



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

碩士學位論文

활성 표지 선발법을 이용한 애기장대
저온 저항성 돌연변이체 선발 및
특성 분석

Isolation and characterization of freezing-tolerant
mutant using Arabidopsis activation tagging.

濟州大學校 大學院

生命工學科

鄭 荷 娜

2013年 2月

활성 표지 선발법을 이용한 애기장대
저온 저항성 돌연변이체 선발 및
특성 분석

指導教授 李 孝 淵

鄭 荷 娜

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013年 2月

鄭荷娜의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____(印)

委 員 _____(印)

委 員 _____(印)

濟州大學校 大學院

2013年 2月

목 차

LIST OF FIGURES AND TABLE	iii
ABSTRACT.....	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	
1. 식물재료 및 생육조건	4
2. <i>Agrobacterium</i> 형질전환 및 애기장대 형질전환	4
3. 활성 표지 선발법을 통한 저온 저항성 돌연변이체 선발	6
4. 동형접합체 식물의 선발	6
5. 플라스미드 회수	8
6. 스트레스 처리	9
7. 지베렐린(GA ₃) 처리	10
8. 수분 손실(water loss) 및 전해질 침출(ion leakage) 분석	11
9. RNA 분리	12
10. cDNA 합성	12
11. 야생형 애기장대 스트레스 처리 및 <i>FTL1/DDF1</i> 유전자의 발현분석	12
12. 식물체에서의 스트레스 관련 유전자들의 발현분석	13
III. 결과 및 고찰	
1. 저온 처리 시간에 따른 야생형 애기장대의 표현형.....	15
2. 화분 내 토양 높이에 따른 야생형 애기장대의 표현형	17
3. 활성 표지 선발법을 이용한 저온 저항성 돌연변이체 선발.....	19
4. 기능 획득 돌연변이 <i>ftl1-1D</i> 의 표현형 및 특성 분석.....	21
5. <i>ftl1-1D/ddf1</i> 돌연변이체의 저온 저항성 표현형	24
6. 저온 처리 시간에 따른 <i>FTL1/DDF1</i> 의 발현양상	26

7. 저온 순화 처리에 따른 <i>ftl1-1D/ddf1</i> 돌연변이체의 저온 저항성 표현형	28
8. GA ₃ 처리에 따른 <i>ftl1-1D/ddf1</i> 돌연변이체의 저온 저항성 표현형	30
9. <i>ftl1-1D/ddf1</i> 돌연변이체의 고온 저항성 표현형	32
10. <i>ftl1-1D/ddf1</i> 돌연변이체의 가뭄 저항성 표현형	36
11. 환경스트레스에 따른 야생형 애기장대 내 <i>FTL1/DDF1</i> 유전자의 발현 양상	39
12. <i>ftl1-1D/ddf1</i> 돌연변이체 내 스트레스 관련 유전자들의 발현 양상	42
 IV. 종합고찰	 44
 V. 참고문헌	 47

LIST OF FIGURES AND TABLE

Fig. 1. Schematic diagram of activation tagging.	5
Fig. 2. Flow chart illustrating the steps and time regime for the production of transgenic Arabidopsis by floral dip methods.	7
Fig. 3. Effect of freezing stress on wild type plants according to exposed time.	16
Fig. 4. Effect of freezing stress on wild type plants according to soil height.	18
Fig. 5. Growth characteristics of the selected T1 freezing tolerant lines(FTLs).	20
Fig. 6. Characterization of gain-of-function mutant, <i>ftl1-1D</i>	23
Fig. 7. Response of <i>ftl1-1D/ddf1</i> mutants to freezing stress.	25
Fig. 8. Expression of <i>FTL1/DDF1</i> at low temperature.	27
Fig. 9. Enhanced freezing-tolerance of <i>ftl1-1D/ddf1</i> mutants by cold-acclimation.	29
Fig. 10. Response of <i>ftl1-1D/ddf1</i> mutants to freezing stress with GA ₃ treatment.	31

Fig. 11. Response of *ft11-1D/ddf1* mutants to heat stress at seedling stage.34

Fig. 12. Response of *ft11-1D/ddf1* mutants to heat stress.35

Fig. 13. Response of *ft11-1D/ddf1* mutants under drought stress.38

Fig. 14. Expression level of *FTL/DDF1* under abiotic stresses.41

Fig. 15. Relative expression level of *CBFs* and *CBF regulons* in *ft11-1D/ddf1* mutants.43

Table 1. Primers used in this study.14

Abstract

Low temperature is one of the most important environmental stress that lead to the various response of plants such as cold acclimation and vernalization. Also extremely low temperatures(freezing temperatures) limit the geographical distribution of plants and cause severer losses in crop plants. Thus, freezing tolerance in crop plants is an important trait for its commercial value. To find the possible genetic resource, a series of mutants were isolated with enhanced freezing tolerance in the absent of cold acclimation by screening for Arabidopsis activation tagging mutants. Arabidopsis activation tagging mutant showing resistance against freezing was screened from 80,000 T1 activation tagged line. One mutant, *freezing-tolerant line 1-Dominant(ftl1-1D)*, showed dark green, dwarfism and late-flowering. To get inside into molecular function of *Freezing-Tolerant Line(FTL1)*, the *FTL1* gene was isolated by using plasmid DNA rescue. The rescued DNA sequence was perfectly matched to AT1G12610(*DDF1*) of *Arabidopsis* genomic DNA sequence. *Dwarf and Delayed Flowering 1(DDF1)*, a gene previously reported that *FTL1/DDF1* encodes AP2 transcription factor and is involved in the regulation of GA biosynthesis and stress tolerance.

ftl1-1D/ddf1 mutant enhanced not only cold tolerance, but also heat and drought tolerance. However, these phenotype were restored by exogenous gibberellin(GA₃). To examine the *FTL1/DDF1* gene expression pattern under abiotic stresses, we monitored the time course of the accumulation of *FTL1/DDF1* mRNA under abiotic stresses by real-time PCR in wild type. The level of *FTL1/DDF1* mRNA in wild type showd that *FTL1/DDF1* gene expression is induced by cold, heat, drought and salt stresses. Therefore, *FTL1/DDF1* plays a role in regulating responses to several abiotic stresses.

I. 서론

식물은 한 곳에서 고착 생활을 하기 때문에 환경스트레스에 항상 노출되어 있다. 환경스트레스는 빛, 수분, 온도, 양분, CO₂, 염분 등 화학적 환경변화에 의한 비생물학적(abiotic) 스트레스이며, 식물의 생존, 성장, 발달 등에 관련하여 불리하게 영향을 미치는 요인이다. 이러한 환경스트레스에 의해서 작물의 생산성과 질이 떨어지게 되며, 경제적으로 막대한 손해를 입는다(Xiong and Zhu *et al.*, 2002).

또한, 세계경제에서 농업이 차지하는 비율은 25%에 이르며(Fisher *et al.*, 2002), 점차적으로 인구가 기하급수적으로 증가할 것으로 전망되는 가운데, 이미 약 8억 명의 인구가 식량 부족으로 고통 받고 있다. 여기에 더해 근세기에 들어 인류의 무분별한 산업 혁명 등으로 인하여 지구의 기후가 점차 빠른 속도로 변화하고 있다. 급변하는 기후 변화가 전 세계 식량 생산에 중요한 영향을 미칠 것으로 예상되며 이에 대처한 농업 연구개발이 더욱 절실하다(Ancheol *et al.*, 2011).

