

최 종
연구보고서

Activation tagging을 통한 농업 유용 유전자 분리

The isolation of Agricultural Useful Genes by
Activation Tagging

제노마인체단생물공학연구소

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Activation tagging을 통한 농업 유용 유전자 분리” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 7월 31일

주관연구기관명 : 제노마인 첨단생물공학연구소

총괄연구책임자 : 강 봉 중

세부연구책임자 : 박 유 신

세부연구책임자 : 최 윤 희

연 구 원 : 전 영 아

연 구 원 : 하 진 옥

요 약 문

I. 제 목

Activation tagging을 통한 농업 유용유전자 분리

II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 세계적으로 농업 유용 유전자의 대량 개발 기술이 확립되어 나가면서, 작물의 유전공학적 개선, 즉 생산량의 증가를 비롯해 병충해와 환경 스트레스 저항성 등 상업적 응용에 이용 가능 유용 유전자를 찾고자 하는 소위 유전자 전쟁이 가속화되고 있다. 따라서 국내 식물 생명 공학의 세계적인 경쟁력 확보를 위해서는 적정한 투자와 획기적인 전략을 통해 유용 유전자를 신속히 확보하여야만 한다.

우수한 형질을 가진 식물 종자를 개발하기 위해서는 기존 육종의 한계점을 보완할 수 있는 생명 공학적 기술의 적용이 필수적이며, 이는 농업 유용 유전자의 분리 및 확보로부터 시작된다. 현재까지 국내에서 자체 개발된 식물 유용 유전자의 자원은 소수에 불과한 실정으로, 이는 장차 국내 농업 관련 생명공학 발전에 큰 장애 요인으로 작용할 것으로 전망된다.

현재 유용 유전자 분리를 위한 대부분의 연구는 특정 유전자의 기능을 없앤 기능 손실 돌연변이체 (loss-of-function mutant)를 이용한 T-DNA insertional mutagenesis에 의존하고 있다. 그러나 이 방법의 경우, 1) 특정 유전자의 기능이 다른 유전자의 기능과 중복되어 (functional redundancy) 그 유전자의 기능 상실만으로는 돌연변이 형질을 보이지 않거나, 2) 배 발생 초기에 관여하는 유전자의 경우 해당 유전자의 기능 손실 돌연 변이체를 얻을 수 없다는 단점이 있다. 따라서 이러한 한계를 극복하면서 새로운 유용 유전자를 분리할 수 있는 기술의 도입이 필수적이다.

최근 확립된 활성 표지 선별법 (activation tagging)은 Cauliflower mosaic virus의 35S promoter의 enhancer 서열이 비교적 멀리 떨어져 있는 상태에서도 주변 유전자의 전사를 활성화 (transcription activation) 시킬 수 있다는 점을 이용한 것으로서, 기능 획득 돌연변이 (gain-of-function mutation)를 통해 표현형

의 변화를 우성적으로 확인할 수 있는 기술이다. 이를 통해 기존의 방법으로는 기능을 밝힐 수 없었던 많은 식물 유전자들의 기능이 밝혀지고 있다.

현재 상용화되어 있는 제초제, 해충, 바이러스 등에 저항성을 가진 작물 품종의 개발 외에도 한발, 냉해, 염분 등 환경스트레스에 대한 저항성 품종의 개발, 작물의 품질개선, 기능 도입, 생물 공학적 천연물 생산 등을 위한 강력한 수단으로서 21세기 핵심학문분야로 주목받고 있다.

또한, 유전자 자원 자체의 상업화 추세에 대비하는 방법이 유용 유전자를 대량 개발하고 이를 특허화 내지 유전자 판매 산업화 하는 것이며 이를 위해 유용 유전자 개발 사업에 국내에서도 필사의 노력을 경주해야 한다.

따라서 본 과제는 농업적으로 활용 가능성이 높은 유용유전자를 대량으로 확보하기 위한 기반기술을 개발하는 차원에서 기획되었으며 본 연구개발 과정에서 분리한 기능성 유전자를 특허화 하고 기능성 유전자의 상업화에 대비할 경우 이를 이용한 국내 생명 농업 시장의 기본 infra 확립에 기여하게 됨으로써 기업 가치의 제고와 국내 생명 공학 시장의 신규 수요 및 발전에 기여하고자 추진되었다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 농업생명공학의 원천 요소인 농업유용유전자 자원의 발굴기술인 activation tagging 기법의 개발 및 활용을 통해 1) 신규농업 유전자의 확보 및 이를 통한 지식기반 벤처형 고부가 사업 활성화 2) 가속화 되는 농업유용유전자 특허경쟁에 따른 한국 농업생명공학의 기반상실 방지 및 국가경쟁력 확보 3) 유용 유전자를 활용한 분자육종의 지표유전자 확보 및 생명공학 및 종묘산업의 활성화에 기여한다는 3가지 목표를 가지고 다음과 같은 내용 및 범위에 대한 연구를 추진하였다.

1) Activation tagging 기술의 확립

Activation tagging 기술은 인접 유전자의 발현을 증가시키는 enhancer element를 대상 식물의 genome에 삽입시키고 이 삽입된 element가 주변의 유전자를 activation 시켰을 때 나타나는 변이형질을 이용하여 유용한 변이체를 선발

할 수 있으며 이는 삽입변이체 (insertional mutant)만으로는 나타나지 않는 유전형질을 발견할 수 있는 dominant phenotype를 나타낼 수 있는 장점이 있다.

본 연구과정에서 이러한 activation tagging이 가능한 vector를 제작하고, 효과적인 변이체 작성법에 의해 대량을 변이체집단을 형성하며 이들 변이체집단으로부터 유용한 변이체를 선별하여 유전자를 분리하는 기술을 정립하고자 추진하였다.

2) 유용 변이체 선별 및 유전자 발굴

상기 과정에서 확립한 방법으로 본 연구기간 동안 확보된 변이체 집단을 대상으로 고농도의 염에 대한 내성 혹은 저항성을 나타내는 변이체와 저농도의 염에 대하여 민감성을 나타내는 변이체들을 선별하고 수분공급 조절 및 인위적 탈수처리에 의한 건조스트레스에 대한 내성 변이체들을 선별하였다.

또한 형태적인 변이체의 선별과 함께 다양한 시기에 치사성을 나타낸 변이체들을 선별하였으며 특성을 연구하였고 이들로부터 활성화된 유전자를 분리하였다.

3) 유전자 기능 확인 및 활용 방안 검토

상기과정에서 선별, 분리된 변이체와 유전자들은 애기장대를 이용하여 기능을 분석하기 위하여 과발현(over expression, sense expression) 또는 발현억제(antisense expression) 과정을 통해 기능검정을 실시하였으며 경우에 따라서는 T-DNA knock-out 변이체를 도입하여 기능성을 검정하였다.

또한, 이들 변이체 및 유전자들의 유전적, 분자유전적 특징은 southern분석이나 northern분석 등의 통상적인 방법으로 분석하였다.

4) 확보 유전자원의 database화

유용형질을 지닌 변이체들은 변이체들은 사진과 함께 표현형을 상세히 기술한 일차적인 형태의 자료로 만들고 이미지와 표현형에 대한 정보를 digital image화에 이은 전형적인 database 형태로 변환하여 국내외 관심 과학자나 산업계에 지공하도록 공개할 예정이다.

나아가 본 연구결과로 확보된 변이체 종자들은 seed bank화하여 유, 무상으로 분양하는 체계를 구축하여 활용하는 것이 바람직할 것이다.

IV. 연구개발의 결과

1) Activation tagging 기술의 확립

본 연구에서 사용한 activation tagging 용 벡터는 자체 제작한 pGM1003이라는 binary vector로서, 이는 right border sequence 옆에 4 분자의 CaMV 35S enhancer를 역방향으로 위치시킨 것이다.

Activation tagging vector인 pGM1003이 transformation 된 Agrobacteria strain AGL1을 이용하여 약 4주 동안 자란 미성숙 단계의 식물을 형질전환 시켰으며 이들로부터 수확한 종자(T0)를 제조체 성분인 바스타에 대한 저항성 유무를 근거로 형질전환된 12,000종의 T1 종자를 수확하였다.

Basta 저항성 확인을 통해 선별된 형질 전환 식물체들의 상호 독립성을 확인하기 위하여 그 중 일부에서 Southern blot analysis를 수행하였다. 삽입 pattern은 다양하였으나, 약 20% 정도가 single insertion으로 나타났으며 T-DNA copy 수가 2개 이상인 multiple insertion들도 확인되었다.

Activation tagging의 경우 T-DNA가 plant genome에 삽입된 후 주로 T-DNA의 right border 쪽에서 수 백 base에서 10 kilo-base(kb) 위치에 있는 유전자가 삽입된 enhance element에 의해서 activation 되며, 평균 3.5 kb 떨어져 있는 유전자가 activation 된다고 한다.

본 연구팀이 확보한 activation tagging pool의 경우 플라스미드 회수(plasmid rescue)에 의해 약 700 bp에서 10 Kb 크기의 다양한 flanking DNA를 분리 할 수 있었다.

2) 유용 변이체 선발 및 유전자 발굴

염(salt)에 대한 유전자 및 변이체를 발굴하기 위하여 50mM NaCl과 150mM NaCl을 사용하여 각각 저항성 변이체와 과민성변이체를 선발하였다.

저항성 변이체의 경우 150mM NaCl plate에 파종한 후 15일 무렵의 표현형으로 판단하여 729개 line을 선발하였고 과민성 변이체의 경우 50mM NaCl plate에서 파종 4일째의 백화현상 또는 anthocyanin 과다축적 등의 표현형으로 292 line을 선발하였다.

건조스트레스에 대한 저항성을 띠는 변이체를 선발하기 위하여서는 토양에서

생육중인 식물체에 수분공급을 중단하거나, 인위적 건조처리를 실시하였다. 먼저 확보된 activation tagging pool을 대상으로 30% PEG (Mr=8,000)을 2주동안 처리한 후 야생형에 비하여 활성을 띠는 변이체들을 선발하였고, 후반부에는 450mM의 D-mannito 배지를 이용한 root bending assay 방법으로 변이체를 선발하였다.

식물의 생산성이나 기타 유용형질과 관련된 변이체를 선발하기 위하여 표현형에 의한 변이체를 선발하였다. 개화시기 및 성장시기, 기관분화, 치사관련 변이체들을 각각 선발하였고 그들의 특성을 연구하였다.

3) 유전자 기능 확인 및 활용 방안 검토

Salt stress에 대하여 강한 저항성을 보이는 변이체로부터 분리한 유전자들 중에서 MAP kinase와 높은 유사성을 보이는 두가지 유전자 (At687, At355)에 대하여 후속 연구를 추진하였다. At687 유전자의 발현은 salt stress외에도 건조, 저온, 고온, UV에 대한 내성을 보이는 것을 확인하였다.

At355는 알려진 다른 MAP kinase들과는 40-50%의 상동성을 보였지만 신규한 종류의 MAP kinase였으며 특히 건조 스트레스에 강하게 유도되는 현상을 발견하고 세밀한 기능분석 연구를 추진하였다.

건조 내성을 보인 변이체로부터 분리한 유전자는 두개의 exon으로 구성되어 있고 446개의 아미노산을 코딩하는 1341개의 핵산으로 이루어진 유전자였다.

PAT3는 개체 전체에 albinism을 나타내며 결국 치사에 이르는 변이체로서, cotyledon 분화 속도는 wild type과 비슷하지만 이후 본엽의 발생과 개체 성장 속도는 현저히 떨어지며 3% sucrose 존재 하에서 약 3주 동안 배양하였을 때, wild type은 lateral root 생성 및 꽃눈 형성 단계까지 진행되는 반면, 변이체는 4번째 본엽의 발생까지는 이루어지지만 개체의 크기 생장은 거의 정지한 상태이며, lateral root 형성이 일어나지 않는 특징을 보였다. plasmid rescue 방법으로 분리 확인된 T-DNA는 WRKY-type DNA-binding protein과 integral membrane protein의 intergenic region에 삽입된 것으로 밝혀졌다.

야생형에 비해 약 10주 가량 flowering 이 늦고 rosette의 직경이 wild type의 4배 이상이며 flower의 크기도 wild type에 비해 현저히 컸으며, inflorescence 침

단에 flower가 모여 자라는 경향이 있었다. 온실의 자연광 하에서 배양하였을 때, 인공 배양실에서 보다 inflorescence가 4배 이상 높이 자랐으며, 종자의 양도 wild type보다 약 3배에서 많게는 20배 가량 많은 특징을 보이는 변이체 (LF508)는 두 개의 “putative Ca²⁺-binding EF-hand family protein (gene id= At1g70680)”의 intergenic region에 T-DNA의 insertion이 일어난 것으로 확인되었다.

LF6-135는 야생형에 비해 성장 속도가 느리며 개화 시기 또한 약 2주 정도 느린 변이체로서, 전체적인 개체의 색깔이 짙은 녹색을 나타내었다. Secondary inflorescence가 수평으로 벌어져서 자라며, silique의 발생 형태나 크기는 야생형과 유사하나, 전체적인 종자의 양은 야생형에 비해 다소 적은 편이었다. 약 4주 동안 자란 식물은 500mM NaCl 처리에 내성을 보이며, 건조 처리에도 내성을 나타내었다. Southern blot analysis를 수행한 결과, 2 copy의 T-DNA가 삽입된 것을 확인하였다. 2개의 T-DNA를 각각 분리하여 염기서열을 분석한 결과 하나는 “Phosphoglucomutase (gene id = At5g51820)” 유전자의 intron 부위로, 다른 한 부위는 “unknown protein”을 coding하는 것으로 확인되었다.

V. 연구개발 결과의 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 작성한 12,000여 종의 activation tagging line들은 seed stock화하거나 web based seed bank 형식으로 국내외 연구자에게 분양할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구과정에서 신규한 유전자로 추정된 At355 및 LF508은 기능이 좀더 보완되는 시점에 특허출원 등 필요한 조치를 취할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구를 통하여 선발된 다양한 형태의 변이체들과 유전자들은 관심이 있는 국내외 과학자들에게 분양될 수 있으며 후속 연구를 위해 좋은 연구재료로 활용되기를 희망한다.

S U M M A R Y

I. Title of the study

The isolation of agricultural useful genes by activation tagging

II. Objective and significance of the study

Recently, the gene war, what we called, is accelerating to isolate commercially useful genes which are important in crop productivity and resistance to pathogens and environmental stresses, as developing the techniques isolating of useful gene largely in molecular farming. So, we will have to obtain useful genes quickly via the proper investment and epoch-making strategy to develop competitive ability in plant biotechnology.

Genetic engineering technique is the alternative to overcome the limit of the conventional breeding process, and is necessary to develop the seeds having the good character. The isolation of agricultural useful genes and there insurance are starting point. Until now we do not have a lot of plant gene resources which have been found out for ourselves. That will be large barrier to develop our agricultural biotechnology in the future.

At present, the research of isolating useful genes is largely dependent on T-DNA insertional mutagenesis method that produces the loss-of-function mutants. But this method has the following weak points: (1) that some mutants do not show a significant mutant phenotype by only loss-of-function, because there are a lot of functionally redundant genes in plant, (2) some genes that have a key role in early embryogenesis do not produce the mutants by loss-of-function owing to lethality. So, it is necessary to introduce the new technology to overcome these weak points in T-DNA mediated mutagenesis.

Activation tagging established recently is founded on the transcription activation of enhancer molecules derived from cauliflower mosaic virus 35S promoter, though an activated gene is far from the sequence of enhancer molecules. The phenotype of activation tagging mutants is able to be identified dominantly by gain-of-function mutation. This character is supposed to be identified new genes which its function have not been found out by the existing other methods. At present, this technique is quite useful for the development of cold-, freezing-, or salt-tolerant crops, the improvement of crop quality, the introduction of new function, and production of an useful natural compound as well as development of commercialized herbicide, insect, and virus-resistant crop etc.

To prepare for commercialization of useful genes, we have to make efforts to identify the useful genes largely, get the patent for many genes, and apply these genes to improve the bad character of other crops. That proceedings will make us have a competitive power for today's trend in biotechnology.

So, this research was made a plan to develop the core technique to identify the many useful genes. Their possible patents and commercialization from this research will be contributed to settle of the basic biotechnology infra in the agricultural industry, propelled to contributed the reconsideration of the company's value, and meeting the new demand in our biotech industry.

III. Purpose and scope of the study

This study on the development and usage of activation tagging technique was propelled to activate the high value in addition to business through ensuring the useful genes being able to apply to farming, to develop of our national power in accelerating patent war about high value of agricultural genes, and to activate the seed industry by developing possible molecular

breeding maker genes

To acquire the previously mentioned purpose, this study was carried out as following.

1) Establishment of activation tagging technique

Activation tagging is based on the T-DNA insertion having the enhancer element to activate the gene expression near right border. The activation of a gene near right border results in the change of normal phenotype, and then this altered phenotype is shown dominantly in contrast to T-DNA insertional mutation. This dominant phenotype is made to identify the new gene function not discovered in insertional mutagenesis.

We drove this study to establish the gene isolation technique from many selected mutants after the construction of activation tagging vector, and the pool generation with the effective transformation method.

2) Mutant screening and discovery of useful gene

As mentioned, we screened the mutants showing the resistance or tolerance to high concentration of salt, hypersensitivity to low concentration of salt, and drought-tolerance to limited water supply and artificially induced dehydration condition. Together with phenotype screening, mutants showing lethality at various stage were also studied, and then their genes were isolated .

3) Examination of the gene function and its usage

The mutants and gene mentioned were studied their function in Arabidopsis by means of antisense expression or overexpression, occasionally by using introduced the T-DNA knock out mutants. Also their genetic and molecular character were analysed by southern and northern blot analysis.

4) Database construction

The primary database was written with the description of mutant phenotype in detail with pictures. This database will be open to the scientists to have interests in after change to the typical database containing the digitalized image of mutant phenotype.

It is desirable for activation tagging pool to be stocked to seed bank in near future, and then many scientist to be provided mutant seeds with of without payment from this seed bank.

IV. Results and Discussion

1) Establishment of Activation tagging

To generate the activation tagging pool, we constructed the activation tagging binary vector, pGM1003, to which 4 molecules of CaMV enhancer were inserted reversely near the right border. Arabidopsis were grown for 4 weeks in growth room, and then transformation by floral dipping method with agrobacteria strain AGL1 containing the pGM1003 vector. After transformation, T₀ seeds were harvested, and then above 12,000 T₁ plants were selected by spray of 0.01% basta solution.

The genomic DNA of some basta-resistant T₁ plants were isolated, and then the T-DNA insertion pattern was analysed by southern blot to confirm the independent T-DNA insertion. It was showed T-DNA insertion pattern had been various, and insertion percentage of single copy was about 20% with multiple insertion above 2 copies of T-DNA.

In other study of activation tagging, it was reported that a gene apart from a few hundred to 10 kilo-base (kb) near right border was activated by enhancer element. Usually a gene located in average 3.5 kb apart from RB

was reported to activate.

In our activation tagging pool, we also isolated a various of flanking DNA by plasmid rescue, which size was from 700 bp to 10 kb .

