

발간등록번호

11-1541000-000527-01

AtBG isoform을 이용한 식물의 ABA level 조절 기술
개발과 그 산업적 활용

(Modulation of Cellular ABA Levels by AtBG Isoforms
and Its Application in Plant Biotechnology)

포항공과대학교

농림수산식품자료실



0006290

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “AtBG isoform을 이용한 식물의 ABA level 조절 기술 개발과 그 산업적 활용”
과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 6월 17일

주관연구기관명 : 포항공과대학교

주관연구책임자 : 황 인 환

세부연구책임자 : 윤 길 영

연 구 원 : 김 신 제

연 구 원 : 권 은 혜

연 구 원 : 전 은 현

연 구 원 : 나 윤 정

연 구 원 : 김 재 현

연 구 원 : 장 미 소

연 구 원 : 민 지 혜

외

요 약 문

I. 제 목

AtBG isoform을 이용한 식물의 ABA level 조절 기술 개발과 그 산업적 활용.

II. 연구개발의 목표 및 필요성

1. 연구개발의 최종목표

- 가. AtBG1 overexpressing 형질전환 벼 제조.
- 나. 새로운 ABA 생합성 경로의 발견과 관련 유전자 확보.
- 다. 새로운 가뭄 반응 과정 조절 유전자의 확보와 이들의 기능 규명.
- 라. 내건성 작물의 형질전환 및 우수 형질전환체 선발.
- 마. AtBG1 형질전환 유채 포장실험 및 특성 검정.
- 바. AtBG1 형질전환 벼 포장실험 및 특성 검정.

2. 연구개발의 필요성

가. 응용 및 적용 기술 개발

- (1) 내염성 및 내건성에 대한 연구가 애기장대를 이용하여 많이 진행되었지만 애기장대에서 얻어진 결과를 실제로 활용하기 위해서는 이러한 기초 연구를 작물에 적용하기 위한 연구는 많지 않아서 작물에서의 적용 기술 (translational research)의 개발이 필요하다.
- (2) AtBG1를 이용한 식물체 내의 ABA level의 조절 기술의 작물 적용 기술 개발.
- (3) AtBG1 이외의 새로운 ABA level 조절 유전자의 개발.

나. 다양한 식물의 형질 전환 기법의 개발

- (1) 종래 작물의 신품종개발은 인공교배한 후대의 분리고정에 많은 시간과 노력, 넓은 포장 이 요구되는 교잡육종에 의존.
- (2) 교잡육종에 의하여 고정된 품종의 내염성은 한계가 있고 보다 강한 내염성 품종의 육성을 위하여 유전공학 기술의 도입이 필요.
- (3) 새로운 방법으로는 형질전환기법을 이용한 유용 유전자의 도입법에 의한 새로운 내염성 또는 가뭄저항성 식물체의 개발에 대한 연구.

(4) 형질전환 기법은 아그로박테리움이라는 토양 박테리아를 이용하는 기법으로 식물체에 새로운 유전자를 도입할 수 있는 방법.

다. 가뭄 내성 및 내염성 식물체 개발

- (1) 가뭄내성 및 내염성 식물을 개발하고자 다양한 전략과 방법이 시도되었으며 model 식물에서 어느 정도 제한적인 연구의 성공이 보고.
- (2) 초기의 시도는 가뭄이나 고농도 염은 식물체에 osmotic stress를 유도한다는 사실에 바탕을 두고 식물체에 osmo protectant를 합성할 수 있는 유전자를 도입하여 저항성을 유도하고자 함.
- (3) 하지만 일정한 성공을 거두었으나 여전히 충분히 활용할 수준에는 도달하지 못하였으며, 따라서 더 다양한 방법들이 제안.
- (4) 그 중 하나는 osmotic stress 신호전달에 관여하는 단백질을 조작하여 식물체의 가뭄 또는 osmotic stress 저항성이 증진된 식물체의 개발하기 위해 이 신호전달 과정에 관여하는 많은 유전자들이 식물체에 도입되었으며 이를 통하여 식물체의 가뭄 내성이 연구 됨.
- (5) 하지만 식물체의 신호전달 체계를 변화시켜서 osmotic stress에 대한 내성 또는 내한성이 증진된 식물체의 개발은 여전히 해결해야 할 많은 문제를 가지고 있음.
- (6) 현재, model 식물을 넘어서 그리고 model 식물과 다른 다양한 식물 종에 적용 가능한 방법이 시도되고 있으며, 농작물에 적용하여 가뭄내성 및 내염성 식물이 신품종으로 개발되어 재배 단계에 진입한 연구결과는 없음.
- (7) 또한, 기후변화 및 에너지 문제에 대응하기 위한 방안으로 생명공학 기술을 이용한 환경내성 작물개발과 우수 형질이 고정된 새로운 품종을 육성하고 바이오에너지 원자재로 활용하기 위한 연구가 필요.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. AtBG1 유전자도입 형질전환 벼 개발 및 내염성 및 내건성 line 선발

가. Agrobacterium-mediated 형질전환 기법을 이용한 AtBG1의 과발현 벼의 형질전환체 구축.

나. 확보된 형질전환 벼에서의 발현 검증: RT-PCR 및 Western blot analysis를 이용하여 발현 확인.

다. 형질전환 벼의 T3세대에서의 발현 검증이 된 것으로부터 NaCl 및 내건성 stress 저항성 검증.

2. ABA 및 ABA-GE의 level을 조절하는 기술 개발

- 가. 새로운 ABA-GE 가수분해 유전자인 AtBG2 transgenic 애기장대 제조 및 특성 분석.
- 나. ABA-GE level을 변화시키는 유전자 개발.
- 다. 새로운 ABA level 조절 유전자 확보 및 특성 연구

3. AtBG1 유전자 도입 유체의 형질전환 및 형질전환체 선발

- 가. 건조내성 관련 유전인 AtBG1 (*Arabidopsis thaliana* beta-glucosidase 1)을 과발현시킨 식물 형질 전환용 벡터를 이용하여 *Agrobacterium*-mediated transformation 방법으로 유체 형질 전환을 실시.
- 나. 선발배지에서 생존한 형질전환 후보 개체로부터 (T0) 외부유전자 삽입 여부가 확인된 것만을 선발.
- 다. AtBG1 유전자의 삽입여부는 항생제 저항성과 AtBG1-specific primer를 이용한 PCR을 수행하여 검정.
- 라. 1차 선발된 개체는 (주)에프엔피의 LMO 연구용 포장 (제 LML08-315호)에 순화하여 세대진전을 진행하면서 2차 및 농업형질을 분석하여 최종 라인을 선발하였음.

4. 형질전환 식물체의 후대검정

- 가. LMO 포장에서 재배중에 개체를 라인별로 육성번호를 부여하여 세대를 진전하면서 후대의 특성을 분석하였음.
- 나. 종자수확은 1차 선발된 형질전환체를 각 라인별로 격리포장에 정식하여 인공수분 후, 봉지를 쉬워 타가수분을 방지하고 종자는 개체 당 500~1,000립을 채종.
- 다. 자가수분을 통해 획득된 형질전환체의 후대 검정은 1차 선발과 같은 방법으로 PCR 및 항생제 segregation과 Western을 통한 단백질의 발현을 조사하였음.
- 라. 각 세대에서 선발된 형질전환체는 생리적 특성 등을 구명하여 최종적으로 우수 형질전환체를 선발.

5. 형질전환체의 분자생물학적 특성 및 농업형질 분석

가. 분자생물학적 특성

- (1) 각 형질전환체의 분자생물학적 특성은 AtBG1-specific primer를 이용하여 PCR, 도입된 선발머커를 활용한 segregation 그리고 western 분석을 통한 단백질 발현을 각 세대별.

나. 생리적 특성 분석

- (1) 형질전환체의 재배생리학적 특성은 저온 감응도를 확인하기 위해 저온처리 기간에 따른 개화시기를 라인별로 조사하였음.
- (2) 저온처리는 발아 후 5-6엽기에 저온 (4C)에 15일부터 5일 간격으로 35일까지 처리하여 포장에 정식하여 추대 및 개화율을 조사하였음.

다. 건조토양에서 생육특성

- (1) 형질전환 유채를 저온처리 후 정식하고 10일 후 단수를 시작하여 75일 (75D) 간 물을 공급하지 않은 상태에서 재배하면서 개화 및 종자 수확량을 조사하였음.
- (2) 또한, 개화 후 단수하여 생육 및 종자 수확량을 조사하였음.

6. AtBG1 형질전환 벼의 특성 구명

- (1) AtBG1 유전자가 도입된 식물 형질전환용 벡터를 이용하여 Agrobacterium-mediated transformation 방법으로 형질전환된 벼의 T2 세대의 생리적 특성을 분석하기 위해 (주)에프앤피의 온실에 이들 형질전환체를 파종하여 재배하면서 각각의 형질전환체의 내건성 특성을 조사하였음.
- (2) 형질전환 벼를 파종 후 70일 (분얼시작 기)에 잎의 시료를 채취하여 western 분석을 수행 (주관기관)한 결과와 내건성 결과를 종합하여 우수라인을 선발하였음.

IV. 연구개발결과

1. AtBG1 유전자가 도입된 형질전환 벼의 제조 및 내염/내건성 line 선발

- 가. AtBG1의 유전자를 이용한 형질전환에서 총 40개의 형질전환 벼 line 확보.
- 나. AtBG1 형질전환 벼의 T3 line에서 homoline과 이들에게서 각자의 WT line을 선발.
- 다. 기내에서 NaCl 및 mannitol stress response의 비교 분석하여 내건성 및 내염성 line 선발.
- 라. 70-3, 70-22, 70-24, 11-8 등 다수의 line에서 내염성 및 내건성 특성이 관찰됨.

2. AtBG2 유전자의 분석을 통한 ABA level 조절 기능 규명

- 가. AtBG2 유전자의 발현 level 및 발현 조직의 규명: AtBG2는 엽맥 및 뿌리 조직에서 발현이 높게 나타나며 dehydration stress에 따라서 발현이 높아짐을 확인함.
- 나. AtBG2 단백질에 의한 ABA level 조절 기작 확인: AtBG2가 ABA-GE를 가수분해하여 세포내 ABA level을 높이는 것을 확인함.

다. AtBG2의 세포내 위치 확인과 dehydration stress 에 따른 단백질 level 조절 기작 규명: AtBG2는 vacuole에 존재하여 dehydration stress에 의하여 단백질의 level이 높아짐을 확인함.

라. AtBG2에 의한 내염성 및 내건성 확인: AtBG2가 knock-out 된 mutant는 NaCl 및 dehydration stress에 sensitive한 반면 AtBG2가 overexpression된 Arabidopsis transgenic plant는 더 이들 stress에 저항성이 높아짐을 확인함.

마. 세포내의 ABA level이 biosynthetic pathway와 degradation pathway가 밀접하게 coordination되는 기작의 존재 확인: atbg2-2 mutant에서는 degradation pathway gene인 CYP707A1의 발현 level이 낮아지고 biosynthetic pathway의 gene인 NCED9의 발현이 높아지는 반면 AtBG2의 overexpression transgenic plant에서는 NCED9의 발현이 낮아지고 CYP707A1의 발현 level이 높아짐을 확인함.

3. ABA level의 조절을 위한 새로운 유전자 확보

가. 세포내 ABA level을 확인할 수 있는 reporter system 개발: RD29A::GFP 및 RD29B::GFP reporter construct를 이용하여 세포내의 ABA level의 변화를 관찰할 수 있었음. 특히 exogenous ABA concentration이 0-1.0 uM range에서 GFP의 발현이 linear하게 변하는 것을 관찰함.

나. UGT에 의한 세포내 ABA level의 down regulation 확인: RD29A::GFP와 35S::UGT의 coexpression시 1.0 uM의 exogenous ABA level에 대한 반응이 다르게 나타남을 통하여 UGT가 세포내의 ABA level을 낮추는 것을 확인함.

4. E3 ligase에 의한 내건성 기작 규명

가. E3 ligase에 의한 PIP2 ubiquitination 규명: 세포내에서 E3 ligase가 PIP2를 ubiquitination 시키는 것을 확인함.

나. E3 ligase에 의한 PIP2 level 조절 기작 규명: E3 ligase의 존재하에서는 PIP2의 level이 현저하게 저해되며 ER에서 plasma membrane으로의 trafficking이 저해됨을 확인함.

다. E3 ligase의 세포내 위치 확인: E3 ligase가 ER에 존재함을 확인함.

5. AtBG1 유전자 도입 유채 형질전환 및 후대 식물체의 선발

가. AtBG1 유전자를 이용한 형질전환에서 총 선발된 형질전환체는 109개로 1차 년도와 2차년도에 각각 42개체와 40개체를 선발하였으며, 3차년도에 27개체를 추가 선발하였음.

나. 선발한 총 109 라인의 외부유전자의 삽입여부와 분자생물학적 특성, 농업형질 그리고 세대진전 과정에서 우수라인을 선발하였음.

다. AtBG1 유전자의 삽입여부는 AtBG1-specific primer를 이용하여 PCR로 1차 검정하고 RT-PCR 및 western 분석을 수행하여, PCR 과정에서 32개체, RT-PCR과 western에서 12개체 선발.

라. 유전자 발현 및 세대진전 과정을 통해 최종 2개 라인을 선발하였음.

5. 형질전환체의 분자생물학적 특성 분석

가. AtBG1 유전자가 도입된 유채 형질전환체는 PCR, RT-PCR, Western 분석하여 외부유전자의 도입여부를 확인하였음.

나. 또한 외부유전자의 도입여부는 형질전환체의 세대진전 과정에서도 PCR과 항생제를 이용한 segregation을 분석하여 homo 라인을 확인.

6. 형질전환체의 농업형질 분석

가. 생리적 특성 분석

- (1) 재배생리학적 특성은 1차로 선발된 6라인의 형질전환체를 이용하여 저온처리 기간에 따른 개화 시기를 라인별로 조사.
- (2) 형질전환체 221, 222 그리고 6번은 30일간 저온처리 후 정식 20일 안에 100% 개화, 28번은 30일 저온처리 후 30일에 100% 개화하였으며, 24번과 대조구는 30일 저온 처리 후 30일 후에 약 80% 정도의 개화율을 나타냄.
- (3) 이러한 결과를 종합해 볼 때, 형질전환체는 대조구에 비해 최대 25일 이상 개화시기를 앞당길 수 있어 휴경지를 활용한 2모작 가능 북방 한계선의 확장효과를 가져옴으로써 재배면적의 확대 및 생산성 증대에 활용 가능할 것으로 판단 됨.
- (4) 생육특성에서 형질전환 유채는 종자 생육 및 발달에서 대조구에 비해 약 7일 정도 빠르게 진행되어 수정 후 14일에 꼬투리가 최대 생육에 도달한 반면 대조구는 21일에 최대 생육에 도달.
- (5) 단위면적당 종자 생산량은 물을 공급한 일반 조건에서는 형질전환체와 대조구가 각각 2.2 톤/헥타, 2.5 톤/헥타로 형질전환체가 다소 높게 나타났으나, 건조조건에서 대조구는 개화율이 극히 저조하고 정상적인 생육과 발달이 이루어지지 않아 채종이 불가능.
- (6) 형질전환체는 1.6 톤/헥타로 관수 처리구에 비해 73.3%의 생산량을 냄.
- (7) 선발된 유채 형질전환체의 지방산 함량은 $23.8 \pm 1.0\%$ 로 25.6 ± 3.1 의 대조구와 유사하였음.

나. 건조토양에서 생육 특성

- (1) 형질전환 유채의 농업형질과 재배생리적 특성을 조사하기 위해 형질전환 유채를 저온처리 후 정식하고 10일 후 단수를 시작하여 75일 (75D) 간 물을 공급하지 않은 상태에서 재배.
- (2) 대조구의 경우 단수 상태에서 개화율이 극히 저조하였으며, 단수 25일 이후에는 잎에 왁스층이

발달하고, 45일 (45D) 후에는 갈변현상이 나타나기 시작하여 75일에는 잎이 백화되고 꽃대가 말라죽었으나, 형질전환체는 종자수확이 가능.

7. 내건성 형질전환체 유체의 “EVENT” 선정

가. 최종선발된 유체 형질전환체의 특성은 건조상태에서 생육 및 종자 수확이 가능하여 형질전환체를 이용한 사막화 진행지역 및 건조지역을 활용한 바이오 원자재 생산 등 산업화가 가능함을 잘 제시.

나. 따라서 유체 형질전환체 #2082와 #2903을 산업화를 위한 환경 및 인체위해성 평가를 위한 “Event”로 최종 선정하였음.

다. 이중 #2802는 타 과 과제에서 활용하여 현재 환경위해성 심사자료 작성 및 해외에서 현지 적응성 실험을 수행 중에 있음.

8. AtBG1 형질전환 벼의 세대진전 및 특성 분석

가. 형질전환 벼의 세대진전 및 종자 수확

(1) 형질전환 벼의 세대진전을 위해 (주)에프엔피의 가온하우스 내에 묘상을 설치하여 각 라인별로 파종하였으며 세대진전을 통해 각 라인별로 50±5g 이상의 종자를 수확.

나. 형질전환 벼의 특성 분석

(1) 각 라인별 특성을 조사하기 위해 사각포트 (15X15 cm)에 파종하여 재배하면서 농업형질과 내건성을 조사하였음.

(2) 초장, 경장, 이삭 길이 및 천립중은 형질전환체와 대조구 또는 형질전환체 사이에서 큰 차이를 나타내지 않아 각 라인별로 오차 범위내의 차이를 나타냈음.

(3) 반면에 본 실험의 재배조건하에서 생존율은 95% 이상을 나타내는 라인으로는 #11-2, 11-8, 11-9, 11-10의 4개 라인과 70-2, 70-3, 70-19, 70-21, 70-25의 5개 라인이었음.

(4) 1주일간 건조 후 수분 손실율에 따른 특성으로는 11-1, 11-3, 11-4, 11-5, 11-6, 11-7, 11-9의 7개 라인에서 건조내성이 있는 것으로 확인되었음.

(5) 또한, 70-5, 70-9, 70-10, 70-11, 70-12의 5개 라인 건조 저항성이 높게 나타났음.

(6) 건조 장애의 초기 생리적 현상인 잎의 말림현상 (welting)은 11-3, 11-8과 70-5, 70-16, 70-20, 70-23이 내건성이 높은 것으로 나타났음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 기초 연구 결과를 작물에 적용하는 기술 개발

가. AtBG1 발현 형질전환 벼의 개발을 통하여 기초 연구에서 얻어진 결과를 벼와 같은 작물에 도입하고 이를 산업적으로 활용할 수 있는 응용 기술을 개발할 수 있는 체계 확립.

2. 새로운 ABA level을 조절하는 유전자의 확보와 이들의 활용 가능성 탐색

가. 새로운 ABA level 조절 유전자인 AtBG2를 확보하였으며 이는 차후에 작물에 도입하여 내건성 및 내염성을 갖는 형질전환체의 개발에 활용.

나. 세포내 ABA level의 변화를 확인할 수 있는 reporter system을 구축하였으므로 세포내 ABA level을 조절할 수 있는 유전자의 확보에 활용.

다. 세포내 water pump인 PIP2의 level을 조절할 수 있는 기작을 이용하여 내건성 작물체 개발에 활용.

3. 작물의 환경내성관련 유용 유전자원의 확보 및 활용 체계를 확립

가. 기후변화와 바이오에너지에 대한 수요 증가로 유용유전자원의 확보와 이들 유전자를 활용한 산업화를 위한 첫 단계인 유용 유전자원의 확보 체계 확립.

나. 형질전환 방법에 의한 목표형질이 도입된 새로운 품종개발 과정의 체계 확립.

4. 과제 수행기간에 축적된 기술과 인력 인프라의 활용

가. 유용유전자를 확보 및 형질전환체 개발 그리고 형질전환체를 검정을 통한 품종개발 체계를 이해하는 인력 및 기술 인프라를 활용한 유용 목표형질이 도입된 신품종 개발.

나. 확보된 유용 유전자는 특허등록을 하여 지적재산권 확보.

다. 환경내성 작물, 바이오 에너지 원자재 확보를 위한 바이오매스 증대를 위한 형질전환 작물의 개발 및 세대고정을 통한 품종 개발에 활용하고자 함.

5. 확보된 건조내성 형질이 도입된 유채를 이용한 인체위해성 평가 (다음 단계 조치사항)

가. 본 연구가 기획되고 진행되는 동안에 이루어진 GMO 품종 등록을 위한 환경위해성 평가 조항의 신설로 신품종 등록에 필요한 위해성평가 자료 작성이 필요.

나. 환경위해성 평가를 위한 원재료 "Event"로 활용하여 환경위해성평가를 위한 기술개발

에 이용. (현재 수행 중)

다. 위해성 평가기술 개발과 축적된 결과는 신제품 등록을 위한 심사자료로 제출하여 신제품 등록.

라. 재배승인을 위해 인체위해성평가도 함께 이루어져야 하기 때문에 환경위해성평가와 함께 인체위해성 심사자료 작성을 위한 연구가 필요함

마. 형질전환 유체의 환경 및 인체위해성 평가 결과는 품종 등록에 활용 후 학술지에 게재.

SUMMARY

Title: Modulation of cellular ABA levels by AtBG isoforms and its application in plant biotechnology

In a previous study, we discovered a novel mechanism for increasing cellular ABA levels. AtBG1 can hydrolyze ABA-GE, an inactive form of ABA, to ABA in vitro and overexpression of AtBG1 in Arabidopsis can give enhanced resistance to NaCl and dehydration stress. In this study, we tried to apply the effect of AtBG1 that generates ABA from ABA-GE through hydrolysis reaction to crop plants such as rice and brassica to see whether we can recapitulate the effect of AtBG1 overexpression on these crop plants and whether we can generate transgenic rice and brassica that are resistant to dehydration and NaCl stress. Indeed transgenic rice and brassica expressing AtBG1 displayed NaCl and dehydration stress resistant phenotype. In the case of brassica, among total 109 transgenic lines, we selected 12 lines with the results from protein expression and agricultural characterization. By comprehensive analysis of experiments such as molecular biological analysis and agricultural characterization during progression of generation, we selected two transgenic lines, #2802 and #2903 as "EVENT". The EVENT is a term that mention for transgenic line selected to experiment of risk assessment to get authorization of cultivation for genetically modified organism (GMO). One of two events was already used to environmental risk assessment experiment at other project. The EVENTS will be registration to new varieties after the experiment of risk assessment. The EVENTS should use for the production of biomass and the prevention of desertification. In addition, we isolated and characterized another gene, AtBG2 that hydrolyzes ABA-GE to ABA, thereby increases cellular ABA level. AtBG2 localizes to the vacuole at high molecular weight forms and its level was increased upon dehydration stress. In an effort to isolate new genes involved in dehydration stress response, we characterized E3 ligase and UGT. These genes and the action mechanism of these genes can also be used in generation of transgenic crops that display enhanced resistance to dehydration and NaCl stresses.

CONTENTS

I. Title	12
II. Trend of Domestic and Foreign Technology and Research Purpose	15
III. Research Contents and Results	18
IV. Achievements and Contributions to Related Research	37
V. Results and Application	39
VI. Information of Foreign Technology	40
VII. Reference	41

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	15
제 2 장	국내외 기술개발 현황	23
	1. 국내기술개발 현황	
	2. 세계적 수준	
	3. 국내외의 연구현황	
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	26
	(주관연구기관)	
	1. AtBG1 Overexpression 벼의 구축과 표현형 연구.	
	2. AtBG2의 유전자 확보와 특성 규명을 통한 활용 가능성 검증.	
	3. ABA-GE Level 조절을 위한 유전자 Cloning과 특성규명.	
	4. E3 ligase를 이용한 새로운 dehydration stress 기작 규명과 이 기작을 이용한 가뭄 내성 식물체 개발 가능성 탐색.	
	(협동연구기관)	
	1. 형질전환 및 후대 식물체의 선발.	
	2. 형질전환체의 분자생물학적 특성.	
	3. 형질전환체의 농업형질 분석.	
	4. 환경내성 신품종 후보 선발.	
	5. 형질전환 벼의 세대진전 및 특성분석.	
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	70
	1. 기술개발 목표	
	2. 연도별 주요개발 목표 달성도	
	3. 관련분야에의 기여도	
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	74
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	76
제 7 장	참고문헌	78

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적 및 필요성

1) 경제적 · 산업적 중요성

(1) 가뭄 내성 작물의 경제 · 산업적 중요성

(가) 농업 생산성 향상 및 환경 복원을 위해서 가뭄 내성 식물의 개발이 산업적으로 대단히 중요하다.

① 가뭄을 중심으로 한 abiotic stress (비생물학적 스트레스)로 인한 농작물의 생산성 감소가 적게는 50%에서 크게는 80%에 달할 정도로 막대한 농업생산성에 피해를 주고 있다고 보고되었다. 우리나라에서도 해마다 다양한 지역에서 빈번하게 발생하는 가뭄현상으로 인하여 농작물의 생산성에 막대한 손실이 초래되고 있다. 또한 가뭄에 대비한 다양한 노력은 막대한 경제적인 손실을 초래하기도 한다. (Buchana et al., 2000)

Table 1 Average yields and record yields of eight major crops

Crop	Record yield (kg per hectare)	Average yield (kg per hectare)	Average losses (kg per hectare)		Abiotic losses as a percentage of record yield
			Biotic ^a	Abiotic ^b	
Corn	19,300	4,600	1,952	12,700	65.8
Wheat	14,500	1,880	726	11,900	82.1
Soybean	7,390	1,610	666	5,120	69.3
Sorghum	20,100	2,830	1,051	16,200	80.6
Oat	10,600	1,720	924	7,960	75.1
Barley	11,400	2,050	765	8,590	75.4
Potato	94,100	28,300	17,775	50,900	54.1
Sugar beet	121,000	42,600	17,100	61,300	50.7

^aBiotic factors include diseases, insects, and weeds.

