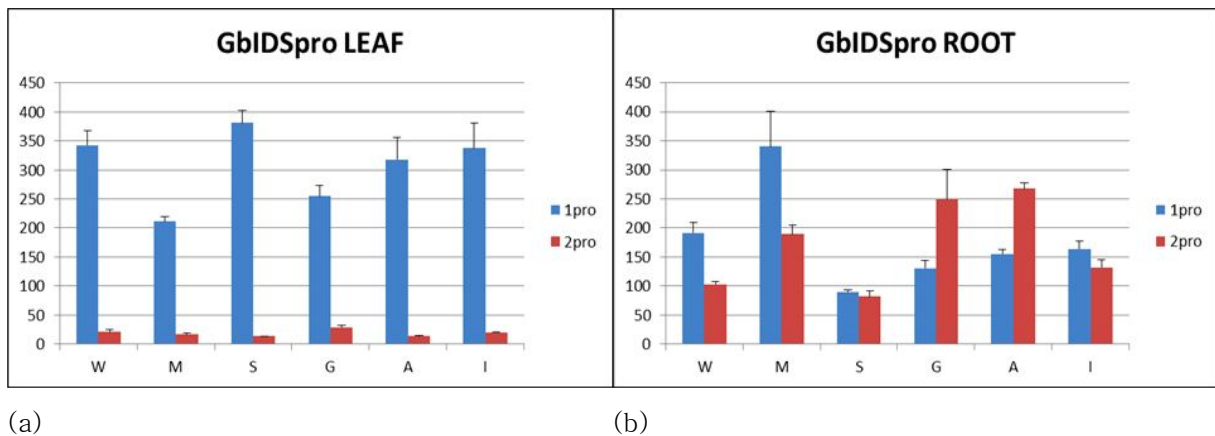


Fig. 24. Fluorometric GUS assay. *pGbIDS*-driven GUS activities of 2-week-old transgenic *Arabidopsis* seedlings were measured. W: water, M: 100mM MeJA, S: 100mM SA, G: 100mM GA, A: 100mM ABA, I: 100mM IBA. (a) Leaf GUS activity after 24h hormone treatment. (b) Root GUS activity after 24h hormone treatment.

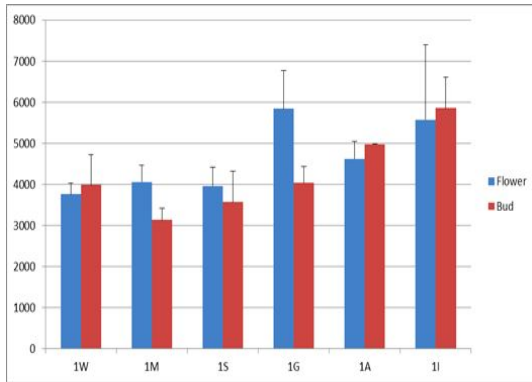


Fig 25. Fluorometric GUS assay to measure *pGbIDS1*-driven GUS activity of 4-week-old transgenic *Arabidopsis* flower and buds.

아. 결론

이 연구에서는 은행 MEP 경로의 최종 효소 GbIDS의 유전자가 세벌로 존재하는 것에 착안하여, 이들 중 GbIDS1과 GbIDS2를 식물에서 과발현하여 isoprene 단위의 공급을 늘렸을 때 일어나는 현상을 관찰하고 이를 이용하고자 하였다. 먼저 애기장대에서 GbIDS를 과발현하였을 때 chlorophyll과 carotenoid의 함량이 증가하였다. 이와 함께 개화시기가 대조군에 비하여 10일 정도 촉진되며, 오히려 개화시 잎수는 2배 증가하였다. 개화에 관련하는 유전자의 전사 수준을 조사한 바, 개화를 억제하는 FLC 수준은 감소하고, 촉진 유전자인 CO와 최종 integrator인 SOC1의 수준은 증가하였다. 한편 담배와 포플러에서는 애기장대와 같이 chlorophyll과 carotenoid의 함량이 증가하고, 이에 따라 광합성 효율이 증가하며, 성장 속도가 빠름을 확인하였다. Terpene 계통 호르몬인 gibberellin의 생합성 효소인 kaurene synthase (KS)와 GA20ox 수준이 증가한 반면 분해효소인 GA2ox는 증가 하지 않았다. 또한 carotenoid 생합성에 관련하는 phytoene synthase(PYS) 수준도 증가하였다. 이 실험에서는 다루지 않았지만 엽록체의 plastoquinone의 함량도 증대시켰을 것으로 기재되며, 여러 유전자들이 플라스토퀴논의 산화수준에 따라 발현이 조절되는 것이 알려져 있다. 결국 GbIDS의 과발현이 MEP 경로를 통하여 isoprenoid의 원료인 isoprene 단위 공급을 촉진하고, isoprenoid 단위로 구성되는 carotenoid와 chlorophyll의 함량증가와 성장호르몬인 gibberellin의 합성을 촉진하여 결국 개화시기 조절과 성장 촉진에 기여한 결과라고 판단된다. 이상의 결과는 현재 고성장 poplar의 분자 육종에 이용되고 있으며, 앞으로 다른 작물에도 적용될 가능성을 보이고 있다. 한편 학술적으로는 엽록체 내 MEP 대사의 변화로 이러한 여러가지 효과를 보다 종합적으로 이해하는 실마리를 찾을 수 있는 genomics와 proteomics 연구가 추후 진전되어야 할 것이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여