2) Screening of the useful mutant and isolation of its gene

The salt-resistant and salt-sensitive mutants were screened in presence of 50 mM and 150 mM NaCl, respectively. In case of salt-resistance. 729 lines had lived on 15 day after planting on 150 mM NaCl plate, and the 292 salt-sensitive lines were also selected by the phenotype showing the degradation of chlorophyll and accumulation of anthocyanin pigment in germinating on 50 mM NaCl plate.

The drought tolerant mutants were screened in dehydration condition caused by PEG and D-mannitol. When the activation tagging mutants were transferred to in condition of 30% PEG (Mr=8,000) for 2 weeks, drought-resistant plants were maintained the green leaves in contrast of wild type. Also, drought-resistant plant were selected by root bending assay using 450 mM of mannitol.

Flowering time, growth, organogenesis, and lethal-related mutants were screened visually and studied to characterize the mutant phenotype in order to select the mutants involved in productivity and other useful characters.

3) Characterization of some genes and examination of their usage.

We selected two genes, At687 and At355, among some genes isolated from salt-resistant mutants, which genes was highly homologous to MAP kinase. At687 gene was confirmed the relationship to environmental stress such as drought, cold, high temp and UV stress by gene expression pattern. At355 would be a new type of MAP kinase, induced the gene expression only by drought stress, although low homologus (40-50%) to other MAP kinase.

The isolated gene from a drought tolerant mutant consist of two exons and 1,341 nucleotides which coding 446 amino acids.

PAT3 mutant showed the following complicated phenotype : the whole plant albinism which leads to lethal, the differentiation rate similar to wild type, very slow growth of true leaves. Also, wild type produced the lateral root and the floral bud when grown in presence of 3% sucrose, but this mutant showed that the whole plant growth would be almost stationary without the production of later root after the appearance of 4th true leaf. T-DNA flanking region isolated by plasmid rescue was located in the intergenic region between WRKY-type DNA binding protein and integral membrane protein.

LF508 was a late flowering mutant which flowering time delayed about 10 weeks and the diameter of rosette leaf was increased 4 times to wild type. The mutant showed the tendency to flower size be more larger than wild type, and flowers be crowded to the top of inflorescence. In natural light condition, the inflorescence height was increased 4 times to wild type, and then the seed production was largely increased about 3 to 20 times in contrast of growth room condition. In this mutant, T-DNA was confirmed to be inserted to intergenic region between 2 putative Ca²⁺-binding EF-hand family protein (gene ID= At1g70680)

LF6-135 mutant was related to growth retardation, showing the slow growth rate delayed flowering time for 2 weeks, dark green color, and horizontally grown secondary inflorescence. Total seed production was more or less decreased, although the developmental form and size of silique were similar to wild type. Especially, this mutant grown for a month in soil showed the tolerance to high salt (500 mM NaCl) and drought stress. According to southern blot analysis, 2 copies of T-DNA were inserted, the one revealed the intron region of phosphoglucomutase (gene ID =

At5g51820), the other coding region of unknown protein.

V. The proposal of this study's practical use

It is considered that approximately 12,000 activation tagging lines will be desirable to be stocked in seed bank form, and provided to many inside or outside scientists through the web-based seed bank.

At355 and LF508 were new genes according to this study, and are considered to be patented or taken other step after more functional studies.

We hope that a various of mutants and genes from this study will be provided to scientists to have interest in, and utilized as a good study material for further functional studies.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	19
Section 1. Objective and significance of the study -----	19
1. Technical viewpoint -----	19
2. Commercial viewpoint -----	20
3. Social and cultural viewpoint -----	21
Section 2. Status and problems of related field -----	21
Section 3. Purpose and scope of the study -----	23
Chapter 2. Generation of Activation tagging pool -----	27
Section 1. Overview -----	27
Section 2. Activation tagging vector construction -----	28
Section 3. Transformation and screening of tagging pool -----	30
1. Model plant -----	30
2. in planta transformation -----	30
3. Mutant screening -----	31
4. Independency of transformed mutant lines -----	32
Section 4. Gene isolation form activation tagged mutant -----	34
Chapter 3. Mutant screening and gene isolation -----	36
Section I. Overview -----	36
Section 2. Salt stress tolerant mutants -----	36
1. Screening method of salt stress tolerant mutants -----	38
2. Characteristic importance of screened mutants -----	42
3. T-DNA copy number and cosegregation test -----	43
4. Plasmid rescue and characterization of the genes -----	44
Section 3. Drought stress tolerant mutants -----	56

1. Screening method -----	56
2. T-DNA copy number and cosegregation test -----	58
3. Characteristics of the mutants -----	59
4. Characterization of the genes -----	59
Section 4. Morphological mutants -----	61
1. Phenotypic characteristics -----	61
A) Lethal mutants	
B) Structural and physiological mutants	
2. Characteristics of isolated genes	
Chapter 4. Discussion -----	80
Chapter 5. Further study and extended research propose -----	84
References -----	86

목 차

제 1 장 서 론 -----	19
제 1 절 연구개발의 필요성 -----	19
1. 기술적 측면 -----	19
2. 경제 상업적 측면 -----	20
3. 사회 문화적 측면 -----	21
제 2 절 국내외 관련기술 현황 및 문제점 -----	21
제 3 절 연구개발의 목적과 범위 -----	23
제 2 장 Activation tagging pool 생산 및 유전자 분리 확립 기술 -----	27
제 1 절 서론 -----	27
제 2 절 형질 전환용 vector 구축 -----	28
제 3 절 형질전환 식물체 pool 제작과 선별 -----	30
1. 모델식물 -----	30
2. in planta transformation -----	30
3. 형질전환 식물체 선별 방법 -----	31
4. 형질전환 식물체의 상호 개별성 -----	32
제 4 절 Activation tagging을 통한 유전자 분리기술 확립 -----	34
제 3 장 변이체 선별 및 유전자 분리 -----	36
제 1 절 서론 -----	36
제 2 절 염 스트레스 저항성 변이체 선별 및 특성분석 -----	37
1. 염 스트레스 저항성 변이체 선별 방법 -----	38
2. 선별 변이체들의 특성 -----	42
3. T-DNA copy 수 확인 및 co-segregation 분석 -----	43
4. 플라스미드 회수를 통한 유전자 분리 및 특성분석 -----	44
제 3 절 건조 스트레스 저항성 변이체 선별 및 특성분석 -----	56

1. 건조 스트레스 저항성 변이체 선별 방법 -----	56
2. T-DNA copy 수 확인 및 co-segregation 분석 -----	58
3. 선별 변이체들의 특성 -----	59
4. 플라스미드 회수를 통한 유전자 분리 및 특성분석 -----	59
제 4 절 형태 변이체 선별 및 유전자 분리 -----	61
1. 형태 변이체의 특성 -----	61
가) 치사 관련 변이체	
나) 식물체 구조, 생리 변이체	
2. 분리 유전자의 특성	
제 4장 고찰 -----	80
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획 -----	84
참고문헌 -----	86

제 1장 서론

제 1 절 연구 개발의 필요성

현재 세계적으로 농업 유용 유전자의 대량 개발 기술이 확립되어 나가면서, 작물의 유전공학적 개선, 즉 생산량의 증가를 비롯해 병충해와 환경 스트레스 저항성 등 상업적 응용에 이용 가능 유용 유전자를 찾고자 하는 소위 유전자 전쟁이 가속화되고 있다. 따라서 국내 식물 생명 공학의 세계적인 경쟁력 확보를 위해서는 적절한 투자와 획기적인 전략을 통해 유용 유전자를 신속히 확보하여야만 한다.

1. 기술적 측면

Arabidopsis는 식물의 유용 유전자의 조기 발견에 있어 가장 우수한 모델 시스템이다. 이 식물 자체의 농업적 중요성은 없으나, 작은 genome의 크기, 짧은 생활사, 작은 개체 크기, 형질전환의 용이성, 모든 염색체의 유전학적, 물리적 지도에 대한 많은 정보 등의 장점을 가지고 있으며, 무엇보다 지난 2000년 12월 전체 염기 서열이 완전히 해독되었으며 전 세계적인 연구 네트워크가 형성되어 있다는 것이 가장 큰 장점이다. Arabidopsis에서 발견되는 농업 유용 유전자의 정보를 규명함으로써 다른 작물에서 유용 유전자 분리가 용이해 진 점을 감안하면, Arabidopsis의 기능성 유전자의 신속한 규명이 곧 국내 식물 생명공학에 경쟁력을 부여할 수 있는 중요 요인이 될 것임은 자명한 일이다.

우수한 형질을 가진 식물 종자를 개발하기 위해서는 기존 육종의 한계점을 보완할 수 있는 생명 공학적 기술의 적용이 필수적이며, 이는 농업 유용 유전자의 분리 및 확보로부터 시작된다. 현재까지 국내에서 자체 개발된 식물 유용 유전자의 자원은 소수에 불과한 실정으로, 이는 장차 국내 농업 관련 생명공학 발전에 큰 장애 요인으로 작용할 것으로 전망된다.

현재 유용 유전자 분리를 위한 대부분의 연구는 특정 유전자의 기능을 없앤

기능 손실 돌연변이체 (loss-of-function mutant)를 이용한 T-DNA insertional mutagenesis에 의존하고 있다. 그러나 이 방법의 경우, 1) 특정 유전자의 기능이 다른 유전자의 기능과 중복되어 (functional redundancy) 그 유전자의 기능 상실 만으로는 돌연변이 형질을 보이지 않거나, 2) 배 발생 초기에 관여하는 유전자의 경우 해당 유전자의 기능 손실 돌연 변이체를 얻을 수 없다는 단점이 있다. 따라서 이러한 한계를 극복하면서 새로운 유용 유전자를 분리할 수 있는 기술의 도입이 필수적이다.

최근 확립된 활성 표지 선별법 (activation tagging)은 Cauliflower mosaic virus의 35S promoter의 enhancer 서열이 비교적 멀리 떨어져 있는 상태에서도 주변 유전자의 전사를 활성화 (transcription activation) 시킬 수 있다는 점을 이용한 것으로서, 기능 획득 돌연변이 (gain-of-function mutation)를 통해 표현형의 변화를 우성적으로 확인할 수 있는 기술이다. 이를 통해 기존의 방법으로는 기능을 밝힐 수 없었던 많은 식물 유전자들의 기능이 밝혀지고 있다.

2. 경제, 상업적 측면

식물의 생명공학적 응용은 식량 자원 뿐 아니라 여러 가지 의약품 및 공업 원료의 생산에까지 그 범위가 확대되고 있다. 그러나 현재까지 국내에서 개발된 식물 유전자 자원은 극소수에 불과한 실정으로 장차 한국에서의 식물 관련 생명공학 연구의 큰 장애 요인이 될 것이다. 특히 현재의 기술 수준과 선진국의 유전자 자원의 상업화 추세에 비추어 볼 때 자체 유전자 자원의 개발 없이는 농업 생명공학을 통한 한국 농업 기술의 경쟁력은 치명적인 타격을 입을 것이 자명하다.

분자유종 작물의 재배면적이 95년 120만 ha, 96년 280만 ha, 97년 1,280만 ha로 엄청나게 빠른 속도로 증가하고 있음은 이를 잘 반영하고 있다

현재 상용화되어 있는 제초제, 해충, 바이러스 등에 저항성을 가진 작물 품종의 개발 외에도 한발, 냉해, 염분 등 환경스트레스에 대한 저항성 품종의 개발, 작물의 품질개선, 기능 도입, 생물 공학적 천연물 생산 등을 위한 강력한 수단으로서 21세기 핵심학문분야로 주목받고 있다. 물론 현재 유전자조작 농산물의 안전성

면에서 다소 논란의 여지가 있고, 분자유종 선결과제인 식물의 재분화가 아직도 많은 주요 작물에 있어서 확립되어 있지 않다는 점 등 미해결의 문제가 있지만 이러한 문제가 해결되기까지는 그리 오랜 시간이 걸리지 않을 것으로 보인다.

유전자 자원 자체의 상업화 추세에 대비해야 한다. 예를 들어 미국의 지난 2년 동안 기능성 유전자 자원을 개발하여 판매하는 유전자 개발 및 판매 기업이 4개나 설립되어 가까운 장래에 대부분의 유용 유전자 자원이 특허화 되고 국내에서 대비 부족 시 국내 농업 생명공학 산업은 기반을 상실하게 될 위기에 직면하고 있다.

이러한 추세에 적극 대비하는 방법이 유용 유전자를 대량 개발하고 이를 특허화 내지 유전자 판매 산업화 하는 것이며 이를 위해 유용 유전자 개발 사업에 국내에서도 필사의 노력을 경주해야 한다.

3. 사회 문화적 측면

21세기 국가 경쟁력은 원천 지식에 기반을 둔 신기술 개발을 통한 산업 활성화를 통해서만 가능하며 이의 일환으로 농업 유전자 개발을 이용한 농업 생명공학 기술의 도입으로 농업 생명공학 산업을 활성화시켜 사회적 활력의 회복 및 고용창출에 기여할 필요가 있다. 또한 물질 자체의 산업화 이전에 지식과 정보가 산업화되고 있는 사회, 문화적 환경 변화 속에서 농업 유용 유전자의 개발 및 산업화를 모색할 필요가 있다.

국가 식량 안보 차원 및 통일 대비 식량 증산 기술 개발을 위해서도 농업 생명공학 기술의 확보는 매우 중요한 과제이다.

제 2 절 국내외 관련 기술 현황 및 문제점

1. 관련 기술 현황

T-DNA insertional mutagenesis와 knock-out line Screening 기술은 현재까지 Arabidopsis에서 functional genomics에 가장 활발하게 사용된 기술이며, 이를

통해 1,000이상의 유전자의 기능이 확인되었다.

단순 T-DNA insertional mutagenesis의 경우, 초기에 가장 효율적으로 사용되었던 functional genomics 기술로서, visible phenotype을 보이는 형질 변이체가 전체의 약 15% 정도의 빈도로 나타난다. 그러나, 분리된 유전자가 실제 T-DNA 와 연관된 경우는 약 5% 정도로 돌연변이 형질이 나타나더라도 유기 유전자를 분리할 수 있는 확률이 낮다.

Reverse genetics 기술은 knock-out line 분리에 아주 효율적인 방법이다. 이 기술은 이미 알고 있는 Arabidopsis의 genomic sequence에 해당하는 knock-out line을 knock-out mutant pool로부터 찾아내어, 해당 유전자의 기능을 간접적으로 확인하는 기술이다. 현재 주로 미국의 공공기관, 대학 등에서 이러한 mutant pool을 제공하고 있으며, 최근에는 이러한 일련의 과정의 가속화를 위해 Salk institute의 Joe Ecker 연구실에서 T-DNA insertion line들의 flanking sequence DB가 제작되고 있으며, 또한 영국의 Jone Innes Institute에서도 유사한 일이 진행되고 있다.

이러한 screening service를 한국에서 이용할 경우 한 sequence 당 보통 3개월의 시간이 소요되므로, 이는 reverse genetics 분야에 있어서의 경쟁력 약화의 큰 요인이 된다고 하겠다. Flanking sequence DB의 경우 현재는 공동 연구를 원하는 그룹에 국한되어 공개되고 있으며, 또한 이미 많은 선진국 연구자들이 access를 하고 있어 이에 의존할 경우 경쟁력의 감소는 자명한 일이다. 또한 현재 단순 T-DNA insertion line의 경우 약 40-50%가 multiple T-DNA가 삽입되는 경향이 있어 mutation이 발견되더라도 표현형의 조사시 오판을 유도하거나 다시 유전적 분석을 해야 하는 문제점이 있다.

2. 산업계 연구동향 및 시장 현황

이미 외국에서는 식물 유용 유전자 자원 개발이 기업의 사활을 건 사업으로 활발히 진행되고 있다.

CCD 이미지 분석 시스템을 포함한 대규모 자동 visual screening system을 갖추고 tagged line들의 screening 작업이 수행되고 있으며 (Paradigm Genetics),

두 개의 다른 Arabidopsis ecotype인 Col-0와 La-0의 genome 비교를 통해 유용 유전자 분리 연구를 비롯하여, tagged line에서 GC를 통한 high-throughput screening이 진행되고 있다 (Cereon). 또한 Arabidopsis에서 약 600 여 개에 달하는 transcriptional factor들의 기능을 확인하여 특허가 출원된 바 있으며 (Mendel Biotech.), full-length cDNA를 이용한 유전자 기능 연구도 특허 출원 작업이 진행되고 있다 (Ceres).

본 개발 기술의 경우 식물 생명공학 산업 분야의 근간이 되는 기능성 유전자 자체를 발굴하는 원천 기술이라는 특수성 때문에 유전자 자체의 licensing-out 시장의 규모를 정확하게 예측하기에는 어려운 면이 있다. 기능성 유전자를 이용하여 개발하는 생명 농업 시장은 국내에서 1조 4,000억 규모의 시장을 형성하고 세계적으로는 1997년에 16억 달러의 시장이 이미 형성되었으며 다가올 2010년에는 약 100억 달러의 시장을 형성할 것으로 전망되고 있다 (생명공학 분야별 세계 시장 및 전망: 산업연구원 1999).

식물을 대상으로 하는 생명 공학 시장은 제초제 저항성 식물로 대변되는 1세대 GMO에서 antibody, hormone, vaccine, functional food를 생산하는 bioreactor 개념의 2세대 GMO로 급속히 발전하고 있는 상황이다. 이러한 2세대 GMO의 경우 종래의 형질전환 기술에 기초하는 1세대 GMO와는 다르게 기능성 유전자를 이용한 원천기술을 필요로 한다. 그러나 국내의 생명 공학 시장은 전적으로 외국에서 개발된 원천 기술에 의존하고 있어 국내 생명 공학 산업의 infra가 매우 미약한 실정으로 자체적으로 시장을 형성하고 확대하기 어려운 것이 현실이다.

따라서 본 과제에서 개발한 기능성 유전자를 특허화 하고 기능성 유전자의 상업화에 대비할 경우 이를 이용한 국내 생명 농업 시장의 기본 infra 확립에 기여하게 됨으로써 기업 가치의 제고와 국내 생명 공학 시장의 신규 수요 및 발전에 기여하기 위하여 수행되었다.

제 3 절 연구 개발의 목적과 범위

본 과제의 연구개발 최종목표는 새로운 functional genomics 기술인

activation tagging 방법을 적용하여 농업 유용 유전자 자원을 다수 확보하고 이를 Data Base화 하여 신규 유용 농업 유전자를 특허화 하고 종묘 관련 기업에 licensing-out 함으로서 단기 수익 회수가 가능한 지식 기반의 벤처형 고부가 가치 사업을 개발하며 가속화 되고 있는 외국의 농업 유용 유전자 특허화로 인한 장래 한국 농업 생명공학 기반 상실을 막고 유용 유전자 발굴 경쟁에서 한국이 경쟁력을 가지는 데 기여하며 종묘 산업적 측면에서 유용 농업 유전자들을 기존 육종과 접목하여 기존 육종시의 지표 (marker) 유전자로 활용함과 동시에 생명공학적 응용의 기반을 만들어 육종 산업의 활성화에 기여하고자 다음과 같은 연구 개발 목표를 설정하여 수행하였다.

1. 추진전략 및 방법

본 연구를 수행함에 있어서 가장 많이 연구가 진행되고 있는 Arabidopsis를 model 식물로 하여 기능이 확인된 유전자를 용이하게 분리할 수 있는 activation tagging 접근 방법을 이용 mutant pool을 확보하고 이들을 screen하여 유용한 형질을 지닌 변이체를 선별하여 농업 유용 유전자 자원으로 활용하고자 하였다.