^bAbiotic environmental factors include, but are not limited to, drought, salinity, flooding, and low and high temperature.

② 또 다른 예상되는 심각한 문제는 전 세계적으로 기온 및 기후의 변화가 빈번해지며 농작물에 직접적인 피해가 예상 된다는 것이다. 그 중의 하나가 기온의 상승이다. 지구 온난화로 인한 전 세계적으로 기온 상승은 물 부족 현상을 가속화 시킬 것이며 농업의 생산성에 심대한 영향을 미칠 것이다. 그 예의 하나가 엘니뇨현상과 같은 기후 변화이다. 이는 전 세계적으로 농업의 생산성에 대단히 큰 영향을 미치는데 대부분이 가뭄 현상으로 인한 것이다. 인도의 경우는 남서몬순과 동시에 가뭄현상이 나타나고, 쌀 수량이 감소하는 경향이 나타나며, 태국에서는 엘니뇨현상이 나타나면 으레 옥수수 수량이 감소하며 쌀 수량도 감소하는 경향이 나타났다. 필리핀에서는 북동 몬순과 동시에 가뭄현상이 나타나지만, 이 시기는 건기로서 주요 작물의 재배기간이 아니지만 쌀 수량은 감소하는 경향이 나타났다고 보고 되었다. 그리고 인도네시아는 건기와 엘니뇨로 인한 가뭄이 동시에 나타나는데 이 시기는 주요 작물 재배기간이 아니어서 다행이지만 때로는 건기가 연장되어 피해를 불러오는 경우가 있다고 보고되었다. 따라서 온도가 높아지는 미래에 새로운 작물이 개발되지 않으면 온난화로 초래되는 가뭄에 대비할 수 없을 것이며 국제 농업연구에 대한 자문그룹은 현존하는 작물의 생산성이 떨어질 것이라고 예측했다. (고정훈 등, 2005; 임은순 등, 2005)

- ③ 또 다른 요인은 지하수의 무분별한 사용으로 식물 재배 가능 농지가 점점 감소한다고 있으며 우리나라의 경우에도 도시근교 농지의 택지화, 산업 단지화, 기계화가 어려운 산간지역의 유휴 농경지화에 따른 경작지 감소는 앞으로 주곡의 안정적 공급에 큰 영향을 미칠 것이다.
- ④ 따라서 가뭄에 견디는 여러 가지 작물을 포함한 다양한 식물의 개발은 여러 가지 측면에서 미래의 농업 생산성 유지 및 향상을 위해서 필수 불가결하다. 또한 우리나라의 경우에는 겨울에 유휴 농경지에 다양한 작물을 재배할 수 있을 정도로 겨울철 기온이 높아지고 있으나 심한 겨울철 가뭄이 작물을 대량으로 재배하고자 할 때는 심각한 장애요인으로 작용하고 있다. 따라서 가뭄에 견디는 식물의 개발은 산업적으로 활용가능성이 무궁무진하다. 각국은 이러한 경제 산업적 중요성 때문에 가뭄 내성 작물의 개발에 심혈을 기울이고 있다. 그 예의 하나로 중국의 경우 병충해를 이길 수 있고 화학 비료를 적게 사용하며 가뭄에 견디고 물을 절약할 있는 녹색 수피 벼 품종을 재배하는 것이 중국 농업 과학자들의 차세대 목표로 설정되었다. 즉 가뭄에 견디는 벼 품종을 재배하여 물 사용량을 줄이고자 한다. 중국에서 농업분야에서의 물 소비량은 전국 물 총소비량의 70%를 점하고 있는데 그중 벼의 물 사용량은 전체 농업 물소비량의 70%를 차지하고 있다. 중국 서북지역은 장기적으로 물이 부족하며 화북지역에서는 한재가 빈번하다. 강수량 분포도 계절적으로 불균형하기 때문에 최근 들어 창장(長江) 유역과 화남(華南) 벼 재배 지역에서도 한재 발생주기가 날로 빈번해지고 있다. 또한 내한성 작물에 대한 필요성이 동남아는 물론 유럽의 나라들까지 대두하고 있다. (KISTI 글로벌동향브리핑(GTB))
- ⑤ 또한 가뭄으로 인한 환경의 변화는 인간의 생존 조건을 크게 위협하고 있다. 그 중의 하나가 온대지역의 사막화 현상이다. 그리고 전세계적으로 이 문제는 급격히 진행되고 있으며 기후 온난화 현상은 이 문제를 더 악화시킬 것이다 (Buchanan et al., 2000). 중국의 경우 매년 제주도보다 큰 2100km²가 사막으로 변하고 있다. 이러한 사막화는 우리나라 봄철의 황사현상을 일으키는 근본 이유이며, 이미 우리나라에 심각한 인간의 건강 문제를 야기할 뿐만 아니라 점차 정밀하고 정교한 첨단 산업으로 발전함에 있어서 심각한 저해 요인으로 작용할 것이다.
- ⑥ 우리나라 봄철의 황사 현상을 억제하기 위해서는 중국 및 몽골의 사막화 현상을 방지할 수 있는 기술 개발이 필수적이다. 이를 위한 핵심 연구개발 내용 중의 하나는 사막화되어가고 있는 건조한 토양에 견디며 자랄 수 있는 식물의 개발일 것이다. 따라서 가뭄에 견디는 식물의 개발은 미래의 환경복원을 위해서 필수적이다.

(나) 식물로부터 바이오 에너지를 생산하고자 하는 새로운 바이오텍 산업의 발전을 위해서는 가뭄 내성 식물과 같은 새로운 형질의 식물의 개발이 필수적이다.

- ① 석유 및 천연가스의 고갈 가능성과 이들 화석 연료의 지속적인 가격의 상승으로 새로운 에너지원의 개발이 요구되고 있으며 대안으로 식물의 biomass를 이용한 bio-ethanol 같은 에너지원으로서 각광을 받고 있다 (Deluca, 2006). 하지만 bioethanol의 대량 생산과 산업화를 위해서는 현재 biomass의 양에서 산업화가 가능할 정도로

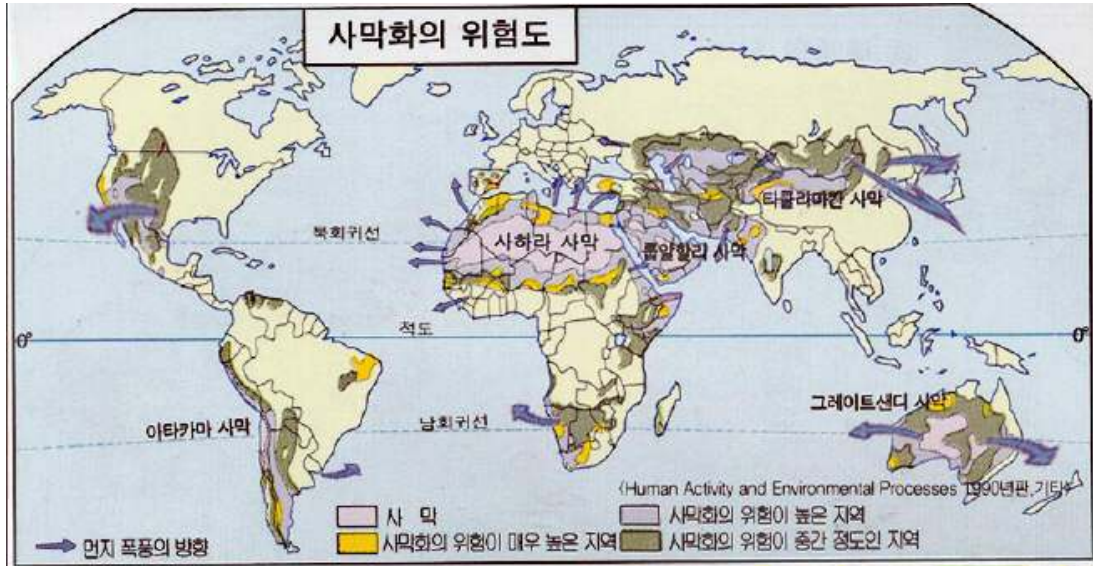


그림 1. 사막화 위험도

biomass의 양을 늘려야 하기 때문에 더 넓은 경작지를 필요로 하며 이 경우 필수불가결하게 식물의 재배로 인한 물 사용량의 증가를 초래하며 이는 결국 물 부족의 문제로 귀결될 것으로 2006년 Stockholm에서 열린 환경 문제 국제회의에서 결론 내렸다.

식물의 biomass로부터 bio-energy (ethanol) 생산

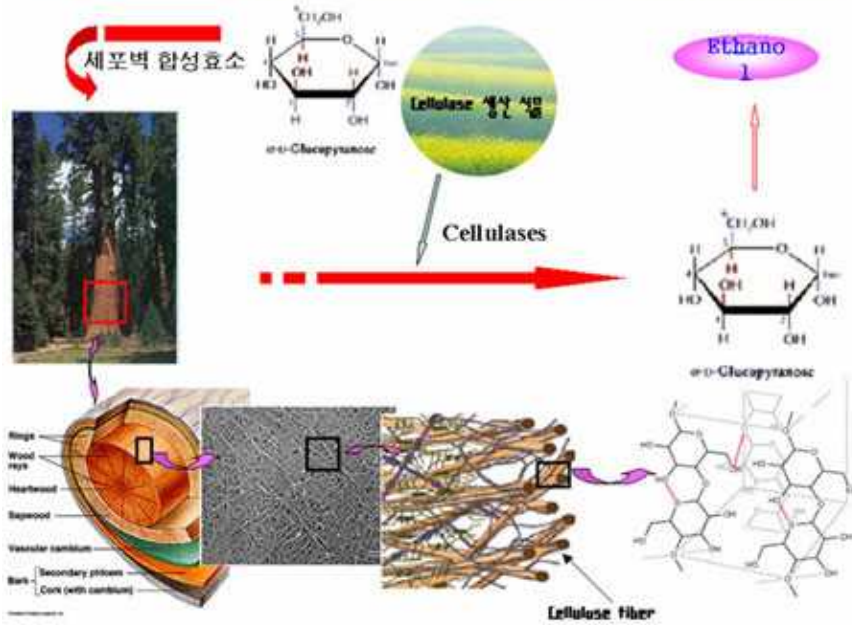


그림2. 식물의 biomass로부터 bioethanol의 생산 개념도

- ② 미국 캐나다를 비롯한 구미 선진국은 bioenergy 생산을 위해서 새로운 기술들을 개발하고 있으며 그 중의 하나가 biomass를 늘리기 위한 방법으로 가뭄에 견디거나 건조한 토양에서도 자라는 식물, 물의 요구가 최소화된 식물의 개발에 심혈을 기울이고 있다.

- ③ 가뭄 내성 식물의 개발에 가장 중요한 요인 중의 하나는 가뭄내성 형질을 유도할 수 있는 유전자이므로 각국은 국가 연구기관이나 바이오 벤처 등을 통해서 가뭄 내성 유전자 확보에 심혈을 기울이고 있으며, 이들 유전자를 이용하여 가뭄에 더 잘 견디거나 건조한 토양에 잘 자라는 작물의 개발하고자 연구에 집중적으로 투자를 하고 있다. 궁극적으로는 이러한 연구개발을 통해 종자 시장에서 부가가치가 높은 신품종 상품을 만들고자 하고 있다.
- ④ 따라서 다양한 가뭄 내성 작물의 개발은 국내의 농업 생산성 향상을 위해서 필수 불가결하며 또한 겨울철 유희 경작지의 사용 가능성 증대 등을 위하여 경제 산업적으로 대단히 중요한 연구과제이며, 또한 중국이나 몽골과 같은 사막화지역의 사막화 방지를 위한 새로운 가뭄내성 식물의 개발을 통하여 가뭄내성 식물 품종을 새로운 수출 산업으로 육성할 수 있을 것이다.

(다) 내염성 작물의 경제·산업적 중요성

- ① 식물 성장 및 발달의 장애를 초래하여 식물의 생산성에 치명적인 비생물학적 스트레스의 중요한 요인 중의 하나는 토양의 염분의 증가이다. 특히 무분별한 비료의 사용이나 도시화 등의 영향으로 토양의 염분이 지속적으로 증가되고 있다. 따라서 이러한 조건은 식물이 정상적으로 자라기에 매우 어려운 환경이며 작물의 생산성에 막대한 피해를 초래하게 된다.
- ② 우리나라에서는 지속적인 농경지의 감소에 직면해 있다. 이에 대한 해결책으로 서해안 간척 가능지역이 400,000 ha나 되므로 농지 부족 문제에 해결책을 제공할 수 있을 것으로 생각되어 왔으며 2000년대까지 63만5천ha의 광범위한 간척지를 조성하여 400,000ha 이상을 농경지로 활용하는 계획이 수립되어 추진되었다. 대표적인 간척지로 이미 개발이 완료되어 작물이 재배되고 있는 대단위 간척지로는 서산, 계화, 남양, 미면, 강화, 영산강 지구이며 이곳들에서는 주로 벼를 재배하고 있으며, 새만금 지구를 비롯하여 더 많은 면적이 늘어날 전망이다.
- ③ 하지만 농지로 사용하기 위해서는 많은 문제점을 해결하여야 함: 간척지에서 관개수의 삼투압이 높기 때문에 식물체의 수분흡수를 저해하고, 염분의 과잉 흡수로 양분흡수의 불균형을 초래하고 종 대사작용이 저해되어 枯葉이 심하게 나타나며, 出穗지연, 염실률 저하 및 수량감소가 두드러짐으로 인하여 생산성이 많이 떨어지는 심각한 문제점을 내포하고 있다. 현재 재배가 가능한 대부분의 내염성 품종은 열대 아열대 지방에서 육성된 Indica형으로 우리나라에 재배할 경우, 키가 크고 잎이 과번성하며 출수가 늦거나 안 될 뿐만 아니라 미질이 불량하여 활용이 어려움이 많다. 또한 이들의 (대부분 내염성 품종은 Indica형으로) 내염성 형질을 Japonica형에 도입할 경우 (遠緣間 교잡이기 때문에 후대의 작물학적 특성이 열악할 뿐만 아니라) 2-3회 교잡을 할 경우 내염성 형질이 후대에 유전이 안 되는 등 여러 가지 문제가 있다.

④ 따라서 새만금 지구를 비롯한 서남해안의 간척면적의 증대에 따라 이러한 지역을 좀 더 생산적으로 활용하기 위해서는 고도의 내염성 신품종 조기육성이 시급히 요구되고 있다. 그러나 간척 초기의 고염분 경작지에 재배할 수 있는 내염성 품종이 현재로서는 거의 없는 실정이다.

2) 연구개발의 필요성

(가) 식물의 가뭄 내성 및 내염성 관련 기초 연구

- ① 기초 학문적 관점에서 식물의 가뭄 내성 및 내염성 현상에 대한 다양한 연구가 진행되었으며 이를 통하여 많은 학문적인 성과가 나타났다. 이들 연구를 통하여 식물의 가뭄 및 고농도 염에 대한 반응 기작 및 stress 대한 기작에 대한 많은 부분이 규명되었다. 하지만 많은 초기의 연구들은 주로 식물생리적인 측면의 연구가 많이 진행되었다.
- ② 최근에 식물체가 물 부족이나 높은 염분의 존재 하에서 (즉 osmotic stress 조건하에서) 반응하는 과정에 대하여 분자생물학적인 측면에서 많은 연구들이 진행되었으며 이러한 연구과정을 통하여 최근에 많은 osmotic stress에 의하여 발현이 유도되는 유전자들이 확보되었다.
- ③ 이러한 유전자의 확보에 이어서 식물의 가뭄신호전달 기작에 대한 연구가 집중적으로 진행되고 있으며, 이들 연구를 통하여 많은 단백질의 인산화나 탈인산화에 관여하는 유전자가 cloning되고 이들의 기능이 밝혀지고 있으며, 이 유전자들이 가뭄 또는 osmotic stress 신호전달 과정에 중요한 역할을 하고 있다는 것들이 규명되었다.

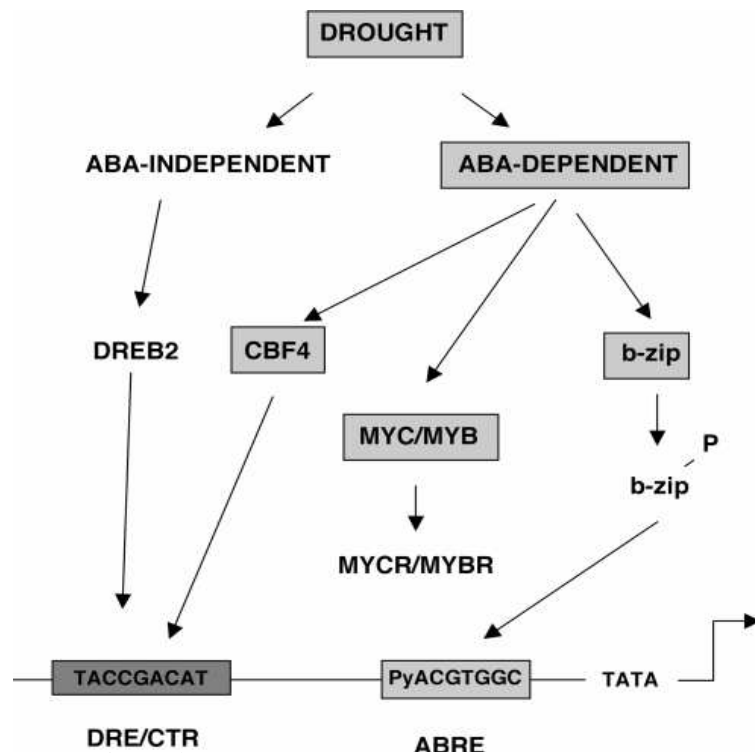


그림 3. 가뭄에 대한 ABA-dependent and -independent signal transduction pathways. (by Riera et al., 2005)

- ④ 그리고 식물의 가뭄이나 높은 염에 대한 반응 연구를 통하여 내한성 및 내염성 반응에 식물 호르몬인 ABA (abscisic acid)가 대단히 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다. 특히 가뭄이나 고농도의 염 조건하에서는 ABA의 농도가 급격히 올라간다는 것이 오래전에 밝혀졌으며, 식물체에서 ABA가 생성되는 기작 및 관여하는 단백질들이 잘 알려졌다.
- ⑤ 국내에서도 여러 대학의 연구실에서 osmotic stress에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으며 이러한 연구를 통하여 가뭄내성 또는 내염성 식물체를 개발하고자 하는 시도가 있다.
- ⑥ 식물체 내에서 ABA의 세포내 level을 조절하는 다양한 방법이 있다는 것이 밝혀졌으며 최근 본 연구진의 연구를 통하여 새로이 ABA-GE로부터 ABA를 만들어 내는 기작이 있으며 이 과정이 식물의 내한 및 내염성 반응에 결정적인 역할을 한다는 것이 밝혀졌다.

(나) 내염성 또는 가뭄에 대하여 내성을 줄 수 가능성이 있는 유전자의 대량 확보

- ① 많은 과학자들의 연구를 통하여 수많은 유전자가 관여하여 가뭄 내성 및 내염성을 유도한다는 것이 밝혀졌으며, 이 과정을 조절하기 위해서는 이 과정에 관여하는 유전자의 확보가 필수적으로 인식되었다. 즉 가뭄 내성 및 내염성 유전자는 모든 작물의 육종에 필요한 유전자 중 우선순위가 높은 것으로 극심한 환경 조건에서도 생장이 가능한 작물을 육종하기 위한 기술적인 기반이 되는 것이다. 즉 가뭄 내성 형질을 나타내는 식물을 만들기 위해서는 이 과정에 관여하는 여러 유전자의 확보가 우선적이다. 따라서 미국, 영국, 일본, 프랑스 등 여러 국가 연구 기관 및 biotech 회사들은 다양한 cDNA 및 genome projects 통하여 유용유전자를 대량으로 확보하고 이를 선점하고자 국가적인 노력을 기울이고 있다.
- ② 내한성 및 내염성 관련 유전자를 이용하여 가뭄 내성 또는 내염성 식물체를 개발하고자 많은 노력을 기울이고 있으며 실제로 model 식물 (애기장대와 같은)의 수준에서는 어느 정도 효과를 얻고 있다. 하지만 아직 충분히 농업적으로 유용한 가뭄 내성 및 내염성 식물의 개발이 되지 않았다. 따라서 더 강력하고 새로운 가뭄 내성 및 내염성 유도 유전자를 발굴하고자 노력을 기울이고 있으며, 또한 다양한 idea를 접목하여 새로운 내염 및 내한성 식물체를 개발하고자 많은 연구가 집중되고 있다. 그 중의 하나가 식물체 내의 ABA level을 직접적으로 조절함으로써 가뭄내성 및 내염성 식물체를 개발할 수 있다는 제안이 발표되었다.
- ③ 이러한 노력들이 구미 각국과 마찬가지로 국내에서도 몇몇 연구진에서 활발히 시도되고 있다. 이러한 노력들을 통하여 일부의 중요 유전자가 확보되었다.

(다) 다양한 식물의 형질 전환 기법의 개발

- ① 종래 작물의 신품종개량은 인공교배한 후대의 분리고정에 많은 시간과 노력, 넓은 포장에 요구되는 교잡육종에 의존하였다. 하지만 교잡육종에 의하여 고정된 품종의 내염성은 한계가 있고 보다 강한 내염성 품종의 육성을 위하여 유전공학 기술의 도입이 필요하다. 새로운 방법으로는 형질전환기법을 이용한 유용 유전자의 도입법에 의한 새로운 내염성 또는 가뭄저항성 식물체의 개발에 대한 연구이다. 형질전환 기법은 아그로박테리움이라는 토양 박테리아를 이용하는 기법으로 식물체에 새로운 유전자를 도입할 수 있는 방법이다.
- ② 국내에서도 형질전환체 개발법을 통하여 다양한 식물체의 형질전환이 가능하다고 보고되었다. 하지만 아직 국내에서는 형질전환 가능 식물 종의 다양성의 측면에서는 여전히 제한적이다. 따라서 형질전환 식물 가능 종의 수를 늘리는 연구가 시급히 요구된다.

(라) 가뭄 내성 및 내염성 식물체 개발

- ① 가뭄내성 및 내염성 식물을 개발하고자 다양한 전략과 방법이 시도되었으며 model 식물에서 어느 정도 제한적인 연구의 성공이 보고되었다. 초기의 시도는 가뭄이나 고농도 염은 식물체에 osmotic stress를 유도한다는 사실에 바탕을 두고 식물체에 osmoprotectant를 합성할 수 있는 유전자를 도입하여 저항성을 유도하고자 하였다. 하지만 일정한 성공을 거두었으나 여전히 충분히 활용할 수준에는 도달하지 못하였으며, 따라서 더 다양한 방법들이 제안되었다. 그 중 하나는 osmotic stress 신호전달에 관여하는 단백질을 조작하여 식물체의 가뭄 또는 osmotic stress 저항성이 증진된 식물체의 개발할 수 있다는 생각이었다. 따라서 이 신호전달 과정에 관여하는 많은 유전자들이 식물체에 도입되었으며 이를 통하여 식물체의 가뭄 내성이 연구되었다.
- ② 또 다른 방법은 신호전달체계에 대한 전반적인 이해를 통한 osmotic stress induced 전사 인자의 발현을 유도하여 가뭄 내성 및 내염성 식물체를 개발하고자 하는 연구였다. 이는 직접적으로 가뭄이나 고농도 염에 대항하는 유전자들의 발현을 늘 높게 유지하고자 하는 시도였다. 하지만 constitutive overexpression은 식물체에 정상적인 성장 조건하에서 stress를 많이 유도한다는 사실이 밝혀졌다.
- ③ 따라서 식물체의 신호전달 체계를 변화시켜서 osmotic stress에 대한 내성 또는 내한성이 증진된 식물체의 개발은 여전히 많은 문제점을 내포하고 있음이 보고되었다. 또한 아직 model 식물을 넘어서 그리고 model 식물과 다른 다양한 식물 종에 적용 가능한 방법은 개발되지 않았으며, 특히 농작물에 적용하여 가뭄내성 및 내염성 식물이 신품종으로 개발되지 않았다. 따라서 실용화 단계의 연구까지는 더 많은 연구가 필요하다.