1. 목표 달성도

연구내용	달성도
GbIDS 형질전환체 확보	100%
형질 전환 작물 특성 확인	95%
Biomass 증대 메카니즘 확인	100%
형질 변환 모델 식물 특성	95%
포장 실험	50%

2. 정량적 연구성과

(괄호내는 계획)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생 수입판 매신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도										
2차년도	2 (1)						0 (1)	0 (1)		
3차년도	(1)	(1)					0 (1)	0 (1)		
4차년도										
5차년도										
계	2 (2)	0 (1)					0 (2)*	0 (2)**		

* 당초 포플러와 박하의 두 식물을 연구 대상으로 하였으나, 일차년도 평가에서 연구 대상을 포플러로 줄이도록 권고 받았으므로, 유전 자원 등록은 목표가 1이 되어야 함.

*** 3편 준비중

3. 관련분야에의 기여

가. 이 연구는 테펜의 생합성 중 특히 MEP 경로의 조절이 식물 성장에 미치는 영향 연구에 기여한다.

나. 특히 IDS 과발현으로 광합성 효율의 증가가 초래된다는 것과, 과발현으로 하류 유전자가 upregulation된다는 것은 처음 발견된 사실이다.

다. MEP 경로의 활성화가 식물의 개화시기에 영향을 미친다는 것을 처음으로 밝혔다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 아래의 특허 2건을 한국특허청에 출원하였다.

- (1) 김수연, 술타나 나르기스, 김대순, 강민경, 김상민, 김진희. IDS 유전자가 포함된 식물체 개화 촉진용 조성물. 출원 10-2011-0000525. 출원일 2011. 01.04
- (2) 김수연, 김연복, 김지영, 박상언, 김상민, 강민경, 노은운, IDS 유전자가 포함된 식물체 성장 촉진용 조성물. 출원 10-2010-0112862. 출원일 2010. 11.12.

2. 아래의 논문 3편을 SCI(E) 잡지에 투고하고자 준비 중이다.

- 가. Overexpression of GbIDS in Arabidopsis promotes flowering.
- 나. Enhancing photosynthesis in Nicotiana and Populus by overexpression of GbIDS.
- 다. Promoter analysis of GbIDS isogenes in Arabidopsis.

3. 학술발표 실적은 다음과 같다.

- 가. Min Kyoung Kang, Nargis Sultana, Sang Min Kim, Soo Un Kim. Analysis of Multy Copy *Ginkgo biloba* 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase (IDS) Gene. 한국응용생명화학회 2010년 춘계학술발표회, 2010년 2월 19일.
- 나. Min Kyoung Kang, Nargis Sultana, Sang Min Kim, Soo Un Kim. Promoter analysis of multy copy *Ginkgo biloba* 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase (IDS) Gene. Phytochemical Society of North America, 50th Anniversary Meeting. Fairmont Orchid, Hawaii. 2011년 12월 10일-15일

3. Transgenic poplar는 임업연구원의 수목 유전자원과의 긴밀한 협조로 포장 실험을 수행할 예정이고, 9개의 line 중 품종화할 후보를 찾을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 연구 수행 과정중 Terpnet2011 (Terpene 연구만을 다루는 국제학회)와 북미식물화학회 년차 학술대회에 참가하였다. 다수의 Terpene 관련 연구가 발표되었지만 MEP 경로 유전자 중 IDS를 이용하여 phytochemical을 포함한 biomass 증대를 시도한 연구를 볼 수 없었다.
2. 기존의 발표된 MEP 경로 유전자의 과발현 연구는 유전자의 기능을 밝히는데 목표를 두고 수행된 연구로서 이 연구에서 본 바와 같이 carotenoid와 엽록체 함량의 증가가 광합성 효율의 증가로 이어진다는 것과, MEP 유전자의 과발현이 하위 유전자의 전사를 크게 촉진한다는 보고는 찾을 수 없었다.

제 7 장 참고문헌

- [1] Seguin A. How could forest trees play an important role as feedstock for bioenergy production? COSUST 3: 1-5, 2011
- [2] Clough S.J and Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 16: 735-743, 1998
- [3] Tuskan, G.A. & Rokhsar D., et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science 313: 1596-1604, 2006
- [4] Jefferson R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. GUS-fusions : β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6: 3901-3907
- [5] Kim S.M., Kuzuyama, T., Kobayashi, A., Sando, T., Chang, Y.J., Kim, S.U. 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate reductase (IDS) is encoded by multicopy genes in gymnosperms *Ginkgo biloba* and *Pinus taeda*. Planta, 227: 287-298, Planta 227: 287-298, 2008

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품 연구개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.