이를 위하여 과제 초기에는 기 확보한 Arabidopsis의 activation tagging pool을 대상으로, 과제 진행에 따라 activation tagging pool을 확장, 구축하여 주로 비생물학적 스트레스 환경 (salt 및 drought, cold, UV)에 대한 변이체를 집중적으로 screening하여 유전적 특성을 밝히는 한편 개화시기 조절, 성장속도, 식물체 크기와 같은 농업 유용 형질에 대한 변이체들도 탐색, 분리하였다.

Activation tagging은 인접 유전자의 발현을 증가시키는 enhancer element를 genome에 삽입시켜 이 삽입된 enhancer element가 인접한 유전자를 activation 시키면 이것이 dominant 돌연 변이로 나타날 수 있다는 원리를 이용한 방법이다. 추후 관련 유전자는 inverse PCR 방법이나 plasmid rescue 방법 등으로 쉽게 분리 할 수 있어 유전자 확보에 유리한 방법이다.

본 연구에서는 초기에는 외부로부터 도입한 tagging pool을 대상으로 변이체 screening을 실시하였으나 자체적으로 pCAMBIA를 바탕으로한 binary vector의 right border sequence 옆에 4x CaMV 35S enhancer를 역방향으로 위치시킨

vector를 제작하여 활용하였다. 이 vector는 효과적으로 형질 전환체를 선발하기 위한 제초제 (BASTA)저항성 유전자를 가지고 있으며 제작된 vector들을 포함하는 hyper-virulence Agrobacteria (AGL1)을 이용하여 vacuum infiltration 방법으로 형질전환체 pool을 구축하였다.

확보된 activation tagging lines을 대상으로 유용 유전자 형질 변이체를 선발하였다. 본 과제를 통하여 확보에 주력한 유용 형질은 식물체의 생산성 및 stress 저항성 등을 높이는데 이용될 수 있는 형질들을 타킷으로 하였다. Stress는 주로 비생물학적 스트레스로써 salt, drought, cold, UV와 oxidative stress (H₂O₂)등에 관련된 변이체였으며 생산성향상과 관련하여서는 형태적변이체 (개화시기, 성장속도, 식물체 크기)의 선발에 주력하였다.

우수 유용 형질 변이체에 대해서는 관찰된 표현형이 도입된 T-DNA와 cosegregation 하는지 여부를 조사하였고 (activation tagging mutant의 경우 대개 우성 형질로 나타남) cosegregation test로서 분석된 유용 형질 변이체들로부터 inverse PCR 방법이나 plasmid rescue방법으로 관련 유전자를 분리 및 특성 연구를 수행하였다.

본 연구과정을 통해 확보한 유용 형질을 지닌 mutant line들의 사진과 함께 이들의 표현형을 자세히 기술하여 Data Base화 하기위한 기반을 조성하였다.

2. 연구개발 범위

본 연구는 3년에 걸쳐 독자적인 activation tagging기술의 확립 및 유전자 분리기술의 확립을 통해 10,000 line에 이르는 tagging pool을 확보하고 환경스트레스, 개화시기, 성장속도 등에 대한 변이체 선발을 통해 유용변이체를 선발하며 최종적으로 5종의 유용유전자의 특성을 구명하며 확보된 tagging line 및 변이체들에 대한 특성을 D/B화 하여 외부에 공개 및 연구용으로 분양하고자 하였다.

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> • Activation tagging pool의 screening을 통한 농업 유용 형질 유전자 분리 • activation tagging pool의 확장 • Data Base 화 	<ul style="list-style-type: none"> • 기 확보된 activation tagging pool의 screening. 2,000 line을 대상으로 salt 관련 변이체 탐색 조건 확립 및 탐색 시작 • 유용 형질 변이체(개화시기, 성장속도, 환경 stress 저항성 등) 탐색 • activation tagging pool로부터 유전자 분리 기술 확립 및 분리 시작 • 3,000 line의 activation tagging line 추가 생산 • 기본 DB format 구축
2차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> • 농업 유용 형질 유전자 screening. • 농업 유용 형질 유전자 분리 • activation tagging pool의 추가 생산 • D/B 운영 	<ul style="list-style-type: none"> • Activation tagging pool screening (5,000 lines) :농업 유용 형질 mutant 분리 및 DB화 • 유용 유전자 분리 3종 완료 및 특성 연구 • Activation tagging mutant line (10,000 lines) 생산 • 변이체 D/B 구축 및 시험운용
3차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> • 농업 유용 형질 mutant 분리 • 농업 유용 유전자 분리 • D/B 운영 	<ul style="list-style-type: none"> • Activation tagging line의 screening (10,000 line) 완료 • 농업 유용 유전자 분리 5 종 완료 • 특성 분석 완료 • 유용 형질 변이체 D/B 및 유전자 D/B 구축 • Web based 운용

제 2 장 Activation tagging pool 생산 및 유전자 분리 기술 확립

제 1 절 서론

지금까지 특정유전자의 기능을 확인하는 방법으로 널리 이용된 기술은 T-DNA 삽입 또는 화학적 물리적 돌연변이 유발에 의한 기능 손실 돌연변이 (loss-of function mutation)을 이용하는 것이었다. 그러나 이러한 loss-of-function 방법에 의한 유전자 분리법은 몇가지 단점을 가지고 있다. 첫 번째 단점은 유전자의 중복성(redundancy)에 의한 기능 확인이 어려운 것이다. 최근 몇 년사이에 진핵생물들의 genome연구결과에 의해 밝혀진 바에 따르면 많은수의 진핵세포들은 기능적으로 중복된 연기서열이 존재하며 이러한 중복서열들은 전사부위(coding region) 뿐만아니라 비전사부위 (non-coding region) 또는 조절부위(regulatory region)에도 널리 분포하는 것으로 알려져 있다. 두 번째로는 어떤 유전자가 초기배발생 단계 또는 생식세포분화 단계에서 발현되는 경우 그 유전자의 발현 손실에 의한 초기과정에서의 발생이 불가능함에 따른 개체확보가 불가능한 경우이다.

이와는 상반되게 기능획득 돌연변이 (gain-of-function mutation)의 경우는 특정 대사과정이나 발달단계에서 특이적 기능을 가지지 않은 유전자의 경우는 변이체의 대립형질로써 존재하는 한 그 대사과정이나 발달과정에서 기능을 할 수 있으며 초기 발달단계에서 특별한 기능을 하는 유전자의 손실이 있을 경우에도 특정 대사과정 또는 발달단계 자체가 부가적 활성화(ectopic activation)을 나타낼 경우에는 개체발생 및 생존이 가능하게 되므로 변이유전자 확인이 가능하게 된다.

Activation tagging 방법은 CaMV의 35S promoter의 enhancer 서열이 비교적 멀리 떨어져 있는 상태에서도 주변 유전자의 전사를 활성화 시킬 수 있다는 점

을 이용한 것으로서, 기능 획득 돌연변이 (gain-of-function mutation)를 통해 표현형의 변화를 우성적으로 확인할 수 있는 기술이다. 관련 유전자는 inverse PCR 방법이나 plasmid rescue 방법 등으로 쉽게 분리할 수 있다. 이를 통해 기존의 방법으로는 기능을 밝힐 수 없었던 많은 식물 유전자들의 기능이 밝혀지고 있다.

제 2 절 형질전환용 vector 구축

본 연구에서 사용한 activation tagging 용 벡터는 자체 제작한 pGM1003이라는 binary vector로서, 이는 right border sequence 옆에 4 분자의 CaMV 35S enhancer를 역방향으로 위치시킨 것이다 (Figure 1). 이 벡터의 중요 구성은 다음과 같다.

1. 형질 전환 식물체를 선별하기 위한 저항성 유전자로서 Basta (ammonium glufosinate) 저항성 유전자를 지니고 있다. Basta를 이용하면 애기장대에서 형질 식물전환체 선별이 용이하고 또한 사람에게 무해하다.

2. Cauliflower mosaic virus의 35S 프로모터로부터 유래한 enhancer 서열 4개가 포함된다. 이 enhance element는 인접한 유전자의 전사를 활성화시키는 역할을 한다.

3. pBluescriptII-SK(+) 벡터는 삽입된 enhancer 주변의 genomic DNA 절편을 cloning 하는데 사용되며, plasmid rescue를 통해 얻은 재조합 plasmid가 E. coli cell 안에서 복제, 증식이 가능하게 해주는 역할을 한다.

4. 식물 binary vector는 Agrobacterium과 식물체에서 DNA를 복제할 수 있는 염기서열을 가지고 있다.

제 3 절 형질전환 식물체 pool 제작과 선별

1. Model 식물

본 연구에서는 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* L.), Col-0를 모델 식물로 이용하였다. *Arabidopsis*는 십자화 과 (*Brassicaceae*)에 속하는 고등 식물로서 이 식물 자체의 농업적 중요성은 없으나, 작은 genome의 크기, 짧은 생활사, 작은 개체 크기, 형질전환의 용이성 때문에 제한된 공간에서 단 시일 내에 tagged pool을 제작하는 것이 가능하다. 또한 모든 염색체의 유전학적, 물리적 지도에 대한 많은 정보가 구축되어 있고, 무엇보다 지난 2000년 12월 전체 염기 서열이 완전히 해독되었으며 전 세계적인 연구 네트워크가 형성되어 있다는 것이 가장 큰 장점이다.

2. *in planta* transformation

비교적 적은 노동력과 비용이 소요되는 floral dipping 방법을 사용하였다 (Figure 2). Activation tagging vector인 pGM1003이 transformation 된 *Agrobacteria* strain AGL1을 seed culture 하고 그것을 다시 28°C에서 liquid culture 하여 OD600 값이 0.8 - 1.0이 될 때까지 키워 4°C, 5000rpm에서 10분간 원심 분리하여 bacterial cell을 회수하였다. Bacterial pellet을 다시 infiltration medium (1×MS salts, 1×B5 vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77)에 최종 OD600 값이 2.0 - 2.4 가 되도록 현탁하였다. 약 4주 동안 자란 *Arabidopsis* 중 대부분의 꽃이 미성숙 단계에 있는 것을 선택하였다. 식물이 자라고 있는 화분을 통째로 뒤집어 *Agrobacteria* 현탁액에 꽃이 잠길 정도로 담그고 (뒤집을 때 흙이 쏟아지는 것을 방지하기 위하여, 식물을 심기 전에 흙 위에 망을 씌운 후 그 위에 파종한다), 약 2분 후 화분을 꺼내어 과잉의 현탁액을 제거한 다음 비닐을 씌워 습도가 유지되도록 하였다. 약 24시간 후 비닐을 벗겨 내고 배양 조건 하에서 배양하여 약 3주 후 T1 종자를 수확하였다.

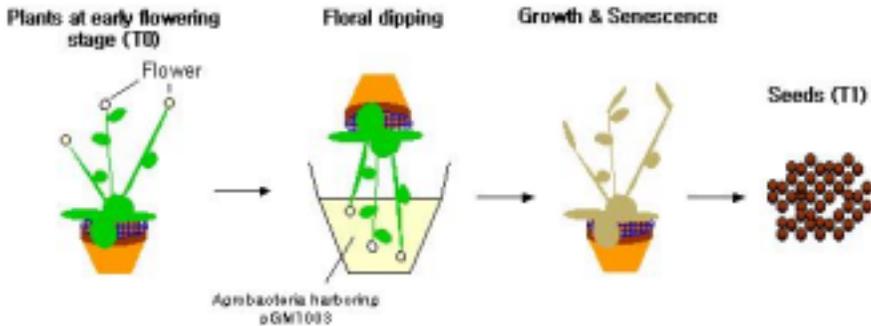


Figure 2. *in planta* transformation (Floral dipping)

3. 형질 전환 식물체 선별

형태적으로 뚜렷한 우성 발현 형질 전환 식물체를 분리할 수 있는 확률은 약 1/1000정도 된다는 보고가 있으므로, 많은 수의 T1 형질 전환 식물체를 만들수록 우성 발현 형질 변이 식물체를 발견할 확률은 높아진다.

T1 형질전환체를 얻기위하여 형질전환 과정을 거친 T0 종자를 0.02% Basta 용액에 담근 상태에서 3일 동안 저온 처리한 후, 모래와 Bioprag를 4:1로 섞어 넣은 납작한 화분에 파종한다. 0.02% Basta 용액에 화분을 담근 채로 1 주일 동안 키운다. Basta에 저항성을 보이는 개체, 즉 형질 전환 식물체는 cotyledon 분화와 뿌리 성장이 정상적으로 일어나는 반면, 저항성이 없는 식물체는 발아는 하지만 이후 생장이 저해되어 결국은 고사하게 된다. 형질 전환 식물체가 구분되기 시작한 이후 3일 이내에 vermiculite와 Bioprag를 4:1로 섞어 넣은 화분에 각 형질 전환 식물체를 옮겨 심는다. 이 방법은 약 90% 이상의 생존율을 보였으며, 약 4 주 후 각 형질 전환 식물체로부터 T2 종자를 얻었다. 전체 T1 세대 대비 형질 전환 식물체로 확인 된 변이 식물체의 비율로 계산한 형질 전환 효율은 평균 0.1 % 정도였다 (Figure 3).



Figure 3. Selection of transformants (T1) using Basta™.

4. 형질 전환 식물체의 상호 독립성

Basta 저항성 확인을 통해 선별된 형질 전환 식물체들의 상호 독립성을 확인하기 위하여 그 중 일부에서 Southern blot analysis를 수행하였다 (Figure 4). 삽입 pattern은 그림에서와 같이 다양하였으나, 약 20% 정도가 single insertion으로 나타났으며 T-DNA copy 수가 2개 이상인 multiple insertion들도 확인되었다.

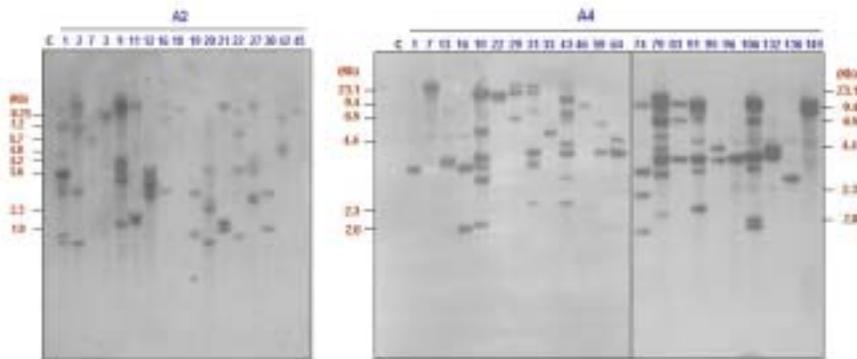


Figure 4. Independence in the pattern of T-DNA insertion. Southern blot analysis was carried out in the individual lines transformed with pGM1003. 5 μ g of genomic DNA was fully digested with EcoRI and then electrophoresed through 0.8 % agarose gel overnight. After electrophoresis, the gel containing the digested DNA was processed and then transferred to a nylon membrane by capillary transfer. The DNA-attached membrane was hybridized with P^{32} -labeled 700-bp fragment of Bar gene at 65°C overnight. After washing of the excess radioactive isotope from the membrane, a radio-sensitive film was exposed to the membrane at -70°C.

제 4 절 Activation tagging을 통한 유전자 분리 기술의 확립

1. 플라스미드 회수법 (Plasmid rescue method)

지금까지 보고된 바에 의하면, activation tagging의 경우 T-DNA가 plant genome에 삽입된 후 주로 T-DNA의 right border 쪽에서 수 백 base에서 10 kilo-base(kb) 위치에 있는 유전자가 삽입된 enhance element에 의해서 activation 되며, 평균 3.5 kb 떨어져 있는 유전자가 activation 된다고 한다.

본 연구팀이 확보한 activation tagging pool의 경우 플라스미드 회수 (plasmid rescue)에 의해 약 700 bp에서 10 Kb 크기의 다양한 flanking DNA를 분리 할 수 있었다 (Figure 5).

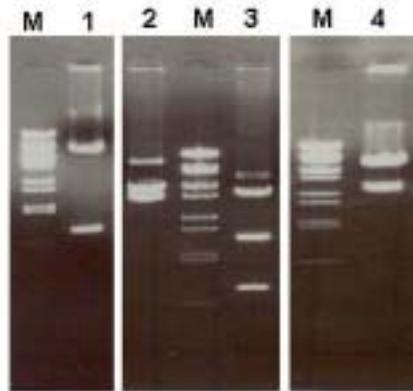


Figure 5. Isolation of the flanking DNA by plasmid rescue. Genomic DNA from the selected mutant plants was fully digested by appropriate restriction enzymes (EcoRI or KpnI) and then self-ligated by T4 DNA ligase. The ligates containing pBlueScript-KS(+) were amplified in *E. coli* Top10 cells. The amplified plasmids

(=ligates) were digested by several restriction enzymes to confirm the size of flanking DNA. M λ DNA/BstEII digests; 1, SphI digests (3.4Kb of pBlueScript-KS(+), 1.46Kb of 4x Enhancer, 800bp of the flanking DNA); 2, EcoRI/NotI digests (3.4Kb of pBlueScript-KS(+), 1.46Kb of 4x Enhancer, 3Kb of the flanking DNA); 3, EcoRI/SphI digests (3.4Kb of pBlueScript-KS(+), 1.46Kb of 4x Enhancer, 800bp of the flanking DNA); 4, KpnI digests (3.4Kb of pBlueScript-KS(+), 1.46Kb of 4x Enhancer, 3.6Kb of the flanking DNA).

2. TAIL PCR법

T-DNA tagging에 의하여 생성된 변이체로부터 유전자를 분리하는 또다른 방법은 TAIL PCR을 이용하는 것이다. 기존에 확보된 activation tagging pool로부터 분리한 변이체로부터의 T-DNA 부위는 이 방법에 의해 분리하였다. 일차적으로 분리된 변이체로부터 핵산을 추출하고 이를 template로 하여 TAIL PCR을 실시한다. TAIL PCR에 사용한 primer들은 다음과 같다.

1차 primer ; 5'-CCGAGCGGCGAACTAATAACGT-3'

2차 primer ; 5'-CCGAAAGTTACGGGCACCATTTCAA-3'

3차 primer ; 5'-GAAGTGCAGGTCAAACCTTGAC-3'

증폭된 PCR 산물은 pGEM-T vector에 cloning하고 vector에 존재하는 T7 및 SP6 primer를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

제 3 장 변이체 선발 및 유전자 분리

제 1 절 서론

우수한 형질을 가진 농작물을 창출하기 위한 전통육종에 있어서 육종목표는 다수확을 근간으로하는 생산성 향상 및 맛, 향, 영양 등의 질적형질의 도입, 가뭄, 수해, 냉해 등의 비생물학적 환경재해 또는 스트레스에 대한 내성, 병원성 미생물, 곤충 류등이 생물학적 스트레스에 대한 내성 또는 저항성 확충, 부영양화, 제초제, 살충제 등의 과다사용에 의한 농업환경 변화에 대한 내성도입 등에 맞추어져 왔다. 특정 형질을 지닌 육종모본을 활용한 교잡, 선발, 고정의 과정을 거치는 전통적 육종방법은 수 많은 신품종을 만들어 내었으나 유전자원의 고갈 및 시간적, 경제적 손실의 단점을 가지고 있다.