기존의 전통 육종을 통하여 환경스트레스 저항성 작물 개발이 가능하지만 거의 한계에 도달하였고, 이러한 상황에서 목적 형질의 유전자를 직접 도입하는 분자 육종을 통한 품종에 대한 개발도 새로운 관심 연구분야로 부각되고 있다. 이러한 관점에서, 식물이 지니고 있는 환경스트레스에 대한 저항성 메커니즘을 분자적 수준으로 이해하고 이에 관여하는 유용 유전자를 발굴하는 연구가 필요하다(Tuteja *et al.*, 2005).

식물은 환경스트레스를 인지하고 신호를 전달하는 과정을 거쳐 다양한 물리적·대사 반응을 나타내며, 과정은 생화학적인 수준으로 분석되었다(for reviews, see Ingram and Bartels, 1996; Thomashow, 1999; Bray *et al.*, 2000; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Zhu, 2002). 환경스트레스에 노출된 식물체들은 스트레스를 인지하고 체내에서 분자적 신호로 전환된다. 이러한 신호에 의해 스트레스에 반응하는 많은 유전자들이 전사 수준에서 조절되고 최종적으로 식물의 스

트레스에 대한 저항성이 증가된다(Agarwal *et al.*, 2006, Kavar *et al.*, 2007).

환경스트레스에 저항하기 위해서 다양한 종류의 유전자들이 관여하며, 크게 구조 유전자와 조절 유전자로 구분된다(Grover *et al.*, 2003). 구조 유전자는 환경 저항성에 관여하는 생화학 반응이나 경로에 관여된 효소를 합성하는 유전자들이며, 조절 유전자는 구조 유전자보다 상위에서 구조 유전자의 발현을 조절하는 전사인자, 신호 유도나 신호수용에 관여된 단백질 등을 합성하는 유전자들이다(Ancheol *et al.*, 2011).

환경스트레스에 반응하는 대표적인 전사인자로는 C-repeat(CRT) binding factor/dehydration-responsive element-binding protein(CBF/DREB1), the ethylene-responsive element binding factor(ERF), zinc fingers, WRKY, MYB, the basic helix-loop-helix(bHLH), basic-domain leucine zipper(bZIP), NAC 등이 알려져 있다(K. Shameer *et al.*, 2009, Eulgem *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2002, Gutterson and Reuber *et al.*, 2004). 유전자들 중 일부는 애기장대와 벼에서 과발현 시켰을 때 환경스트레스에 대한 저항성을 나타내어(Umezawa *et al.*, 2006) 스트레스 내성 작물 개발에 필요한 유전자원으로 전사인자의 활용 가능성을 보여주었다. 그러나 이러한 전사인자들이 환경스트레스에 대해 생체 내 어떠한 기능을 수행하는지 불확실하며, 유전자 발현 조절과 스트레스에 대한 저항성 간의 관계를 분자적 수준에서 규명한 연구 거의 미비한 상태이다. 그러므로, 이러한 유전자 기능 분석 연구를 기반으로 유전자 발현 조절을 통한 환경스트레스 저항성 작물 개발의 가능성을 확인할 필요가 있다.

유전자 기능 분석 연구 분야에서는 몇 가지 분석 방법에 근거하여 생물학적 과정을 분자적 수준에서 밝히는 강력한 도구로 사용한다(Livesey and Hunt *et al.*, 2000). 일반적으로 관심 있는 표현형을 보이는 돌연변이 개체를 선발하여 원인 유전자를 동정하는 전통적 순유전학(forward genetics) 분석 방법은 표현형과 연관된 유전자 기능을 밝히는데 효과적인 방법이다. 위 방법은 우선 전체 유전체에 무작위적인 돌연변이 집단을 생산하는 것으로 시작을 한다. *Agrobacterium*을 매개로 무작위적인 T-DNA 삽입 돌연변이 집단을 생산하여, 고등식물 유전자들의 기능연구에 활용하고 있다(Hiei *et al.*, 1994, Azpiroz-Leehan and Feldmann *et al.*, 1997, Zhang *et al.*, 1997, Jeon *et al.*, 2000, Bouche and Bouchez *et al.*, 2001, Jeong *et al.*,

2002, An *et al.*, 2005). 이러한 돌연변이 집단에서 육안으로 관찰하기 용이한 비정상적인 표현형을 보이는 개체를 분석하여 원인 유전자를 동정하는데 많이 활용하고 있다. 모델 식물인 애기장대의 경우 22만여 이상의 T-DNA 돌연변이 라인이 확보되어 있다(Alonso *et al.*, 2003; <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).

돌연변이체 중 유전자의 발현이 억제된 기능 상실 돌연변이(loss-of-function mutant)를 이용하여 해당 유전자의 기능을 알아보는 방법은 일부 단점이 있다. 예로서 동일한 기능을 갖는 유전자가 군(family)으로 존재하여 서로 간에 기능이 중복되는 경우에는 단일 유전자의 기능 상실만으로 표현형이 나타나지 않는 열성 돌연변이를 창출한다. 이러한 단점을 극복하기 위해서 표현형의 변화를 우성으로 확인할 수 있는 활성 표지법(activation tagging)이 개발되었다(Weigel *et al.*, 2000). 활성 표지 선발법은 *CaMV*(cauliflower mosaic virus)로부터 유래한 35S transcriptional enhancer를 식물 게놈에 *Agrobacterium*을 매개로 삽입하여 인접 유전자의 전사를 활성화시켜 기능 획득 돌연변이(gain-of-function mutant)를 생산하는 방법이다(Marsch-martinez *et al.*, 2002, Tani *et al.*, 2004, Jeong *et al.*, 2006). 따라서, *Agrobacterium*을 매개로 활성 표지(activation tagging) T-DNA가 삽입된 돌연변이 집단을 생산하고 환경스트레스 저항성이 증진된 돌연변이체를 분석하여 원인 유전자를 발굴하고 그 기능을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 생육조건

애기장대 식물체의 생태형은 *Col-0*(*Columbia-0*)를 사용하였다. 이틀간의 춘화처리 후 토양 Sunshin Mix 5 (Sungro Horticulture)에 직접 파종하였다. 이후 22℃ 온도, 60%의 습도에서 장일 조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실로 옮겨 재배하였다.

2. *Agrobacterium* 형질전환 및 애기장대 형질전환

기능 활성화 벡터(activation tagging vector)인 pSKI015내에는 형질전환체 선발마커로 제초제저항성을 위한 *bar* 유전자가 포함되어 있다. *bar* 유전자는 글루타민 합성효소의 활성을 저해하는 phosphinotricin (PPT, 또는 glufosinate) 과 bialaphos (phosphinotricyl-alanyl-alanine)에 대한 저항성을 수여하는 phosphinotricin acetyltransferase를 암호화한다. 또한 벡터 내에는 *CaMV*(*cauliflower mosaic virus*) 35S promoter로부터 유래한 *CaMV* 35S transcriptional enhancer 서열 4개가 포함되어 있어 식물 게놈에 삽입되었을 때 인접한 유전자의 전사를 활성화 시켜 기능 획득 돌연변이(gain-of-function mutant)를 생산한다(Marsch-Martinez *et al.*, 2002; Tani *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2006). *bar* 유전자와 35S enhancer에 사이에 존재하는 pUC19 벡터 서열은 대장균의 복제기점과 ampicillin 저항성 유전자를 포함하고 있다. 대장균의 복제기점을 포함하고 있어 genomic DNA에서 회수된 재조합 플라스미드가 대장균에 의해 복제 될 수 있으며, ampicillin 저항성 유전자는 재조합 플라스미드로 형질전환된 대장균을 ampicillin이 첨가된 배지에서 생존하여 선발 될 수 있도록 한다(Fig 1).