3) 연구개발의 목표

- (1) 식물체의 ABA의 level을 조절할 수 있는 유전자를 이용한 가뭄저항성 식물체 개발 및 이를 이용한 산업화.
- (2) 작물 환경내성 관련 형질전환체의 분자생물학적 특성 분석.
- (3) 형질전환 유체의 후대검정 및 농업형질 분석.
- (4) 가뭄 내성 및 내염성 유체 선발.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 기술개발 현황

- 1) 국내 바이오에너지 사용량은 2005년 기준 대체에너지 사용량의 3.7%를 차지하였으며, 고유가에 따른 대체에너지 수요의 증가로 2030년에는 약 20%까지 시장을 점유할 것으로 전망. (2007년, 에너지연구센터)
- 2) 국내의 기술개발 분야에서 연구비 지원 규모는 2005년 약 58억원 규모였으며 약 72%가 정부지원금임.
- 3) 바이오 고형원료 및 전분질계 에탄올 연료는 2002년에 이미 상용화 연구가 이루어졌으며, 바이오디젤은 2007년 목질계 에탄올 연료는 2009년 상용화 연구가 진행될 것으로 전망됨. (2007, 산업은행 경제연구소 보고서)
- 4) 우리나라의 바이오에너지 기술개발 수준은 선진국 대비 약 65~70% 수준으로 적극적인 기술개발이 필요.
- 5) 바이오에너지 개발의 원료인 원자재 개발의 일환으로 환경 내성 형질전환체 개발은 산업화 과정에서 요구되는 대량의 원자재 공급뿐만 아니라 앞으로 예상되는 원자재 가격 상승에 대한 대비차원에도 매우 중요한 과제임.
- 6) 다양한 내염성 및 내건성 관련 기초 연구를 통한 유전자 개발 및 활용 연구 진행됨.

2. 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	○	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

- 1) 미국은 정부주도의 기술개발과 보급으로 2030년까지 전기열 생산 점유율 5%, 운송연료 점유율 20% 그리고 제품생산 점유율 25%를 목표로 하고 있음. (2007, Vision for Bioenergy and Biobased Products in the US)
- 2) EU 연합은 바이오디젤 생산에서 높은 기술력으로 가지고 있으며, 2005년 390만 톤 이상의 바이오연료를 생산하였으며 2020까지 수송연료 시장의 10% 점유를 목표로 하고 있음.
- 3) 일본의 경우 바이오에너지 생산기술 개발이 미흡하였으나 2002년 이후 정부 주도의 기술 개발로 해외에너지 개발에 주력하여 2030년 수송연료의 20% 시장 점유를 목표로 하고 있음.
- 4) 현재, 바이오에탄올 사용현황은 연료용 (61%)으로 대부분 사용되고 있으며 나머지는 공업용 및 음료용으로 사용되고 있음.
- 5) 앞으로 바이오에너지에 대한 시장 점유율은 새로운 바이오원료의 개발 및 산업화 기술 (에탄올 및 디젤 생산)의 발달과 더불어 급격한 신장을 가져올 것으로 전망됨.

3. 국내 · 외의 연구현황

1) 국내 연구현황

- (1) 우리나라는 90년대 육종기술 위주에서 2000년부터 형질전환체 개발 및 특허 출원 건수가 증가하고 있음.
- (2) 국내외 형질전환체 개발의 최종 목표는 개발된 작물의 산업적 활용에 있어서 대부분 식량작물을 대상으로 제초제 내성을 통한 생산성 향상에 집중되어 왔음.
- (3) 형질전환 작물 및 바이오에너지 원자재의 개발과 관련된 국내 연구기관 및 연구개발 성과의 활용은 다음과 같음.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
(주)에프앤피	- 바이오 원자재 품종육성 - 환경저항성 GM식물 개발	- 조숙성 유채 품종개발 (Postech 공동) - 건조내성 유채 개발 완료 - 현지적응성 포장 실험
바이오에너지작물센터	- 바이오디젤용 유채품종개발 - 바이오에너지 원료작물 유전자 원수집, 품종개량, 실용화	- 조숙성, 고오일 함유 등 품종개발 및 보급
한국원자력연구원	- 돌연변이 기술을 활용한 신품종 개발	- 내염성, 조숙성 유채 개발 중
한국생명공학연구원	- 바이오매스 자원 개발	- 건조내성 고구마 개발
ECO Solutions	- 식물성오일 원료농장 - 안정적 biodiesel 생산기반 - 해외 Plantation 구축	- 국내생산 5만톤/년 - 해외생산 50만톤/년 (Jatropha Palm)
M Energy (구, 가야에너지)	- 바이오디젤 연구개발 및 판매	- 2002년 10만톤/년 생산공장준공
삼성 C&T	- 바이오디젤 생산	- 인도네시아에 Palm oil 농장 (24,000ha 조성-2008년)

2) 국외 연구현황

- (1) 형질전환체 개발관련 원천 특허는 거대종자회사 (Bayer Crop Science, Syngenta 등)가 주요기술을 독점하고 있으며, 최근의 기술들은 외래유전자 삽입의 원천기술 및 원리는 비슷하나 효율을 증가시키는 방법들이 출원되고 있음. (Binary vector system, Genegun 등)
- (2) 미국은 형질전환 등 품종개량 분야에서 독보적인 위치를 차지하고 있으며, 일본은 90년대 후반부터 육종기술에 치중하고 있고 유럽은 90년대 후반 이후 감소 추세에 있음.

(3) 출원 기업은 Monsanto사, Dupont, Pioneer Hi-Bred 등이 형질전환체 출원 위주로 개발하고 있음.

(4) 형질전환 작물 및 바이오에너지 원자재의 개발과 관련된 국외 연구기관 및 연구개발 성과의 활용은 다음과 같음.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Logan Corporation, Canada	- 짚에서bioethanol 생산 - 균주 및 효소 개발	- Cellulose 분해균 개발 - 생산공장 설립
Shell, USA	- Bioethanol생산 공정개발	- 시범사업
Cargill, USA	-바이오디젤 생산공장 설립	- 2006년 독일에 20만톤/년 규모 공장 설립
Adeco, USA	- 신규 에탄올 생산공장 건설 추진	- 2007년 10억 달러 투자 발표
InfinityBio-Energy, EU	- 에탄올생산체계 구축	- Disa, Montasa에탄올공장 인수 - 2007년 3억불 투자
Louis Dreyfus, France	- 에탄올 생산	- 5개의 에탄올 공장 운영
SocieteGenerate, France	- 바이오에탄올 시장 진출	- 10억 달러규모의 에너지 펀드 조성
Toyota, Japan	- Bioplastic생산 원자재 확보	- 2050까지 10조 달러 투자 (고구마)
Mitsui, Japan	- 바이오에탄올상업화	- Petrobrastk와 해외 수송망 건설 - 40개 에탄올 공장 건설-80억 달러
Agrobransie, Sweden	- 바이오에너지 원자재개발	- Short Rotation Croppice (버드나무) 개발

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

< 주관 연구기관 >

1. AtBG1 overexpression 벼의 구축과 표현형 연구

본 연구에서는 본 연구실에서 2006년 Cell지에 발표한 ABA-GE를 ABA로 가수분해하여 세포내 ABA level을 조절하는 기능을 가진 유전자인 AtBG1을 rice에 형질전환하여 이 형질전환한 rice line들을 구축하고 AtBG1이 벼에서 가뭄이나 NaCl stress에 내성을 나타낼 것인지를 연구하고자 하였다. AtBG1이 들어간 벼 형질전환 vector를 제조하였다. Promoter로는 ubiquitin promoter를 사용하여 transformation vector를 제조하였으며 벼의 형질전환은 포항 공대 안진홍 교수님의 도움으로 T0 세대에서 40 line을 구축하였다 (그림 1). Primary transformant로부터 tissue를 harvest하여 이들이 형질전환체라는 것을 HA antibody를 이용하여 Western blot analysis를 통하여 확인하였다. (그림2) 이는 형질전환체를 만들 때 AtBG1의 C-terminal 말단 근처에 HA epitope를 삽입한 AtBG1:HA 를 사용하였기 때문에 가능하였다. 이들 T0 line으로부터 씨를 확보하여 이들을

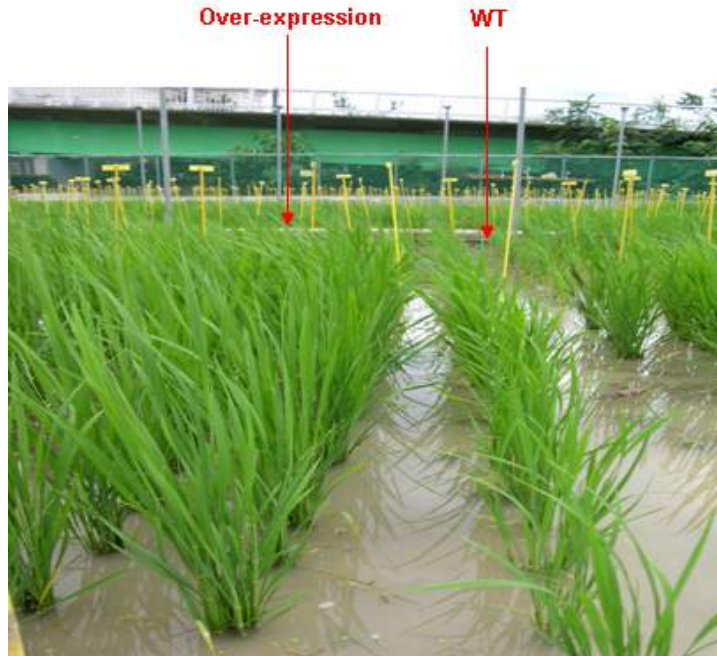


그림 1. AtBG1이 도입된 형질전환 벼의 제조.
40개의 T0 line을 선발하였으며 이들로부터 씨를 확보하였다.

T1 전개를 수행하였다. 각 T0 line 당 40-50개의 씨를 이용하여 T1 line을 전개하였다. T0 line의 개수는 40 line을 전개하였다. 이들 각 T0 line의 40개에 해당하는 T2 씨를 확보하였으며

이들의 표현형 및 항생제 저항성을 관찰하기 위하여 T2 line을 전개 하였다.

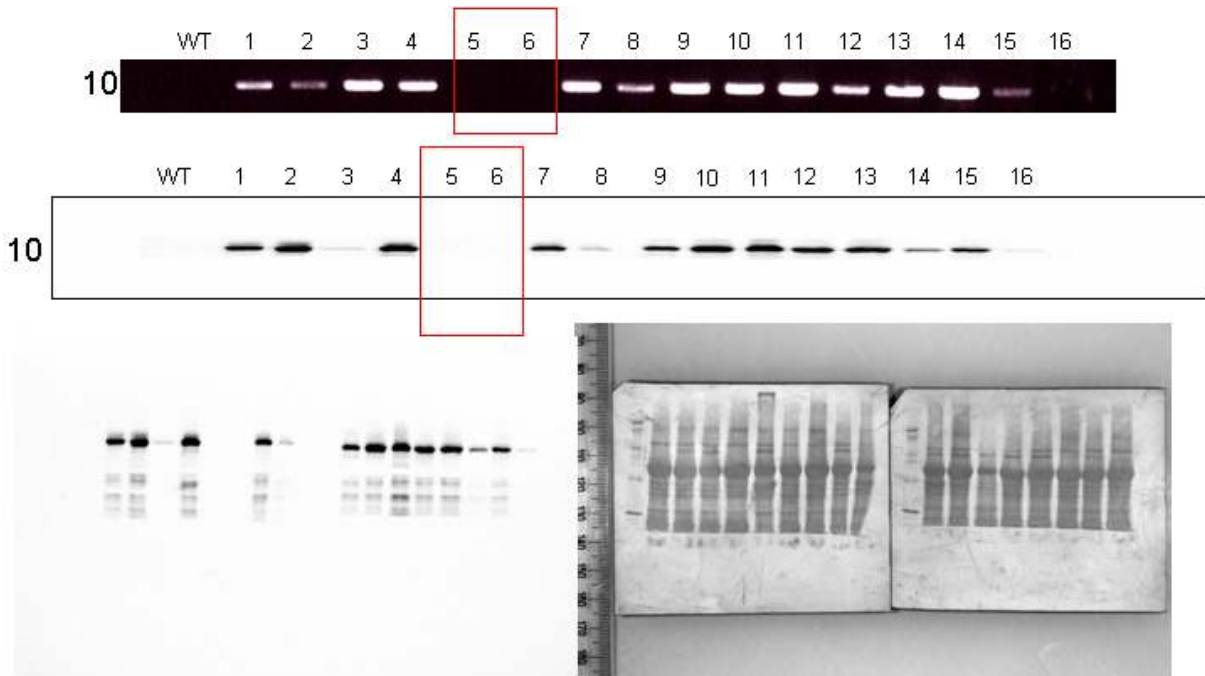


그림 2. Western blot 및 genomic PCR을 통한 T1 line의 분석

Total genomic DNA와 total protein extracts를 잎으로부터 분리하여 PCR과 Western blot analysis를 수행하였다. Genomic PCR은 AtBG1-specific primer를 이용하여 수행하였으며 Western blot analysis는 anti-HA antibody를 사용하여 수행하였다. T1 line 중에서 10번 line을 분석하였으며 16개의 #10 line 중에서 5번과 6번 line이 segregating non-transgenic plant임을 확인할 수 있다.

일차년도에 T1 line의 일부를 사용하여 stress 실험을 수행하여 표현형을 관찰하고자 하였다. 이로부터 얻어진 결과는 transgenic line에서 dehydration stress에 더 잘 견디는 표현형이 나타났다 (그림 3). 이 결과는 아직은 preliminary 결과로 많이 T2 line을 가지고 충분한 data를

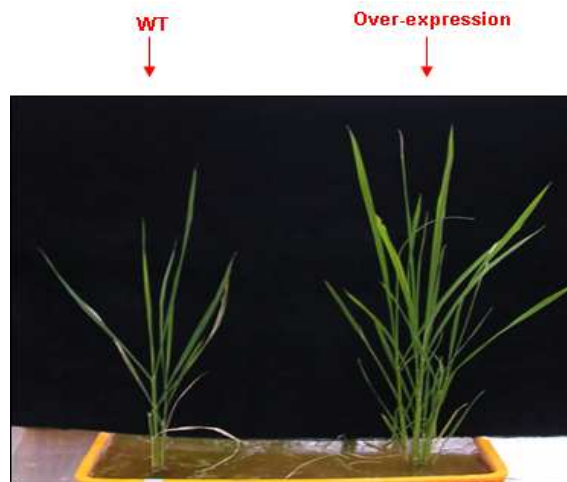


그림 3. 형질전환 벼의 dehydration stress resistancy test

T1 line의 벼를 pot에 심어서 약 2 주간 물을 주지 않는 dehydration stress 조건하에서 다시 2주일 동안 관찰하였다. 이로부터 얻어진 결과는 AtBG1 overexpression line이 더 잘 견디며 발육이 우수하다는 결과를 얻었다.

확보하여 확실한 결론을 내려야 할 것으로 사료된다. 하지만 preliminary 결과이지만 고무적인 결과라 할 수 있을 것이다. 또한 T3 line을 이용하여 일차적인 내염성 및 내건성에 대한 연구를 진행하였다.

이들을 다시 전개하여 T3 세대의 seed를 확보하였으며 이들을 가지고 individual line 들의 표현형을 연구하였다. 각 line의 T3 세대에서 homoline, hetero line 및 wild type의 분리 작업을 hygromycine resistance를 이용하여 확인하였으며 이렇게 확인된 line들은 다시 각 개체로부터 protein을 분리하여 western blotting analysis를 통하여 이들이 homoline인지를 다시 한번 검증하였다.

이렇게 확인된 line들은 다시 기내 배지에서 NaCl stress resistance에 대한 연구를 수행하였다. 그 결과 흥미롭게도 wild type에 비해서 AtBG1 rice transgenic line들은 높은 NaCl stress resistance를 나타냄을 관찰하였다. 실험은 0 mM, 150 mM, 200 mM의 NaCl 농도에서 수행하였다. 이 결과 AtBG1이 발현되는 homoline에서 높은 NaCl stress resistance를 나타내고 있다 (그림 1). 또한 기내 배지에서 뿐만 아니라 field trial을 동시에 시도하였다. 각 line 당 20에서 40개의 individual line을 포장에 심어서 dehydration stress resistance에 대한 연구를 수행하였다 (그림 2). 포장 실험에서 사용한 line은 각 개체의 genotyping이 되지 않은 전체 pool을 대상으로 예비 연구를 수행하였다.

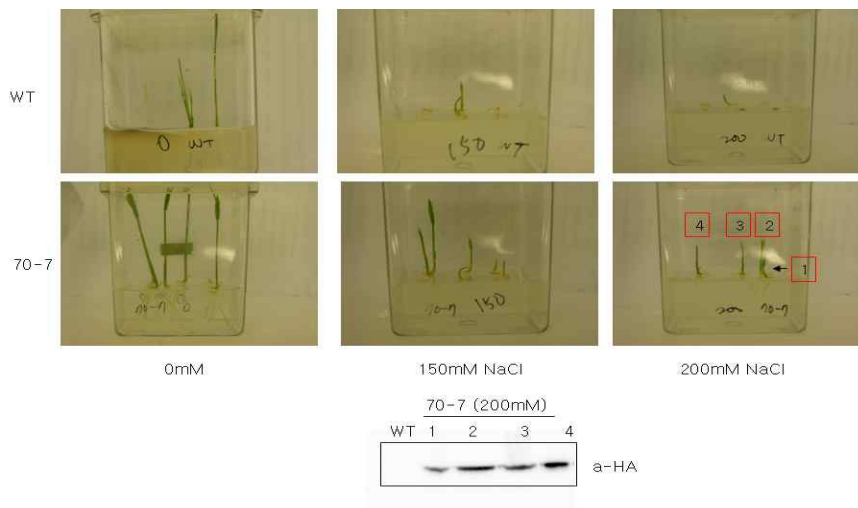


그림 4. NaCl stress resistance 표현형과 AtBG1의 발현

T3의 homoline과 WT을 0 mM, 150 mM, 200 mM의 NaCl 농도에서 키웠다. 그결과 wild-type은 150과 200 mM에서 거의 발아를 하지 않으며 따라서 성장을 하지 않지만 70-7번이 homoline에서는 200 mM에서 다 잘 발아하고 성장함을 확인할 수 있다. 그리고 각 line에서 total protein을 확보하여 Western blot analysis를 수행한 결과 모두 AtBG1을 발현함을 확인할 수 있다.



그림 5. 벼 포장에서의 각 line에 대한 내건성 실험

각 original line당 20-40개의 T3 line을 포장에 심고 이들을 표현형을 관찰하고 있다. 이들 각 개체에서는 다시 tissue를 sampling하여 Western blot analysis를 수행하여 AtBG1이 발현됨을 관찰할 것이다.

기초 실험 결과 AtBG1을 overexpression하는 T3 line에서 osmotic stress (NaCl 및 내건성)에 대해서 반응성이 좋은 (저항성을 나타내는) 것을 기내 배지를 통한 실험과 field trial을 이용한 연구로 확인한 후 좀 더 정확한 실험을 위하여 homoline 및 wild-type line 선발을 실시하였다.

그 방법은 아래와 같다.

1. T3 11라인, 각 20 siblings에 대한 종자를 확보하여 연구를 진행하였다.
(segregation population을 대상으로한 수분 손실 실험 결과를 기초로 하여 선별하였음, 일부는 쪽정어로 종자 확보가 용이하지 않은 라인도 있었음).
2. Hygromycin 배지에 심어 선별 작업을 시도하였다 하지만 hygromycin에 대한 저항성의 표현형이 leaky하여 wt이 안나옴. 따라서 표현형 별로 PCR을 5개체씩 HPT유전자를 대상으로 PCR실시한 결과를 바탕으로 호모라인과 야생형을 추정 선별하였다.
3. 확실한 결과 도출을 위해 선별된 라인별로 10개체씩 더 심어 HPT에 대한 PCR을 재실시하고, 동일한 배지에서 자란 개체 4개를 무작위 선별하여 단백질 발현을 확인하였다.
4. PCR과 단백질 발현 실험을 근거로 7개 독립적 라인에서 최소 1개의 호모와 야생형을 확보하였다.

☞ Osmotic 및 dehydration stress 실험 수행

1. Sample 준비: 20개의 Seed 껍질을 까서 씨눈이 깨끗한 것으로 선택하여 70%ET-OH에 살짝 헹군 다음 70%ET-OH버리고 50% 락스 용액에 30min shacking함. -> 락스 용액 버리고 QW로 4번 정도 헹굼. -> Hygromycin selection용 MS배지에 치상 인공환경실에서 키움 -> 10일 후

확인. (온도에 따라 다름)

Sampling은 2잎 정도로 함. (mixer mill이용)

CTAB 방법사용 최종 volume 50 μ l.

2. DNA prep해서 PCR수행.

☆ PCR primer

Hph-a: tgt att gac cga ttc ctt gc

Hph-b: cga cgt ctg tcg aga agt tt

☆ PCR 조건.

95 $^{\circ}$ C 5min-95 $^{\circ}$ C 1min-57 $^{\circ}$ C 1min-

72 $^{\circ}$ C 1min30sec-72 $^{\circ}$ C 10min-15 $^{\circ}$ C ∞

MS(hyg)배지 selection결과 각 라인에서 homo 2plate, wild type 2plate로 PCR.

3. 2차 실험

각 라인에서 homo 2,wild type 1로 실험

Seed 10~15립을 MS 배지에 키워서 sampling 한 후 DNA prep 해서 PCR.

Hyg-PCR 결과 후 homo와 wild type으로 추정되는
3개의 plate, 각 4개의 sample 실험

10 μ l씩 loading

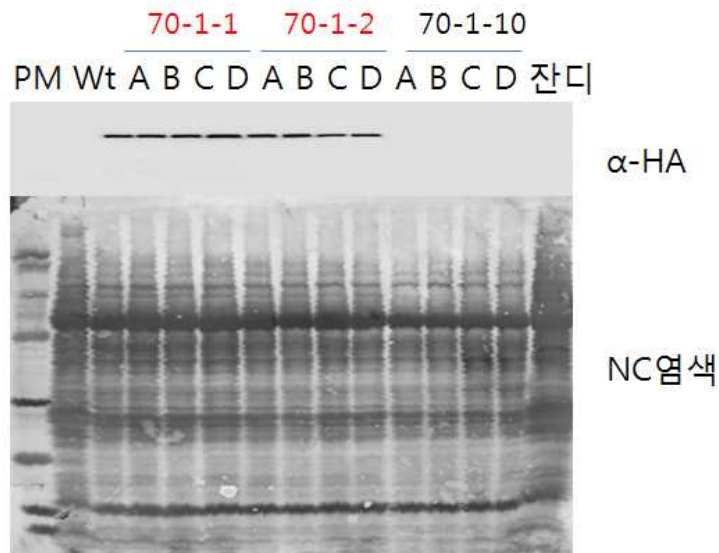


그림 6. Homoline 선발 1.

70-1 line에서 얻어진 T3 세대의 씨로부터 얻어진 rice plant에서 total protein을 extract하여 anti-HA antibody를 이용하여 Western blot analysis를 수행하였다. 또한 hygromycin selection 및 PCR을 이용하여 1:3의 비율로 hygromycin negative and positive plant ratio를 나타내는 것을 확인하였다.

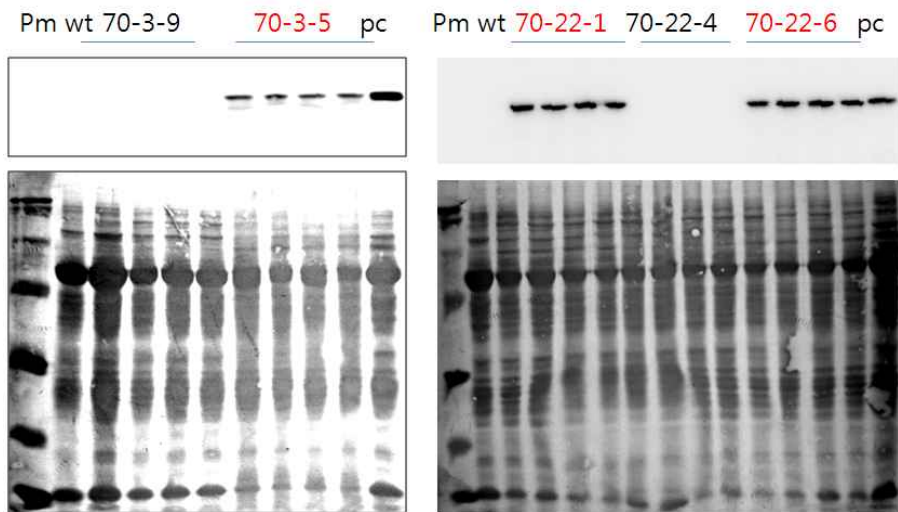


그림 7. Homoline 선발 2.

70-3 and 70-22 line에서 얻어진 T3 세대의 씨로부터 얻어진 rice plant에서 total protein을 extract하여 anti-HA antibody를 이용하여 Western blot analysis를 수행하였다. 또한 hygromycin selection을 이용하여 1:3의 비율로 hygromycin regative and positive plant ratio를 나타내는 것을 확인하였다.