근래에 이러한 전통육종법의 단점을 보완하기 위한 생명공학기술을 도입한 소위 분자육종법의 필요성이 부가되었으며 지난 수년에 걸쳐 가시적인 성과가 도출되고 있다. 분자육종에 있어서 기반기술은 유전자재조합 기술이며 1982년 petunia의 형질전환이 성공된 이래로 초창기의 유전자재조합에 의한 분자육종은 주로 이종의 유전자 도입을 통한 바이러스 또는 병해저항성의 도입이 이루어졌으며 1994년 'Flavrsavr' 토마토가 시판에 들어가는 등 급속히 발전하게 되었다. 각종 생명체에 대한 genome project의 성공적인 수행결과 전체 유전체에 대한 정보가 속속 발견되고 있다. 이러한 유전체연구의 급속한 진전과 함께 후속연구에 대한 필요성이 대두되었고 그 근간은 가능성유전체연구 또는 유전자의 기능성을 밝히고 그 응용방향을 결정하는 것이었다.

분자육종에 대한 기술개발 및 발달에 따른 한계는 여전히 유전자 또는 유전자원의 확보이며 이에 따른 농업유용유전자의 확보경쟁은 '종자전쟁'에 필적하는 '유전자전쟁'으로 까지 표현되고 있다. 결국, 기존의 유전자의 기능 및 유전자간의 상호작용, 발현조절 등에 대한 기능유전체 연구가 필요하며 이를 위해서는 될 수 있는한 많은 유전자의 확보 및 계통적 분류, 기능적분류 및 상호기능연구 등의 후속연구가 필요한 것이다.

따라서, 본 연구과제를 수행함에 있어서 직접적인 개발 목표는 농업적 활용이 가능한 유용유전자의 발굴이며 이를 위한 기본적인 기술 infra를 구축하기 위한 변이체집단의 작성 및 기능유전자 발굴을 위한 선발과정을 수행하게 되었다. 본 연구에서는 우선적으로 염(NaCl) 및 건조 등의 비생물학적 스트레스 환경에 대한 변이체 선발을 시도하였고, 개화시기 및 개체크기 등에 대한 표현형 선발도 병행하였다.

식물체들은 건조 스트레스에 대하여 여러 가지 물리적 또는 발생적인 변화를 통해 반응하는 것으로 알려져 있다. 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성을 도입하기 위한 육종적 시도는 오랜 시간을 거쳐 추진되어 왔으며 유전자재조합 기술을 이용한 분자육종이 그 가능한 방법으로 대두하고 있다. 그러나 이러한 유전자재조합 기술을 적용하기 위하여서는 건조 스트레스에 대한 내성을 가질수 있는 유전자들의 발굴과 그 기능을 정확하게 확인할 필요가 있다.

지금까지 알려진 바로 건조조건에 대하여 반응하는 여러 가지 유전자들이 전사수준 (transcription level)에서 확인되었으며 ABA(abscisic acid)가 식물의 내건조성과 밀접한 관계가 있다고 알려졌다. 최근까지 알려진 여러 가지 내건조성 유전자들이 ABA에 의해 발현이 유도되는 것으로 확인되고 있으나 일부 유전자는 건조처리에 의해 발현이 유도되지만 외부의 ABA 처리에 대하여서는 반응하지 않는 경우도 보고되고 있다. 따라서 건조에 대한 유전자 수준의 반응은 ABA의존적 또는 ABA비의존적 신호전달 기작에 의해 이루어 지는 복잡한 과정으로 나타난다고 추정되고 있다.

이러한 건조내성 또는 신호전달과정에 관여하는 유전자들은 cis- 또는 trans-acting factor 들이 관여할 것이며 많은 경우 저온이나 염(salt) 스트레스 과정에 대한 신호전달과정과 공유할 것으로 예측되고 있다.

제 2절 염 스트레스 저항성 변이체 선발을 통한 유용 유전자 분리 및 특성 규명

1. 염 스트레스 저항성 변이체 선별 방법

일차적으로 환경스트레스 중 염(salt)과 관련된 유전자를 발굴하기 위하여 arabidopsis (Col-0)를 이용하여 salt screening 농도를 50 mM NaCl과 150 mM NaCl로 결정하여 germinating seedling stage에서 screening하였다(Figure 6).

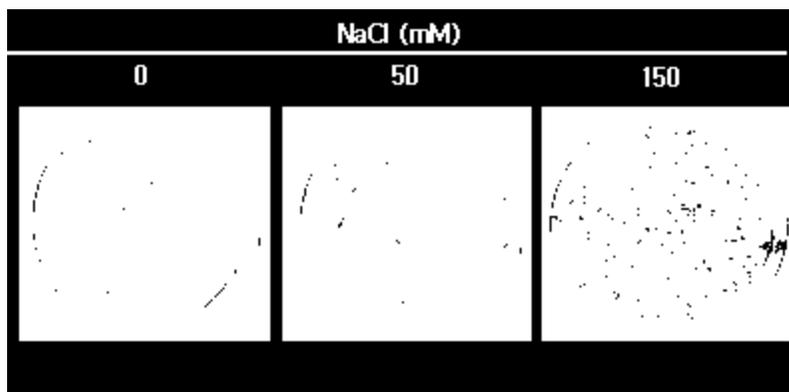


Figure 6. Early development of wild-type Arabidopsis on NaCl containing medium. Surface sterilized Arabidopsis seeds were planted on the medium with various concentrations of NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 300mM) and allowed to grow about two weeks under the optimal culture condition.

변이체 선발을 위하여 activation tagging pool의 각line을 대상으로 1차 screening에서는 20 line씩 T1 seed들을 섞은 후 50mM NaCl과 150 mM NaCl이 들어 있는 plate에 약 500여개의 seed를 뿌린 후 선별하여 이를 soil로 옮겨 선별된 개개의 plant에서 seed를 확보한 후 같은 조건에서 각 plant당 50여개의 seed를 뿌려서 2차 screening을 수행하여 phenotype이 반복되는 개체를 선별하였다. 각 pool의 종자들을 표면 소독하여 3일 동안 4°C에서 저온 처리하였다. 식물 배양용 Petri dish에 배양용 배지 (1×MS salt, 3% sucrose, 0.7% agar, pH 5.7)를 부어 굳히고 그 위에 멸균한 mesh를 한 겹 얹었다. 저온 처리한 종자를 mesh 위에 일정 간격으로 파종하여 21-23°C, 16hr/8hr - light/dark cycle 하에서 10일 동안 배양하였다. 10일 된 식물체가 함께 분리되도록 mesh를 배지 표면으로부터 떼어내어 염 배지 (0.5×MS salt, 150mM NaCl, pH 5.7)이 담겨 있는 Petri dish

로 옮겼다. 이 상태로 전과 동일한 배양 조건에서 3일 동안 처리하였다. 3일 후 다시 mesh 재로 들어내어 세척 배지 (1/2×MS salt, pH 5.7)에 잠시 담궈 여분의 염 용액을 제거하고 회복 배지 (0.5×MS salt, 1 % sucrose, 0.7% agar, pH 5.7)로 옮겼다. 이 후 약 4일이 지나면서 wild type 개체에서 황화현상과 고사 현상이 관찰되기 시작하고 1주일 더 정도 지나면 wild type은 모두 죽게 되고 각 변이체 pool 내에서도 저항성 개체와 감수성 개체들이 확연하게 구분되었다 (Figure 7). 저항성이 보이는 개체는 흡으로 옮겨 심어 자가 교배 시킨 후 다음 세대 (T3) 종자를 수확하였다.

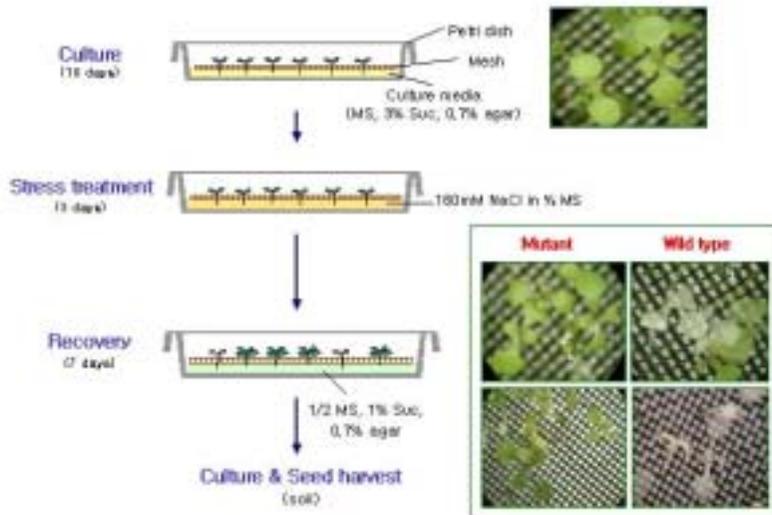


Figure 7. Screen and selection method of the NaCl mutants.

salt-sensitive mutant는 50 mM NaCl plate에서 뿌린 후 4일째 되는 날에 wild type은 정상적으로 발아를 하여 자라는 반면에 cotyledon에서 엽록소가 분해되기 시작하거나 분해되어 cotyledon의 색이 흰색으로 변하거나 cotyledon과 hypocotyl에서 anthocyanin이 축적되는 식물체들을 대상으로 하였다.

1차 screening을 통해 292개체를 확인하였으며, 2차 screening을 통해 T-DNA insertion이 되었으리라 생각되는 plant를 20 line의 T1 seed mix-up 4개에서 5 plant들을, activation되었을 가능성이 높은 것을 20 line의 T1 seed mix-up 4개에서 11 plant들을 확보하였다(Figure 8).

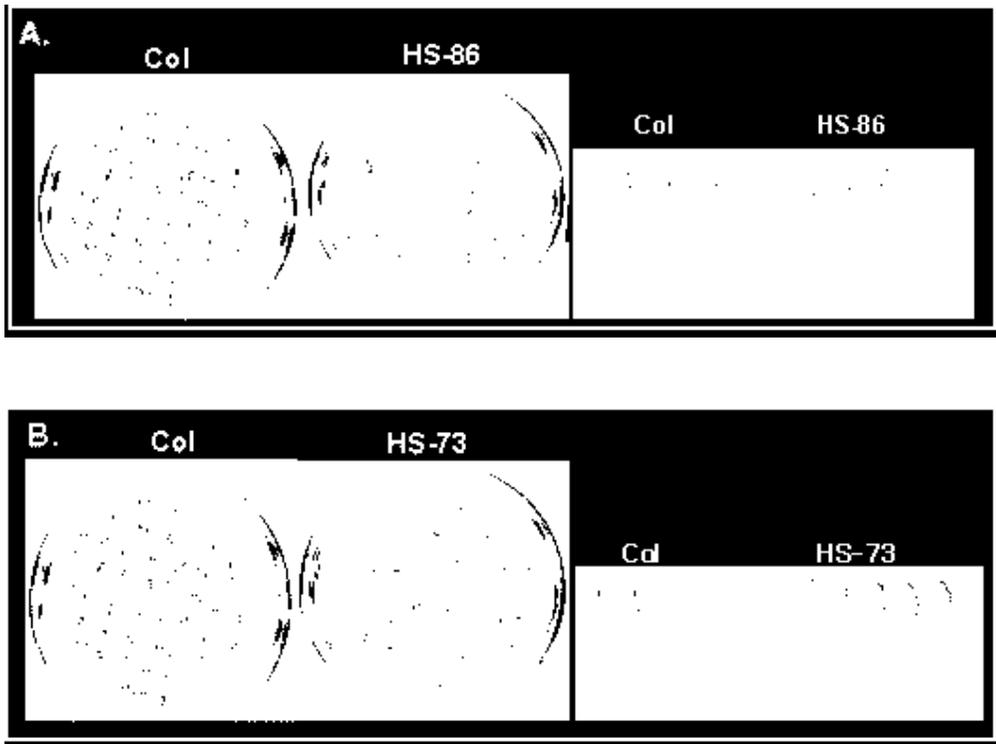


Figure 8. The phenotype of salt-sensitive mutants which screened on 50mM NaCl containing media.

A. T-DNA insertional mutations ; all seedlings were Basta-resistant and showed recessive segregation pattern.

B. Activation tagged mutations ; all seedlings were Basta-resistant and

showed dominant segregation pattern.

salt-resistant mutant는 150 mM NaCl plate에서 seed를 뿌린 후 14-15일 동안 키우면서 wild type은 엽록소가 분해되어 잎의 색이 흰색으로 변하여 죽는 반면에 엽록소의 분해가 이루어지지 않으면서 잎과 뿌리의 성장이 계속적으로 이루어지는 식물체를 선발하였다.

1차 screening을 통해 729개체, 2차 screening을 통해 20개 T1 seeds mix-up 5개에서 44plant들을 확보하였다(Figure 9).

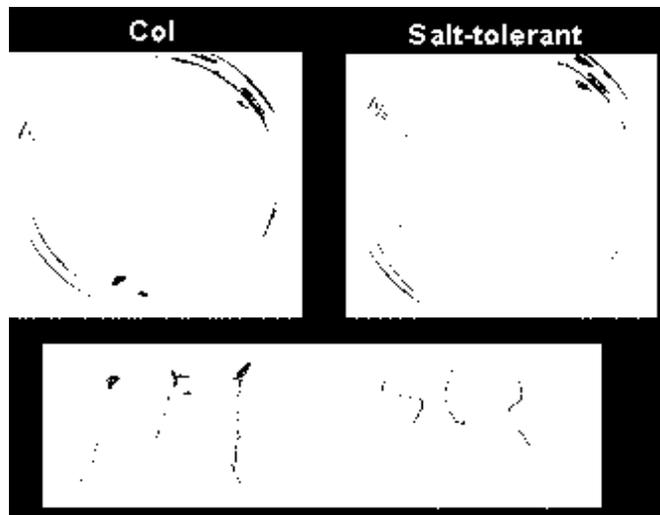


Figure 9. The phenotypes of salt-tolerant mutants screened on 150mM NaCl containing media.

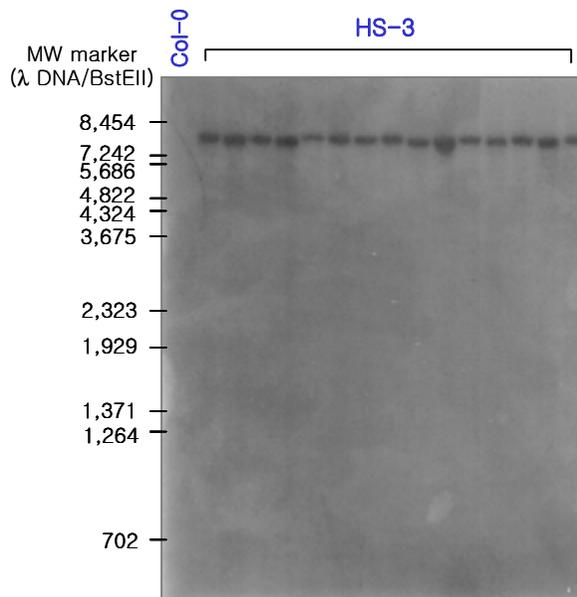
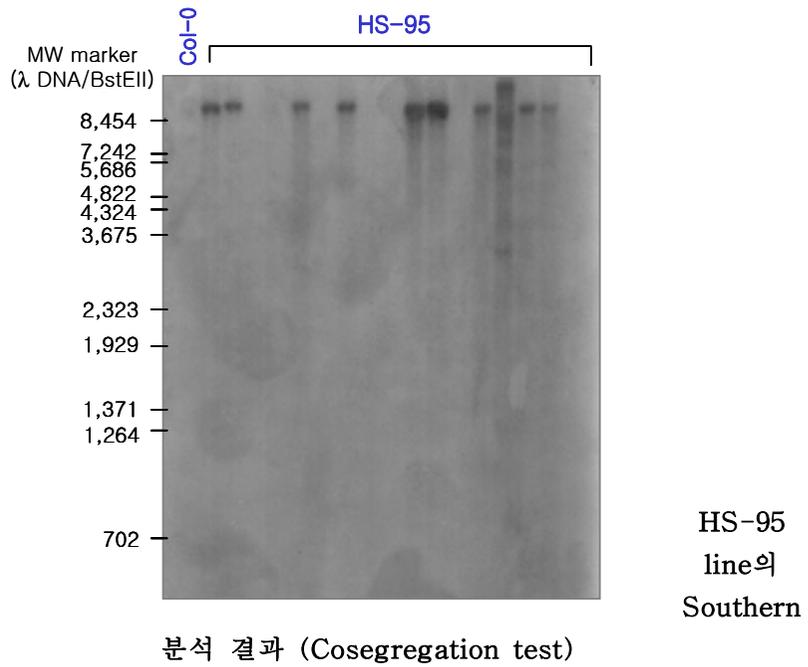
2. 분리된 변이체에서 유용 유전자 분리 및 특성 연구

선발한 salt sensitive 변이체 및 salt tolerant 변이체 들에 대한 특성 분석(표현형 및 Southern 분석)을 실시하였으며 plasmid rescue를 통해 해당 유전자를 분리하였다(Figure 10).



Figure 10. Salt-hypersensitive phenotypes in the activation tagging lines of *Arabidopsis thaliana* L.(HS-3, HS-3, & HS-95) after 100mM NaCl treatment

One-month-old plants (T3) grown on soil in green house were soaked in 100mM NaCl solution for 14 hours under the growth condition. After 7 days, withering of rosette leaves and slight yellowing of siliques were observed only in mutant lines. The ratio of Basta-R to Basta-S in HS-3 and HS-95 was 18:0 and 21:3, respectively.



3. Plasmid rescue를 통한 유전자의 분리

Enhance element 주위의 flanking DNA를 분리하고자 플라스미드 회수 (plasmid rescue)를 실시하였다. salt resistant 변이체들에서 plasmid rescue에 의해서 MAP kinase와 유사성을 보이는 At687과 At355를 확인하였다.

1) At687

선발된 염 변이체에서 plasmid rescue를 통해 삽입된 T-DNA의 RB에서 약 800bp정도의 flanking region을 확보하고 sequencing 결과를 이용하여 database search로 인접한 유전자들의 candidate들 선발한 결과 stress에 의해서 유전자의 발현이 증가되는 유전자로 MAP kinase 3와 높은 유사성을 보이는 유전자를 확인하였고 이 유전자의 genomic clone의 size는 약 1.6 Kb 이었다.

genomic DNA full clone을 probe로 이용하여 유전자의 발현이 salt 이외의 건조, 내한성, 내열성, UV등의 다른 환경 stress들에 의해서도 발현이 증가됨을 dot blot analysis로 확인하였다 (Figure 11, 12).

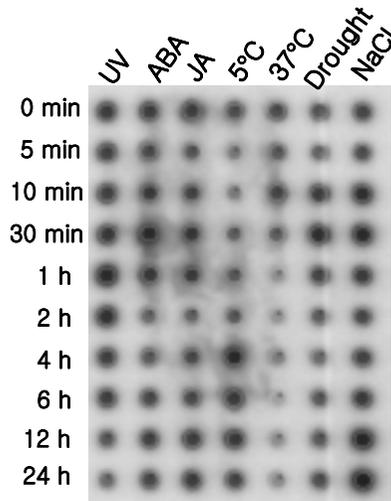


Figure 11. RNA dot blot analysis of At687.