기능 활성화 벡터(activation tagging vector)인 pSKI015를 식물체 내로 도입하기 위해, *Agrobacterium tumefaciens* 균주인 GV3101(pMP90RK)에 형질전환 하였다. 벡터 DNA를 *A. tumefaciens* GV3101로 도입하는 방법으로는

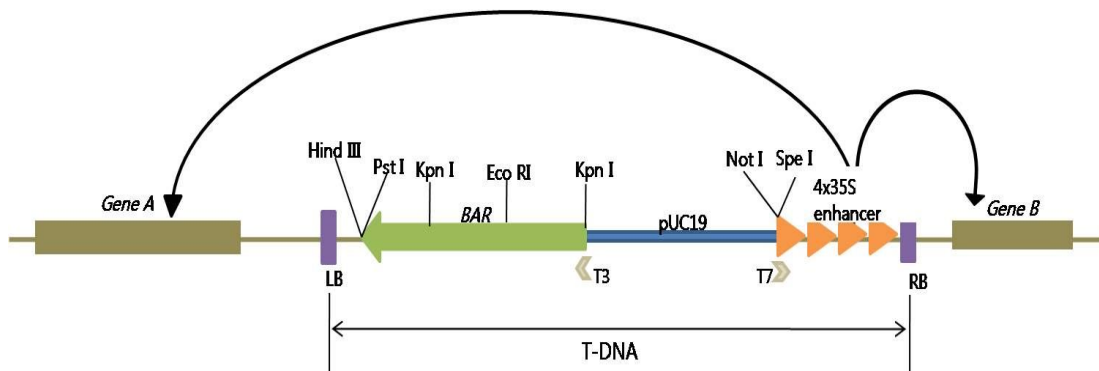


Figure 1. Schematic diagram of activation tagging

Scheme showing principle of activation tagging. T-DNA region of activation tagging vector pSKI015. Restriction enzyme sites in bold indicate limit of T-DNA internal sequences after plasmid rescue. pSKI015 are identical except for the *Kpn I*/*Hind III* fragment that contains the selection marker including promoter and terminator sequences. pUC19 vector is a typical cloning vector consist ampicilline resistance site, and origin of replication.

LB, left border of T-DNA; *BAR*, Basta selection marker; pUC 19, pUC19 sequences; 35S enhancer, *CaMV* 35S enhancer; RB, right varder of T-DNA; T3, T3 RNA polymerase promoter; T7, T7 RNA polymerase promoter.

freeze-thaw 방법을 이용하였다(An *et al.*, 1987)

애기장대의 genomic에 T-DNA 유전자를 도입하기 위해 Floral Dip방법(S. Clough *et al.*, 1998)을 이용하였다. 표 2에서 보이는 바와 같이 형질전환을 위한 애기장대는 22°C, 습도 60%, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실에서 4주 동안 재배하였고, 애기장대에 맺힌 종자들은 제거하여 준비하였다. *A. tumefaciens* GV3101을 YEP 배지 30ml에서 OD₆₀₀ 0.6정도로 배양한 후 원심분리(3000rpm, 20min, 4°C)하여 균을 수집하였다. 수집된 균주는 0.05% (v/v) silwet L-77가 포함된 5% (w/v) Sucrose 용액을 30ml 넣고 재현탁 하였다. 현탁액에 애기장대의 꽃대를 5분간 담근 후 꺼내고, 비닐로 하루에서 이틀간 덮은 후 벗겨내었다. 형질전환 시킨 애기장대는 종자가 다시 맺힐 때까지 배양실에 두어 재배하였고, 성숙된 T1 종자를 수확하였다.

3. 활성 표지 선발법을 통한 저온 저항성 돌연변이체의 선발

이들간 춘화처리한 T1 종자를 토양에 파종하였고 22°C, 습도 60%, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실로 옮겨 재배하였다. 심은 지 1주가 된 T1 식물체에 5.78% (w/v) 의 ammonium glufosinate가 첨가된 흔히 Basta로 알고 있는 Finale solution (AgrEvo, Montvale, NJ)을 1000배 희석시킨 용액을 3주에 걸쳐서 주 2회씩 살포하여 형질전환체를 선발하였다.

저온에 대해 저항성을 갖는 돌연변이체를 선발하기 위해서 선발된 T1 식물체들을 -5°C, 암 조건 하에 48시간 두었다. 이 때, -5°C에서 한 시간 저온 처리 후 얼음 조각들을 화분 위에 뿌렸다. 48시간 후, 저온 처리가 끝난 화분은 다시 정상조건으로 설정된 배양실로 옮겨 2주일간 회복시켰다.

4. 동형접합체(homozygote)의 선발

저온에 대한 저항성을 보이는 T1 돌연변이체로부터 동형접합체를 선발하기 위하여 Basta를 이용하였다. T1 개체별로 수확한 T2 종자들은 이들간 춘화처리 후 토양에 파종하였고 22°C, 습도 60%, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실에서 재배하였다. 심은 지 1주가 된 T2 식물체에 5.78% (w/v) 의 ammonium glufosinate가 첨가된 흔히 Basta로 알고 있는 Finale solution

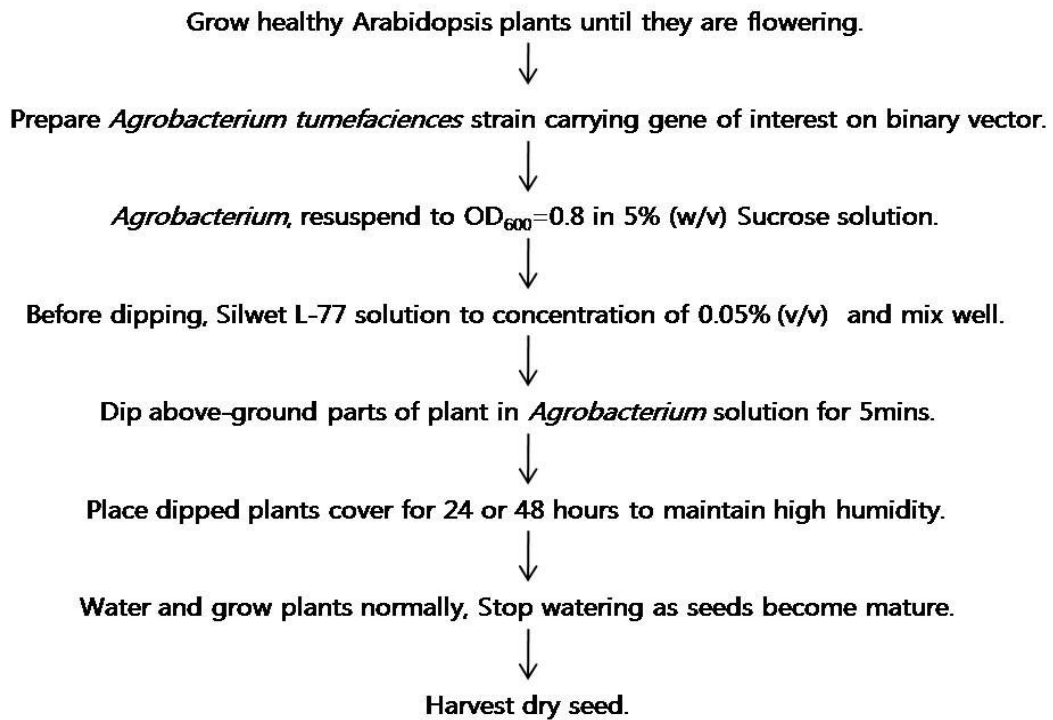


Figure 2. Flow chart illustrating the steps and time regime for the production of transgenic Arabidopsis by floral dip methods.