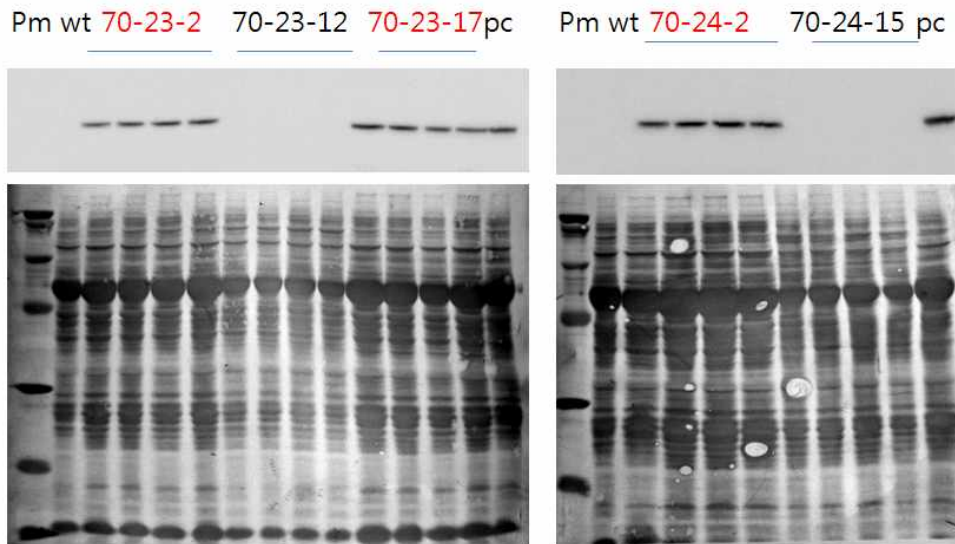


그림 8. Homoline 선발 3.

70-23 and 70-24 line에서 얻어진 T3 세대의 씨로부터 얻어진 rice plant에서 total protein을 extract하여 anti-HA antibody를 이용하여 Western blot analysis를 수행하였다. 또한 hygromycin selection을 이용하여 1:3의 비율로 hygromycin regative and positive plant ratio를 나타내는 것을 확인하였다.

Table 1. Osmotic and dehydration 실험을 위하여 최종 선발된 line

	Line number	Homo	Wild type
1	70-1	70-1-1	70-1-10
2	70-3	70-3-5	70-3-9
3	70-22	70-22-1	70-22-4
4	70-23	70-23-2	70-23-12
5	70-24	70-24-2	70-24-15
6	70-25	70-25-1	70-25-15
7	11-8	11-8-1	11-8-18

☼ salt와 Osmotic stress 에 관한 내성 조사

본 연구에서는 salt stress와 dehydration stress에 대한 내성을 조사하였다. Salt stress로는 NaCl을 사용하였고 dehydration stress를 위하여서는 mannitol을 이용하였다. 그리고 이들 plant에 대한 stress 저항성은 일차적으로 배지에서 수행하였다.

☆ 배지 조건

Salt Stress condition

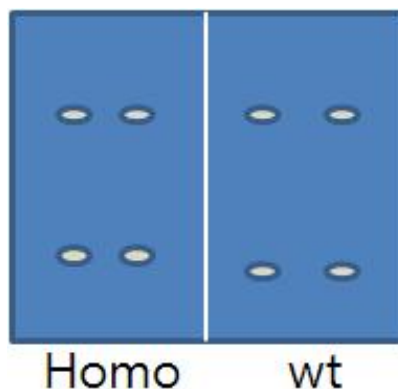
: 0mM, 100mM, 200mM of NaCl

Osmotic Stress condition

: 0mM, 200mM, 300mM of Mannitol

☆ 배양방법

아래 그림과 같이 magenta 박스에 각 조건의 배지를 만들고 homo와 wt 각각 4개의 종자를 파종하여 배양실 조건에서 배양하였다.



☀ Salt와 Osmotic stress 에 관한 내성 조사 실험 결과

총 7개의 개별라인을 대상으로 실험한 결과,

70-3번 라인에서 100mM 과 200mM NaCl 농도에서 차이를 보여 내염성을 가지는 것으로 판단 되었다.

70-22번 라인에서 200mM 에서 homo라인이 wt에 비해 근소한 차이로 생육상태가 좋아보이는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 9) . Mannitol에서도 비슷한 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있었지만 다시 다양한 Mannitol농도를 이용하여 반복실험을 할 필요가 있다.

그리고 Mannitol에 대한 현저한 내성을 나타내는 대표적인 것으로는 line 70-22에서 확인할 수 있었다 (그림 10). 그 효과를 좀 더 정교하게 분석하기 위해서 다양한 농도의 mannitol에서 확인할 필요가 있다.

❖70-3 내염성 결과

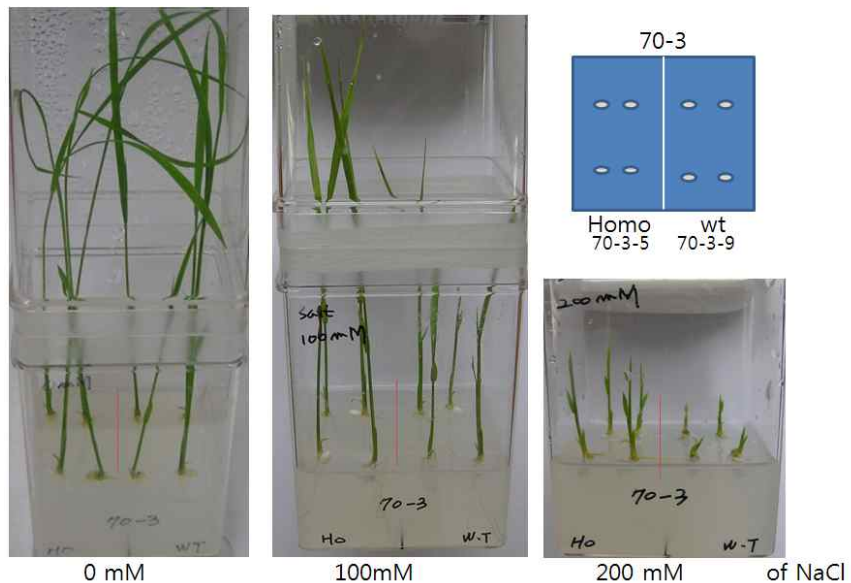


그림 9. NaCl stress에 대한 내성 검증

70-3 line에서 homoline과 wild type plant를 확보하고 이들을 이용하여 0 mM, 100 mM, 200 mM NaCl 농도에서 벼의 발육 상태를 비교함.

❖70-22 Osmotic resistance 결과

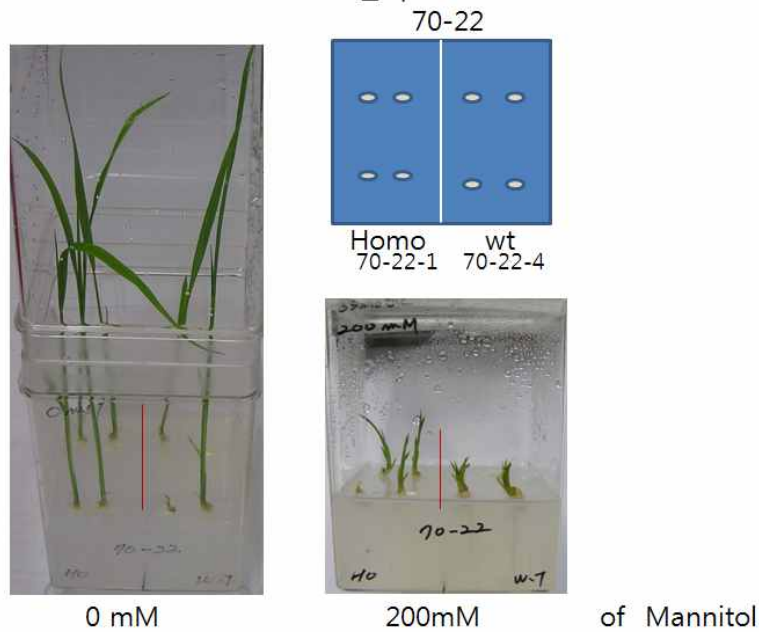


그림 10. Mannitol stress에 대한 내성 검증

70-22 line에서 homoline과 wild type plant를 확보하고 이들을 이용하여 0 mM, 200 mM Mannitol 농도에서 벼의 발육 상태를 비교함.

고농도의 염과 mannitol에서 뿌리의 성장에 미치는 영향이 크기 때문에 형질전환체들이 이러한 조건하에서 뿌리의 성장에 어떠한 영향을 미치는지는 대단히 중요한 형질이 된다. 따라서 200 mM의 NaCl과 200 mM mannitol에서 형질전환 벼 뿌리의 성장을 조사하였다. Line 11-8의 경우에 볼 수 있듯이 200 mM의 NaCl 농도에서 WT은 전혀 뿌리의 발육이 일어나고 있지 않지만 homoline은 아주 좋은 뿌리의 발달을 볼 수 있다. 또한 Mannitol 200 mM하에서 homoline이 WT에 비하여 대단히 좋은 뿌리의 발육을 보이고 있다. 따라서 AtBG1의 발현을 통한 ABA의 생성이 벼의 내염성 및 내건성을 증가 시켜 주었다는 결론을 도출할 수 있다 (그림 11). 또한 line 70-24의 경우에도 WT보다 homoline이 뿌리의 성장이 더 낫다는 것이 관찰되었다. 이어서 mannitol 200 mM에서의 뿌리를 관찰하였다. 그 결과 homoline이 WT보다도 현저하게 뿌리의 발육이 좋게 나타났다 (그림 12). 두 개의 line을 경우 모두 AtBG1의 발현을 통한 ABA의 생산이 벼에서도 애기장대에서도 마찬가지로 가뭄의 내성에 특히 효과적인 작용을 한다고 결론을 내렸다. 이러한 결과는 아직 초기의 결과로 이어서 더 연구를 진행하여 이들로부터 더 나은 line을 선발하고 이들 line을 고정하여 내염성 및 내건성이 강한 벼를 개발할 수 있을 것으로 기대된다. 그리고 다양한 농도의 NaCl과 Mannitol 조건하에서 여러 형질전환체 line에 대한 뿌리의 발육 및 성장의 비교를 하였다 (그림 13, 그림 14). 그리고 이들 형질전환체에 대한 fiedl test를 통한 내건성 및 내염성 분석은 협동 연구과제에서 수행하였다.

❖11-8 뿌리 발달 결과



그림 11. 200 mM의 NaCl과 200 mM의 mannitol 조건하에서의 형질전환체 Line 11-8의 뿌리의 발육 및 성장 비교.

❖70-24 뿌리 발달 결과



그림 12. 200 mM의 NaCl과 200 mM의 mannitol 조건하에서의 형질전환체 Line 70-24의 뿌리 발육 및 성장 비교.

❖ NaCl 영향

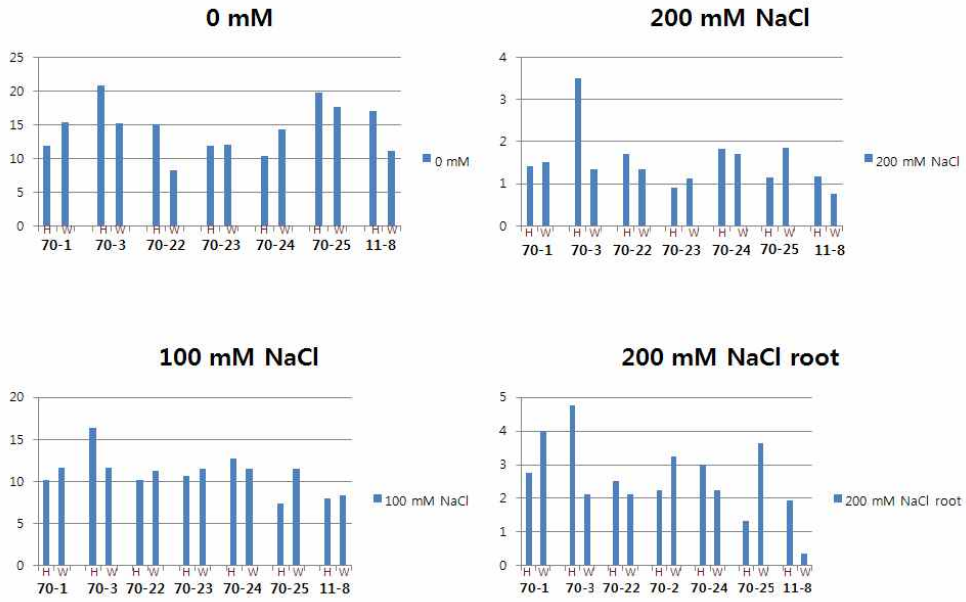


그림 13. 다양한 형질전환 line의 NaCl에 대한 뿌리 성장의 비교

❖ Mannitol 영향

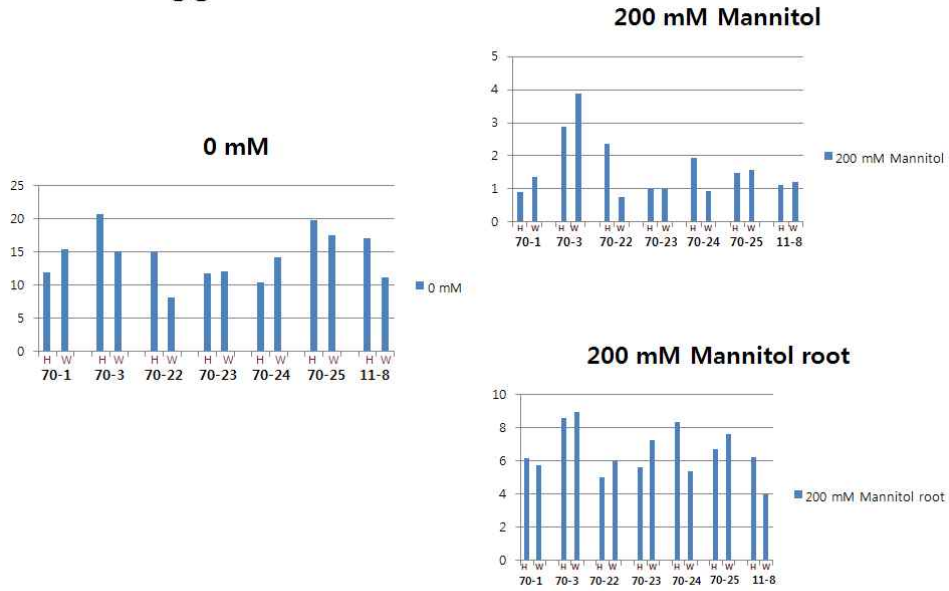


그림 14. 다양한 형질전환 line의 mannitol에 대한 뿌리 성장의 비교

2. AtBG2의 유전자 확보와 특성 규명을 통한 활용가능성 검증

AtBG2 유전자의 localization과 ABA-GE를 분해하는 능력은 1차 년도에 연구를 수행하였으며 2차 년도에서는 이 유전자가 mutation이 된 *atbg2* mutant에서의 ABA level을 측정하고자 하였다. 다양한 tissue에서 수행하였으나 seed에서 좀 더 significant한 변화를 관찰할 수 있었다. Seed tissue에서는 wild type에 비해서 약 90% 정도의 ABA level을 보였다. 그리고 이 낮은 ABA level은 AtBG2를 complementation한 transgenic line에서 다시 wild type과 같은 level로 높아짐을 확인하였다 (그림 15). 또한 AtBG2가 NaCl 및 ABA signaling pathway에 대한 영향을 *atbg2*에서 luciferase activity를 이용하여 다시 확인하였다. 이를 통해서 AtBG2가 mutation되었을 때 NaCl 및 ABA에 대해서 defective하다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 16). 이로써 AtBG2가 세포 내 ABA level을 조절한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 AtBG2가 ABA 및 NaCl의 signaling에 의해서 조절 받는지를 규명하기 위하여 AtBG2의 발현을 ABA 100 μ M 및 150 mM에서의 AtBG2의 induction을 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 그 결과 AtBG2가 외부 ABA와 NaCl에 의해서 induction된다는 것을 확인하였다 (그림 16).

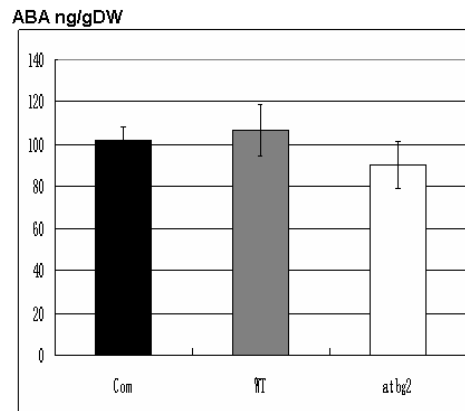


그림 15. *atbg2*에서의 ABA의 농도 측정

Wild type, *atbg2* 및 complemented *atbg2*의 plant의 ABA 농도를 측정하였다. 그 결과 *atbg2* mutant의 씨에서 약 90% 정도의 ABA level을 보임을 알 수 있다.

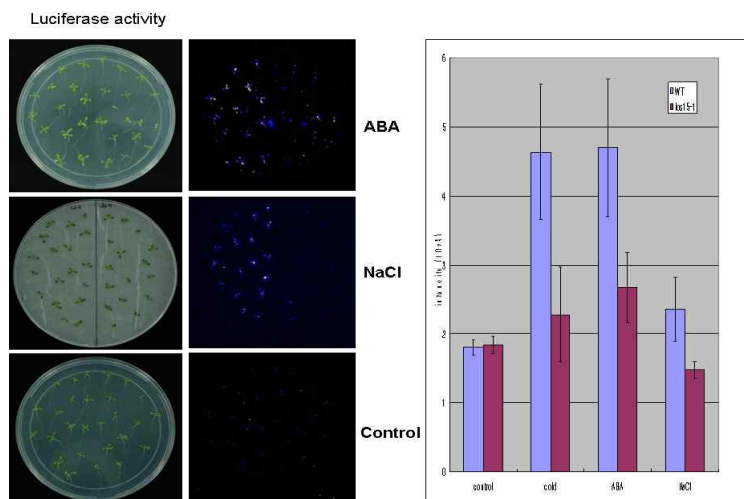


그림 16. *atbg2* mutant line에서의 RD29-luciferase gene의 luciferase activity

Wild typd 과 atbg2의 mutant line에서 NaCl 및 ABA를 처리한 후 luciferase activity를 측정하였다. 그 결과 mutant plant에서 luciferase activity가 낮게 나타남을 알 수 있다.

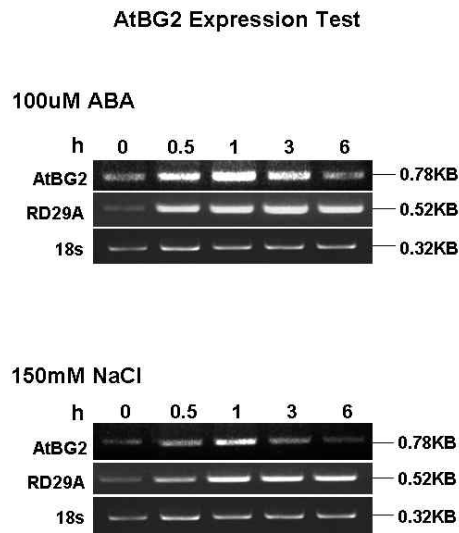


그림 17. Induction of AtBG2 by ABA and NaCl

Total RNA was purified from Arabidopsis plants grown for 2 weeks and used for RT-PCR analysis using the indicated specific primers. RD29 and 18S rRNA were used as positive and internal controls.

이어서 AtBG2의 발현을 조사하기 위하여 AtBG2::GUS construct를 제조하고 이를 형질전환하여 transgenic Arabidopsis를 만들고 이로부터 AtBG2의 발현 조직을 조사하였다. T1 generation의 seedling 및 잎, 뿌리 등을 X-GLUX으로 염색하여 발현 조직을 확인하였다. 그림 17에서 보는 바와 같이 흥미롭게도 seed의 경우에는 axial bud라 부르는 부분에 특이적으로 발현이 되었다. 이 조직은 새로이 뿌리가 나오는 조직으로 아마도 가뭄이나 물의 존재에 대해서 민감하게 반응하는 조직이기 때문에 ABA의 생성이 중요한 역할을 할 것으로 판단되었다. 떡잎과 잎 조직에서 발현이 되었다. 특히 떡잎과 잎의 vein 조직에서 발현이 강하게 나타났다. 또한 뿌리에서 발현이 됨을 관찰할 수 있었다. 이를 통하여 AtBG2의 발현이 ABA의 생성과 관련이 높은 조직에서 발현됨을 확인할 수 있었다. 또한 AtBG2의 발현이 dehydration stress에 따라서 높아지는 결과를 얻었다 (그림 18). 이는 PCR을 통해서 얻어진 결과들과 일치하고 있다. 이를 통해서 AtBG2의 발현이 이미 본 연구실에서 연구한 AtBG1과 유사하면서도 뿌리와 같은 조직에서의 발현에는 차이를 보이는 것으로 관찰되었다.

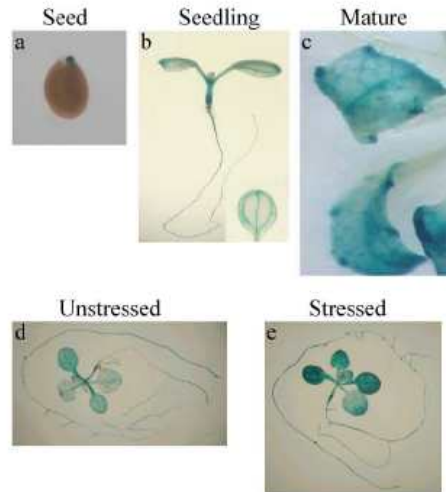


그림 18. AtBG2::GUS의 transgenic Arabidopsis에서의 AtBG2의 발현 조사

AtBG2의 기능을 확인하기 위하여 *atbg2*의 mutant의 표현형을 연구하였다. *atbg2-1*과 *atbg2-2*의 두 개의 allele을 이용하여 NaCl에 대한 표현형을 연구하였다. 125 mM의 NaCl이 있는 MS plate에서 mutant의 성장을 wild type plant와 비교하였다. 그 결과 *atbg2* mutant들의 성장이 저해됨을 확인할 수 있었다. 이를 통해서 AtBG2가 NaCl stress 반응에 관여한다는 것을 확인할 수 있었다. 특히 뿌리의 성장을 비교하였을 때 그 차이가 분명하게 드러남을 확인할 수 있다. 이는 전형적인 NaCl stress sensitive phenotype의 하나이다. 그리고 이러한 결과를 더 확인하기 위해서 AtBG2를 35S promoter를 사용한 형질전환 vector를 만들고 이를 *atbg2-2* mutant에 도입하여 AtBG2가 overexpression 되는 경우에 어떤 표현형을 나타내는지 확인하였다. 그 결과 AtBG2/*atbg2-2* transgenic plant가 NaCl stress에 대해서 오히려 wild type 보다 더 저항성을 나타냄을 확인할 수 있었다 (그림 19). 이는 아마도 AtBG2를 strong한 promoter인 35S promoter를 사용하였기 때문에 wild type plant에서의 AtBG2의 발현보다도 더 높게 발현됨으로 인하여 나타나는 현상이라 생각된다.



그림 19. AtBG2, *atbg2-2*와 AtBG2/*atbg2-2*의 125 mM NaCl plate에서의 성장 비교
세 종류의 식물을 125 mM이 포함된 MS 배지에 plant한 후 식물의 성장을 비교하였다.

이어서 이 AtBG2의 기능을 더 연구하기 위하여 AtBG2/*atbg2-2*, *atbg2-2*과 wild type에 대한 dehydration stress response를 연구하였다. 이 때 dehydration stress response를 보기 위해서 seed out-put을 비교하였다. 이들 식물이 flowering stage까지 성장하였을 때 더 이상 물을 공급하지 않고 계속 키운 후 이들 식물이 생산하는 seed의 전체 양을 비교하였다. 이 조건

하에서 씨의 out-put이 wild type의 경우에 15%로 줄어 들을 보였다. atbg2-2의 경우에는 거의 씨가 맺히지 않았다. 반면에 AtBG2/atbg2-2의 경우에는 28%로 씨의 생산이 현저히 늘어나는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 20). 이는 AtBG2가 특히 seed 형성 시기에 dehydration stress에 강하게 저항성을 나타내도록 하여 준다는 것을 의미한다.

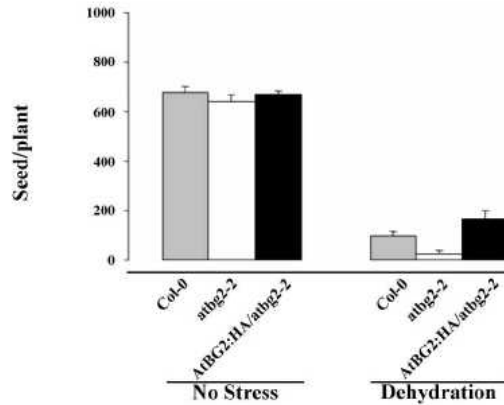


그림 20. Dehydration stress 반응에 대한 AtBG2의 역할

AtBG2의 표현형은 AtBG2가 ABA의 생성에 중요한 역할을 할 것으로 판단되게 하였다. 따라서 AtBG2가 AtBG1과 같이 ABA의 생성에 관여하는지를 규명하기 위해서 in vitro에서 AtBG2가 ABA-GE를 ABA로 가수분해하는 능력이 있는지를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 AtBG2:HA를 protoplast에서 발현시키고 이를 anti-HA antibody를 이용하여 immunoprecipitation기법을 이용하여 분리하고 이를 이용하여 ABA-GE hydrolysis activity를 측정하였다. 이와 같은 방법으로 한 결과 AtBG2가 ABA-GE를 ABA로 가수분해하는 능력이 있다는 것을 확인하였다 (그림 21). 이는 AtBG2가 AtBG1과 같은 효소 기능을 갖는 단백질을 제시하는 것이다. 이로서 세포내에서 ABA-GE를 ABA로 가수분해하는 효소가 여러가지 isoform이 존재하는 것을 최초로 증명하였다. AtBG2의 효소의 활성도를 비교하기 위해서 AtBG1을 분리하여 효소의 활성도를 비교하였다. 그 결과 AtBG2의 ABA-GE 가수분해 활성이 AtBG1과 거의 유사하다는 것을 확인할 수 있었다.