Total RNAs were extracted from the whole arabidopsis tissue sample

which treated various abiotic stresses (UV; UV chamber, ABA; 100 μ M abscisic acid, JA; 100 μ M jasmonic acid, cold; 5 $^{\circ}$ C, high temp;37 $^{\circ}$ C, drought; blowing on clean bench, NaCl;200 mM NaCl). 3 μ g of each RNA sample were blotted on the Nylon membrane with a vacuum blotter and hybridized with the genomic clone as a probe.

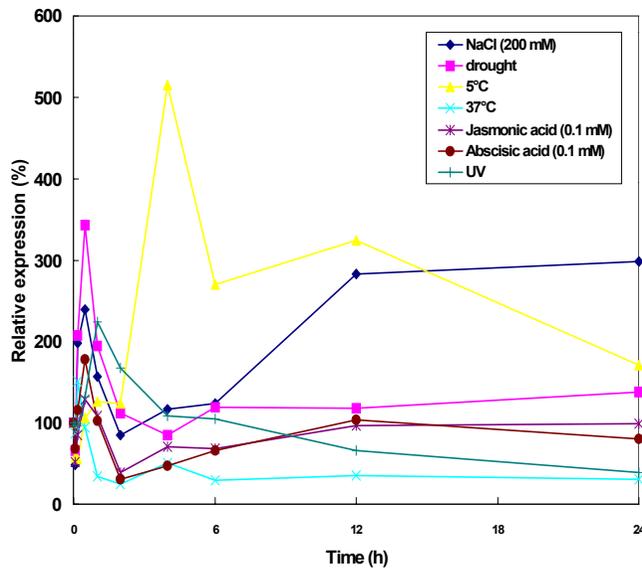


Figure 12. Relative expression of MAP kinase 3 homolog, At687

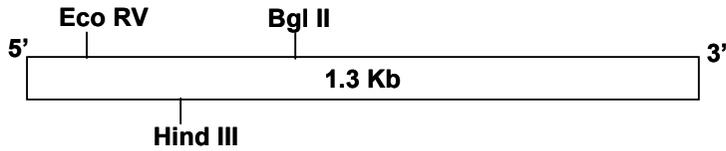
The expression value of each samples were calculated after compensate the expression level of rRNA as a control.

발현이 3배정도 증가한 200 mM NaCl을 24시간 처리한 *Arabidopsis (Col)*의 RNA를 이용하여 RT-PCR로 1.3 Kb의 cDNA을 분리하였고 그 특성을 분석하였다.

At687은 MAP kinase 3와 DNA sequece상에서 95%이상의 identity를 보였으며 기존의 알려진 ATMPK1-8의 MAPK와의 amino acid multiple alignment에 의하면 highly conserved된 residue가 62.12%로 나타났다.

따라서 At687의 MAP kinase는 다른 arabidopsis의 MAPK와의 높은 homolgy로 인해 여러 가지 stress에 대해서 broad한 유전자의 발현을 보인 것이라 판단되었다(Figure 13).

A. Restriction map



B. cDNA sequence

```

1   CCTCAAAGCAACCACTGAATCTCGACTTTGATCAATTGAGAGAGAA■■■■AACACCGGCGG
                                     M N T G G
61  TGGCCAATACACGGATTTTCCGGCGGTGAAAACACGGAGGACAGTTCATAAGTTACGA
    G Q Y T D F P A V E T H G G Q F I S Y D
121 TATCTTCGGTAGTTTATTCGAGATCACATCTAAGTATCGTCCTCCGATTATACCAATTGG
    I F G S L F E I T S K Y R P P I I P I G
181 TCGTGGAGCTTATGGAATCGTTTGTCTGTGTTGGATACGGAGACGAACGAGCTAGTAGC
    R G A Y G I V C S V L D T E T N E L V A
241 GATGAAGAAGATAGCTAATGCTTTTGATAATCATATGGATGCTAAGCGTACGTTTCGTGA
    M K K I A N A F D N H M D A K R T L R E
301 GATCAAGCTTCTTCGTCATCTTGATCATGAAAACATTATAGCTATAAGAGATGTTGTTCC
    I K L L R H L D H E N I I A I R D V V P
361 ACCACCACTAAGAAGACAGTTCAGTGATGTTTATATCTCTACTGAATTAATGGATACTGA
    P P L R R Q F S D V Y I S T E L M D T D
421 TCTTCATCAAATCATCAGATCTAACCAGAGTTTATCAGAAGAACACTGTCAGTACTTCTT
    L H Q I I R S N Q S L S E E H C Q Y F L
481 GTACCAGCTACTTCGAGGACTGAAGTATATCCACTCAGCTAACATTATTCATAGGGATTT
    Y Q L L R G L K Y I H S A N I I H R D L
541 AAAGCCGAGCAATCTTCTGTTGAACGCGAATTGCGATTTAAAGATTTGTGATTTCCGTCT
    K P P S N L L L N A N C D L K I C D F G
601 TGCTAGACCTACTTCAGAGAATGATTTTATGACTGAGTATGTTGTACGAGATGGTA7AG
    I A R P T S E N D F M T E Y V V T R W Y
661 AGCACCTGAGCTTCTG7TGAACTCTTCAGATTACACAGCTGCTATTGATGTTTGGTCTGT
    R A P E L L L N S S D Y T A A I D V W S
721 TGTTGTATCTTTATGGAGCTTATGAATAGAAAGCCTTTGTTCCCTGGTAAAGACCATGT
    V G C I F M E L M N R K P L F P G K D H
781 TCATCAAATGCGCTTATTGACAGAGTTGCTTGGCACACCGACAGAATCTGATCTCGGTTT
    V H Q M R L T E L L G T P T E S D L G F
841 TACTACAATGAGGATCGAAAAGATACATCCGGCAACTTCCCAACTCCCACGTCAGCC
    T H N E D A K R Y I R Q L P N F P R Q P
901 CTTAGCTAAACTTTTCTCTCATGTTAACCCAATGGCCATTGATCTTGTGACAGAATGTT
    L A K L F S H V N P M A I D L V D R M L
961 GACGTTTGACCCCAACAGAAGAATCACTGTTGAACAAGCTCTGAATCACCAGTACCTTGC

```

T F D P N R R I T V E Q A L N H Q Y L A
 1021 TAAATTGCACGACCCGAATGATGAGCCAATCTGTCAAAGCCATTCTCTTTTGAGTTCGA
 K L H D P N D E P I C Q K P F S F E F E
 1061 ACAACAGCCTCTGGATGAGGAACAGATAAAAGAGATGATCTACCAAGAAGCCATAGCACT
 Q Q P L D E E Q I K E M I Y Q E A I A L
 1121 CAATCCAACATACGGT AAGTGCAGCAGCCCCGTGAATGCCTGGTATTACCAATAAC
 N P T Y G *
 1181 CATCCGAATGGCTACTTAGTATCTTTGCCTGTTCTTTTATTCATGTACTTCTCCACATA
 1241 TGTAATCTTGTAACCTTTATTTGTTGTTTCATGTTATTTACTGCTAGTGATTAAGTGTAG
 1301 CTCC

C. mutiple alignment with other Arabidopsis MAP kinases

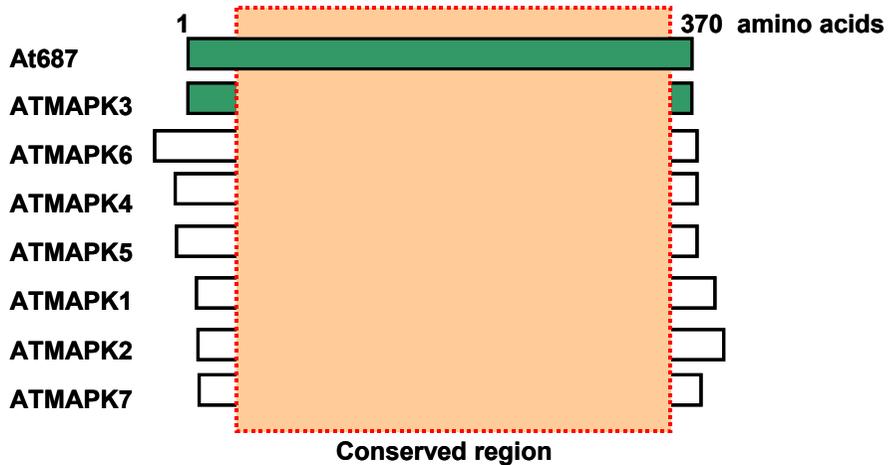


Figure 13. The cDNA sequence, restriction map of At687 and multiple alignment with other arabidopsis MAP kinases

2) At355

At355의 genomic size는 약 2.5 Kb이며 기존의 알려진 다른 MAP kinase들과 DNA sequence상에서 40-50% identity를 보이거나 어떤 종류의 MAP kinase인 지 보고되어 있지 않았다.

다른 MAP kinase와 homology를 낮게 보이는 3'-end 쪽 1 Kb를 probe로 사용하여 유전자의 발현을 조사한 결과 특히 건조에 의해서 크게 증가됨이 dot blot analysis로 확인되었다(Figure 14, 15).

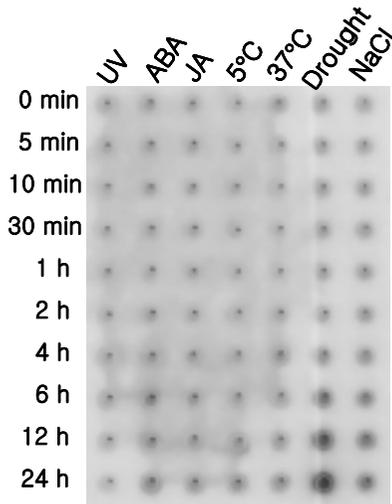


Figure 14. RNA dot blot analysis of At355.

Total RNAs were extracted from the whole arabidopsis tissue sample which treated various abiotic stresses (UV; UV chamber, ABA; 100 μ M abscisic acid, JA; 100 μ M jasmonic acid, cold; 5 $^{\circ}$ C, high temp;37 $^{\circ}$ C, drought; blowing on clean bench, NaCl;200 mM NaCl). 3 μ g of each RNA sample were blotted on the Nylon membrane with a vacuum blotter and hybridized with the genomic clone as a probe.

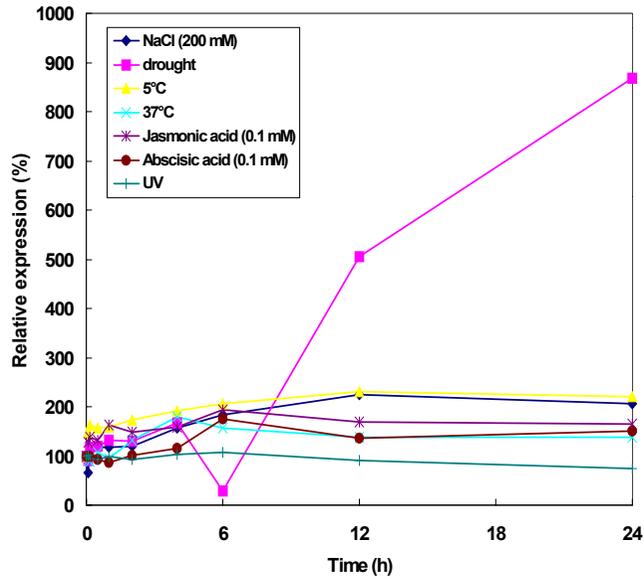


Figure 15. Relative expression of MAP kinase 3 homolog, At355

The expression value of each samples were calculated after compensate the expression level of rRNA as a control.

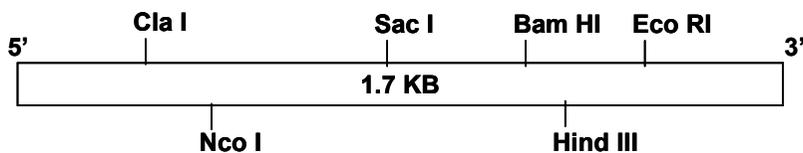
24시간동안 건조 처리한 arabidopsis의 RNA를 이용하여 RT-PCR로 1.7 Kb의 cDNA를 확보하여 특성분석을 실시하였다.

At355는 기존의 알려진 MAP kinase들과 비교할 때 5'-end의 200 bp정도에서 homology가 낮게 나타났으며 3'-end 쪽으로 At355에만 존재하는 sequence가 약 300 bp정도 존재하였다.

DNA상의 identity는 ATMPK1-8들과 각각 40-50% 정도로 나타나며 amino

acid sequence 상에서도 각각의 ATMPK들과 약 20% 정도의 identity를 보였다(Figure 16).

A. Restriction map



B. cDNA sequence

```

1      *****
      M Y M E I S S A S D D S I A Y V
61     *****
      E T D P S G R Y G R F R E V L G K G A M
121    *****
      K T V Y K A F D Q V L G M E V A W N Q V
181    *****
      K L N E V F R S P E P L Q R L Y S E V H L
241    *****
      L K N L N H E S I I R Y C T S W I D V N
301    *****
      R R T F N F I T E L F T S G T L R E Y R
361    *****
      R K Y Q K V D I R A I K S W A R Q I L N G
421    *****
      L A Y L H G H D P P V I H R D L K C D N
481    *****
      I F V N G H L G Q V K I G D L G L A A I
541    *****
      L R G S Q N A H S V I G T P E F M A P E L
601    *****
      Y E E D Y N E L V D I Y S F G M C V L E
661    *****
      M L T G E Y P Y S E C T N P A Q I Y K K
721    *****
      V T S G K L P D S F H L I Q H T E A Q R F
781    *****
      V G K C L E T V S R R L P A K E L L A D
841    *****
      P F L A A T D E R D L A P L F R L P Q Q
901    *****
      L A I Q N L A A N G T V V E H L P S T T D
961    *****
      P T R T T D M S I T G K M N S E D H T I
1021   *****
  
```

```

      F L Q V Q I L D G D G H M R N I Q F P F
1081 *****
      N I L S D T P L E V A L E M V K E L E I T
1141 *****
      D W D P L E I A A M I E N E I S L L V P
1201 *****
      N W R A N D S S I R H E S F G H E D D E D
1261 *****
      N G D T E G R T R L F S S A S S S H D S
1321 *****
      P V A V R E N N D D S S N D V I P D M D
1381 *****
      D G N R S S N R L L N S S T Y H Y S P A I
1441 *****
      D D D Q N Q Q Q R R R V R L Q Q K M R S
1501 *****
      L V D T R T Q V L H R S L M E L I N K R
1561 *****
      R G R G F D P N T N E L Q P Q P S S T D F
1621 *****
      I R R C *
1681 *****

```

C. 다른 arabidopsis MAP kinase와의 mutiple alignment

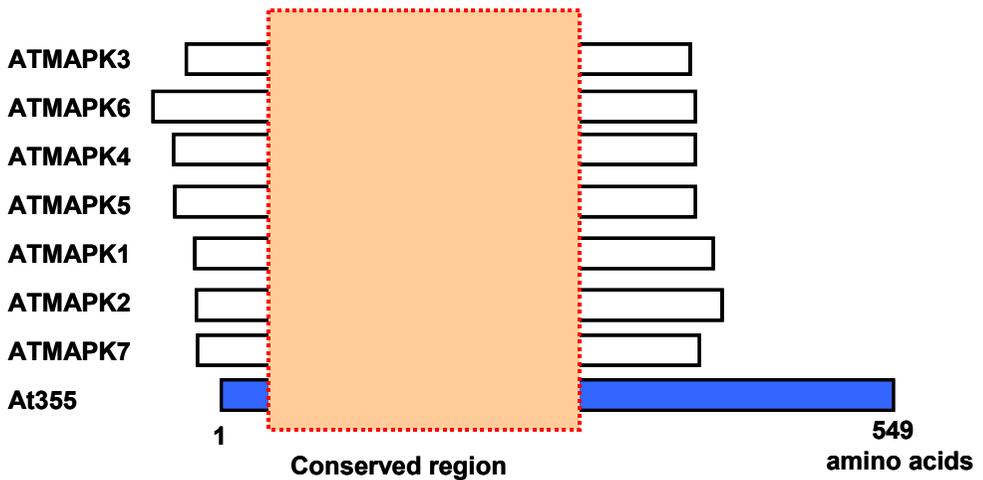


Figure 16. The amino acid sequence, restriction map of At355 and multiple alignment with other arabidopsis MAP kinases.

At355의 특성 분석을 위하여 pNB96 vector를 이용하여 sense 및 antisense로 발현될 수 있도록 vector를 제작하여 wild type Arabidopsis(Col-0)에 형질 전환하였다.

Sense expression용 vector의 경우, full-length cDNA (1.7kb)를 사용하였으며, antisense expression용 vector의 경우 다른 MAPK와 유사성이 적은 3' 말단 쪽 특이적 부위인 300bp를 사용하였다 (Figure 17).

Sense expression 용 vector로 형질 전환 식물체 (T1) 140여 개체, antisense expression 용 vector로 형질 전환 식물체 (T1) 60여 개체를 확보하여 건조 스트레스에 대한 기능을 확인하였다.

Wild type 과 형질 전환 식물체를 동일한 화분에 과중하여 발아 후 물 공급을 중단하였다. Sense line의 경우, wild type에 비해 비교적 성장 속도가 느리고 개체의 크기 또한 상당히 작았다. 그러나, 물 공급 중단 40일 이후부터 wild type에서는 개체 내의 수분 손실로 인한 rosette leaf과 cauline leaf의 탈수·고사 현상과 함께 inflorescence가 쓰러지는 현상이 관찰되는 반면, 형질 전환 식물체는 수분 손실이 적은 듯 그와 같은 현상이 관찰되지 않았으며, root bending assay 결과에서도 건조 내성이 관찰되었다 (Figure 18).

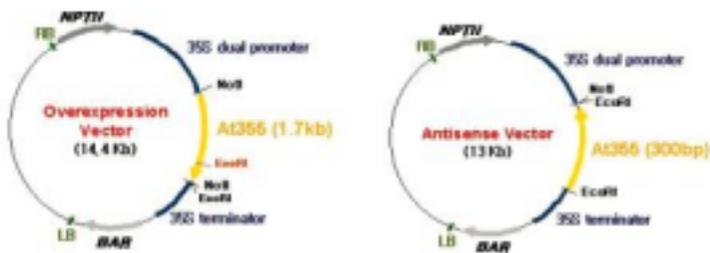
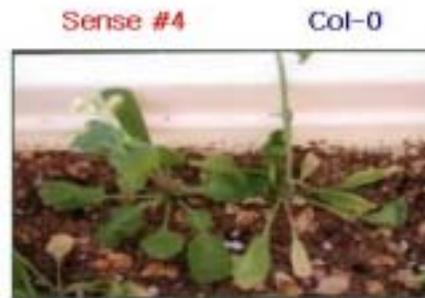


Figure 17. Vectors for the re-capitulation of drought stress-related phenotype induced by the application of At355.

(A)



(B)



Figure 18. Drought stress-tolerant phenotypes in transformed by sense expression-vector. (A), Cold-treated T2 seeds were sowed in soil. There was no supply of water for 8 weeks after sowing.; (B), Root bending assay. 7-day-old plants were transferred to half-strength MS medium containing 450mM D-mannitol and then cultured for 2 days. Growth retardation in rosette leaves and roots was observed in the D-mannitol-treated plants. Formation of root hook and lateral roots was observed only in the mutant plants.