Flow chart illustrating the steps of floral dip transformation of *Arabidopsis thaliana*(S. Clough *et al.*, 1998).

(AgrEvo, Montvale, NJ)을 1000배 희석시킨 용액을 3주에 걸쳐서 주 2회씩 살포하여 Basta에 저항성을 갖는 개체를 선발하였다. 선발된 T2 개체별로 성숙된 T3 종자를 수확하였다. 각 계통별 T3 종자들은 이틀간 춘화처리 후, 토양에 파종하였고, 배양실에서 재배한 지 1주가 된 T3 식물체에 Basta를 처리하여 동형 접합성의 개체(homozygous plant)를 얻었다.

5. 플라스미드 회수(Plasmid DNA rescue)

저온에 대한 저항성을 보이는 돌연변이체로부터 활성화된 유전자를 동정하기 위해서, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 종자를 Triton-X100이 첨가된 70% 에탄올과 70% 에탄올로 표면 살균 한 후, 필터 페이퍼에 충분히 건조시키고 1/2 MS(Murashige and Skoog) 배지에 파종하였다. 파종 후 22°C, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)에서 배양하였다. 배양한지 12일이 된 돌연변이체로부터 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA 1µg에 EcoR I을 처리하였고 phenol/chloroform 추출법에 의해 DNA 단편을 분리하였다. Ethanol precipitation을 통해 DNA 단편을 농축하였고, 재조합 플라스미드로 제작하기 위하여 T4-DNA ligase를 첨가하고 16°C에서 12시간 이상 반응시켰다. Ligated DNA은 Ethanol precipitation을 이용하여 침전시켰고, 침전된 DNA pellet은 TE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) buffer에 녹였다. 재조합 플라스미드를 대장균에 도입하기 위해서 플라스미드를 TOP10 competent cell (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)와 섞어 37°C에서 15분간 배양한 후 ampicillin(50µg/ml)이 첨가된 LB 고체 배지에 도말하여 ampicillin 저항성 colony를 선발하였다. 선발된 colony은 LB 액체 배지에서 16-24시간 동안 배양한 후 원심분리(13000rpm, 5min, 4°C)하여 균을 수집하였다. 수집된 균으로부터 alkaline lysis 추출법을 이용하여 plasmid DNA을 추출하였다. 추출한 plasmid DNA는 T-DNA 내부에 존재하는 T3 primer (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3')를 사용하여 sequence 분석을 수행하였다.

6. 스트레스 처리

선발된 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 환경스트레스에 대한 표현형을 분석하기 위하여 동형접합체인 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체와 대조구인 야생형 애기장대에 여러 환경스트레스를 처리 한 후, 식물체의 표현형을 관찰하였다.

ftl1-1D/ddf1 돌연변이체에서 저온에 대한 표현형을 보기 위해 대조구인 야생형 애기장대와 동형접합체의 돌연변이체 종자를 이틀간 춘화처리 한 후 토양에 파종하였다. 파종된 화분은 22°C, 습도 60%, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실에 옮겨 재배하였다.

저온에 노출된 경험의 유무에 따른 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 저온 저항성의 표현형을 비교해 보기 위하여 저온에 노출되지 않은 식물체와 4°C, 광 조건하에서 4일간 저온에 노출시킨 식물체를 각기 다른 온도(0, -2, -4, -6, -8, -10, -12°C)에 24시간동안 두었다. 화분을 다시 22°C 온도, 장일 조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실에 옮겨 일주일간 회복시켰다. 배양실로 옮긴 지 일주일 이 지났을 때 화분 내에서 생존한 개체의 수를 측정하여 생존율을 계산한 후 그래프화 하였다.

가뭄 스트레스에 따른 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 표현형을 관찰하기 위해 다음과 같이 실험을 수행하였다. 대조구인 야생형 애기장대와 동형접합체의 돌연변이체 종자를 이틀간 춘화처리 한 후 토양에 파종하였고, 22°C, 습도 60%, 장일 조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실에 옮겨 재배하였다. 토양에 심은 지 4주된 식물체에 12일간 물을 공급하지 않는 방법으로 건조시킨 후, 화분에 물을 다시 공급하였다.

고온 스트레스는 토양에 심은 지 4주가 된 식물체를 50°C, 다습한 조건(습도 90%)하에서 17시간 두어 처리하였다. 처리 후 화분은 정상 조건인 22°C 온도, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실에 옮겨 회복시켰다.

기내 (*in vivo*) 배양한 식물체를 사용하여 고온에 따른 표현형을 관찰하기 위해서 다음과 같이 실험을 수행하였다. 애기장대 종자는 0.03% (v/v) Triton-X100가 포함된 70% (v/v) 에탄올을 사용하여 종자의 표면을 멸균하였고, 70% (v/v) 에탄올을 사용하여 종자의 표면에 묻은 Triton-X100을 제거하였다. 필터페이퍼 위에 종자들을 올려놓아 충분히 건조 시키고 1/2 MS 고체 배지

에 과중하였다. 이틀간 춘화처리 한 후, 22℃, 습도 60%, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실에 옮겨 배양하였다. 배양한지 12일 된 식물체를 45℃, 다습한 조건(습도 90%)하에 두고 노출 시간(0, 10, 20, 30, 40, 50, 60min)을 달리 하였다. 처리가 끝난 식물체는 다시 22℃, 습도 60%, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)의 배양실로 옮겨 회복시켰으며, 일주일 후 화분 내에 생존한 개체의 수를 측정하여 생존율을 계산 한 후 그래프로 나타내었다.

7. 지베렐린(GA₃) 처리

대조구인 야생형 애기장대와 동형접합체인 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 종자를 이틀간 춘화처리하고 토양에 과중하였다. 과중한 화분은 22℃, 습도 60%, 장일 조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실에 옮겨 재배하였다. 심은 지 4주가 되었을 때, GA₃ 처리구는 10⁻⁶M 농도의 GA₃을 식물체의 잎에 살포하였고, GA₃ 미 처리구는 동량의 물을 식물체의 잎에 살포하였다. GA₃을 처리한 식물체를 저온, 고온, 가뭄 스트레스에 노출 시키고 식물체의 표현형을 관찰하였다.