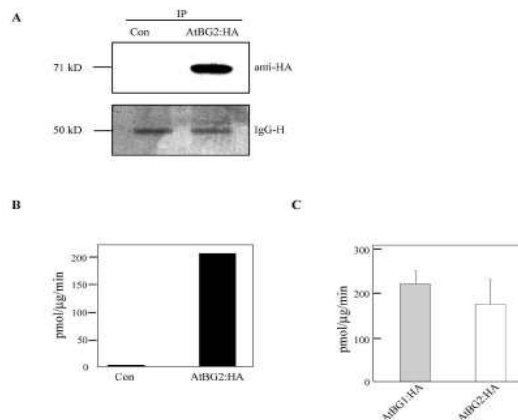


그림 21. AtBG2의 ABA-GE 가수분해 효소 활성도의 측정 및 AtBG1과의 활성도 비교

AtBG2:HA 및 AtBG1:HA를 protoplast에 발현 시킨 후 anti-HA antibody를 이용하여 분리하였다. 그리고 이들 분리된 AtBG1과 AtBG2를 이용하여 in vitro에서 ABA-GE와 incubation하여 ABA-GE의 가수분해 정도를 확인하였다. 반응 후 ABA는 HPLC를 이용하여 ABA fraction을 확보하고 이를 anti-ABA antibody를 이용하여 정량하였다.

AtBG1의 경우에는 ER에 존재하면서 ABA-GE를 ABA로 가수분해하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 AtBG2의 세포내의 어떤 소기관에 존재하는지를 확인하고자 하였다. AtBG2 역시 N-terminus에 hydrophobic signal sequence를 가지고 있는 것이 확인되었다. 하지만 AtBG1과 같이 ER retention signal을 가지고 있지는 않았다. 따라서 ER로 targeting이 되기는 하지만 ER에 머물지 않을 것으로 예측되었다. AtBG2가 targeting되는 세포내의 소기관을 확인하기 위해서 AtBG2에 GFP를 tagging하거나 HA를 tagging하여 protoplast와 transgenic plant에서의 위치를 확인하였다. 그 결과 AtBG2는 vacuole에 targeting되는 것을 확인하였다 (그림 22). 그리고 biochemcial level에서 확인하기 위해서 central vacuole을 분리하여 단백질을 Western blot으로 확인한 결과 역시 vacuole에 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

AtBG1의 경우에는 dehydration stress 시에 high molecular weight form을 만듦으로 인하여 효소의 활성도를 높이는 것으로 보고되었다 (Lee et al., 2006). AtBG2의 경우에 dehydration stress에 따른 효소의 변화를 관찰하였다. 흥미롭게도 AtBG2는 식물 성장의 정상 조건에서도 high molecular weight form으로 존재한다는 것을 확인하였다. 대신 흥미롭게도 dehydration stress하에서는 protein의 level이 증가한다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 23). 이는 AtBG2가 vacuole에 존재하기 때문에 늘 proteolytic activity에 노출되어 있을 것으로 추정되며 이에 대한 protection mechanism으로 single molecule로 존재하기 보다는 high molecular weigh form으로 존재하는 것이 더 합리적이라는 판단을 하게 해 주었으며 동시에 dehydration stress 하에서는 vacuole에서 AtBG2의 degradation을 막아서 protein의 level을 높이는 방법으로 활성을 증가하여 ABA level을 높이는데 기여할 것으로 생각되었다. 따라서 소기관의 특성에 맞게 AtBG2의 활성 조절 방법이 고안되었다는 가설을 세울 수가 있었다.

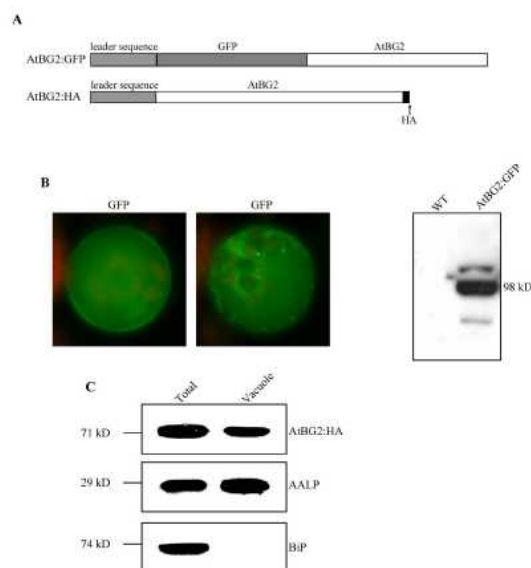


그림 22. AtBG2의 vacuole에 localization 함

- A. AtBG2의 GFP 및 HA tagging construct의 schematic presentation.
- B. Transgenic plant에서의 AtBG2:GFP의 localziation 및 Western blot analysis를 통한 발현 검증.
- C. Vacuole을 분리한 후 Western blot analysis를 통하여 AtBG2가 vacuole 존재함을 검증함.

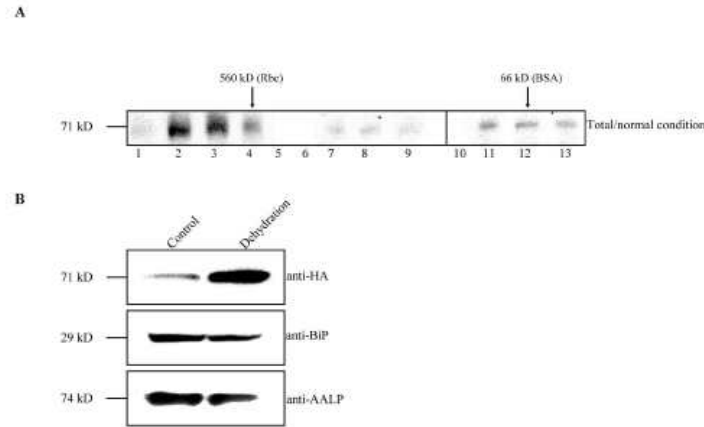


그림 23. AtBG2 의 high molecular weight form의 존재와 dehydration stress에 따른 level의 증가

- A. Total protein을 AtBG2 transgenic plant에서 분리한 후 gel filtration column chromatography를 이용하여 분리한 후 각 fraction을 anti-HA antibody로 Western blot analysis를 수행하였다.
- B. Dehydration에 의하여 AtBG2가 stabilization됨을 확인하기 위하여 AtBG2에 10 시간의 dehydration stress를 준 후에 total protein을 분리하여 Western blot analysis를 수행하였다. 이때 control로 ER protein인 BiP와 vacuole protein인 AALP의 level을 같이 측정하였다.

AtBG1에 의한 ER에서의 ABA 생산에 이어서 vacuole에 존재하는 AtBG2를 통한 ABA의 생산은 식물에서 어떻게 ABA를 생산하는지에 대한 근본적인 질문을 제기하였다. 지금까지 ABA의 생산은 chloroplast를 통한 de novo biosynthetic pathway가 주된 것으로 생각되었다. 하지만 이들 두 다른 pathway를 통한 ABA의 생성은 세포내에서 다양한 방법으로 ABA를 생산할 수 있다는 것을 의미하게 되었다. 따라서 atbg2-2 mutant와 AtBG2의 transgenic plant에서의 de novo biosynthetic pathway와 ABA degradation에 관여하는 효소들의 유전자들의 발현 양상을 연구하였다. 즉 NCED9와 ABA2 및 ABA dehydration pathway에 관여하는 CYP707A1의 발현 양상을 RT-PCR 기법을 이용하여 비교하였다. 그 결과 atbg2-2 mutant에서는 NCED9의 발현이 150% 정도 높게 나오고 있으며 AtBG2 overexpression line에서는 오히려 wild-type plant에서보다 낮게 나오는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 CYP707A1의 경우에는 atbg2 mutant에서는 발현이 wild type에서보다 낮게 나오고 AtBG2의 overexpression plant에서는 높게 나오는 것을 확인할 수 있었다 (그림 24). 이는 식물 세포에서 ABA의 level에 biosynthetic pathway와 degradation pathway가 밀접하게 coordination 되고 있음을 나타내는 흥미로운 결

과로 해석할 수 있었다 (그림 25).

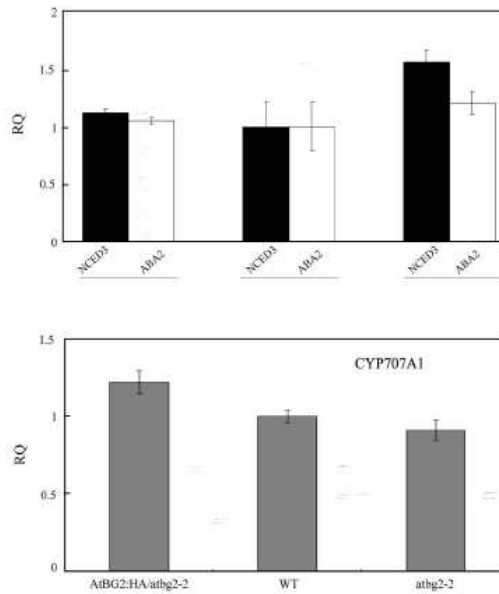


그림 26. atbg2-2 mutant와 AtBG2/atbg2-2 transgenic plant에서의 ABA biosynthetic and degradation pathway 유전자의 발현 비교

Control of ABA levels in plants

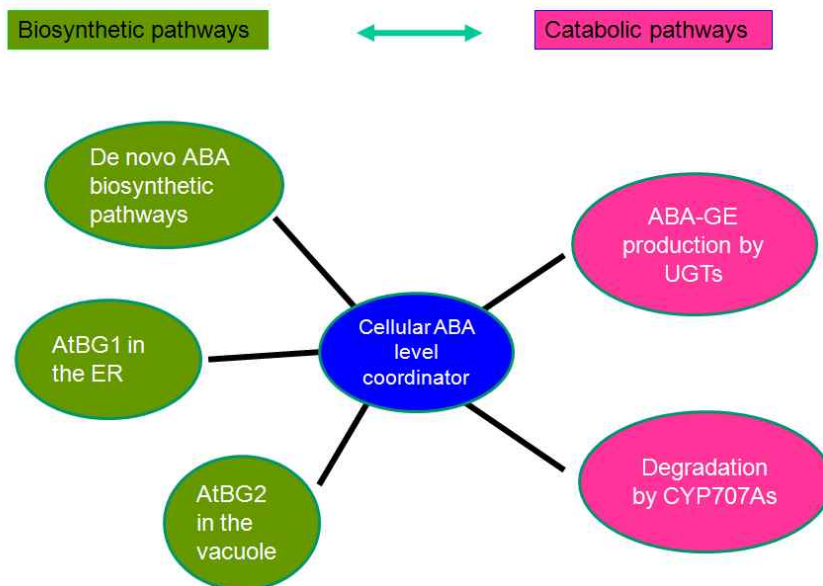


그림 27. 식물 세포내에서의 ABA level의 fine tuning을 위한 model

3. ABA-GE level 조절을 위한 유전자 cloning과 특성 규명.

ABA-GE의 level이 ABA level의 조절에 대단히 중요하다는 것을 본 연구실에서 규명하였다. 따라서 식물 세포에서의 ABA level을 조절에 관여하는 유전자를 확보하고자 하였다. ABA UTP glycosyltransferase (UGT)라 명명된 유전자를 확보하였다. (그림 28)

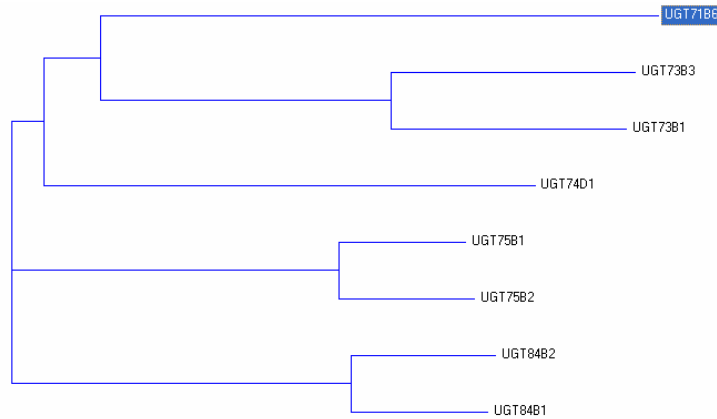


그림 28. UGT의 close family member들의 Phylogenetic tree

UGT71B6는 이미 UGT 활성을 나타내는 것으로 보고가 된 유전자이며 이와 closest homolog들인 UGT73B3 및 UGT73B1에 대한 연구를 수행 중에 있다.

이어서 이 유전자들이 ABA에 대한 responsive한 유전자들인지를 확인하기 위해서 ABA를 처리하고 이들 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과 이들 모두 ABA에 responsive하다는 것을 확인하였다 (그림 29). 하지만 이들 중에서 UGT73B1이 가장 ABA에 대한 sensitivity가 높음을 알 수 있었으며, UGT71B6와 UGT73B3는 비슷한 level의 ABA sensitivity를 나타내었다. 하지만 초기 발현은 UGT73B1이 가장 낮은 발현을 보였다. 이를 통해서 이들 유전자가 coding하는 단백질이 ABA를 glycosylation하여 ABA를 ABA-GE로 만들 가능성을 제시하였다. 계속하여 이들의 physiological role을 연구하기 위해서 이들 유전자가 knock-out된 mutant를 screening하였다. 하지만 단독으로 knock-out된 mutant는 특별한 phenotype을 나타내지 않았다. 그것은 아마도 유사한 유전자가 두 개가 더 있기 때문이라 생각되었다.

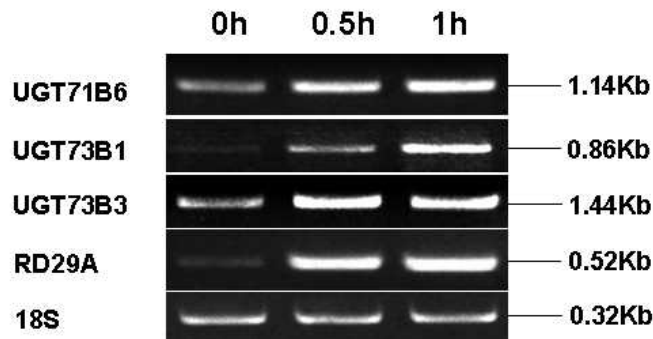


그림 29. Induction of UGT isforms by ABA

Arabidopsis plants grown for 2 weeks in liquid medium were treated with ABA for 0.5 and 1 h. Total RNA prepared from these plants were used for semi-quantitative RT-PCR analysis to examine the induction of UGT isoforms. RD29 and 18S rRNA were used as positive and internal controls, respectively.

이 단백질은 세 개의 isoform의 세포내 localization을 규명하기 위해서 UGT의 C-terminus에 GFP를 fusion하여 chimeric construct를 만들어 protoplast에서 발현시켜 localization을 형광현미경 및 protein fractionation을 기법을 이용하여 확인한 결과 이들 세 단백질 모두 세포질에 존재함을 확인하였다. (그림 30)

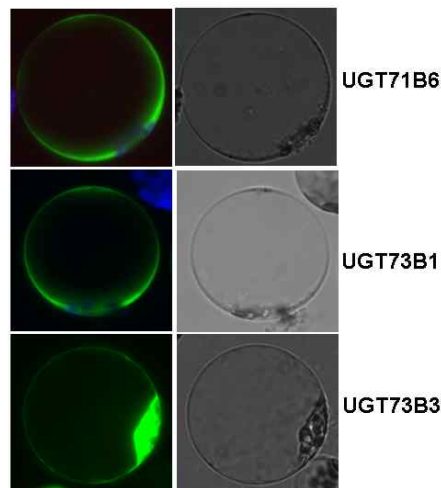


그림 30. Localization of UGT-GFP fusion proteins in the cytosol

Fusion constructs were introduced into protoplasts and localization of these fusion proteins was examined under a fluorescent microscope. All three fusion proteins localize to the cytosol.

UGT가 세포내의 ABA level을 낮추지를 확인하기 위하여 세포내의 ABA level을 확인할 수 있는 방법을 만들고자 하였다. 많은 유전자 중에서 RD29A와 RD29B가 ABA level에 따라서 발현 level이 조절됨이 잘 알려져 있었다. 이를 이용하여 RD29A와 RD29B의 promoter에 GFP coding region을 연결하여 reporter construct를 만들었다. 그리고 이를 이용하여 세포내의 ABA의 변화에 따른 발현의 변화를 관찰하고자 하였다 (그림 31).

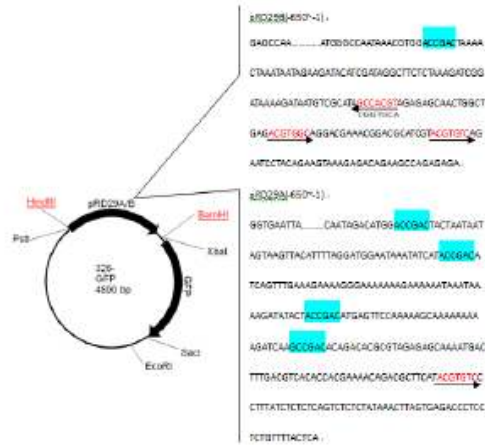


그림 31. RD29A::GFP reporter construct

이 reporter construct를 이용하여 세포내에서의 ABA level에 따른 GFP의 발현을 비교하였다. Protoplast에 이 construct를 도입한 후 GFP signal이나 Western blot analysis를 이용하여 확인하였다. 그 결과 이 reporter construct는 외부에도 처리한 ABA의 농도에 민감하게 반응하여 발현의 level이 조절된다는 것을 확인하였다 (그림 32). 특히 ABA의 농도에 따른 변화를 관찰하기 위하여 외부에서 처리하는 ABA농도의 minimal level의 range를 찾고자 하였다. 그 결과 0.2 uM에서 1.0 uM 사이에서 linear 하게 발현이 나타남을 확인하였다 (그림 33). 이를 이용하여 세포내에 de novo biosynthetic 또는 ABA degradation 유전자의 활성을 확인할 수 있을 것이다.

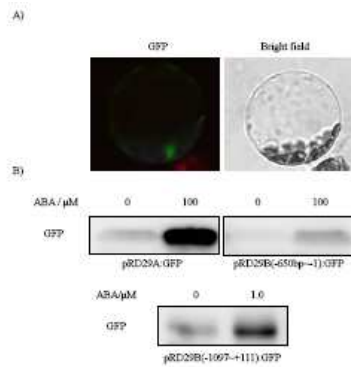


그림 32. RD29A::GFP의 reporter construct에 의한 ABA response 확인

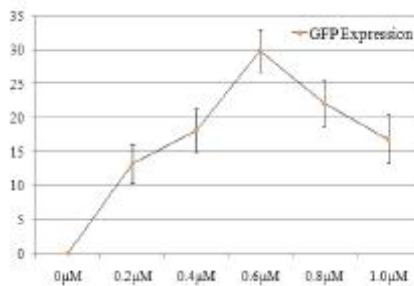


그림 33. ABA의 농도에 따른 GFP reporter 단백질의 발현 level 비교

Protoplast에 RD29A::GFP를 transformation한 후 다양한 ABA 농도를 처리하여 GFP의 발현 정도를 Western blot analysis를 이용하여 비교하였다.

이러한 RD29A::GFP reporter system을 이용하여 UGT가 세포에서 ABA의 농도를 낮출 수 있는지를 간접적으로 확인하고자 하였다. RD29A::GFP와 35S::UGT construct를 PEG를 이용하여 동시에 protoplast에 transformation한 후 GFP의 level을 Western blot analysis를 이용하여 확인하였다. 그 결과 UGT가 같이 발현된 세포에서는 GFP의 발현 level이 현저하게 줄어들음을 확인하였다. 이를 통하여 UGT가 세포내에서 ABA의 level을 낮추는 것을 확인하였다 (그림 34). 이를 통하여 세포에서의 ABA level을 이와 같은 transient expression system을 이용하여 확인할 수 있다는 것과 세포에서의 다양한 ABA modulating protein들이 endogenous ABA level을 조절하는 것을 연구할 수 있는 기틀을 마련하였다.

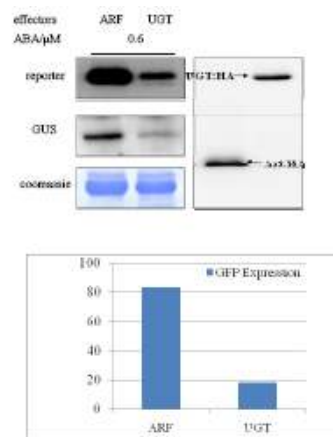


그림 34. RD29A::GFP reporter construct를 통한 UGT의 endogenous ABA level에 대한 영향 비교

Protoplast에 RD29A::GFP와 35S::UGT를 transformation한 후 protoplast에 0.8 mM의 exogenous ABA를 처리하였다. 그런 후 8시간 후에 total protein extract를 분리한 후 Western blot analysis를 통하여 GFP의 level을 비교하였다.

4. E3 ligase를 이용한 새로운 dehydration stress 기작 규명과 이 기작을 이용한 가뭄 내성 식물체 개발 가능성 탐색.

식물에 dehydration resistance를 줄 수 있는 기작은 다양하다고 알려져 있다. 연세대 김우택 교수팀에서 고추에서 dehydration stress에 의하여 높이 발현되는 CaRMA1이라는 유전자를 확보하였다. 이 유전자를 Arabidopsis에 도입하였을 때 강력한 dehydration stress resistance를 준다는 것을 확인하였다 (그림 35). E3 ligase인 CaRMA1이 어떻게 Arabidopsis에 강력한 dehydration stress resistance를 주는지를 규명하고자 연구를 수행하였다. E3 ligase는 ubiquitination을 통하여 세포내에서의 단백질 level을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 E3 ligase가 식물에 dehydration stress resistance를 줄 수 있는 방법은 세포 내의 어떤 특정 단백질의 degradation을 통하여 dehydration stress에 견디게 해 줄 것이라는 가설을 세웠다.

Ubiquitination을 통해서 세포에서 단백질의 level을 조절할 수 있는 방법은 크게 두 가지로 나누어진다. 하나는 세포질에서 polyubiquitination을 통한 protein degradation이고 다른 하나는 monoubiquitination을 통한 endocytosis이다. 식물에서 endocytosis로 internalization되는 단백질 중에 잘 알려진 것 중의 하나가 water channel인 PIP들이다. 따라서 본 연구실에서는 E3 ligase가 PIP2의 endocytosis를 조절하고 이를 통해서 water channel을 plasma membrane으로부터 제거함으로써 식물에 dehydration stress resistance를 줄 것이라는 가설을 세웠다. 이를 증명하기 위해서 E3 ligase의 localization을 GFP fusion protein을 이용하여 세포내에서 확인하고자 하였다. 그 결과 CaRMA1-GFP이 ER 및 plasma membrane에 존재함을 확인할 수 있었다. Majority가 ER에 존재하였으며 minor portion이 plasma membrane에 존재함을 확인하였다. (그림 36). 그리고 ER에 존재하는 CaRMA가 어떻게 dehydration stress resistance를 높이는지를 확인하기 위해서 CaRMA1과 PIP2-GFP를 protoplast에 cotransformation하여 PIP2-GFP의 targeting을 조사한 결과 CaRMA1의

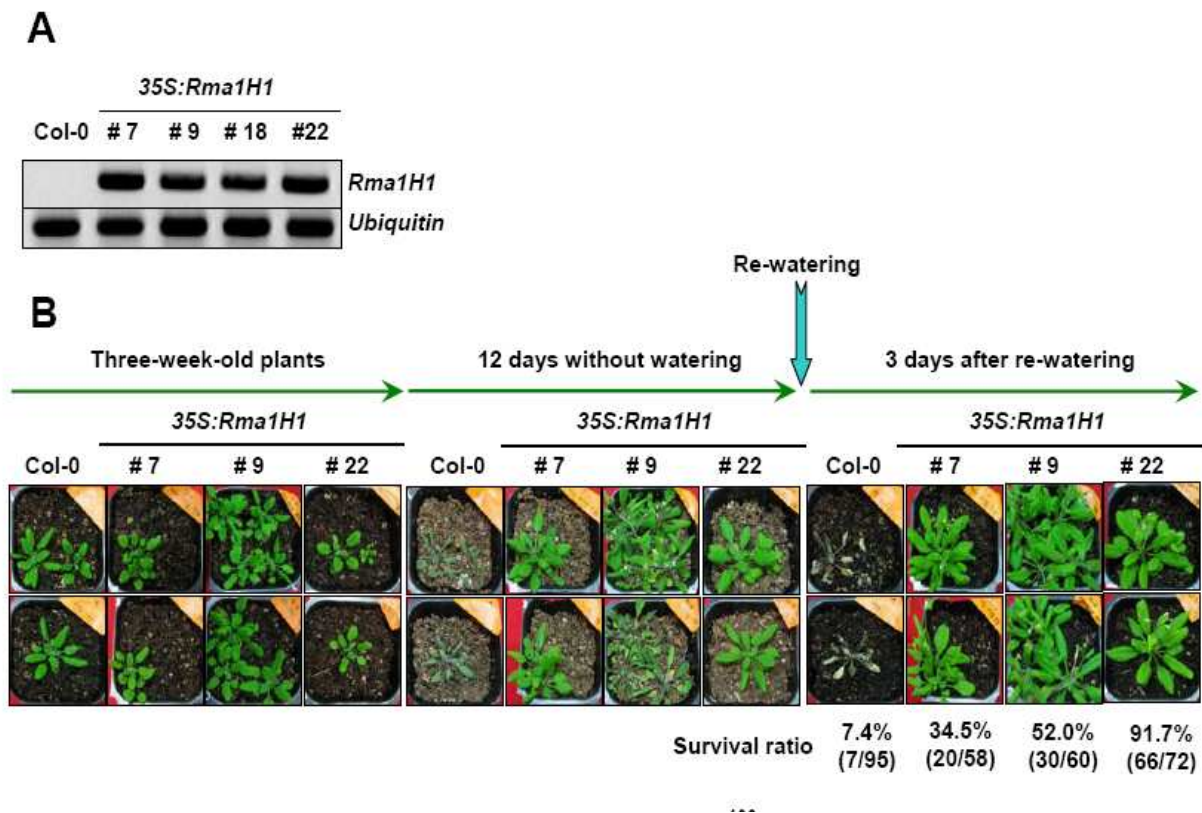


그림 35. CaRMA1 발현 애기장대의 dehydration stress resistance 표현형

Transgenic plants and wild-type plants were treated as indicated in the figure and dehydration stress was scored at the indicated time points.