제 3 절 건조 스트레스 저항성 변이체 선발 및 특성분석

1. 건조 스트레스 저항성 변이체 선발 방법

건조 스트레스에 대한 저항성 변이체를 선발하기 위하여 변이체 집단을 파종하여 온실에서 충분히 생육시킨 후 수분공급을 중단한 상태에서 노화가 지연되는 변이체 집단을 선발하였다.

또한, 인위적인 건조스트레스를 처리하여 변이체 선발을 시도하였다. 초기과정에서 건조 저항성 변이체 선발을 위한 PEG 처리는 30% PEG(Mr=8,000)를 함유한 1/2MS 액체배지에서 2주 동안 처리하여 대조구인 야생형에 비하여 내성을 가지는 변이체를 선발하였으나 표현형의 재현이 어려웠기 때문에 mannitol을 사용하여 후속 연구를 진행하였다.

실험적인 편의를 위해 T1 종자를 10 line씩 pooling하여, D-mannitol 함유 배지에서 root bending assay를 수행하였다. 우선, assay에 사용할 mannitol의 농도를 결정하기 위해, wild type 식물체를 이용해 단계별 D-mannitol 농도에 따른 root bending 현상을 예비 실험하였다. Wild type 종자를 표면 소독하여 3일 동안 4°C에서 저온 처리한 후, 식물 배양용 Petri dish에 배양용 배지 (1×MS salt, 3% sucrose, 0.7% agar, pH 5.7)를 부어 굳히고, 그 위에 저온 처리한 종자를 파종하여 21-23°C, 16hr/8hr - light/dark cycle 하에서 배양하였다. 5일 동안 배양한 후, cotyledon 분화가 어느 정도 진행되었지만 lateral root 분화는 진행되지 않은 식물체를 부드러운 forcep을 이용해 배지로부터 하나씩 조심스럽게 뽑아 내어, 사각 Petri dish에 굳혀 놓은 건조 배지 표면에 뿌리의 방향이 수직이 되도록 조심스럽게 앉혔다. 단, 뿌리의 모든 부분이 배지 표면에 닿도록 해야 하며 뿌리에 물리적인 손상이 가해지지 않도록 했다. Mannitol 배지는 기본적으로 0.5×MS salt, 1.2 % agar, pH 5.7의 조성이었으며, 이에 D-mannitol (Sigma M4125, M.W.=182.2)의 농도가 300, 400 그리고 500mM이 되도록 첨가하였다. 단계별 mannitol 농도를 가지는 배지에 식물을 앉은 Petri dish를 24시간 간격으로 시계 방향으로 90°씩 돌리기를 2회, 그리고 나서 48시간 후에 마지막으로 한 번 더 방향을 바꾸어 가며 root growth를 관찰하였다. 결과적으로, mannitol이 없는 상

태에서는 정상적으로 보이던 root gravitism과 본엽의 발생이 mannitol 첨가에 의해 저해가 되는 것이 관찰되었다. 500mM 에서 간혹 고사하는 개체가 관찰되어 lateral root 생장이 저해되면서 개체의 생명에는 영향이 적은 450mM을 assay 농도로 결정하였다 (Figure 19).

T1 종자를 예비 실험에서 사용한 것과 동일한 조건 하에서 5일 동안 배양하여 그 개체를 사용하였다. 한 plate 당 변이체 50 개체, wild type 15 개체가 되도록 하고, 배양 조건에서 지면으로부터 기울기가 약 80°가 되고 뿌리의 위치가 위쪽이 되도록 plate를 뒤집어서 배양하였다. 그로부터 약 3-4일 후 건조 저항성이 있는 변이체는, root의 gravitism으로 인해 root hook을 형성하였지만, wild type과 저항성을 가지지 않는 변이체는 뿌리의 성장이 일어나지 않았다. T1 세대의 형질 전환 식물체 당 1 copy의 T-DNA가 들어가는 개체를 선별하기 위하여, 변이 형질 (root hook 형성)과 야생 형질 (root hook 형성 안됨)로 나뉘어지는 분리비 (segregation ratio)가 3:1 이 되는 line을 선별하였다. 선별 작업을 통해 우성 형질을 보이는 개체를 선별하였으며, 이 후 유전자 분리과정을 수행하였다.

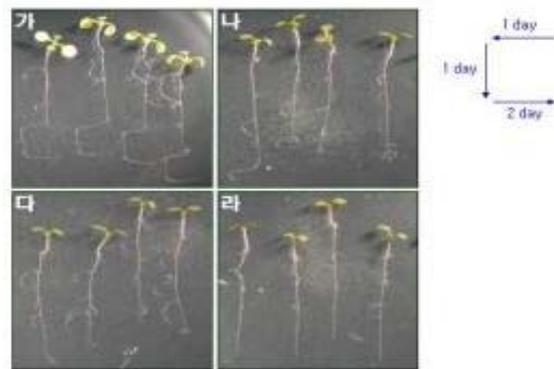


Figure 19. Determination of the concentration of D-mannitol for the root bending assay. (가), Control; (나), 300mM D-mannitol; (다), 400mM D-mannitol; (라), 500mM D-mannitol. See the method described in the text.

2. T-DNA copy 수 확인 및 co-segregation 분석

선별된 개체 모두에서 1 copy의 T-DNA가 삽입된 것을 Southern blot analysis를 통해 확인한 후, T-DNA 삽입과 건조 내성 형질의 연관성을 확인하기 위하여 PCR을 통해 co-segregation test를 실시하였다.

3. 플라스미드 회수 (Plasmid rescue)를 통한 건조 유기 유전자의 분리

Enhance element 주위의 flanking DNA를 분리하고자 플라스미드 회수 (plasmid rescue)를 실시하였다. 형질 전환 식물체의 genomic DNA를 분리하고 EcoRI 또는 KpnI으로 절단한 다음 T4 DNA ligase를 이용하여 self-ligation 시키고 이것을 *E. coli* 세포에 형질 전환하여 증폭한 다음 flanking DNA를 포함하는 plasmid를 분리하였다.

4. 건조 스트레스 저항성 변이체의 특성

본 연구의 초기에 기 확보된 activation tagging pool의 screening을 통해 건조 스트레스에 저항성을 보인 변이체를 선발하였다 (Figure 20).

이 변이체는 토양에서 28일 이상 수분공급을 중단한 후에도 정상적인 색상을 유지하였고 명확하게 잎의 황화현상이 지연되는 것이 확인되었다. 더구나 이 변이체는 600mM NaCl을 2시간 동안 처리한 후에도 정상적인 생육이 가능한 것으로 확인되었다(Figure 21).

야생형의 경우 발아후 약 40일이 지나면 광합성 활성 및 엽록소의 함량이 현격히 줄어드는데 비하여 변이체에서는 100%의 광합성 활성과 78%의 엽록소 함량을 보여주었다.

TAIL PCR 방법에 의해 분리된 T-DNA 부근에 위치한 ORF를 찾아내어 그 특성을 조사하였고, 해당 유전자를 probe로 변이체와 야생형에서의 발현정도를 비교해본 결과 야생형에서는 아주 미약하게 발현되는데 비하여 변이체에서는 강하게 발현되는 것을 확인하였다(Figure 22). 더구나 분리한 유전자의 기능을 확인하기 위하여 PCR 방법으로 cloning한 ORF region을 over expression vector에 도입하여 야생형 (Col-0) 애기장대를 형질전환 시킨 결과 표현형이 재현되어 가능성이 확인되었다.

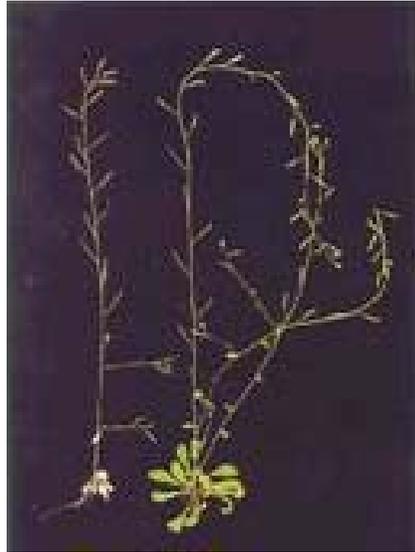


Figure 20. Phenotype of a drought tolerant mutant after 28 days of stop watering.

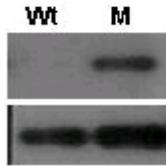


Figure 21. Characteristics of mutant treated 600mM NaCl

Figure 22. The expression level of the gene that isolated from drought tolerant mutant

제 4 절 형태 변이체 선발 및 유전자 분리

RT-PCR



1. 형태 변이체의 분리 및 특성

가) 치사 관련 변이체

1) 변이 형질

개체 전체에 albinism을 나타내는 변이체로서, cotyledon 분화 속도는 wild type과 비슷하지만 이 후 본엽의 발생과 개체 성장 속도는 현저히 떨어진다. 3% sucrose 존재 하에서 약 3주 동안 배양하였을 때, wild type은 lateral root 생성 및 꽃눈 형성 단계까지 진행되는 반면, 변이체는 4번째 본엽의 발생까지는 이루어지지만 개체의 크기 생장은 거의 정지한 상태이며, lateral root 형성이 일어나지 않았다 (Figure 23). 이러한 현상은 배지 내에 sucrose가 없을 때 더 확연하게 나타났는데, cotyledon 상태에 머무르는 현상이 관찰되었다. 흙에 과종하였을 때 역시 cotyledon 상태에 머무르다가 결국 lethal이 되었다.



Figure 23. Phenotype of PAT-3. T4 seeds were surface-sterilized and cold-treated for 3 days. The cold-treated seeds were sowed on culture medium (1× MS salt, 3% sucrose, pH 5.7, 0.7% agar) and then cultured at 22±2°C under the 16hr/8hr- light/dark cycle for 3 weeks. The average segregation ratio of mutant to wild type was 4 to 20.

2) T-DNA copy 수 확인 및 co-segregation test

Southern blot analysis를 수행한 결과, 1 copy의 T-DNA가 삽입된 것을 확인하였으며 (Figure 24), T-DNA 삽입과 변이 형질의 연관성을 확인하기 위하여 T4 세대에서의 변이 형질의 분리비 분석과 개체별 Southern blot analysis를 통한 co-segregation test를 실시하였다. 그 결과, PAT-3의 변이 형질이 T-DNA 삽입과 강하게 연관되어 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 25).

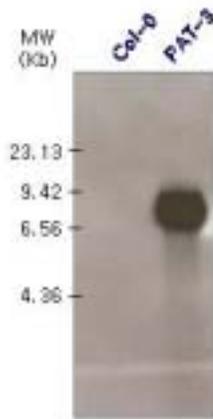


Figure 24. Confirmation of T-DNA copy number in PAT-3 through

Southern blot analysis. Southern blot analysis carried out in the mixture of T3 generation plants. 5 μ g of genomic DNA was fully digested with EcoRI and then electrophoresed through 0.8 % agarose gel overnight. After electrophoresis, the gel containing the digested DNA was processed and then transferred to a nylon membrane by capillary transfer. The DNA-attached membrane was hybridized with P³²-labeled 3-kb fragment of pBlueScript-SK(+)/EcoRI at 65°C overnight. After washing of the excess radioactive isotope from the membrane, a radio-sensitive film was exposed to the membrane at -70°C.

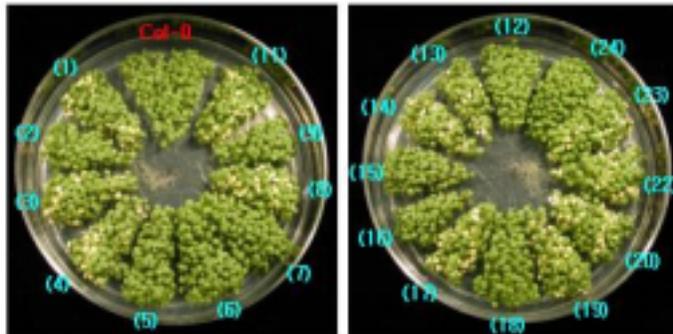


Figure 25. Co-segregation test between mutant phenotype and T-DNA insertion in PAT-3. Upper, segregation of mutant phenotype in T4 generation. Approximately 80 seeds harvested from each T3 plants were used. This test wasn't carried out in T3 homo plants with lethalties (# 10, 21, and 25)

3) 유기 유전자의 분리

플라스미드 회수 방법을 통해 약 2.2 kb 크기의 flankig DNA를 분리하였다

(Figure 26). 염기 서열 분석 결과, Arabidopsis chromosome 2의 putative WRKY-type DNA-binding protein과 integral membrane protein의 intergenic region에 T-DNA가 삽입된 것으로 예상되었고, 현재까지 이 영역에 대해서는 보고된 기능이 없어 후속 연구로 이어져야 할 것으로 사료된다.

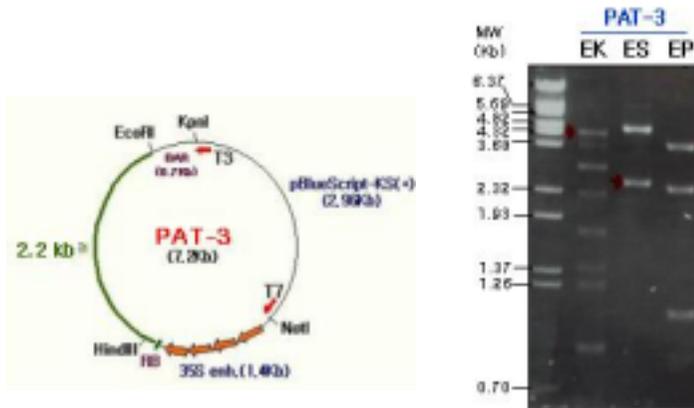


Figure 26. Rescued plasmid of PAT-3. Genomic DNA from the mixture of T3 plants was fully digested by EcoRI and then self-ligated by T4 DNA ligase. The ligates containing pBlueScript-KS(+) were amplified in *E. coli* Top10 cells. The amplified plasmids (=ligates) were digested by several restriction enzymes to confirm the size of flanking DNA. EK, EcoRI/KpnI digests ; ES, EcoRI/ScaI digests; EP, EcoRI/PvuI digests.

나) 식물체 구조 · 생리 변이체

1) LF508

(가) 변이 형질

18h/ 6h의 light/ dark cycle 하에서 인공 배양실에서 배양하였을 때, wild

type에 비해 약 10주 가량 flowering 이 늦었다. Flowering이 시작될 때, rosette leaf의 수는 약 40장 이상이였으며, rosette의 직경이 wild type의 4배 이상이였다. Flowering이 진행되면서 rosette leaf에서 색소 침착과 고사 현상이 관찰되었으며, 잎 자체의 색깔이 짙은 녹색이였다. flower 자체의 크기도 wild type에 비해 현저히 컸으며, inflorescence 침단에 flower가 모여 자라는 경향이 있었다. 온실의 자연광 하에서 배양하였을 때, 인공 배양실에서 보다 inflorescence가 4배 이상 높이 자랐으며, 종자의 양도 wild type보다 약 3배에서 많게는 20배 가량 많았다 (Figure 27).

(A)



(B)



Figure 27. Phenotype of LF508. (A) 4-week-old plants of wild type and LF508. Roots were not shown in this figure; (B) 11-week-old plants of LF508. Seven plants were shown in a 15cm × 15cm pot.

(나) T-DNA copy 수 확인 및 플라스미드 회수를 통한 flanking DNA 분리 Southern blot analysis를 수행한 결과, 1 copy의 T-DNA가 삽입된 것을 확인

하였다 (Figure 28). 플라스미드 회수를 통하여 insertion site를 분리하여 염기 서열 분석을 수행한 결과, Arabidopsis chromosome 1의 동일한 두 개의 “putative Ca²⁺-binding EF-hand family protein (gene id= At1g70680)”의 intergenic region 인 것으로 예상되었다 (Figure 29).

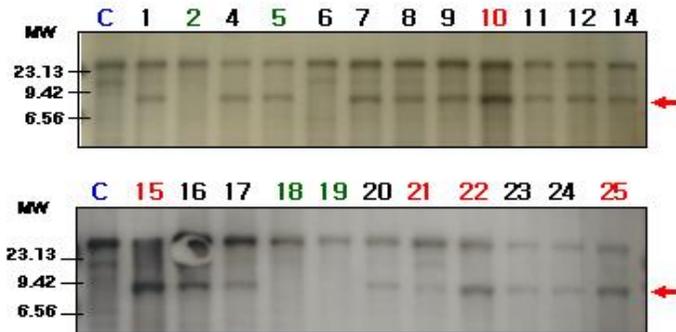


Figure 28. Southern blot analysis of LF508. Southern blot analysis carried out in each T2 generation plants. 3 μ g of genomic DNA was fully digested with HindIII and then electrophoresed through 0.8 % agarose gel overnight. After electrophoresis, the gel containing the digested DNA was processed and then transferred to a nylon membrane by capillary transfer. The DNA-attached membrane was hybridized with P³²-labeled 700-bp fragments of Bar gene at 65°C overnight. After washing of the excess radioactive isotope from the membrane, a radio-sensitive film was exposed to the membrane at -70°C. C, wild type; Red, mutant (homo); Black, wild type (hetero); Green, wild type (No T-DNA).

LF508의 염기서열 상의 특징으로 “CATCTTTTACCATTCTCTT”가 zinc finger-NEX domain으로 transcription repressor와 homology를 보이는 것으로 나타났다. 이 domain은 인간의 전사억제제인 NK-X1에서 발견되는 HLA-DRA 전사의 억제제로써 초파리의 배발생과정에서의 신경형성에서 결정적인 기능을 하는 shuttle craft 단백질로 알려져 있다.

또한 LF508은 calcium-binding domain을 보유하고 있으며 lipid body 형성 및 저장과정에 기능을 하는 calosin protein에서 발견되는 EF hands를 가지고 있었다.

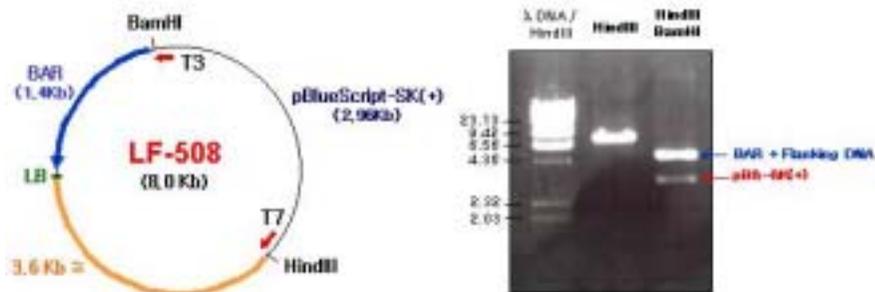


Figure 29. Rescued plasmid of LF508. Genomic DNA from the mixture of T3 plants was fully digested by HindIII and then self-ligated by T4 DNA ligase. The ligates containing pBlueScript-KS(+) were amplified in *E. coli* Top10 cells. The amplified plasmids (=ligates) were digested by several restriction enzymes to confirm the size of flanking DNA.