저온 스트레스는 저온에 노출된 경험의 유무에 따른 표현형의 변화를 보기 위하여 4℃, 광 조건 하에서 4일간 저온에 노출시킨 처리구와 저온에 노출시키지 않은 미처리구로 나누어 진행하였다. 저온 순화 처리 후, 식물체를 각기 다른 온도(0, -2, -4, -6, -8, -10, -12℃)에 24시간동안 두어 스트레스를 처리하였다. 처리가 끝난 화분들은 다시 22℃, 습도 60%, 장일 조건(낮 16시간, 밤 8시간)의 배양실에 옮겨 두고 회복시켰다. 옮긴 지 일주일 후, 화분 내에 생존한 개체들의 수를 측정하여 생존율을 계산한 후 그래프로 나타내었다.

가뭄 스트레스는 식물체에 12일 동안 물을 공급하지 않았고, 건조 처리가 끝난 화분은 다시 충분한 물을 공급하며 회복시켰다. 화분 내에 생존한 개체들의 수를 측정하고 생존율을 계산한 후 그래프화 하였다.

고온 스트레스는 식물체를 50℃, 다습한 조건(습도 90%)하에서 17시간 두어 처리한 후, 정상 조건인 22℃, 습도 60%, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)의 배양실에 옮겨 두고 회복시켰다.

8. 수분 손실(water loss) 및 전해질 침출(ion leakage) 분석

가뭄과 고온 스트레스에 대한 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 표현형을 정량적으로 분석하기 위하여, 가뭄 스트레스에 대한 수분 손실(water loss)와 고온 스트레스에 대한 전해질 침출(electro leakage)을 측정하였다.

가뭄 스트레스에 대한 수분 손실을 측정하기 위해서 다음과 같이 실험을 수행하였다. 대조구인 야생형 애기장대와 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 종자를 이틀간 춘화처리를 한 후 토양에 파종하였다. 파종한 화분은 22°C, 습도 60%, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실에 옮겨 재배하였다. 토양에 심은 지 4주가 된 식물체의 rosettes를 뿌리와 분리시켰다. 분리된 각 식물체들의 rosette은 건조된 Whatman 3MM paper에 올려두고 22°C, 60%, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)의 배양실에 두어 건조시켰고, 일정 시간간격(0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240, 300분)로 식물체의 생체중량을 측정하였다. 수분 손실률은 초기 생체중량에 대한 시간 별 생체중량을 백분율로 계산하고 상대적인 수분 손실률을 그래프로 나타내었다.

ftl1-1D/ddf1 돌연변이체에서 고온 스트레스에 따른 세포 손상 정도를 분석하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다. 돌연변이체와 대조구인 야생형 애기장대 종자들을 Triton-X100이 첨가된 70% (v/v) 에탄올과 70% (v/v) 에탄올로 표면 살균 한 후, 필터 페이퍼에 충분히 건조시키고 1/2 MS 배지에 파종하였다. 파종 후 22°C, 습도 60%, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)에서 10일 동안 배양하였고, 45°C의 고온에서 일정 시간 간격(0, 10, 20, 30, 40, 50, 60min)로 식물체의 잎을 샘플링하여 전해질 침출을 측정하였다. 전해질 침출은 EC Meter CM-21P conductivity meter(Aanalyticon, Springfield, NJ, USA)를 사용하여 측정하였다. 고온 스트레스를 처리한 각 샘플들에 6ml의 증류수를 넣고 1시간동안 교반을 한 후, 용액의 전해질 침출(e1)을 측정하였다. 용액에서 잎만 꺼내어 -80°C에 보관하여 얼리는 과정을 통해 모든 세포를 손상시킨 후, e1을 측정했던 용액을 다시 넣고 1시간 더 교반하여 용액의 전해질 침출(e2)을 측정하였다. e1에 대한 e2의 백분율을 계산한 후 상대적인 전해질 침출율을 그래프로 나타내었다.

9. RNA 분리

각 실험구의 샘플들이 해동되지 않도록 액체 질소를 넣어 가며 완전한 분말 형태가 될 때까지 분쇄하였다. 식물체를 1.5ml pestle로 완전히 마쇄한 후 1ml의 Trizol(Introvitrogen Life Technologies, USA)을 넣고 균질화시킨 후 상온에서 15분간 보관하였다. Trizol에 녹지 않는 조직을 제거하기 위해 현탁액을 상온에서 12,000x g로 5분간 원심분리 후 상등액을 새로운 튜브로 옮겨 담았다. 이후 cell lysis를 유도하기 위해 전체의 1/5부피의 chloroform(200ul)을 첨가한 후 손으로 15초간 격렬하게 흔들어준 후 상온에서 10분간 보관하였다. Phenol/chloroform 층을 현탁액과 분리하기 위해 4°C, 12,000x g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 새 튜브로 옮겨 담았다. RNA pellet은 상등액과 동일 부피의 isopropanol을 첨가하여 상온에서 10분간 보관한 다음 4°C, 12,000x g에서 10분간 원심분리하여 얻었다. 얻어진 RNA pellet을 75 % (v/v) 에탄올로 1회 세척 한 후 0.1% DEPC 수용액에 녹여 UV spectrometer에서 정량하였다.

10. cDNA 합성

순수 분리된 total RNA로부터 cDNA 합성은 Reverse Transcription system (Promega)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 시행하였다. 먼저 1 μ g의 total RNA에 0.5 μ g의 oligo dT primer을 첨가 한 후, RNA의 이차구조를 제거하기 위하여 70°C에서 5분간 보관하였다. 이차구조로 재형성되지 않도록 ice에 두고 tube 벽면에 묻어 있는 용액들을 spin down을 통하여 tube 바닥으로 오도록 하였다.

전 처리된 RNA에 cDNA 합성을 위해 반응 전체 부피가 25 μ l가 되도록 M-MLV 5X reaction buffer 5 μ l, dNTP(10mM) 5 μ l, Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor 25units, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) 200units를 넣고 42°C 1시간 동안 반응 시켰다. 합성된 cDNA는 -20°C에서 보관하였다.

11. 야생형 애기장대 스트레스 처리 및 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현분석

야생형 애기장대 종자를 Triton-X100이 첨가된 70% (v/v) 에탄올과 70%

(v/v) 에탄올로 표면 살균 한 후, 필터 페이퍼에 충분히 건조시키고 1/2 MS 배지에 파종하였다. 파종 후 배지는 온도, 습도, 광 조건을 각각 22°C, 60%, 16시간으로 조절되는 배양실에 옮겨 배양하였다. 야생형 애기장대에 저온, 고온, 가뭄, 염 스트레스를 처리하였다.

저온 스트레스는 배양한지 2주가 된 식물체들을 4°C, 광 조건 하에 두어 스트레스를 처리하였다. 고온 스트레스는 배양한 지 12일된 식물체들을 45°C, 광 조건 하에 배양하는데 이 때, 습도를 90%로 두어 가뭄 스트레스 조건을 최소화시켰다. 가뭄 스트레스는 1/2 MS 배지에서 배양한 지 2주가 된 식물체를 뿌리가 다치지 않게 조심스럽게 꺼내어 물기가 없는 Whatman 3MM paper에 올려두고 22°C, 습도 60%, 흐린 빛 조건에 두는 방법으로 처리하였다. 염 스트레스를 처리하기 위해서 1/2 MS 배지에서 2주 정도 자란 식물체를 250mM NaCl 용액에 뿌리가 잠기도록 담가 두었다(Magome *et al.*, 2004).