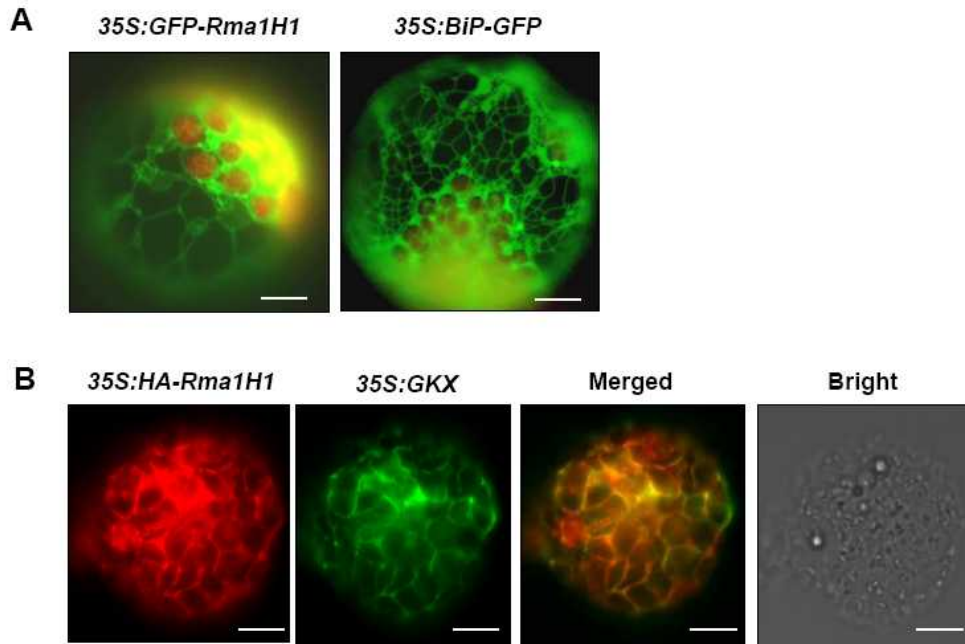


그림 36. Localization of CaRMA1 in Arabidopsis protoplasts

CaRMA1-GFP or HA-CaRMA1 were introduced into protoplasts and localization of these proteins was examined by either direct GFP signals or immunohistochemistry using anti-HA antibody GKX was used as a marker for the ER.

존재하에서는 PIP2-GFP의 plasma membrane targeting이 현저하게 줄어들음을 확인할 수 있었다. 이를 통해서 CaRMA1이 PIP2의 plasma membrane trafficking을 조절한다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 protoplast level에서 뿐 만 아니라 transgenic plant level에서도 같은 현상을 나타냄을 확인하고자 하였다. 이를 확인하기 위해서 CaRMA1 overexpression line과 PIP2-GFP transgenic line을 cross하여 double transgenic plant 를 만들고 이들 transgenic plant 에서 PIP2-GFP의 level을 관찰한 결과 CaRMA1이 overexpression 된 line에서 PIP2-GFP의 level이 현저하게 줄어들음을 확인하였다. 이를 통해서 식물에서 ubiquitination을 통해서 PIP2의 level을 조절하여 dehydration stress에 저항성을 높일 수 있다는 것을 증명하였다. 이는 Plant Cell에 발표하였다.

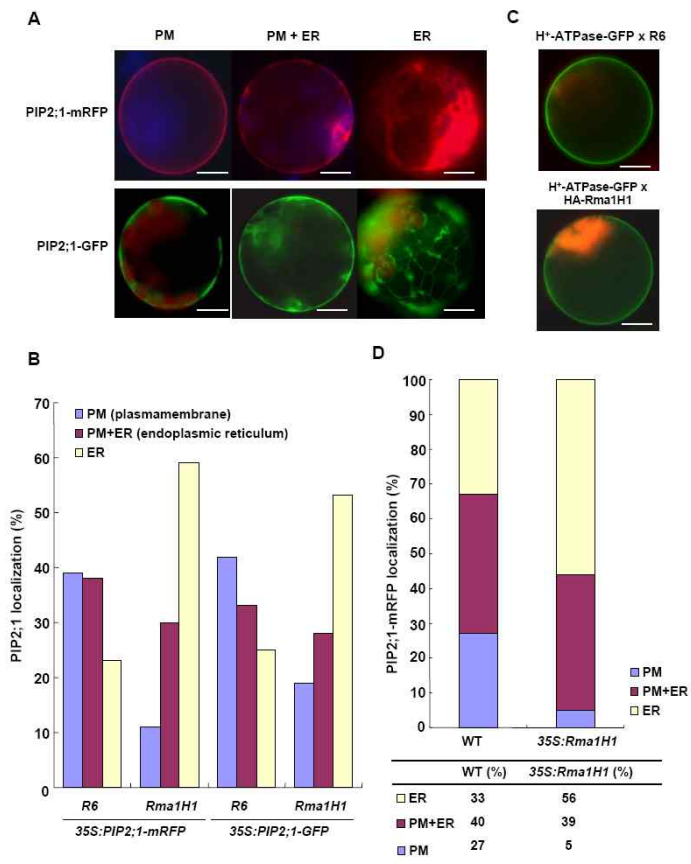


그림 37. Trafficking of PIP2-GFP is inhibited by CaRMA1 in protoplasts

Protoplasts transformed with both PIP2-GFP and HA-CARMA1 constructs were scored based on the localization patterns of PIP2-GFP. In the presence of CaRMA1, the trafficking of PIP2-GFP was significantly inhibited.

< 협동 연구기관 >

1. 형질전환 및 후대 식물체의 선발

1. 형질전환

- *Arabidopsis thaliana* beta glucosidase 1 (AtBG1) 유전자를 형질전환용 벡터를 이용하여 Agrobacterium-mediated transformation 방법으로 유채 (*Brassica napus*) 형질전환을 실시하여 형질전환체를 획득
- 형질전환용 벡터가 포함된 아그로박테리움과 무균 발아시킨 유채절편을 공동배양하여 형질전환체를 유도 (그림 1)

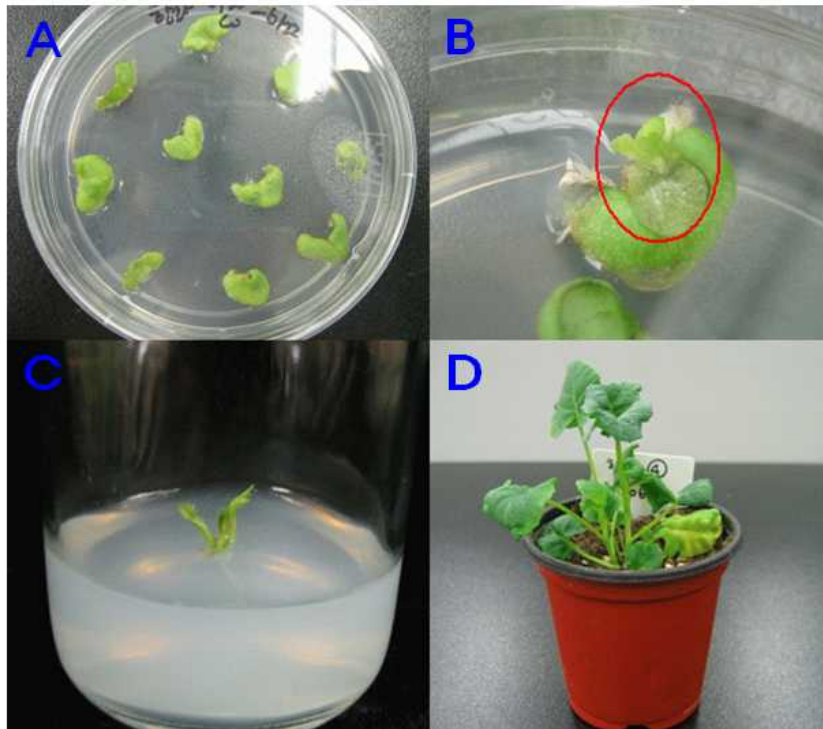


그림 1. 건조내성 유전자 AtBG1 형질전환 유채 개발과정. A: Agrobacterium-mediated transformation 후 치상한 유채 절편, B: 유채절편으로부터 shoot 형성, C: 뿌리 유도배지에 치상, D: 재분화된 형질전환 후보 개체의 순화

- 선발배지에서 기관분화된 형질전환 후보 개체(T0)로부터 외부유전자 삽입 여부가 확인된 것만을 선발
- 유전자의 삽입여부는 항생제 저항성과 AtBG1-specific primer를 이용한 PCR을 수행하여 1차 검정하였으며, 세대를 진전하면서 PCR, RT-PCR 그리고 Western 분석을 실시하여 최종 선발하였음 (표 1)
- 선발된 109개체 중 1차년도 (2007-2008), 2차년도 (2008-2009) 그리고 3차년도

(2009-2010)에 각각 42, 40, 27개를 선발

- 선발된 109개체의 분자생물학적 특성 및 세대진전 과정에서의 농업형질을 종합하여 1차 선발결과 32개체의 후보군으로 압축하였음
- 1차 후보군으로 선발된 32개체의 지속적 특성 검정과 Western 분석을 통해 12개 라인을 2차로 선발하였으며, 이들 중 세대진전이 빠르고 생육이 왕성한 6개의 라인을 이용하여 농업형질을 조사하였음
- 최종 선발에서는 안정적인 세대고정이 이루어진 라인인 #2802를 건조내성 형질전환체로 선발하여 재배승인을 위한 환경위해성 심사자료 작성을 위한 “EVENT”로 최종 선정하였음
- 선정된 “EVENT #2802”는 타 과제에서 환경위해성 심사자료 작성에 활용 중에 있음
- 최종 선발된 두 번째 “EVENT #2903”은 다수성 및 조생 특성을 가지고 있어 재배승인을 위한 위해성 평가가 완료된다면 품종 등록할 예정임

표 1. AtBG1 유전자 도입 유채 형질전환체의 개발 및 선발*

재분화된 개체수	1차 선발 개체	2차 선발	EVENT
109	32	12	2**

* 선발기준: PCR 및 항생제 segregation; 3회 이상 일치, RT-PCR, Western 결과; 2회 이상 일치, 농업형질; 내진성, 개화, 다수성 등

** 최종 선발 EVENT number; #2802, #2903

2. 형질전환체의 검정 및 세대진전

- 선발배지에서 선발된 형질전환체(T0)는 LMO재배 포장에 순화하여 T1 세대 형질전환체를 확보하고 생리적 특성 및 건조내성 등을 검정
- 형질전환 유채는 온실에서 재배하면 세대를 단축하고 자가수분을 통해 고정 라인을 조기에 확보하여 후속 실험을 진행하였음 (그림 2)



그림 2. 선발배지에서 순화된 형질전환 유체의 온실 생육 및 세대진전

- 자가수분을 통해 획득된 형질전환체의 T2 세대를 이용한 후대검정은 항생제 (PPT 25 mg/L)가 포함된 MS 기본 배지에 종자를 100립씩 치상하여 segregation 율을 조사하였으며, 저항성 개체는 순화시킨 후 포장에 정식하여 다음 세대진전을 하였음 (그림 3)
- 형질전환체의 선발 및 세대진전은 순화과정 중에 외부유전자의 삽입여부를 재 확인하고, (주)에프엔피의 LMO 연구용 포장 (제 LML08-315호)에 정식하여 자가수분 후 후대 종자를 개체당 500-1000립 정도 수확 (그림 4)



그림 3. 수확 종자의 phosphinothricin (PPT, Basta®) 검정에 의한 후대 검정. 형질전환체는 PPT 저항성 유전자를 가지고 있어 제초제 첨가 배지에서 정상적인 생육이 가능

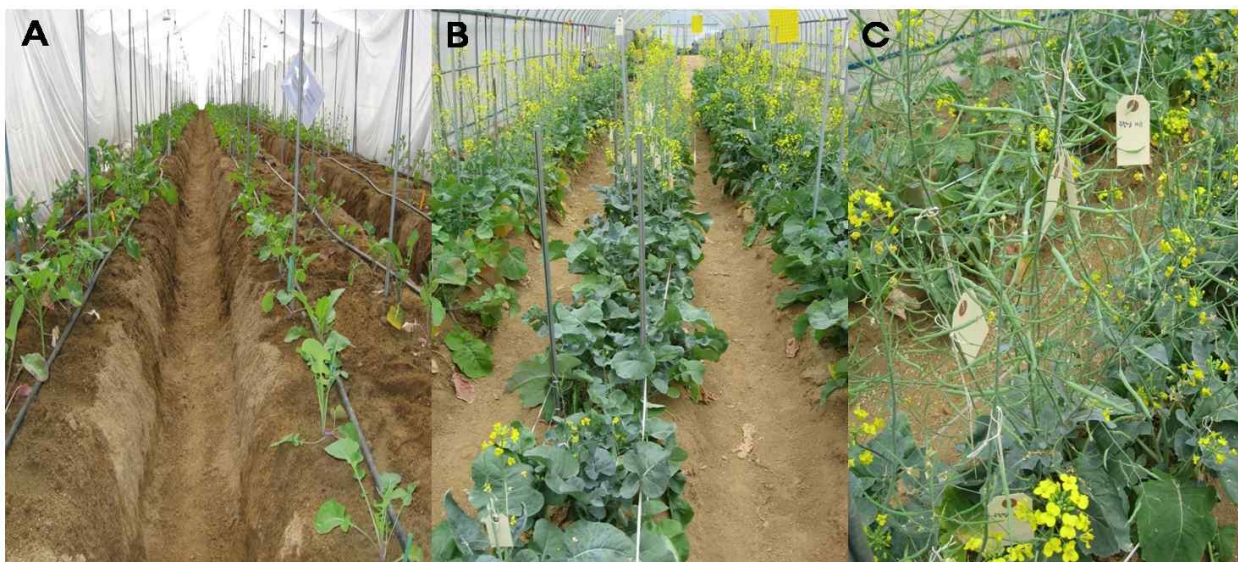


그림 4. (주)에프엔피의 LMO 실험연구용 포장에서 생육 및 교배한 형질전환 유체. A; 정식 7일 후, B; 정식 30일 후, C; 정식 60일 후의 생육 상태

2. 형질전환체의 분자생물학적 특성

1. 형질전환체의 검정

- AtBG1 유전자로 형질전환된 식물체로부터 RNA를 분리하여 항생제 저항성과 AtBG1-specific primer를 이용한 PCR을 수행하여 1차 검정하였으며, 세대를 진전하면서 PCR, RT-PCR 그리고 Western 분석을 실시하여 최종 선발하였음 (그림 5)

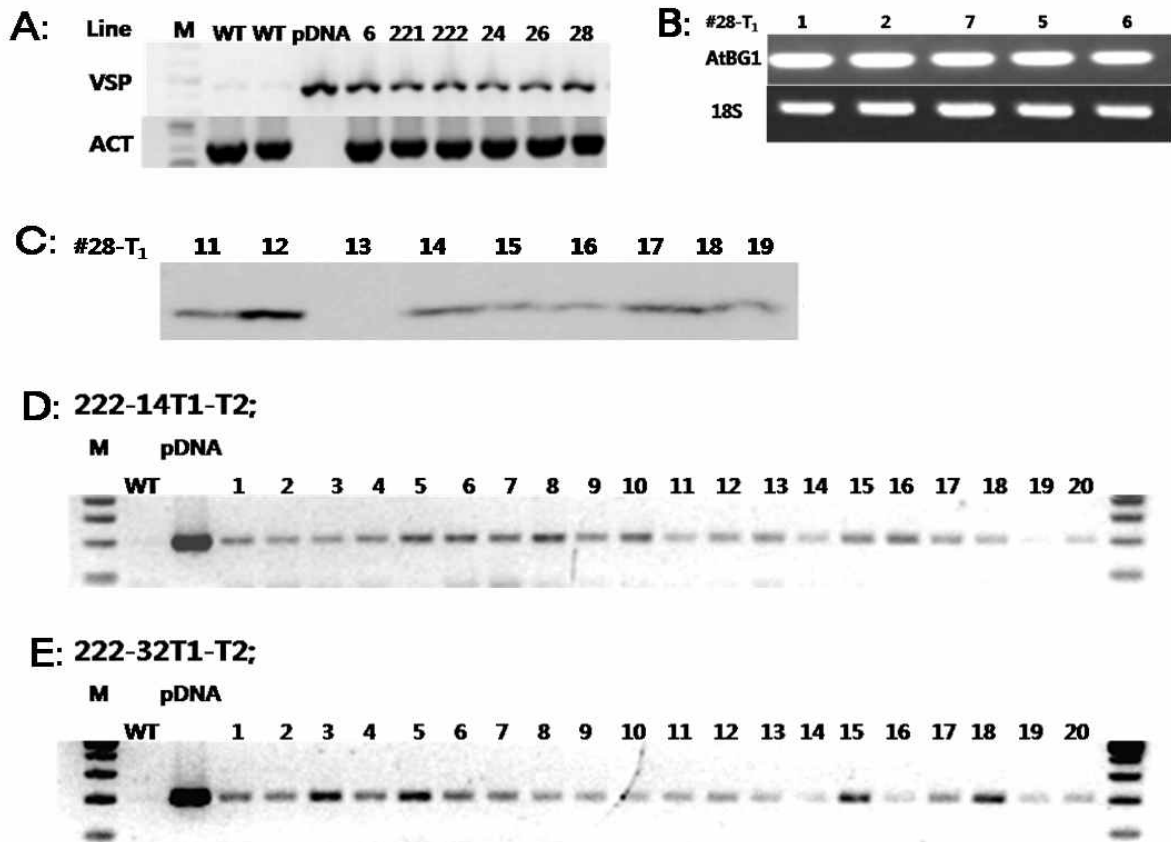


그림 5. 형질전환 벡터 특이 염기서열을 이용한 형질전환체 검정 및 선발. A; 벡터 특이 염기서열 (VSP)을 이용한 PR 검정, B; AtBG1 특이 염기서열을 이용한 RT-PCR 검정, C; HA-tag 특이 염기서열을 이용한 western 검정, D, E; 벡터 특이 염기서열을 이용한 T2 세대의 검정

2. 세대진전 형질전환체의 검정

- 세대진전 형질전환체의 검정은 T0 세대와 같은 방법으로 외부유전자의 삽입여부는 형질전환 벡터 specific primer를 이용하여 RT-PCR 및 western 분석을 수행 (그림 6, 7)

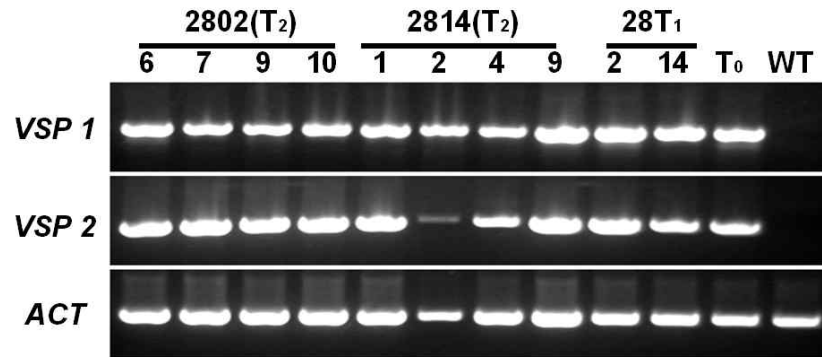


그림 6. 형질전환체의 후대검정의 RT-PCR 예. 형질전환 벡터에 사용된 선발마커 (VSP 1)와 AtBG1 특이 마커 (VSP 2)를 이용한 검정 결과. ACT; beta actin

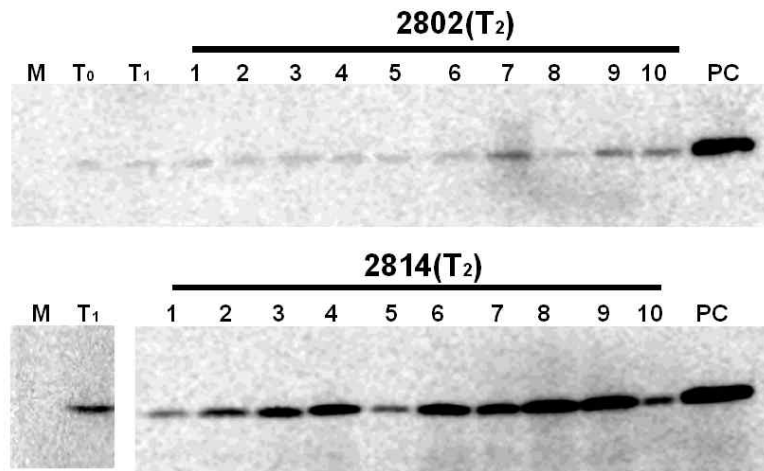


그림 7. 형질전환체의 안정적인 단백질 발현 및 후대검정을 위한 western 분석의 예. PC; Positive control

3. 형질전환체의 농업형질 분석

1. 특성 조사를 위한 형질전환 식물체의 재배

- 본 과제의 1차년도부터 확보된 형질전환체로부터 수확한 T2 - T4 세대의 종자의 생육조사를 위하여 (주)에프엔피의 GMO 품종 재배 비닐하우스 (그림 8)에서 재배하며 각 형질전환체의 재배·생리적 특성을 조사하였음



그림 8. LMO 시험재배용 비닐하우스 포장

2. 형질전환 유체의 농업형질 분석

2-1. 건조토양에서 생육특성

- 형질전환 유체는 저온처리 후 정식하고 10일 후 단수를 시작하여 75일 (75D) 간 물을 공급하지 않은 상태에서 재배하면서 생리적 특성을 조사
- 대조구의 경우 단수 상태에서 개화율이 극히 저조하였으며, 단수 25일 이후에는 잎에 왁스층이 발달하고, 45일 (45D) 후에는 갈변현상이 나타나기 시작하여 75일에는 잎이 백화되고 꽃대가 말라죽었으나 (그림 9), 형질전환체는 종자수확이 가능

2-2. 종자 생육 및 생산량

- 형질전환 유체는 종자 생육 및 발달에서 대조구에 비해 약 7일 정도 빠르게 진행되어 수정 후 14일에 꼬투리가 최대 생육에 도달한 반면, 대조구는 21일에 최대 생육에 도달 (그림 10)
- 단위면적당 종자 생산량은 물을 공급한 일반 조건에서는 형질전환체와 대조구가 각각 2.2톤/헥타, 2.5톤/헥타로 형질전환체가 다소 높게 나타났으나, 건조조건에서 대조구는 개화율이 극히 저조하고 정상적인 생육과 발달이 이루어지지 않아 채종이 불가능한 반면에 형질전환체는 1.6톤/헥타로 관수 처리구에 비해 64%의 생산량을 나타냄 (그림 11)
- 이러한 결과는 형질전환체를 이용한 사막화 진행지역 및 건조지역을 활용한 바이오 원자재 생산 등 산업화가 가능함을 잘 제시