* Alignment of Caleosin related protein family

		10	20	30	40	50	60	80	
	+.....+.....+.....+.....+.....							
код в енриб	1	HDPEGHVTLQQHU	SFFDRK	EDGI	IYPWETVQGF	RALGFNVI	FSAFIA	IFINGHLSV	ETLP 80
gi_4775226	8	TSSEEEKITLQRHI	EPWDFK	GTGVI	WPRDUYAGF	RRLGFSRA	FSTAITPI	ISGGLSFM	TQT 87
gi_5475216	82	HVHDNLSTLQQHC	AFFDQDD	NGI	IYPWETVSG	LKQIGFNTI	ASLIHA	IUTINUAL	SVPTLP 121
gi_3335169	69	HEHYGLSTLQQHU	SFFDIDD	NGI	IYPWETVSG	LRLGFM	IGSLII	AAVINLTL	SVATLP 118
gi_1177320	61	EDHRQMSVTLQQH	AFFDLGD	GI	IYPWETVYGG	RELGFNVI	IUSFFLA	IAINUGL	SVPTLP 120
gi_2459431	64	HDSEGMSTLQQHU	AFFDQDD	NGI	IYPWETVEGF	FDLGFNFI	SSIFWILL	INILAF	SVUTLP 113
gi_6900305	35	FDPANHTLQKHU	SFFDRK	EDGF	ITPTETIQGF	VAIGCEYA	FATAASAA	IEGALAP	QTTP 94
gi_9295714	8	WVVEGETAL	EKHUSFFDR	-----	-----GR-----	-----	FMSAFVA	UUFFNHL	SQKTRP 48
LF605	11	FVPEEDNPLQRHU	AFFDRK	EDGI	IYPSETTQGF	RALGCGVLL	SAVA	SUTINIGL	SSKTRP 70

		70	80	90	100	110	120						
	+.....+.....+.....+.....+.....											
код в енриб	81	GWIPSPILLPI	YUKNI	HEAKHG	SDSGUYD	AEGRF	FUPS	NFEIIF	SKYART	HEDALITL	EEIQ 120		
gi_4775226	88	SKIIFDPLPL	PYUER	IHLGI	HTSDTGSYD	AKGHFD	SKRF	DEULAQ	YDIGN	EGGLTQ	EEUKA 127		
gi_5475216	122	GWIPSPFFPI	YLVNI	HEAKHG	SDSGTYD	TEGRYLP	PMF	ENLFS	KBART	MPDELTL	GELWS 161		
gi_3335169	119	GWLPSPFFPI	YIENI	HESEHG	SDSETYD	NEGRF	MPUNL	ELIF	SKYAKT	LPDEL	SLGELWE 178		
gi_1177320	121	SWIPSPILLPI	IHKNI	HRAKHG	SDSSTYD	NEGRF	MPUNF	ESIF	SEKART	APDEL	TFGDIWR 180		
gi_2459431	114	SWIPSPILLPT	YVDNI	HEAKHG	SDSSTYD	TEGRY	UPUNL	ENIF	SKYAL	TUKDEL	SFEUWN 173		
gi_6900305	96	AGTFLPL	ELTIY	VENI	HEAKHG	SDSGUYD	AEGRF	LPQNF	ELFET	VAIL	RPDALITL	ENEH 164	
gi_9295714	47	UQLFGYI	LPLFL	EPF	CTUTT	-----	TDUYD	EDGRF	USE	SEFEEIF	NEBART	HEDALITL	EEIQ 104
LF605	71	GEGFSI	WFFPI	IUKNI	HLAKHG	SDSGUYD	EDGRF	VA	SKFEEI	PTK	BART	HEDALITL	NEELIQ

		130	140	150	160	170	180					
	+.....+.....+.....+.....+.....										
код в енриб	121	HTEGNRE	PLDPP	GWL	ASK-----	-----	TEWKLIV	LAK-----	DEEGFLS 166			
gi_4775226	125	LTRGQR	EPED	PEGW	TGSW-----	-----	TEWNL	SFLAAr	espDGK	FLY 187		
gi_5475216	182	HTEANRE	AFDIF	GWL	ASK-----	-----	HEWTLIV	LAK-----	DQDG	FLS 217		
gi_3335169	179	HTEGNRE	DAWDIF	GWL	ASK-----	-----	TEWGLIV	LAK-----	DEEG	FLS 214		
gi_1177320	181	HTEGQR	VALDLL	GR	LASK-----	-----	GEWILL	VLAK-----	DEEG	FLR 216		
gi_2459431	174	UTEGNRE	HAIDPP	GWLS	NK-----	-----	TEWILL	VLAK-----	DEEG	FLS 209		
gi_6900305	166	MLFA	KRD	LDPI	SWAPPQ	-----	TEWGLI	LFTL	AS-----	DWL	GFLH 189	
gi_9295714	105	MLKTR	REPYD	FIGW	FUTV	klnlklnklnynhav	tyhsd	flhyf	TEWKLIV	LAK-----	DWGL	LIT 169
LF605	131	LLKANE	KFPN	DREG	WLAGY-----	-----	TEWKLIV	LCK-----	DEEG	FLH 166		

		190			
	+.....+.....			
код в енриб	167	KEAVRGI	YDGS	SLFE	ELAK 174
gi_4775226	186	KEDLLGI	MDGTL	FP	ELSE 186
gi_5475216	218	KEAIRCY	YDGS	SLFE	YCAK 236
gi_3335169	216	KEAIRRC	FDGSL	FE	YCAK 232
gi_1177320	217	KEAVRRC	FDGSL	FE	STIAK 234
gi_2459431	210	KEAVRGC	FDGSL	FE	QIAK 227
gi_6900305	190	EDSURGI	YDGS	SLF	IKLEK 207
gi_9295714	180	EDAURGI	YDGS	gklldkclm	177
LF605	167	EDTURAA	YDGS	SLF	IKLEK 184

Purative Ca2+ binding protein, chlorella
27EDA Ca2+ binding protein, Sesame
Embryo-specific protein, Arabidopsis Ler
EFA27 for EF hand, ABA, 27ED, rice
ED20 protein, Arabidopsis Col
Purative Ca2+ bind EF hand protein, barley
Similar to Ca2+ binding EF hand protein,
Arabidopsis

(다) Co-segregation 분석

(1) T3 세대에서의 변이 형질 분리비 확인

Insertional mutation의 경우 형질이 열성 유전되므로, 한 쌍의 대립 유전자 모두가 변이형일 경우에만 변이 형질을 발현하므로 변이 형질과 T-DNA 사이의 연관성을 확인하기 위해서는 T3 세대에서의 변이 형질과 야생 형질의 분리비를 확인하여 T2 세대의 식물이 homozygote인지 heterozygote인지 구분하여야 한다. LF508의 T3 세대에서의 변이 형질과 야생 형질의 분리비는 Table 1과 같았다.

T2 세대		T3 세대	T2 세대		T3 세대
식물 #	표현형	변이형:야생형	식물 #	표현형	변이형:야생형
1	야생형	2 : 8	14	야생형	1 : 9
2	야생형	0 : 9	15	변이형	8 : 0
4	야생형	1 : 9	16	야생형	4 : 6
5	야생형	0 : 10	17	야생형	1 : 9
6	야생형	2 : 8	18	야생형	0 : 9
7	야생형	1 : 9	19	야생형	0 : 10
8	야생형	2 : 7	20	야생형	3 : 7
9	야생형	1 : 8	21	변이형	8 : 0
10	변이형	7 : 0	22	변이형	9 : 0
11	야생형	2 : 7	23	야생형	1 : 9
12	야생형	2 : 8	24	야생형	1 : 6
13	변이형	10 : 0	25	변이형	7 : 0

Table 1. Segregation analysis in T3 generation of LF508. Ten of T3 seeds harvested from each T2 plants were sowed in soil.

(2) PCR을 통한 co-segregation 분석

Table 1의 각 식물체로부터 얻은 genomic DNA를 이용하여 bar 유전자를 PCR 하였다 (Figure 30). 결과적으로 각 식물의 T2 세대의 표현형과 T3 세대의 분리비로부터 bar 유전자의 존재 여부를 예상했을 때와 거의 일치하는 경향을 나타

내었다. 17번, 20번과 21번 식물의 경우 Figure 25의 결과에서는 나타나지 않았으나, 이후 추가 실험에서 bar 유전자의 존재를 확인하였으며 (data not shown), 이러한 사실은 Southern 분석 결과에서도 재확인되었다 (Figure 23).

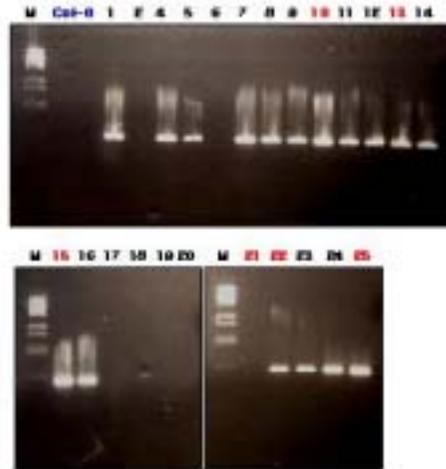


Figure 30. Co-segregation test of mutant phenotype and T-DNA insertion in LF508 by PCR. 700-bp fragments of Bar gene were amplified. Primers : Reverse, 5'-gac acg ctg aaa tca cca gtc-3'; Forward, 5'-ctc gag tca aat ctc ggt gac-3'. Reaction mixture : Takara Ex TaqTM; Protocol : Cycle 1, 94°C for 2 minutes (1 time); Cycle 2, 94°C for 1 minutes → 55°C for 1.5 minutes → 60°C for 1 minute (30 times); Cycle 3, 60°C for 15 minute (1 time); Cycle 4, 4°C for ∞ (1 time).

(3) 기능 예상

Late-flowering 형질에 대한 At1g70680 유전자의 기능이 있는지 확인하기 위하여 ABRC로부터 At1g70680의 exon 또는 intron 부위에 T-DNA가 삽입된 Arabidopsis의 변이체 종자를 구입하여, LF508와 형질을 비교 관찰하였다. 구입

한 변이체 모두에서 야생형과 표현형이 거의 유사하였으며, late-flowering 형질을 보이지 않았으나 (Figure 31) 후속연구가 요구된다. 후속연구를 통하여 본 유전자의 sense, anti-sense expression을 통한 mutant phenotype complementation study 등에 의해 기능이 확인될 것으로 사료된다.

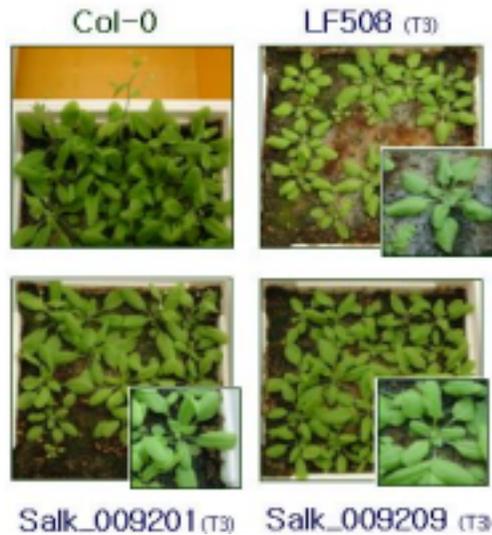


Figure 31. Phenotypes in two mutant lines with T-DNA insertion in *At1g70680* gene. Salk_009201 and Salk_009201 seeds have T-DNA in the exon and the intron region of the gene, respectively. After 3-week culture in soil under the 16h/18h-light/dark cycle, flower bus were generated only in Col-0 and two Salk mutants, but in LF508.

2) LF10-238

온실의 자연광 하에서 배양하였을 때, 야생형에 비해 약 6주 이상 개화 시기가 늦었다. 앞서 소개한 LF508과 매우 유사한 변이 형질을 보이는 개체로서, 개화가 시작될 때 rosette leaf의 수는 약 40장 이상이였으며, rosette의 직경이 wild type의 4배 이상이었다. 잎 자체의 색깔이 짙은 녹색이었으며, inflorescence가 매우 높이 자랐으며, flower 자체의 크기도 wild type에 비해 컸다 (Figure 32).

(A)

(B)



Figure 32. Phenotype of LF10-238. (A) 3-week-old plants of wild type and LF10-238; (B) 8-week-old plants of LF10-238.

Southern blot analysis를 수행한 결과 2 copy 이상의 T-DNA가 삽입된 것을 확인하였고 (Figure 33) plasmid rescue 방법으로 유전자를 분리하였다 (Figure 34).

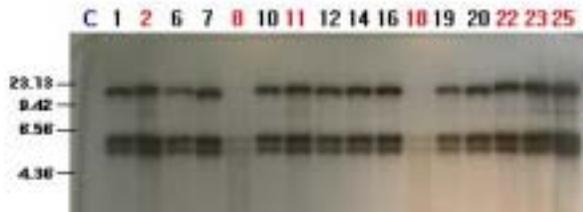


Figure 33. Southern blot analysis in

LF10-238. Southern blot analysis carried out in each T2 generation plants. 3 μ g of genomic DNA was fully digested with HindIII and then electrophoresed through 0.8 % agarose gel overnight. After electrophoresis, the gel containing the digested DNA was processed and then transferred to a nylon membrane by capillary transfer. The DNA-attached membrane was hybridized with P³²-labeled 3-Kb fragments of pBlueScript-SK(+)/EcoRI at 65°C overnight. After washing of the excess radioactive isotope from the membrane, a radio-sensitive film was exposed to the membrane at -70°C. C, wild type; Red, mutant (homo); Black, wild type (hetero). Basta-sensitive plants described in Table 2 were omitted. In case of #8 and 18, there was no bands for the very low concentration of genomic DNA digests.

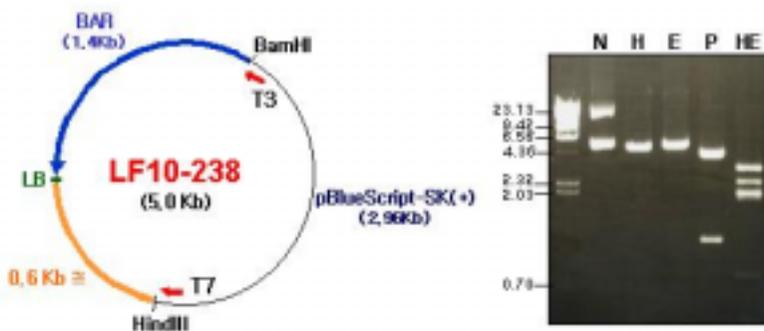


Figure 34. Rescued plasmid of LF10-238. Genomic DNA from the mixture of T3 plants was fully digested by HindIII and then self-ligated by T4 DNA ligase. The ligates containing pBlueScript-KS(+) were amplified in *E. coli* Top10 cells. The amplified plasmids (=ligates) were digested by several restriction enzymes to confirm the size of flanking DNA. N, uncut; H, HindIII; E, EcoRI; HE, HindIII + EcoRI.

LF10-238의 T3 세대에서의 변이 형질과 야생 형질의 분리비는 Table 2와 같았

다.

T2 세대		T3 세대	T2 세대		T3 세대
식물 #	표현형	변이형:야생형	식물 #	표현형	변이형:야생형
1	야생형	3 : 8	15	야생형	-
2	변이형	12 : 0	16	야생형	3 : 6
5	야생형	1 : 11	17	야생형	Basta-S
6	야생형	4 : 6	18	변이형	12 : 0
7	야생형	1 : 11	19	야생형	2 : 10
8	변이형	11 : 0	20	야생형	2 : 10
9	야생형	Basta-S	21	야생형	-
10	야생형	3 : 8	22	변이형	12 : 0
11	변이형	12 : 0	23	변이형	12 : 0
12	야생형	-	24	야생형	3 : 9
13	야생형	Basta-S	25	변이형	10 : 0
14	야생형	5 : 5			

Table 2. Segregation analysis in T3 generation of LF10-238. T3 seeds harvested from each T2 plants were sowed in soil. 'Basta-S' represents the sensitivity to 0.02% Basta. This test was not carried in '-'-marked plants, because T3 seeds were not available.

3) LF6-135

야생형에 비해 성장 속도가 느리며 개화 시기 또한 약 2주 정도 느린 변이체로서, 전체적인 개체의 색깔이 짙은 녹색을 나타내었다. Secondary inflorescence가 수평으로 벌어져서 자라며, silique의 발생 형태나 크기는 야생형과 유사하나, 전체적인 종자의 양은 야생형에 비해 다소 적은 편이었다 (Figure 35-A). 흙에서 약 4주 동안 자란 식물은 500mM NaCl 처리에 내성을 보이며 (Figure 35-B), 건조 처리에도 내성을 나타내었다.

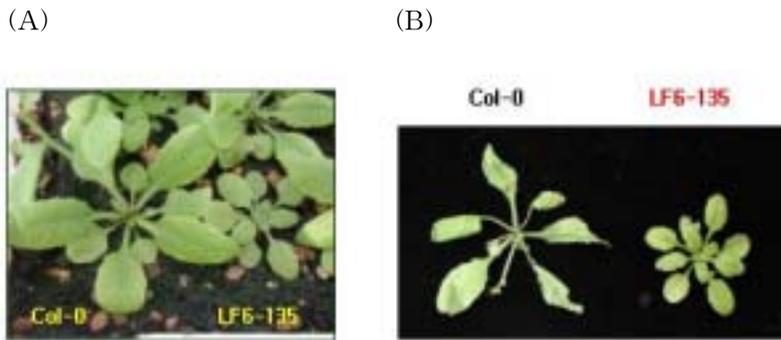


Figure 35. Phenotype of LF6-135. (A) 3-week-old plants of wild type and LF6-135; (B) NaCl-tolerance after 2 days of 500mM NaCl treatment. 3-week-old plants in soil were used. All plants with mutant phenotype showed NaCl-tolerant phenotypes, delayed chlorophyll degradation and maintenance of turgor pressure.

Southern blot analysis를 수행한 결과, 2 copy의 T-DNA가 삽입된 것을 확인하였다 (Figure 36). 플라스미드 회수를 통하여 플라스미드 회수를 통하여 insertion site 두 개를 분리하였다 (Figure 37). 염기 서열 분석 결과, 하나는 Arabidopsis chromosome 5의 “Phosphoglucomutase (gene id = At5g51820)” 유전자의 intron 부위로, 다른 한 부위는 chromosome 3의 “Unknown protein”으로 예상되었다.

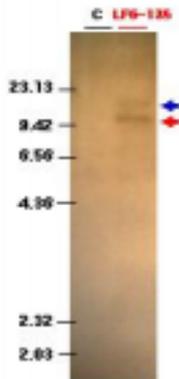


Figure 36. Southern blot analysis in LF6-135. Southern

blot analysis carried out in T2

generation plants. 3 μg of genomic DNA was fully digested with HindIII and then electrophoresed through 0.8 % agarose gel overnight. After electrophoresis, the gel containing the digested DNA was processed and then transferred to a nylon membrane by capillary transfer. The DNA-attached membrane was hybridized with P^{32} -labeled 3-Kb fragments of pBlueScript-SK(+)/EcoRI at 65°C overnight. After washing of the excess radioactive isotope from the membrane, a radio-sensitive film was exposed to the membrane at -70°C. C, wild type.