여러 스트레스 조건에서 시간별(0, 2, 4, 8, 24시간)로 식물체를 샘플링하고 -80°C에 보관하였다. 보관해 두었던 샘플은 Trizol(Introvitrogen Life Technologies, USA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후 *DDF1* 유전자 특이적인 서열로 디자인된 primer(Table 1)로 real-time PCR을 수행하여 유전자의 발현양상을 확인하였다. PCR 산물들은 1.2% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였다.

12. 식물체에서의 스트레스 관련 유전자들의 발현분석

야생형 애기장대와 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체 간의 스트레스 관련 유전자들의 발현양상을 비교하기 위하여, 애기장대 종자를 Triton-X100이 첨가된 70% (v/v) 에탄올과 70% (v/v) 에탄올로 표면 살균 후, 필터페이퍼 위에서 건조시켜 1/2 MS 배지 위에 파종하였다. 파종 후 온도, 습도, 광 조건이 각각 22°C, 60%, 16시간으로 조절되는 배양실에 옮겨 배양하였다. 파종 후 2주 된 식물체를 샘플링 하여 -80°C에 보관하였다. 보관해 두었던 샘플들은 액체질소를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 샘플들은 Trizol(Introvitrogen Life Technologies, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였고, 스트레스 관련 유전자 특이적인 서열로 디자인된 primer(Table 1)들로 real-time PCR을 수행하였다. 야생형에서의 발현량을 기준으로 각 유전자별 상대적인 발현정도를 그래프로 나타내었다.

Table 1. Primers used in this study.

Target gene	Primer name	Sequence(5'→3')	Remarks
DDF1	JK107	ATGAATAATGATGATATTATTCTGGC	RT-PCR
	JK108	TTAATATCTGTAACTCCACAATGAC	
Tubulin	JK11	CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA	RT-PCR
	JK12	TCACCTTCTTCATCCGCAGTT	
DDF1	JK109	GATGATGTGGATTTGGGTTTTGGT	Real time PCR
	JK110	CATCATCGTCGTTGAGACTTCTTVCG	
ELF1a	JK223	TTGCTCCACAGGATTGACCACTG	RT-PCR(Achard <i>et al.</i> , 2008)
	JK224	TCACTTCGCACCCTTCTTGACG	
KIN1	JK131	GAGACCAACAAGAATGCCTTCCAAG	Real time PCR
	JK132	CCGCATCCGATACACTCTTTCCC	
RAB18	JK133	GAGGGAGGAGGAAGAAGGGAATAAC	Real time PCR
	JK134	ACCGTAGCCACCAGCATCATATC	
COR15A	JK119	CACAGCGGAGCCAAGCAGAG	Real time PCR
	JK120	GTTGAGAAACGACGACGAACTGAG	
COR15B	JK121	GATGACCTCAACGAAGCCACAAAG	Real time PCR
	JK122	TTTCTCGCCATCCGCAAGG	
RD29A	JK117	GTGCGACGGAGGAGGTGAAG	Real time PCR
	JK118	GGAACAACAGTGGAGCCAAGTG	
CBF1	JK111	AAGTGAGAGAGCCAAACAAGAAAACC	Real time PCR
	JK112	GTAGCCGCCAAGCCGAGTC	
CBF2	JK113	TCTGAAATGTTTGGCTCCGATTACG	Real time PCR
	JK114	TCCTTCCCGCTGGTTTCTTGG	
CBF3	JK115	TCTGAAATGTTTGGCTCCGATTACG	Real time PCR
	JK116	TCCGACGAACTCCTCTGTATATTGG	

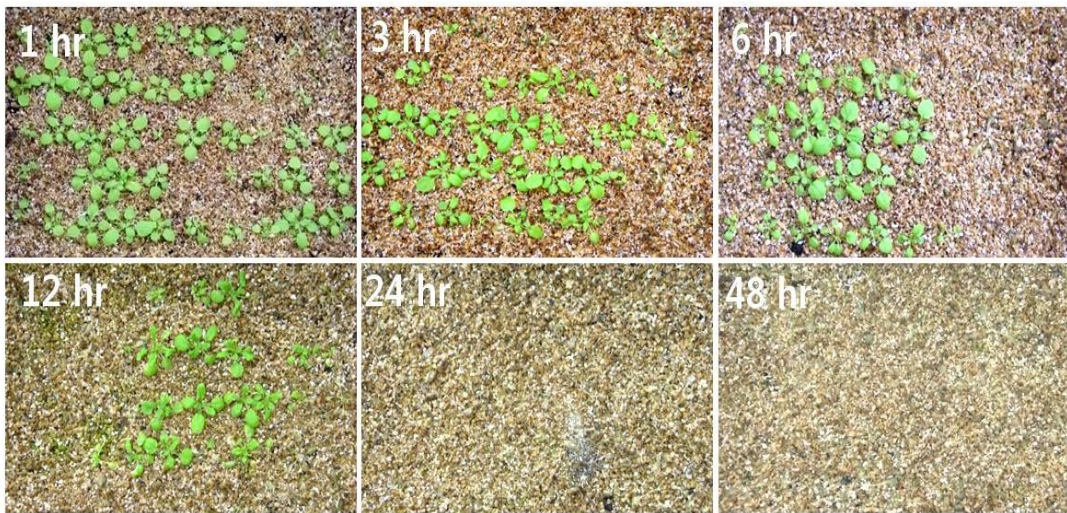
III. 결과 및 고찰

1. 저온 처리 시간에 따른 야생형 애기장대의 표현형

야생형 애기장대가 저온에 노출되었을 때 어떠한 반응을 하는지 알아보기 위해서 저온에 따른 야생형 애기장대의 표현형을 관찰하였다. 기존의 참고 문헌을 통하여, 야생형 애기장대를 -5°C 로 설정된 생장실에 두어 저온에 노출시켰다 (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). 저온에 저항성을 갖는 돌연변이체를 선발하기 위한 저온 처리 조건을 설정하기 위하여, 동일한 조건에서 키운 야생형 애기장대를 각기 다른 시간(1, 3, 6, 12, 24, 36, 48hr) 동안 저온에 노출시켰다. 저온 처리가 끝난 화분은 다시 정상적인 생장 조건으로 설정된 배양실로 옮겨 식물체의 표현형을 관찰하고, 생존율을 분석하였다.

배양실로 옮긴 지 4일이 지나자 식물체의 생존 가능성을 육안으로 판별할 수 있었다. 저온에 노출된 시간이 길수록 생존하는 식물체의 개체수가 눈의 띄게 감소하는 것으로 나타났다. 그림 3a에 보는 것처럼 야생형 애기장대는 -5°C 에서 24시간 이상의 저온에 노출되었을 때, 모든 식물체들이 고사하였다. 생존율로 나타내었을 때(Fig. 3b) -5°C 에서 6시간 동안 저온에 노출된 화분에서 약 50%의 개체가 고사하였고, 24시간 이상 노출된 경우에는 모든 개체가 고사하였다. 이러한 결과를 토대로, 저온에 저항성을 갖는 돌연변이체를 선발하기 위한 저온 스트레스 조건은 -5°C 에서 48시간동안 처리하는 것으로 설정하고 추후 실험을 진행하였다. 이와 유사하게 -5°C 에서 2일간 저온에 노출시켰을 때 야생형 애기장대가 모두 고사한다고 알려졌다(Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). 또한 -6°C 에서 1시간동안 저온에 노출되었을 때도 위의 결과와 동일하게 식물체가 고사함을 확인하였다 (Zhu *et al.*, 2005). 이처럼 기존에 보고된 애기장대에서의 저온 스트레스에 관련된 실험을 확인하였을 때 저온 처리로 설정된 온도와 처리 시간이 다른 것을 볼 수 있었다. 이러한 이유로는 처리 온도가 더 낮아질수록 식물체가 받는 스트레스의 정도가 커진다고 알려져 있으며(E. Ruelland *et al.*, 2009), 처리 시간도 저온에 노출된 길어짐에 따라 식물체의 스트레스 정도가 클 것으로 사료된다.