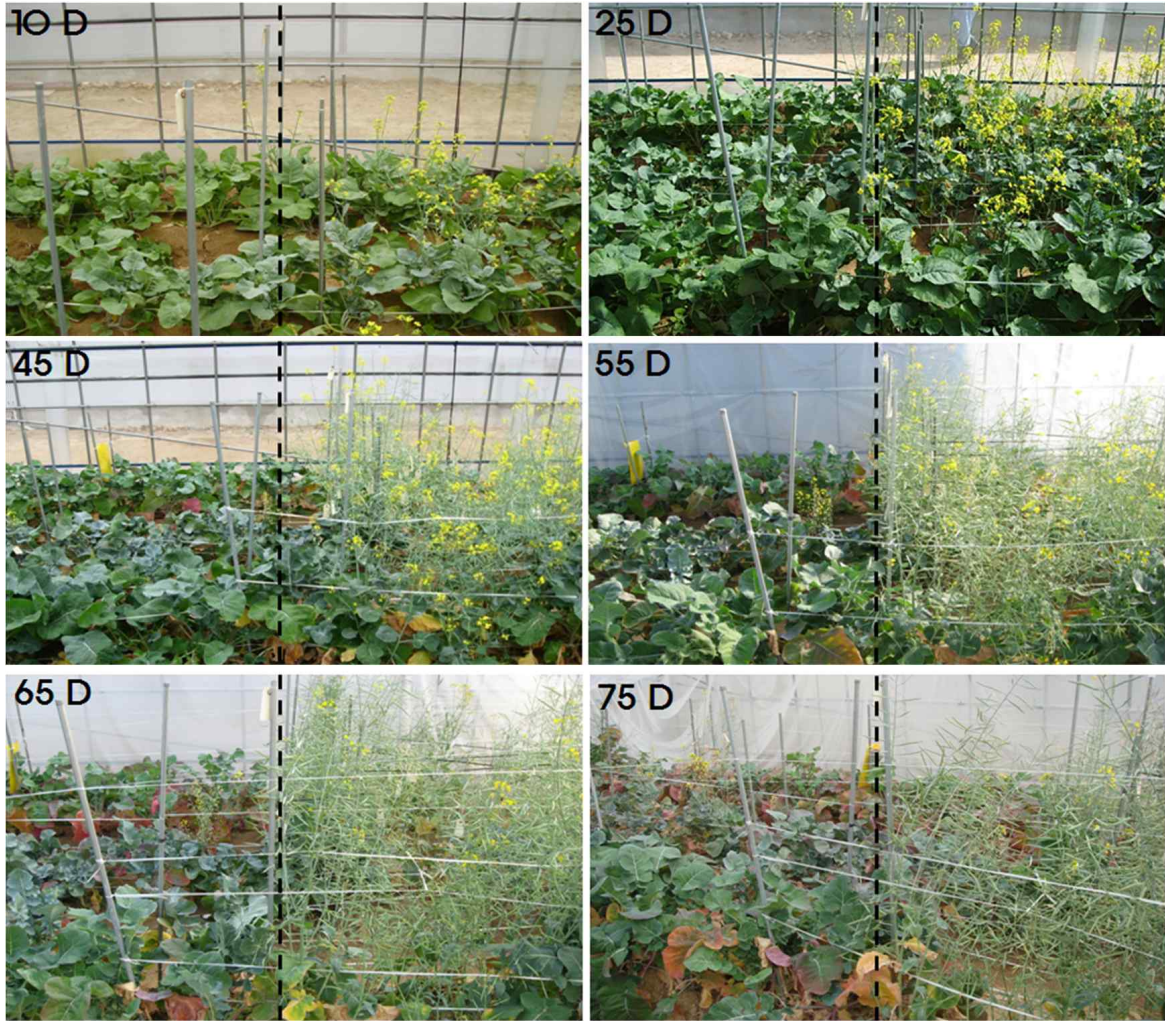


그림 9. 형질전환 유체의 내건성 실험 결과 10D-75D; 포장에 정식 후 단수 기간. 점선 왼쪽은 대조구 오른쪽은 형질전환 유체를 40 cm 간격으로 제식하여 재배

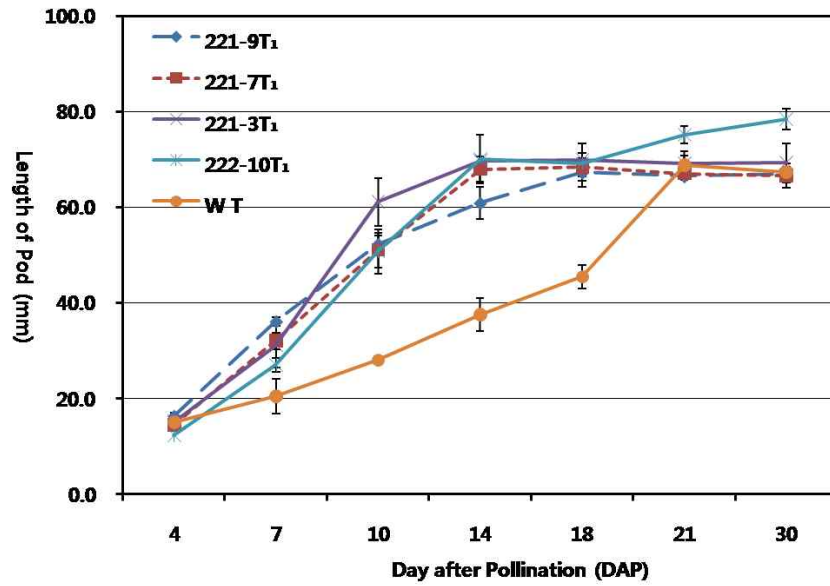


그림 10. 형질전환체와 대조구의 꼬투리 생육 비교. 형질전환체가 약 7일 정도 빠르게 진행

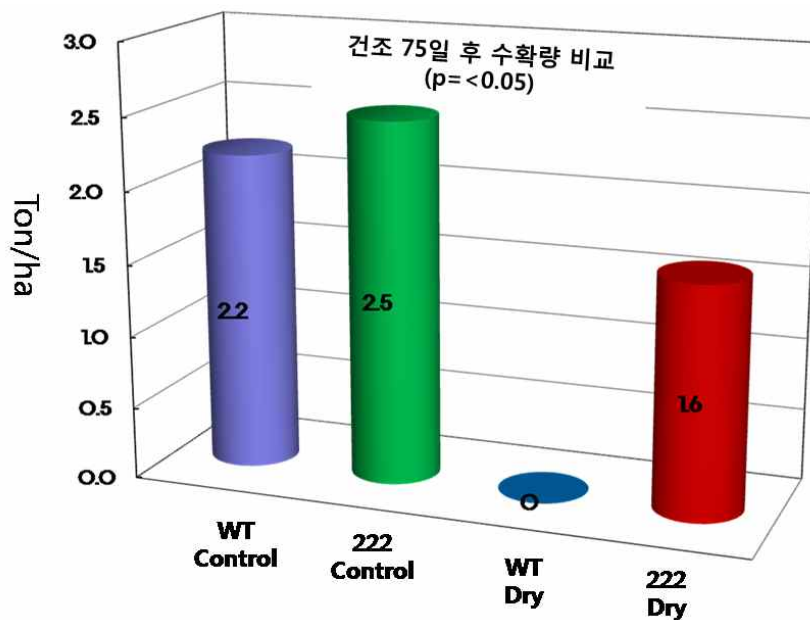


그림 11. 형질전환체와 대조구의 종자 생산량 비교. 형질전환체는 건조한 조건 (75일 단수)에서 관수상 태 대조구의 72.7% 생산성을 나타냄

2-3. 형질전환체의 생리적 특성 검토

- 형질전환체의 재배생리학적 특성은 1차로 선발된 6라인의 형질전환체를 이용하여 저온처리 기간에 따른 개화시기를 라인별로 조사
- 형질전환체 221, 222 그리고 6번은 30일간 저온처리 후 정식 20일 안에 100% 개화한 반면에 28번은 30일 저온처리 후 30일에 100% 개화하였으며, 24번과 대조구는 30일 저온 처리 후 30일 후에 약 80% 정도의 개화율을 나타 냄 (그림 12)
- 또한, 정식한 후 개화율이 80% 정도 진행된 상태에서 단수를 시작하여 종자를 수확한 경우, 형질전환체 라인에 따라 대조구에 비해 약 1-3배 까지 높은 수확량의 차이를 나타내었 음 (그림 13)
- 이와같은 수확량의 차이는 형질전환체의 건조내성 뿐만 아니라 개화시기의 차이에 따른 종 자의 발달의 차이에서 기인하는 것으로 판단 됨
- 각 라인별 개화생리 결과를 요약하면, 형질전환체는 대조구에 비해 최대 25일 이상 개화시 기를 앞당길 수 있어 휴경지를 활용한 2모작 가능 북방 한계선의 확장효과를 가져옴으로써 재배면적의 확대 및 생산성 증대에 활용 가능할 것으로 판단 (표 2)

표 2. 형질전환체에 따른 개화 기간 단축 효과

형질전환체	저온처리기간 (일)	추대기간 (일)	개화율(%)	개화소요기간 (일)
222	15	20	100	35
6 / 221	30	20	100	50
28	30	30	100	60
24 / 대조구	30	30	80	60

2-4. 형질전환체의 오일함량 분석

- 형질전환 유체의 오일 함량은 Soxhlet 방법으로 추출하여 대조구와 총 조지방 함량을 비교
- 형질전환 유체와 대조구의 지방산 함량은 각각 23.8 ± 1.0 과 $25.6 \pm 3.1\%$ 로 큰 유의차가 없음 (그림 14)

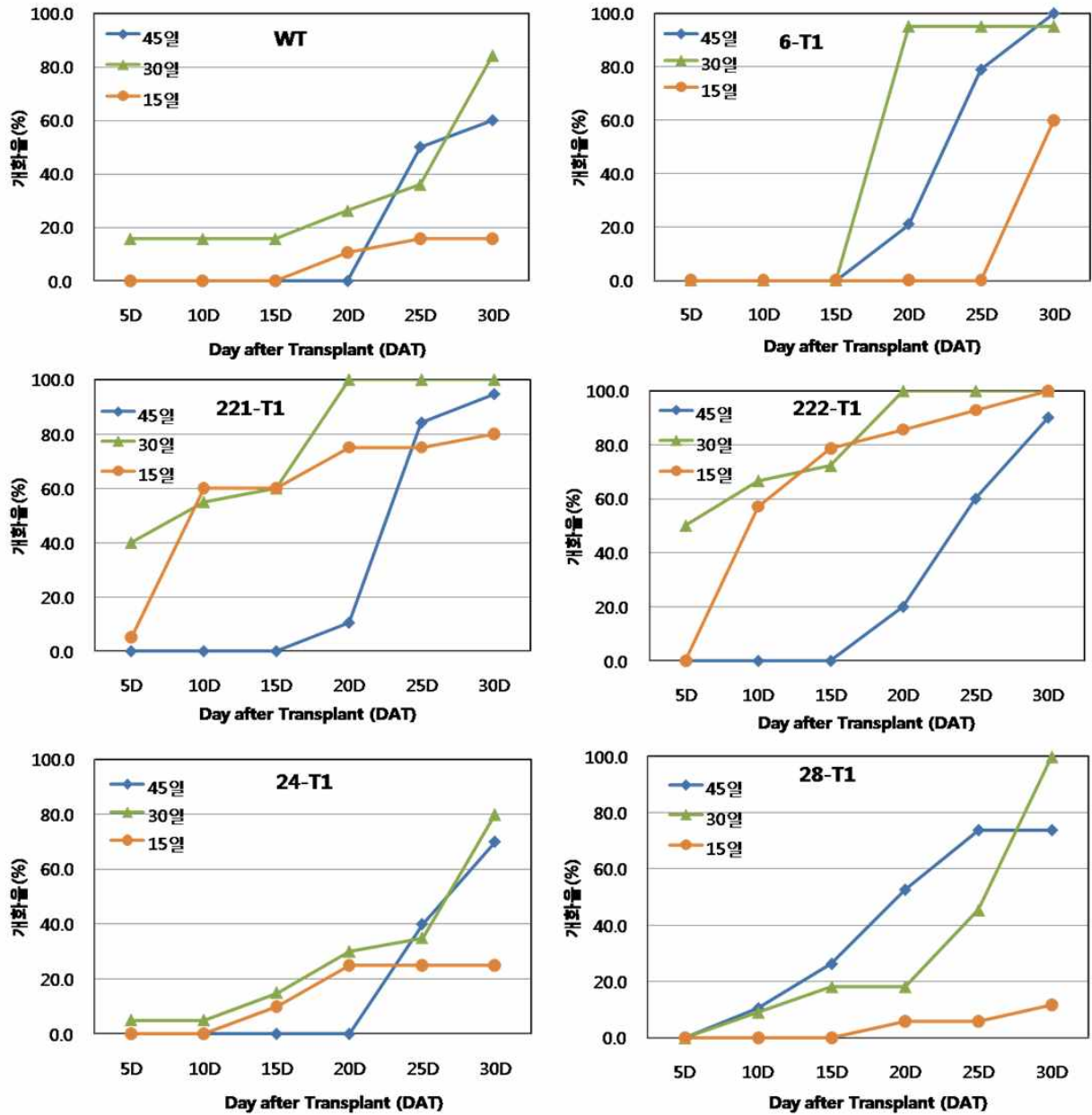


그림 12. 저온처리 기간에 따른 라인별 개화시기. 221과 222 라인은 대조구에 비해 저온처리 기간 및 개화 시기에서 최대 25일 단축 가능

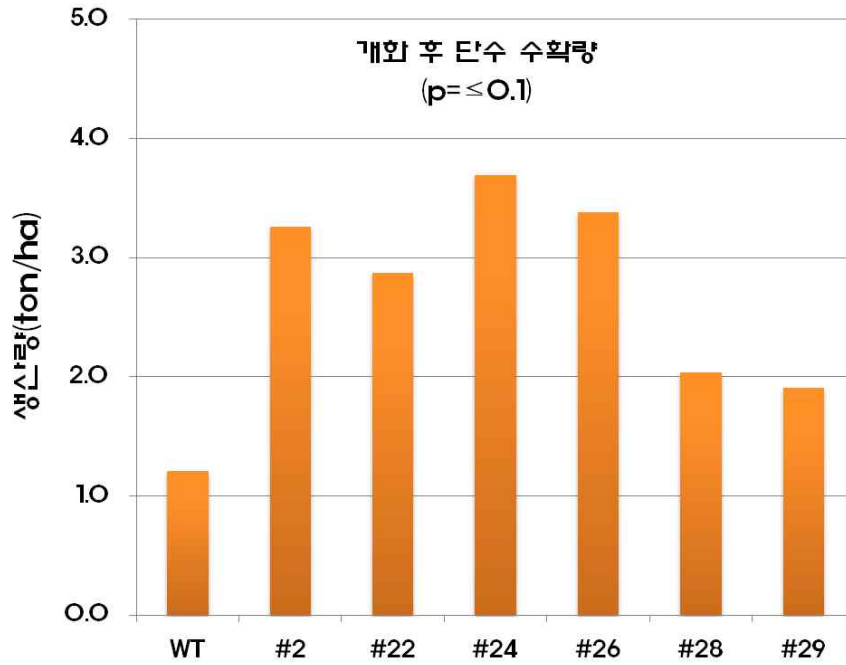


그림 13. 개화 후 단수조건에서 형질전환 유채와 대조구 (WT)의 종자 수확량. 형질전환체의 라인에 따라 대조구에 비해 1-3배 이상의 높은 종자 수확량을 나타냄

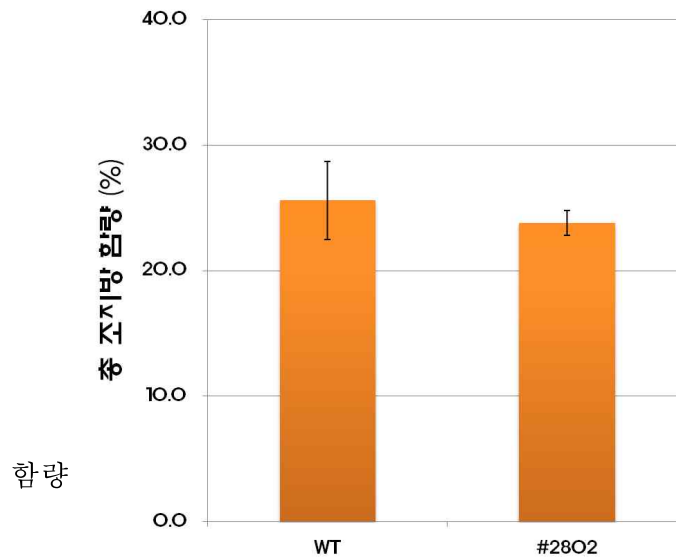


그림 14. 형질전환 유채와 대조구의 총 조지방 함량. 형질전환에 의한 총 조지방 함량은 유의 차를 나타내지 않음

4. 환경내성 신품종 후보 선발

1. 건조내성 형질전환 유체의 선발

- 작물의 환경내성관련 유전자 형질전환체의 후대검정 및 농업형질 분석을 통해 우수한 형질 전환체를 선발하고자 형질전환체의 특성을 분석한 결과는 표 1과 같음
- 최종선발된 유체 형질전환체의 특성은 건조상태에서 생육 및 종자 수확이 가능하여 형질 전환체를 이용한 사막화 진행지역 및 건조지역을 활용한 바이오 원자재 생산 등 산업화가 가능함을 잘 제시
- 따라서 유체 형질전환체 #2082와 #2903을 산업화를 위한 환경 및 인체위해성 평가를 위한 “Event”로 최종 선정하였음
- 이중 #2802는 타 과 과제에서 활용하여 현재 환경위해성 심사자료 작성 및 해외에서 현지 적응성 실험을 수행 중에 있음

2. 품종등록 신청

- 작물의 환경내성 유전자를 이용하여 내건성이 우수한 형질전환체를 확보하여, 형질전환체의 후대검증 및 생육조사 결과를 종합하고 확보된 채종된 종자를 이용하여 최종 품종등록 후보 계통을 선발
- 최종적으로 건조내성 형질전환체를 국립종자원에 품종 등록하고자 하였으나, 2008년 1월부터 “유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률”이 발효되면서, GMO 품종의 등록은 환경위해성 심사후 승인을 얻어야 가능
- 그러나 환경위해성 심사를 위한 자료를 수집하기 위해서는 최소 2~3년이 소요되고 연간 5~10억 원의 예산이 필요한 방대한 연구가 필요함
- 따라서 본 과제에서 개발 및 선발된 건조내성 형질전환체를 유체는 품종 등록하지 못하였음

5. 형질전환 벼의 세대진전 및 특성 분석

1. AtBG1 형질전환 벼의 세대진전

- 형질전환 벼의 세대진전을 통해 수확된 종자는 각 라인별로 50±5g 이상씩 보관하였으며, 경장, 간장, 이삭 길이 및 천립중에서는 대조구와 형질전환체 그리고 형질전환체 사이에서 큰 유의차는 발견되지 않았음 (표 3)

표 3. 형질전환 벼의 형태학적 특성 및 천립중

형질	대조구 (WT)		형질전환체 (Tg)					
			#11			#70		
경장 (Cm) Plant height	52.2±1.6		Max	63.2±1.4	56.8±1.8	Max	63.1±1.8	59.4±1.5
			Min	56.0±1.8		Min	54.1±1.1	
간장 (Cm) Culm length	43.2±1.5		Max	53.0±1.4	46.6±1.7	Max	53.5±1.2	49.8±1.5
			Min	40.5±1.7		Min	45.3±1.0	
이삭 (Cm) Ear length	9.0±1.0		Max	11.4±0.6	10.1±0.7	Max	10.7±0.9	9.6±0.6
			Min	9.2±0.8		Min	8.8±0.4	
천립중 (g)	Max 27	21±2.1	Max	14	19.6±1.2	Max	20	23.4±0.8
	Min 20		Min	22		Min	27	

2. AtBG1 형질전환 벼의 특성 구명

- AtBG1 유전자가 도입된 식물 형질전환용 벡터를 이용하여 Agrobacterium-mediated transformation 방법으로 형질전환된 벼의 T2 세대의 생리적 특성을 분석하기 위해 (주)에프앤피의 온실에 이들 형질전환체를 파종하여 특성을 조사
- 형질전환 벼를 파종 후 70일 (분얼시작)에 잎의 시료를 채취하여 western 분석을 수행한 결과, 도입유전자가 안정적으로 발현되고 있음이 확인 (그림 15)
- 1차로 파종된 개체로부터 세대진전을 위해 종자를 수확하였으나, 라인별 채종량에 큰 변이를 나타냄 (그림 16)
- 이러한 원인은 개화기에 온도 및 수분관리의 불량으로 판단되어 상토를 교체하고 묘상을 이용하여 2차 파종하였으며 세대진전 및 생리적 특성을 검정하기 위해 (주)에프앤피의 가온하우스에서 생육 특성 조사 (그림 17)

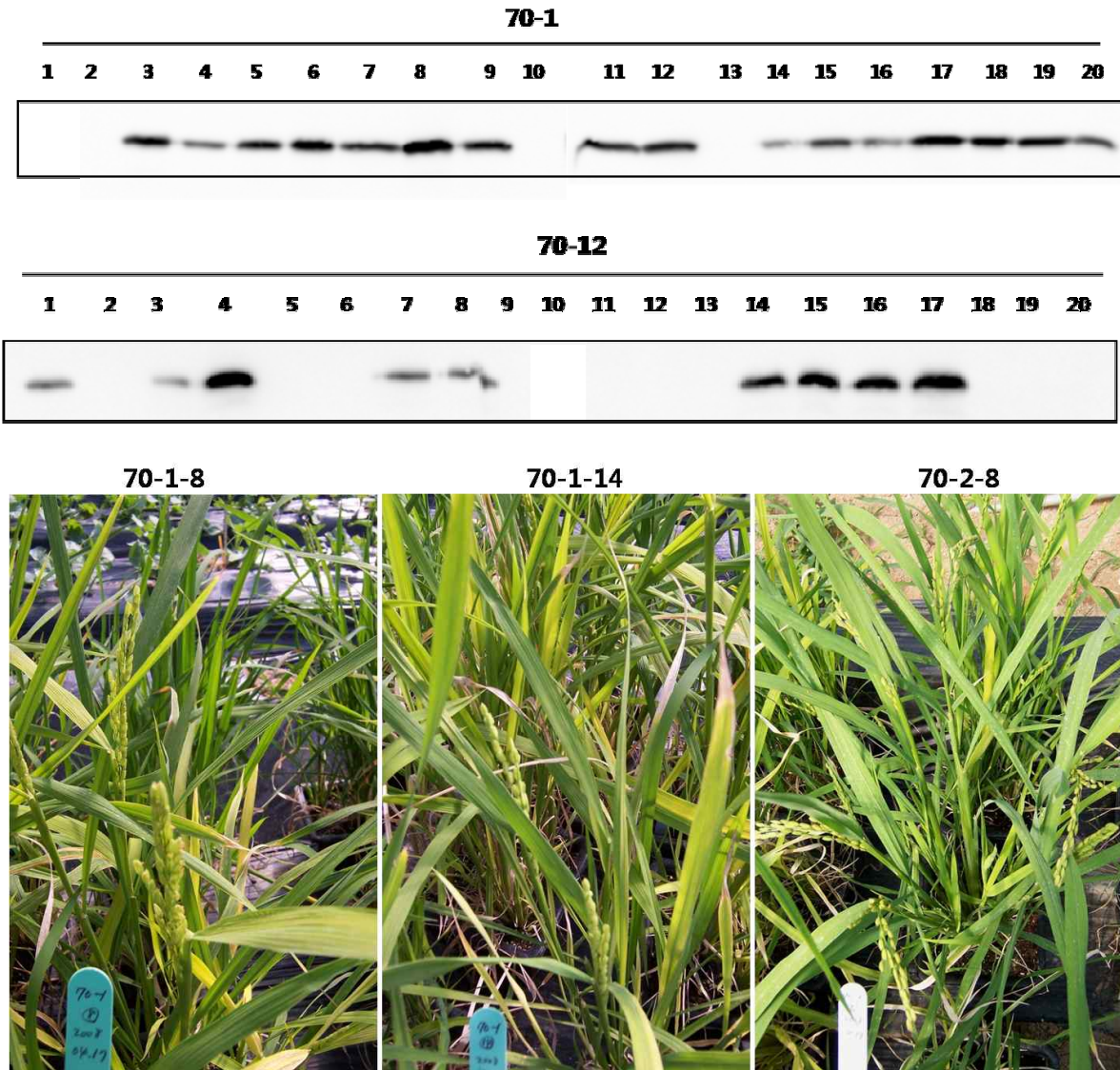


그림 15. 형질전환 벼의 western 분석 결과 형질전환 라인에서 안정적인 발현이 확인됨

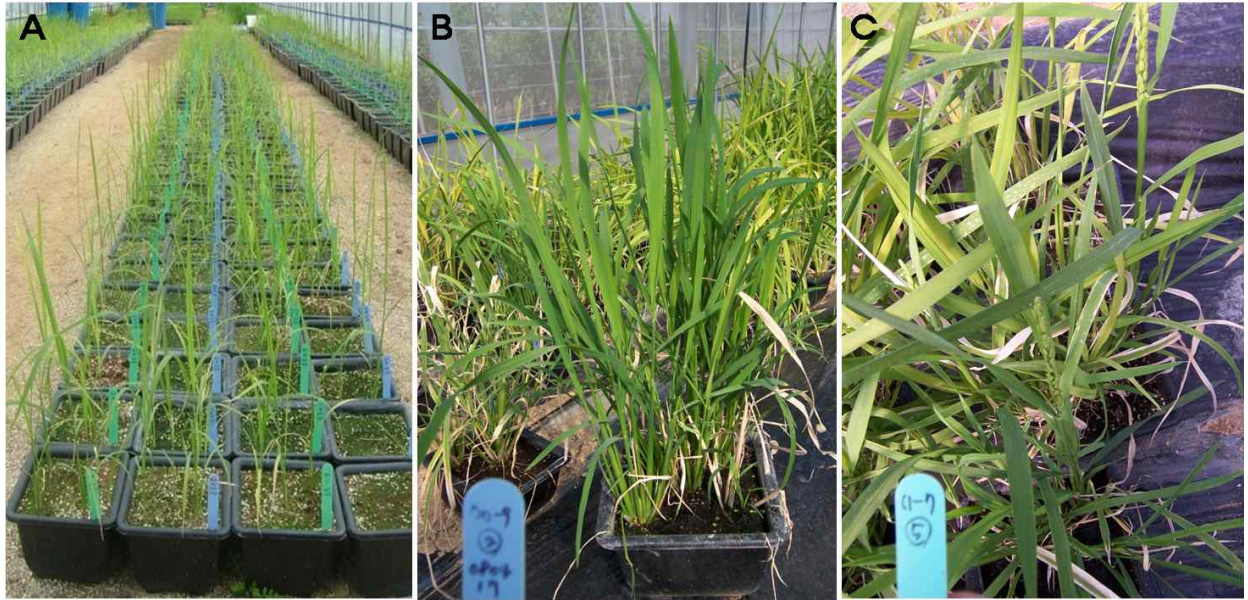


그림 16. 생리적 특성 검정 및 세대진전을 위한 1차 파종 및 생육(A). 포트에서 생육조사는 형질전환체에 따라 출수가 불량 (B)하거나 종자의 생산량에서 (C) 변이가 나타남