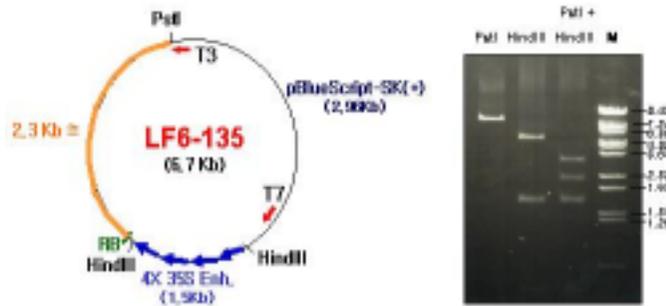


Figure 37.
Rescued

plasmid of LF6-135. Genomic DNA from the mixture of T3 plants was fully digested by HindIII and then self-ligated by T4 DNA ligase. The ligates containing pBlueScript-KS(+) were amplified in *E. coli* Top10 cells. The amplified plasmids (=ligates) were digested by several restriction enzymes to confirm the size of flanking DNA.

3) 그 외의 변이체들

위에 열거한 변이체들 이외에도 상당수의 치사 관련 변이체 (Figure 38), 종자를 맺지 못하는 변이체 (Figure 39), 그리고 식물 구조 변이체 (Figure 40)를 획득하였다. 현재 이들 변이체의 유전분석과 flanking DNA 분리 연구를 수행 중이며, 농업적으로 유용한 형질로 판단되는 경우 세부적인 기능 연구를 수행할 것이다. 1) Rosette leaf의 일부가 위쪽으로 오목하게 접히는 모습을 나타냄 2) 잎의 대칭 구조가 깨어져 있음 3) 잎의 가장자리 부분이 야생형에 비하여 돌기형으로 나타나며 전체적으로 작고, 연한 녹색을 띠며 early flowering 임 4) 잎표면에 주름이 생기고 정상적인 발생을 하지 못함 5) 엽맥과 엽표면의 녹색정도가 달라 나타 나며 전체적으로 compacta 형태임 6) 잎이 야생형에 비하여 길죽하게 나타나며 전체적으로 야생형에 비하여 연약한 모습을 보이고 있음



Figure 38. Mutant

lines with lethality at the early developmental stage. A, albinism in cotyledon and retarded growth (19-705); B, breakdown of phototropism and arrested development (14-38); C, abnormal development (10-78); D, pale green and retarded growth (8-178); E, breakdown of phototropism and albinism (12-125); F, arrested development and albinism (19-153); G, breakdown of phototropism and albinism (10-89); H, abnormal development (10-173); I, abnormal development (4-109); J, albinism and arrested development (19-401).



Figure 39. Mutant lines with sterility and altered architecture. These plants were very small and made abnormal flowers and abnormal siliques. A, 4-123; B, pale green 4-123; C, 3-123; D, 9-65; E, 4-123; F, 19-153.



Figure 40. Mutant lines with altered architecture. A, early-flowering (8-202); B, late-flowering (10-200); C, giant (4-123); D, rose-like rosette leaves and abnormal siliques (6-162); E, wavy rosette leaves (2-103); F, oval rosette leaves (10-253); G, small (2-63); H, small (9-165); I, round rosette leaves and small (18-111); J, saw tooth-like rosette leaves (8-124); K, pale green and longish rosette leaves (2-73); L, longish rosette leaves (12-33).

제 4 장 고 찰

특정 유전자의 기능을 확인하는 방법은 해당유전자의 기능이 상실된 돌연변이체를 이용하여 유전학적 기법을 이용하여 왔다. 돌연변이란 일반적으로 유전자 수준에서의 변형에 의한 개체의 유전형질적 변화를 의미하며 개체에게는 불리하게 작용하는 것으로 알려져 왔다. 돌연변이를 구하기 위하여서는 자연계에 존재하는 돌연변이체를 수집하여 사용하거나 인위적으로 돌연변이를 일으키는 돌연변이원 (mutagen)을 처리하여 해당 유전자의 돌연변이를 선발하는 방법을 사용한다. 돌연변이원으로는 x-ray, γ -ray와 같은 고에너지 이온화방사선류나 EMS, DMS, DEB와 같은 화학물질이 사용되어 왔으나 이러한 돌연변이원에 의한 돌연변이는 유전자 분리과정에 매우 복잡하고 시간을 많이 소모하는 단점을 가지고 있었다. 식물의 경우에는 토양미생물인 *agrobacteria*의 T-DNA가 감염된 숙주의 유전체내로 무작위적으로 삽입되는 원리를 이용하여 T-DNA를 꼬리표(tag)로 이용하여 변이유전자를 분리하는 기술이 개발되었다. 이러한 기능상실 돌연변이류를 이용한 유전학, 분자유전학적인 기법에 의해 수많은 유전자들이 발견되었고, 기능이 확인되기도 하였다. 그러나 이러한 기능상실돌연변이를 이용한 기능성 검증법은 많은 장점을 가지고 있으나 생물의 유전체계에서 흔히 발견되는 유전자의 기능적 중복현상 (functional redundancy)에 의한 돌연변이 형질의 확인이 불가능한 경우에는 효과가 저하된다. 또한 특정유전자가 발생초기 단계에서 결정적인 기능을 할 경우, 해당 유전자의 결함에 의한 기능상실은 발생초기에 치사성을 나타내게 되므로 개체발생을 저해하게 되기도 한다. 이러한 유전자 기능연구 기법의 단점을 보완할 수 있는 방법으로 기능획득 돌연변이 선발법으로 activation tagging법이 제안되었다. CaMV의 35S 프로모터 부위의 enhancer 서열이 인근유전자의 활성을 유발한다는 기본 원리에 착안하여 제안된 activation tagging법은 유전자의 활성화 현상을 이용하므로 다양한 형태의 positive screening을 가능하게 한다. 실제로 이러한 activation tagging법에 의해 기능이 확인된 유전자들은 개화시기, 잎, 줄기 등의 형태변화, 병내성, 개체 크기변화 등에 걸쳐 다양하게 분포하고 있다.

본 연구에서는 이러한 activation tagging 기술을 자체적으로 확보하기 위하여 직접 activation tagging용 vector (pGM1003)를 제작하고자 하였다. 이 vector는 T-DNA의 RB에 인접하여 4반복의 CaMV 35S 프로모터의 enhancer 부위를 가지고 있으며 다양한 제한효소 부위를 가지고 있어 tagging후의 유전자 분리를 용이하게 하며 Basta 저항성 유전자 및 pBluescript sequence를 가지고 있어 효과적인 변이체 선발 및 plasmid rescue가 가능하다. 본 연구에서는 감염성이 뛰어난 agrobacteria strain인 AGL1을 이용하여 형질전환 효율을 높였으며 in planta 형질전환법의 일종인 화아침지법에 의해 애기장대의 형질전환을 실시하였고 효과적인 basta screening 방법을 개발하여 연구에 적용하였다. 본 연구를 통해 2년간에 걸쳐 확보한 10,000종의 변이체를 확보하였고 이들을 대상으로 환경스트레스에 대한 변이체 및 유전자를 분리하고자 하였고 표현형의 변화를 보이는 변이체 및 유전자 분리도 시도하였다. 본 연구결과 형질전환 효율은 평균 0.2% 이상이었으며 다양한 변이체를 선발할 수 있었다. 또한 효과적으로 유전자 분리가 가능함을 확인하였다.

식물의 생산성은 빛, 온도, 수분 및 토양의 무기물 또는 유기물의 구성 등 비생물학적인 요인과 병원성 미생물에 의한 감염 등의 외부환경과 개체수준의 유전적인 내부요인에 의해 결정된다. 우수한 형질을 가진 농작물을 창출하고 생산성을 극대화 하기위한 육종적 시도는 질적형질의 도입과 함께 비생물학적 환경재해 또는 스트레스에 대한 내성, 생물학적 스트레스에 대한 내성 또는 저항성 확충 등에 맞추어져 왔다. 이러한 환경적 요인에 대한 특성을 도입하기 위한 시도가 되어 왔으며 많은 유전자들이 직접 또는 간접적으로 환경 및 스트레스에 대응하는 것으로 밝혀지고 있다 (표)

작물에 있어서 salt stress는 가장 기본적인 비생물학적 환경스트레스이다. 실제로 농업환경에서의 고염화 현상은 나날이 가속화 되고 있는 것으로 나타나며 미국의 경우 코로라도강 상류가 50mg/L 하류지역은 900-3,000mg/L에 이를 정도로 심각하며 지구상의 농작지의 1/3이 salt에 의한 영향을 받는 것으로 보고되고 있다. 식물은 뿌리를 통해 수분을 흡수할 때 다른 영양원들과 함께 여러 가지 형태의 염을 받아들이며 이러한 염류는 체내에서 축적되어 세포내 대사과

정 및 식물의 생장에 지속적인 영향을 미치게 된다. 특히 고농도의 나트륨(Na^+) 염이 존재하는 환경에 식물이 노출되면 K transporter에 의해 K^+ ion과 같이 세포내로 유입되며 potassium binding site에 경쟁적으로 결합되어 식물세포내의 수분결핍 및 ion-specific stress를 유발하여 growth rate를 감소시키거나 leaf damage, root/shoot ratio를 증가시키는 등 식물 및 토양조성에 심각한 영향을 미치게 된다.

식물체내에서 salt flux를 조절하는 기작으로는 통도조직으로의 ion 유입을 조절하거나 vacuole이나 tonoplast로 축적시키는 방법이나 transpiration, expansive growth fluxes, cell morphology 변화, intercellular connection 등을 통한 ion discrimination 등이다. 또한 고농도의 salt는 plasma membrane의 ion transport의 barrier인 proton pump와 연관되며 결국 membrane potential에 영향을 미치게 된다. 식물세포내에서는 고농도의 salt 유입에 의한 osmotic potential을 낮추기 위하여 osmolyte의 생성을 유도하거나 저장하기 위한 변화를 수반하기도 한다. 고농도의 salt의 영향으로는 단백질합성 및 광합성과 같은 대사과정의 변화 및 잎조직에서는 저해된 광합성에 의해 당의 생성이 감소함에 따른 membrane potential의 감소로 chlorophyll의 분해가 촉진되기도 한다.

Salt stress에 대하여 영향을 받는 물질로는 ion homeostasis, osmolyte biosynthesis, toxic radical scavenging, water transport 및 long-distance response coordination과 관련이 있으며 salt tolerance effectors를 조절하는 cellular signal pathway의 component들은 regulatory molecule로 작용한다.

본 연구를 통해 분리, 확인된 유전자(At355)의 경우 지금까지 알려진 MAP kinase들과는 40-50%정도의 유사성을 보이는 신규한 유전자였으며 특이하게 건조스트레스에 의해 강하게 유도됨을 확인하였다. 더구나 이 유전자를 과발현 시킨 결과 건조처리 및 스트레스 처리에 대한 민감도가 현저히 저하됨을 확인할 수 있었다. 따라서 At355에 대한 후속연구를 통해 가뭄스트레스에 강한 식물 품종을 육성할 수 있는 방안을 강구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

개화시기가 현저히 늦어지는 변이체로부터 분리된 LF508의 경우는 개화시기가 늦어지는 특징 외에도 꽃의 크기 및 식물체의 크기가 현저히 큰 특징을 보였

으며 종자수확량도 3-20배에 이르는 특징을 보였다. LF508은 그 기능이 확실히 밝혀지지지는 않았으나 유전자 서열상에 ZnF_NEX domain으로 transcription repressor와 homology를 보였으며 calosin protein family에 속하는 EF hands motif도 보유하는 중요한 기능을 할 것으로 추정된다.

또다른 개화시기 지연 변이체 (LF10-238)은 개화시기가 야생형에 비하여 6주 이상 지연되며 꽃 및 식물체의 크기가 현저히 큰 특징을 보였고 LF6-135의 경우는 개화시기가 약2주정도 느려지는 특징과 종자량이 적은대신에 500mM NaCl 처리나 건조처리에 내성을 보이는 것으로 확인되어 후속 연구를 통해 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

각종 모델 생명체들의 유전자 서열분석이 완료된 이후에는 유전자의 기능성을 확인하여야 할 필요성이 있다. 기능성이 입증된 유전자는 지적재산권 및 이러한 유전자의 도입에 따른 신품종 육성의 경쟁에도 유리하게 활용될 수 있으며 종자산업 및 파생적인 생물산업에 대한 국가경쟁력을 높이는데 기여할 수 있다. 본 연구에서는 이러한 관점에서 농업적으로 활용하기 위한 유용유전자를 효과적으로 확보할 수 있는 activation tagging 기술을 확립하고자 하였으며 10,000여종의 activation tagging 변이체 집단을 확보하였고 유용형질을 확보하기 위하여 염(salt) 및 건조(drought)처리를 통한 환경스트레스 관련 변이체를 선발하는 한편 개화시기, 개체크기, 외형, 치사성(lethality) 등의 형태적인 변이체에 대한 선발을 실시하였다.

본 연구를 통하여 확보된 변이체 집단은 관련 연구자가 원할 경우 적절한 절차를 거쳐 분양할 수 있으며 필요한 경우 변이체 선발이나 유전자 분리에 대한 공동연구 개발에 활용할 수도 있을 것으로 사료된다.

특히 유전자의 기능이 어느 정도 확인된 경우에는 후속연구를 통해 작물에 도입하여 기능성 신품종을 육성하는 재료로 활용하며 필요한 경우 유전자특허 등 지적재산권화 할 계획이다.

At355의 경우 유전자 발현 양상이 건조처리에 강하게 나타났으며 over expression 시킨 경우 건조 스트레스뿐만 아니라 다른 스트레스에 대하여서도 저항성을 가지는 것으로 확인되었으므로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

건조 스트레스 저항성 변이체로부터 분리된 유전자는 잎 및 개체수준에서의 노화과정에서도 변화가 확인되었으므로 작물의 수명 또는 저장성을 증가시킬 수 있는 품종개발에 이용될 수 있을 것으로 기대한다.

개화시기가 매우 늦어지며 꽃의 크기, 식물체의 크기 및 종자의 크기, 종자 수 확량 등에서 야생형에 비하여 현격히 증가된 형태를 나타내었던 LF508은 유전자

의 가능성이 확실하게 판명되지는 않았으나 후속연구를 통해 가능성을 입증하고 분자유종에 활용할 수 있는 좋은 소재라 생각되므로 지속적으로 연구할 계획이다.

참고문헌

- Blumwald, E., Aharon, G., and Apse, M.P. (2000) Sodium transport in plant cells. *BBA* 1465, 140-151.
- Brosche', M., and Strid., Ake. (1999) Cloning, expression, and molecular characterization of a small per gene family regulated by low level of ultraviolet B radioation and other stress. *Plant Physiol* (1999) 479-487.
- Choi., H.I., *et al.*, ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* 275, 1723-1730.
- Cushman, J.C., and Bohnert, H.J. (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 117-124.
- Gisbert, C., *et al.*, (2000) The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiol.* 123, 393-402.
- Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (2000) Plant cellular and molecular response to high salinity. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol* 7, 463-99.
- Hoshida, H., *et al.*, (2000) Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol. Biol.* 43, 103-111.
- Ishitani, M., Xion, L., Stevenson, B., and Zhu, J.K. (1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal trnasduction in arabidopsis : interactions and convergence of abscisic acid-dependenct and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell* 9, 1935-1949.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Shinozaki, K.Y., and Shinozaki, K. (2000) A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under waterstress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol.* 2000, 123, 553-562.
- Jonak, C., Ligterink, W., and Hirt, H. (1999) MAP kinase in plant signal transduction. *CMS. Cell. Mol. Life Sci.* 55, 204-213.
- Kiyosue, T., Shinozaki, K.Y., and Shiozaki, K. (1994) Cloning of cDNAs for genes that are eary-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes. *Plant Mol. Biol.* 25, 791-789.
- Lee, H.J. *et al.*, (1999) Cold-regulated gene expression and freezing tolerance in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Plant J.* 17, 301-328.

- Lee, Y.H., and Chu, L.Y. A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. *Plant Mol. Biol.* 37, 377-384.
- Liu, J., and Zhu, J.K. (1997) An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *PNAS* 94, 14960-14964.
- Liu, J., and Zhu, J.K. (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*. 280, 1943-1945.
- Mie, K. et al., (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech.* 17, 287-291.
- Mizoguchi, T., et al., (1993) *ATMPKs*: a gene family of plant MAP kinase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 336, 440-444.
- Munnik, T., et al., (1999) Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J.* 20, 381-388.
- Nakashima, K. et al., (2000) Organization and expression of two *Arabidopsis DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol. Biol.* 42, 657-665.
- Nakashima, K., et al., A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hyposmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118. 1233-1241.
- Nanjo, T., et al., (1999) Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18, 185-193.
- Pia, H.L. et al., An *Arabidopsis* GSK3/shaggy-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and abscisic acid. *Plant Physiol.*, 119, 1527-1534.
- Rakwai, R., Agrawal, G.K., Yonekur, M. (1999) Separation of proteins from stress rice (*Oryza sativa* L.) leaf tissues by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: induction of pathogenesis-related and cellular protectant proteins by jasmonic acid, UV, irradiation and copper chloride. *Electrophoresis* 20, 3472-3478.
- Saijo, Y., et al., (2000) Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein

- kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* 23, 319-327.
- Shen, B., Bohmann, S., Jensen, G., and Bohert, J. (1999) Role of sugar alcohol in osmotic stress adaptation replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol.* 121, 45-52.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C.S., and Zhu, J.K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOSq* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *PNAS* 97, 6896-6901
- Shinozaki, K. and Shinozaki, K.Y. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathway. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 217-223.
- Shinozaki, K., and Shiozaki, K.Y. (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115, 327-334.
- Shinozaki, K.Y., and 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.
- Tsonew, T.D., Laxova, G.N., Stoinove, Z.G., and Popova, L.P. (1998) A possible role for jasmonic acid in adaptation of barley seedling to salinity stress. *J. Plant Growth Regul.* 17, 153-159.
- Urao, T., *et al.*, (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant cell* 11, 1743-1754.
- Urao, T., Yakubov, B., Shinozaki, K.Y., and Shinozaki, K. (1998) Stress-responsive expression of genes for two-components response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 427, 175-178.
- van der Krol, A.R. *et al.*, (1999) Developmental and wound-, cold, desiccation-, ultraviolet-B-stress-induced modulations in the expression of petunia zinc finger transcription factor gene *ZPT2-2*. *Plant Physiol.* 121, 1153-1162.
- Wu, S.J., Ding, L., and Zhu, J.K. (1996) *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell.* 8, 617-627.
- Xion, M., Ishitani, M., and Zhu, J.K. (1999) Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in regulation of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 119, 205-211.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H.J. and Zhu, J.K., (1999) *HOS5*- a negative regulator of osmotic stress-induced gene expression in *Arabidopsis*

- thaliana*. Plant J., 19, 569-578.
- Yeo, A. (1998) Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. J. Exp. Botany 49, 915-929.
- Zhang, J., Nguyen, H.T., and Blum, A. (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. J. of Exp. Botany 50, 291-302.
- Zhinozaki, K. and Shinozaki, K.Y. (1996) Molecular responses to drought and cold stress. Current Opinion in Biothech. 7, 161-167.
- Zhu, J.K. (2000) Genetic analysis of plant salt tolerance using arabidopsis. Plant Physiol. 124, 941-948.
- Zhu, J.K., Lie, J., and Xiong, L. (1998) Genetic analysis of salt tolerance in arabidopsis : evidence for a critical role of potassium nutrition. Plant Cell. 10, 1181-1191.