(a)



(b)

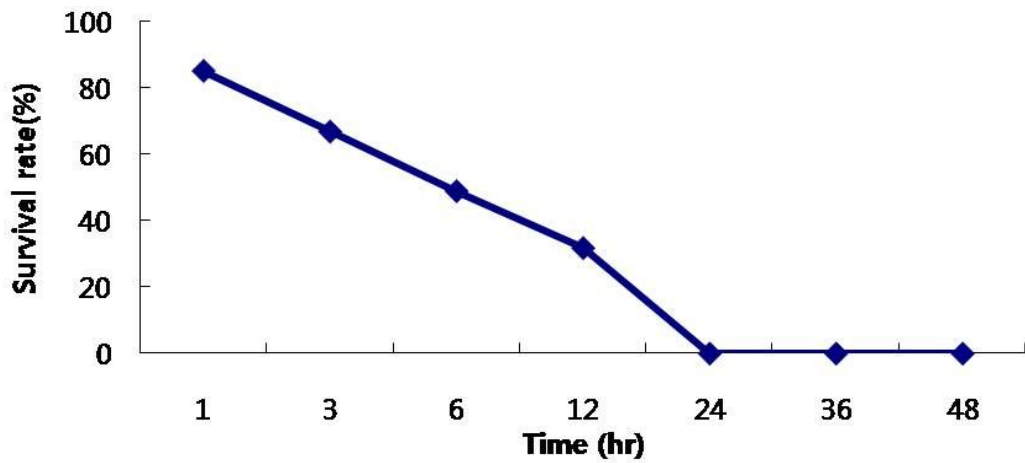


Figure 3. Effect of freezing stress on wild type plants according to exposed time.

(a) Photograph analysis of wild type plants under freezing stress at indicated time. Plants were exposed to -5°C for 1, 3, 6, 12, 24, 48h, respectively and photographed 7d after return to normal growth condition (b) Survival rate of wild type under -5°C at each time.

2. 화분 내 토양 높이에 따른 야생형 애기장대의 표현형

화분에 심은 애기장대에 저온을 처리하였을 때, 화분의 토양 높이에 따라서 식물체가 받는 저온 스트레스 정도가 다른지 확인하고자 동일한 화분 내에 4cm, 8cm로 토양 높이를 다르게 하고 야생형 애기장대의 종자를 파종하였다. 22℃, 습도 60%, 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)으로 설정된 배양실에서 3주간 재배한 후, -5℃, 암 조건 하에서 48시간동안 저온에 노출시켰다. 저온 처리가 끝난 화분은 다시 정상적인 성장 조건의 배양실에 옮겨 회복시키며 식물체의 표현형을 관찰하였다.

배양실로 옮긴 지 4일 후 식물의 생존 유무를 육안으로 판별할 수 있었으며, 그림 4.에서 보이는 바와 같이 배양실로 옮긴 지 7일이 지나자 토양 높이가 다른 두 화분의 모든 식물체가 고사하였다. 이러한 결과를 통하여, 화분의 토양 높이가 -5℃, 48시간의 저온 처리 조건에는 큰 차이를 주지 않는다는 것을 확인하였다. 그러나 화분 내 토양 높이의 차이가 토양 내 수분과 양분의 함량으로 인하여 식물체의 생육에 영향을 미칠 수 있으므로, 추후에 실험 과정에서 화분의 토양 높이는 8cm로 동일하게 맞추었다.

(a)

(b)

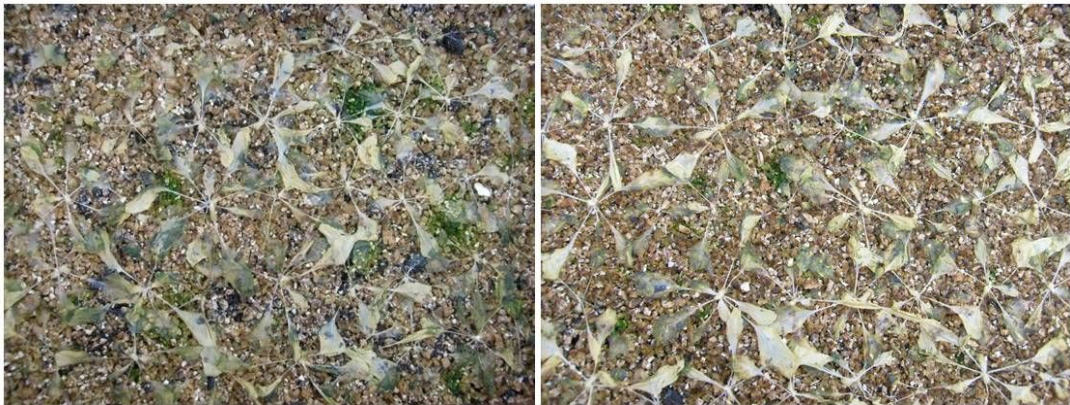


Figure 4. Effect of freezing stress on wild type plants according to soil height

Plants had first been grown in soil for 3 weeks with watering, then incubated for 48h at -5°C . Each plants was exposed to -5°C for 48h, and photographed 7d after return to normal growing conditions.

(a) Plants had been grown in soil 4cm height. (b) Plants had been grown in soil 8cm height.

3. 활성 표지 선발법을 통한 저온 저항성 돌연변이체 선발

일반적으로 목적하는 표현형을 갖는 돌연변이체로부터 원인 유전자를 동정하는 전통적 순유전학 분석방법은 생물학적 과정에 연관된 유전자의 기능을 밝히는데 효과적인 방법으로 알려졌다. 따라서 이러한 방법을 활용하기 위해서 우선적으로 *Agrobacterium*을 매개로 무작위적인 돌연변이 집단 제작이 필요하였다. 모델 식물인 애기장대의 경우, 계놈 내 유전자로 T-DNA가 삽입되어 발현을 억제시킨 기능 손실 돌연변이체 집단이 있다(<http://signal.salk.edu/about.html>).