그림 17. 세대진전을 위해 (주)에프엔피의 LMO 온실에 2차 파종된 형질전환체

○ 반면에 본 실험의 재배조건하에서 생존율은 95% 이상을 나타내는 라인으로는 #11-2, 11-8, 11-9, 11-10의 4개 라인과 70-2, 70-3, 70-19, 70-21, 70-25의 5개 라인이었음 (그림 18)

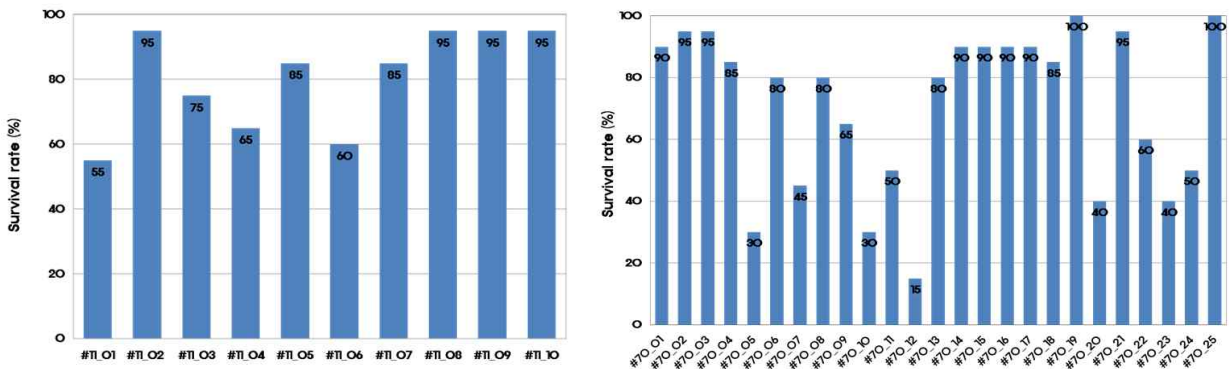


그림 18. 형질전환 벼의 생존율 비교. 본 실험 조건에서 형질전환체 [왼쪽(#11 series)와 오른쪽 (70 series)]의 생존율은 과종개체수를 생존개체 수로 나누어 측정

○ 1주일간 건조 후 수분손실율에 따른 특성으로는 11-1, 11-3, 11-4, 11-5, 11-6, 11-7, 11-9의 7개 라인에서 건조내성이 있는 것으로 확인되었음 (그림 19)

○ 또한, 70-5, 70-9, 70-10, 70-11, 70-12의 5개 라인 건조 저항성이 높게 나타났음

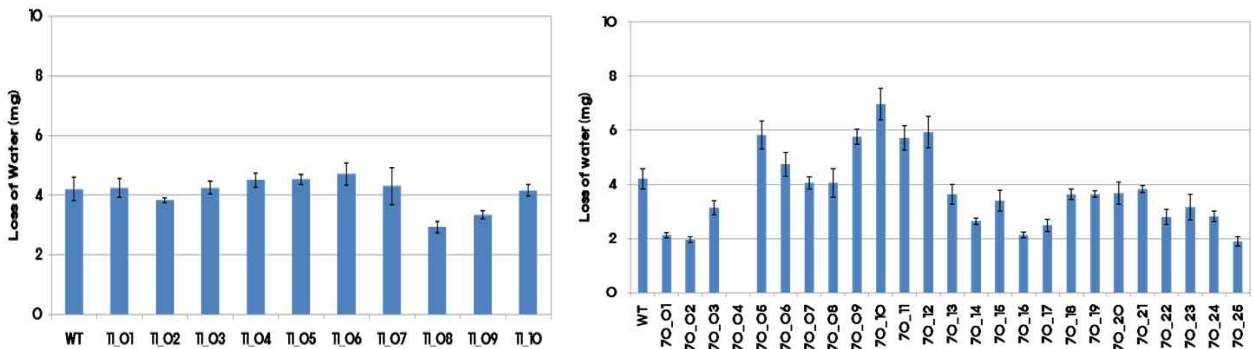


그림 19. 형질전환 벼의 건조상태에서 수분손실. 형질전환체 [왼쪽(#11 series)와 오른쪽 (70 series)]의 수분손실은 1주일간 건조한 후 수분함량으로 계산하였음

○ 건조 장애의 초기 생리적 현상인 잎의 말림현상을 건조지수 (welting index, 그림 20)를 이용하여 조사한 결과, 11-3, 11-8과 70-5, 70-16, 70-20, 70-23이 내건성이 높은 것으로 나타났음 (그림 21)

Phenotype						
	WI 0 WI 1 WI 2 WI 3 WI 4 WI 5	At Leaf			With Stem	
Wetling Index (WI)	WI 0	WI 1	WI 2	WI 3	WI 4	WI 5
Symptom	Normal	Rolling the leaf margin	Up to 50% rolling	Over 70% rolling	Rolling the stem	Over 50% rolling

그림 20. 건조저항성을 지표로 위한 건조지수 (welting index)의 형태적 특성 및 지수

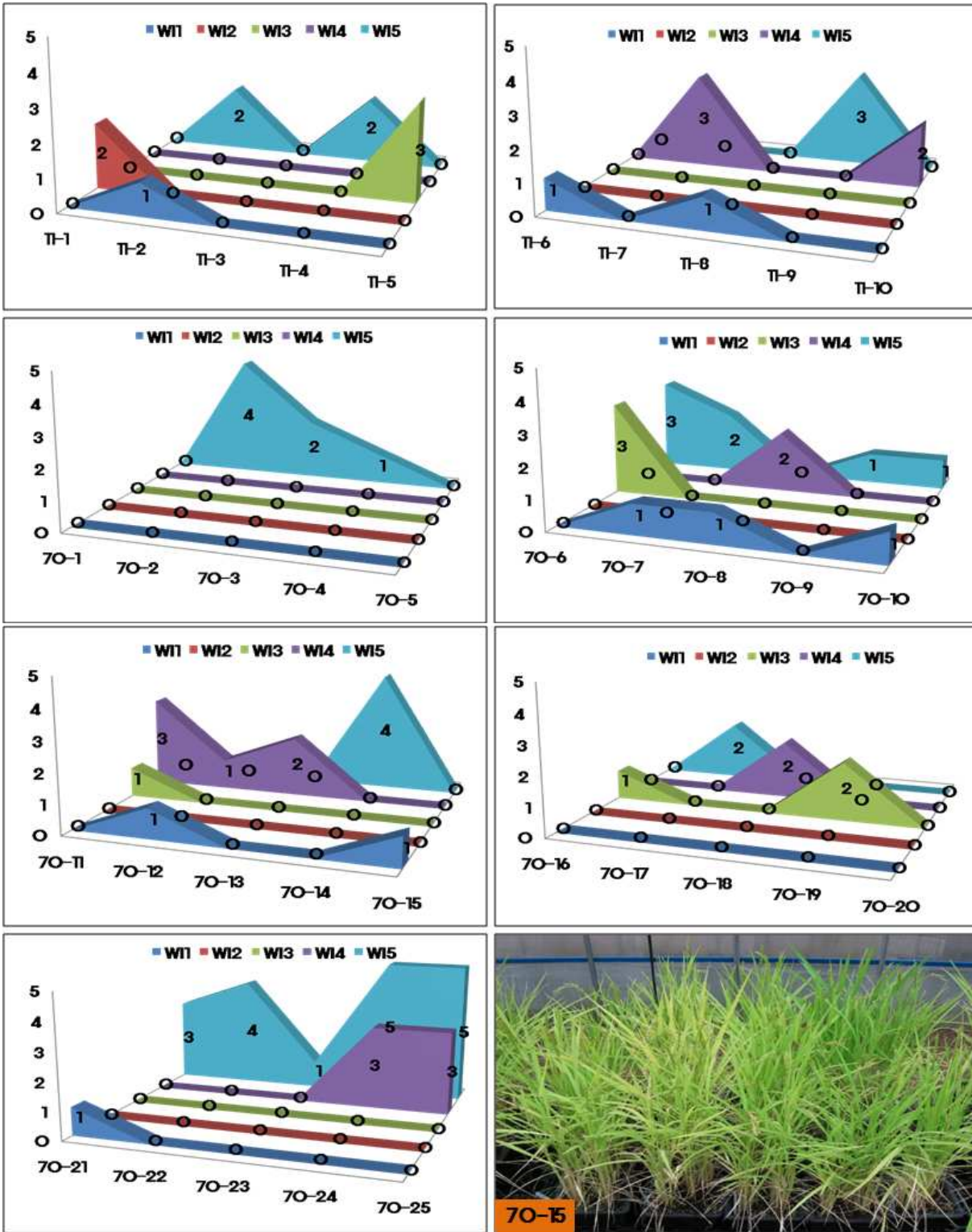


그림 21.형질전환 벼의 건조 저항성은 건조지수(welting index)를 기준으로 초기는 1으로 완전 건조는 5로 판정

표 4. 각 형질전환체의 조만성 비교. 조만성은 대조구를 기준으로 대조구보다 출수가 낮은 것을 만생으로 판정

라인	조만성	라인	조만성	라인	조만성	라인	조만성
11-1	만생	70-1	만생	70-11	만생	70-21	조생
11-2	만생	70-2	조생	70-12	만생	70-22	만생
11-3	만생	70-3	조생	70-13	만생	70-23	만생
11-4	만생	70-4	만생	70-14	만생	70-24	만생
11-5	만생	70-5	만생	70-15	만생	70-25	만생
11-6	만생	70-6	조생	70-16	조생		
11-7	만생	70-7	만생	70-17	조생		
11-8	만생	70-8	조생	70-18	조생		
11-9	만생	70-9	만생	70-19	조생		
11-10	만생	70-10	만생	70-20	만생		

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 기술개발 목표

- 1) AtBG1 형질전환 벼의 제조 및 NaCl과 dehydration stress response 연구
- 2) AtBG2의 유전자 기능 연구와 ABA level 조절 연구
- 3) 새로운 ABA level 조절 유전자의 확보 및 기능연구
- 4) AtBG1 형질전환 유채 포장실험 및 특성 검정
- 5) AtBG1 형질전환 벼 포장실험 및 특성 검정

2. 연도별 주요개발 목표달성도

1. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

<주관 연구 기관>

구분	연도	연구개발 목표	주요수행 내용	달성도
1차년도	2007	<ul style="list-style-type: none"> ○ 벼 및 유채에 AtBG1 유전자 도입 형질전환체 개발 ○ ABA-GE를 가수분해 할 수 있는 새로운 AtBG2 유전자 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환용 vector 구축 및 다양한 식물의 형질전환체 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 벼 - 유채 ○ 형질전환체에서 AtBG1 유전자의 발현 <ul style="list-style-type: none"> - mRNA 발현 level 조사 - 단백질 발현 조사 ○ AtBG2 유전자의 cloning 및 역할 규명 <ul style="list-style-type: none"> - AtBG2의 localization 연구 - AtBG2의 ABA-GE 가수분해 연구 - AtBG2 overexpression line의 구축 및 특성 연구 	100%
2차년도	2008	<ul style="list-style-type: none"> ○ 벼에 AtBG1 유전자 도입 형질전환체 개발 (계속) ○ ABA-GE를 	<ul style="list-style-type: none"> ○ AtBG1 발현 식물 형질전환체 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 벼 ○ AtBG1 형질전환 식물의 가뭄 내성 및 내염성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 가뭄 내성 특성 연구 - 내염성 특성 연구 ○ AtBG2 유전자의 기능 규명 	100%

		<p>가수분해 할 수 있는 새로운 AtBG2 특성 규명</p> <p>o 새로운 가뭄 내성 관련 유전자 확보 및 기능연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 세포내 localization 연구 - Targeting 기작 연구 - 활성 연구 - 형질 전환 애기장대 구축 <p>o E3 ligase에 의한 가뭄 내성 기작 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - E3 ligase의 기능 연구 - E3에 의한 PIP2의 level 조절 기작 연구 - E3 ligase의 localization 연구 	
3차년도	2009	<p>o 벼에 AtBG1 유전자 도입 형질전환체 개발 (계속)</p> <p>o AtBG2 형질 전환체 개발 및 특성 연구</p> <p>o 새로운 ABA level 조절 유전자 연구</p>	<p>o AtBG1 형질전환체 특성 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 가뭄 내성 특성 연구 - 내염성 특성 연구 <p>o AtBG1 형질전환체 형질특성 규명 실험 (계속)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 벼 <p>o AtBG2 과다발현체 특성 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - mRNA 발현 및 level 조사 - 단백질 발현 연구 - 표현형 연구 <p>o UGT에 의한 세포내 ABA level 의 조절 기작 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 세포내 ABA level 확인을 위한 reporter system 구축 - UGT에 의한 세포내 ABA level의 down regulation 확인 	100%

<협동 연구 기관>

구분	연도	연구개발 목표	주요수행 내용	달성도
1차 년도	2007	o 유체에 AtBG1 유전자 도입 형질 전환체 개발 (20 line 이상 개발)	- Agrobacterium을 이용한 유체의 형질전환 체계를 확립하고 형질전환을 실시 - 형질전환 유체 개발 (42 line 확보)	120
2차 년도	2008	o 유체에 AtBG1 유전자 도입 형질 전환체 개발 (계속) o AtBG1 형질전환체 유체 포장실험 및 세대진전 o AtBG1 형질전환체 벼 포장실험 및 특성 검정	- 유체 형질전환체 개발 (65 line 확보) - 형질전환체 유체 포장실험을 통한 세대진전 및 특성검정 - 형질전환체 선발 및 세대진전 - 형질전환 유체의 분자생물학적 특성 검정 - 형질전환체의 농업형질 조사 - 우수 후보라인 선발 - 형질전환체 벼 포장실험 및 세대진전	110
3차 년도	2009	o AtBG1 형질전환 유체 포장실험 및 특성 검정 o AtBG1 형질전환 벼 포장실험 및 특성 검정	- 건조 포장실험을 통한 세대진전 및 우수 형질전환 유체의 선발 - 형질전환 유체의 분자생물학적 및 농업형질 분석 - 우수 형질전환체 유체의 최종 "EVENT" 선발 - 형질전환체 벼 포장실험과 세대진전 및 내건성 특성 조사	110

3. 관련 분야에의 기여도

- 1) 작물의 환경내성관련 유전자의 클로닝 및 이들 유전자를 이용하기 위한 벡터제작 및 형질전환체 개발체계 확립.
- 2) 기초 연구분야에서 새로운 ABA level 조절 기작의 규명을 통한 세포내 ABA 생성 기작 및 세포내 ABA 조절을 위한 biosynthetic pathway와 degradation pathway간의 coordination mechanism의 존재 확인.
- 3) E3 ligase를 통한 dehydration 기작의 존재 규명.
- 4) 기초연구에서 얻어진 결과를 작물에 적용하여 산업화 할 수 있는 적용 기술 개발 체계 확립.
- 5) 생명공학 기법을 이용한 신품종 개발에 필요한 형질전환 세대의 검정 및 후대 검정 방법과 우수한 목표 형질을 고정하기 위한 일련의 과정에 대한 체계 확립.

- 6) 작물의 환경내성 관련된 분자생물학적 및 농업형질 분석에 의한 우수 라인 선발 체계 구축.
- 7) 유용유전자 cloning 및 활용을 위한 체계 확립으로 유사 연구에 활용 가능.
- 8) 형질전환체의 환경위해성 평가를 위한 “EVENT”로 활용 가능.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획.

1. 기초 연구를 통하여 확보한 가뭄 및 고농도 염에 대한 저항성 유전자의 작물 형질전환체 개발에의 활용.

- 1) 새로이 확보된 AtBG2의 유전자를 이용하여 형질전환 작물체 제작과 형질의 특성의 검증을 통하여 가뭄내성 형질전환체에 활용.
- 2) 새로운 내염성 및 내건성 유전자를 작물에 도입하여 산업적으로 유용한 형질전환체 개발.

2. 작물의 환경내성관련 유용 유전자원의 확보 및 활용 체계를 확립.

- 1) 기후변화와 바이오에너지에 대한 수요 증가로 유용유전자원의 확보와 이들 유전자를 활용한 산업화를 위한 첫 단계인 유용 유전자원의 확보 체계 확립.
- 2) 형질전환 방법에 의한 목표형질이 도입된 새로운 품종개발 과정의 체계 확립.

3. 과제 수행기간에 축적된 기술과 인력 인프라의 활용.

- 1) 유용유전자를 확보 및 형질전환체 개발 그리고 형질전환체를 검정을 통한 품종개발 체계를 이해하는 인력 및 기술 인프라를 활용한 유용 목표형질이 도입된 신품종 개발.
- 2) 확보된 유용 유전자는 특허등록을 하여 지적재산권 확보.
- 3) 환경내성 작물, 바이오 에너지 원자재 확보를 위한 바이오매스 증대를 위한 형질전환 작물의 개발 및 세대고정을 통한 품종 개발에 활용하고자 함.

4. 확보된 건조내성 형질이 도입된 유채를 이용한 인체위해성 평가 (다음 단계 조치사항)

- 1) 본 연구가 기획되고 진행되는 동안에 이루어진 GMO 품종 등록을 위한 환경위해성 평가 조항의 신설로 신품종 등록에 필요한 위해성평가 자료 작성이 필요.
- 2) 환경위해성 평가를 위한 원재료 “Event”로 활용하여 환경위해성평가를 위한 기술개발에 이용. (현재 수행 중)
- 3) 위해성 평가기술 개발과 축적된 결과는 신품종 등록을 위한 심사자료로 제출하여 신품종 등록.

- 4) 재배승인을 위해 인체위해성평가도 함께 이루어져야 하기 때문에 환경위해성평가와 함께 인체위해성 심사자료 작성을 위한 연구가 필요함.
- 5) 형질전환 유채의 환경 및 인체위해성 평가 결과는 품종 등록에 활용 후 학술지에 게재.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

1. Brassica Genome Resources

1) The Multinational Brassica Genome Project (MBGP) (<http://www.brassica.info>)

(1) 십자화과 작물의 유전체 연구정보 공유 site.

(2) 현재 제공되는 유전체 정보.

(가) Genetic maps and populations.

(나) Collation of public domain SSR markers.

(다) ESTs in public repositories.

(라) BAC libraries and physical (BAC) contig maps.

(마) Analysis of *B. oleracea* shotgun sequences.

(3) 현재 진행중이거나 추후 제공될 유전체 정보.

(가) Induced variation (TILLING) and other reverse genetics resources.

(나) Transcriptional micro-arrays.

(다) Standardisation of nomenclature. (e.g. linkage groups, genes)

(라) Information registries and data exchange standards.

(마) Integration of genetic and genomic maps: from QTL to gene.

2) Brassica Genome Project (<http://brassica.bbsrc.ac.uk>)

(1) MBGP의 partner project 수행

(2) BAC library의 fingerprinting을 통해 배추속의 A와 C genome의 물리지도 작성

(3) Anchor probe를 이용한 Arabidopsis genome과의 비교유전체 연구

(4) 유채 (*Brassica napus*)의 SNP 제공

(5) 현재 축적된 Database 현황

	A genome	C genome
Fingerprinted Clones	33,159	35,419
% clones in contigs	69.1%	58.5%
Average no. clones/marker	11.7	10.1
Average no. markers/contig	4.6	4.8
Coverage	462 Mb	N/A*
Contigs	2041	1365

2. 환경내성 작물 등을 이용한 바이오에너지 확보를 위한 국외 연구 현황

- 제 2장 국내외 연구개발 현황 참조

제 7 장 참고문헌

Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Motoaki S., Kazuo S., Kazuko Y. S. (2006) Transcriptional Regulation of ABI3- and ABA-Responsive Genes Including RD29B and RD29A in Seeds, Germinating Embryos, and Seedlings of Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 60, 51-68.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, (1994) A Novel cis-Acting Element in an Arabidopsis Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low Temperature, or High-Salt Stress. *Plant Cell* 6, 251-264.

Yoo S-D, Cho Y-H, Sheen J. (2007) Arabidopsis Mesophyll Protoplasts: a Versatile Cell System for Transient Gene Expression Analysis. *Nature Protocols* 2:7.

Lee KH, P HL, Kim H-Y, Choi S-M, Fan J., Wolfram H., Hwang I, Kwak J-M, Lee IJ, Hwang I. (2006) Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid. *Cell* 126, 1109-1120.

Park S-Y, Fung P, Noriyuki N, Davin RJ, Hiroaki F, Yang Z, Cutler SR (2009) .Abscisic Acid Inhibits Type2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* 324, 1068-1071.

Yoshida T, Yasunari F, Hiroko S, Satoshi K, Kyonoshin M, Junya M, Kazuo S, Kazuko YS. (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 Are Master Transcriptional Factors That Cooperatively Regulate ABRE- Dependent ABA Signaling Involved in Drought Stress Tolerance and Require ABA for Full Activation. *Plant Journal*, 61, 672-685.

Fujii H, Chinnusamy V, Americo R., Silvia R., Regina A, Park SY., Cutler SR, Sheen J, Pedro L.R., Zhu JK. (2009) In vitro Reconstitution of an Abscisic Acid Signaling Pathway. *Nature* 462, 660-664.

Fujita Y, Nakashima K, Takuya Y., Takeshi K., Satoshi K., Norihito K., Taishi U., Miki F., Kyonoshin M., Kanako I., Masatomo K., Shoko N., Khji Y., Takuya I., Kazuo S., Kazuko Y. S. (2009) Three SnRK2 Protein Kinases Are the Main Positive Regulators of Abscisic Acid Signaling in Response to Water Stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 50, 2123-2132.

- Farshadfar E, Ghasempour H, Vaezi H (2008) Molecular aspects of drought tolerance in bread wheat (*T. aestivum*).** Molecular aspects of drought tolerance in bread wheat (*T. aestivum*). *Pak J Biol Sci.*, 11(1):118-22
- Gao C, Liu J, Nielsen KK (2009) Agrobacterium-mediated transformation of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.).** *Plant Cell Rep.*, 28(9):1431-7
- Hsieh TH, Li CW, Su RC, Cheng CP, Sanjaya, Tsai YC and Chan MT (2010) A tomato bZIP transcription factor, SlAREB, is involved in water deficit and salt stress response.** *Planta*, 231(6):1459-73
- Hu Y, Li WC, Xu YQ, Li GJ, Liao Y and Fu FL (2009) Differential expression of candidate genes for lignin biosynthesis under drought stress in maize leaves.** *J Appl Genet.*, 50(3):213-23
- Lee HK, Cho SK, Son O, Xu Z, Hwang I and Kim WT (2009) Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic Arabidopsis plants.** *Plant Cell.*, 21(2):622-41
- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ and Hwang I (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid.** *Cell*, 126(6):1109-1120
- Oliver MJ, Cushman JC and Koster KL (2010) Dehydration tolerance in plants.** *Methods Mol Biol.*, 639:3-24.
- Peng Z, Wang M, Li F, Lv H, Li C and Xia G (2009) A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat.** *Mol Cell Proteomics*, 8(12):2676-86
- Q Liu, M Kasuga, Y Sakuma, H Abe, S Miura, K Yamaguchi-Shinozaki and K Shinozaki (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis.** *Plant Cell*, 10(8):1391-1406
- Rabello AR, Guimarães CM, Rangel PH, da Silva FR, Seixas D, de Souza E, Brasileiro AC, Spehar CR, Ferreira ME and Mehta A (2008) Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L).** *BMC Genomics*, 9:485

Xu ZS, Ni ZY, Liu L, Nie LN, Li LC, Chen M and Ma YZ (2008) Characterization of the TaAIDFa gene encoding a CRT/DRE-binding factor responsive to drought, high-salt, and cold stress in wheat. *Mol Genet Genomic*, 280(6):497-508

Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo J and Ma Y (2009) Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J Exp Bot.*, 60(13):3781-96

Zheng X, Chen B, Lu G and Han B (2009) Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem Biophys Res Commun.*, 20;379(4):985-9

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.