기능 손실 돌연변이체는 동일한 기능을 갖는 유전자군이 있게 되면 단일 유전자의 기능 상실로는 표현형이 나타나지 않는다. 따라서 본 실험은 이러한 단점을 보완하기 위해서 개발된 활성 표지 선발법을 이용하였다. 활성 표지 선발법은 CaMV로부터 유래한 35S enhancer element를 식물 계놈 내로 도입시켜 기능 획득 돌연변이체를 생산하는 방법이다(Marsch-Matinez *et al.*, 2002, Tani *et al.*, 2004, Jeong *et al.*, 2006). 따라서 활성 표지 선발법을 이용하여 기능 획득 돌연변이 집단을 생산하기 위해, 기능 활성화 벡터로 형질전환된 *Agrobacterium*을 매개로 활성 표지 T-DNA를 애기장대 내로 도입시켰다. 이러한 방법으로 얻은 T1 종자들을 토양에 파종하였고, 1주가 된 T1 식물체들에서 T-DNA가 삽입된 형질전환체를 선발하기 위해 비선택성 제초제인 Basta를 처리하였다. 활성 표지 T-DNA 내에는 식물 선발 마커로 *bar* 유전자가 포함되어 있다(Fig. 1). 따라서, Basta에 저항성을 갖는 개체는 활성 표지 T-DNA가 삽입된 기능 활성화 돌연변이체들이다. 최근까지 애기장대와 벼에서 활성 표지 선발법을 이용하여 돌연변이 집단을 대량 생산하였다(Weigel *et al.*, 2000, Jeong *et al.*, 2002, Jeong *et al.*, 2006).

Basta로 선발된 돌연변이체들을 저온에 노출시켜 저온에 저항성을 보이는 개체들을 육안으로 선발하였다. 그 결과, 약 80,000개의 T1 종자를 토양에 파종하여 스크리닝 하였고, 이 중 약 22개체가 저온에 저항성을 보였다. 이러한 돌연변이체를 Freezing tolerance lines(FTLs)으로 명명하였다. 22개체 중 17개체들은 저온에 강한 저항성을 보였고, 나머지 5개체는 약한 저항성을 보였다. 그림 5.에 보이는 바와 같이, 선발된 저온에 저항성을 갖는 개체들은 정상적인 성장 조건의 배양실에서 건강하게 성장을 계속 유지하였다.



Figure 5. Growth characteristics of the selected T1 freezing tolerant lines (FTLs).

Each panel shows selected freezing tolerant lines (FTLs) from an Arabidopsis activation tagging pool. Plants had first been grown for 1 week with watering, then sprayed Basta for selecting transgenic plants. Selected plants maintained with watering additional 2 weeks and incubated for 48h in -5°C chamber. Then return to normal growing conditions.

4. 기능 획득 돌연변이 *ftl1-1D*의 표현형 및 특성 분석

앞서 실험을 통해 선발된 저온에 저항성을 보이는 T1 돌연변이체 중, 짙은 녹색, 왜성, 개화 지연의 표현형을 보인 돌연변이체를 *freezing tolerant line1-1Dominant(ftl1-1D)*로 명명하였다(Fig. 6 a, b). *ftl1-1D* 돌연변이체의 T-DNA insertion copy 수를 확인하기 위하여 토양에 심은 지 1주 된 T2 식물체에 Basta를 처리하였다. T-DNA 내부에 식물 선발 마커인 *bar* 유전자가 있어 분석할 수 있었다(Fig. 1). 그 결과, T2 식물체 중 Basta에 저항성을 갖는 식물체는 246개체, 민감성을 보이는 식물체는 79개체로, Basta에 민감한 식물체와 Basta에 저항성을 갖는 식물체의 비율이 각각 1과 3.1이었다. 또한, Basta에 대한 저항성을 보였던 개체들이 T1 돌연변이체와 동일한 표현형을 보였으며, 이와 유사하게 기능 활성화 돌연변이체에서 돌연변이체의 표현형과 Basta에 대한 저항성을 동시에 갖는다는 것을 확인된 바 있다(Weigel *et al.*, 2000). 이러한 결과를 통하여, Basta에 대한 저항성과 돌연변이체의 표현형이 cosegregation됨을 확인하였다. 이러한 결과는 *ftl1-1D* 돌연변이체가 single copy의 T-DNA가 삽입된 우성 돌연변이체임을 의미한다. *ftl1-1D* 돌연변이체의 동형접합체를 선발하기 위해 Basta를 이용하여 선발하였다. Basta에 저항성을 보였던 T2 식물체 개체별로 T3 종자를 수확하여 여러 계통의 T3 종자를 얻었다. 다시 각 계통별로 T3 종자를 토양에 파종하고 Basta를 처리하였을 때, 모든 식물체가 Basta에 저항성을 보이는 특정 계통만 선발하여 동형접합체를 얻었다.

ftl1-1D 돌연변이체에서 삽입된 T-DNA 내부에 있는 35S enhancer에 의해 활성화된 유전자를 동정하기 위해, 플라스미드 회수(plasmid DNA rescue)기법을 이용하여 삽입된 T-DNA 근처의 genomic DNA를 회수하였다. 회수된 genomic DNA의 서열을 분석하고 GenBank에 등재된 애기장대의 게놈 서열을 검색하여 해당 genomic DNA의 정보를 얻을 수 있었다. 그 결과, 돌연변이체 내에 삽입된 T-DNA에 인접 유전자는 총 3개로 확인하였다(Fig. 6c). 인접 유전자 중 35S enhancer element에 의해서 전사 활성이 증가된 유전자를 분석하고자, 야생형 애기장대와 *ftl1-1D* 돌연변이체에서의 인접 유전자 별 발현 차이를 분석하였다. 그림 6.d에서 보듯이, internal control로 tubulin을 사용하여 야생형과 돌연변이체에서 동일한 수준으로 발현함을 확인하였다. *AT1G12620*과

AT1G12600 유전자는 야생형과 돌연변이체에서 별다른 차이가 없었지만, *AT1G12610* 유전자의 경우, 야생형에 비하여 돌연변이체에서 발현이 높아졌다 (Fig. 6d). 따라서, *ft1-1D* 돌연변이체는 *AT1G12610*(*Dwarf and delayed flowering 1, DDF1*) 유전자의 전사를 활성화 시켜 저온에 대한 저항성을 갖게 되었다고 생각되며(Fig. 6d), 이러한 유전자를 *Freezing-Tolerance Line1(FTL1)*으로 명명하였다. *FTL1/DDF1* 유전자는 APETALA2/ethylene-responsive element binding factor (AP2/ERF)의 CBF/DREB1 subfamily에 속하는 전사인자를 암호화함을 확인하였다. AP2/ERF family는 식물에 특이적인 전사인자로 알려져 있으며, 크게 네 가지의 subfamily로 나누어졌다(Saleh A. and M. Pagés *et al.*, 2003).

또한, 35S promoter에 의해서 *FTL1/DDF1* 유전자를 과발현시킨 애기장대의 표현형이 *ft1-1D* 돌연변이체와 동일함을 확인하였다(Magome *et al.*, 2004). 따라서, *FTL1/DDF1* 유전자에 의해서 짙은 녹색, 왜성, 개화 지연의 표현형을 갖는 다는 것을 확인하였다.

DDF1 유전자는 GA 생합성과 연관되어 있으며, *DDF1* 과발현체는 GA 결핍 돌연변이체와 유사한 표현형을 갖는다(Magome *et al.*, 2004). 또한, *DDF1* 유전자는 전사인자를 암호화하고 저온에 대한 저항성을 조절하는 상위 유전자원인 *CBF* 유전자들과 높은 상동성을 보이지만(Magome *et al.*, 2004), *DDF1* 유전자와 저온 저항성간의 관계에 대한 연구는 보고된 바 없다. 따라서, *DDF1* 유전자가 *CBF* 유전자들과 유사하게 저온에 대한 저항성과 관련된 기능을 할 것으로 기대할 수 있다.

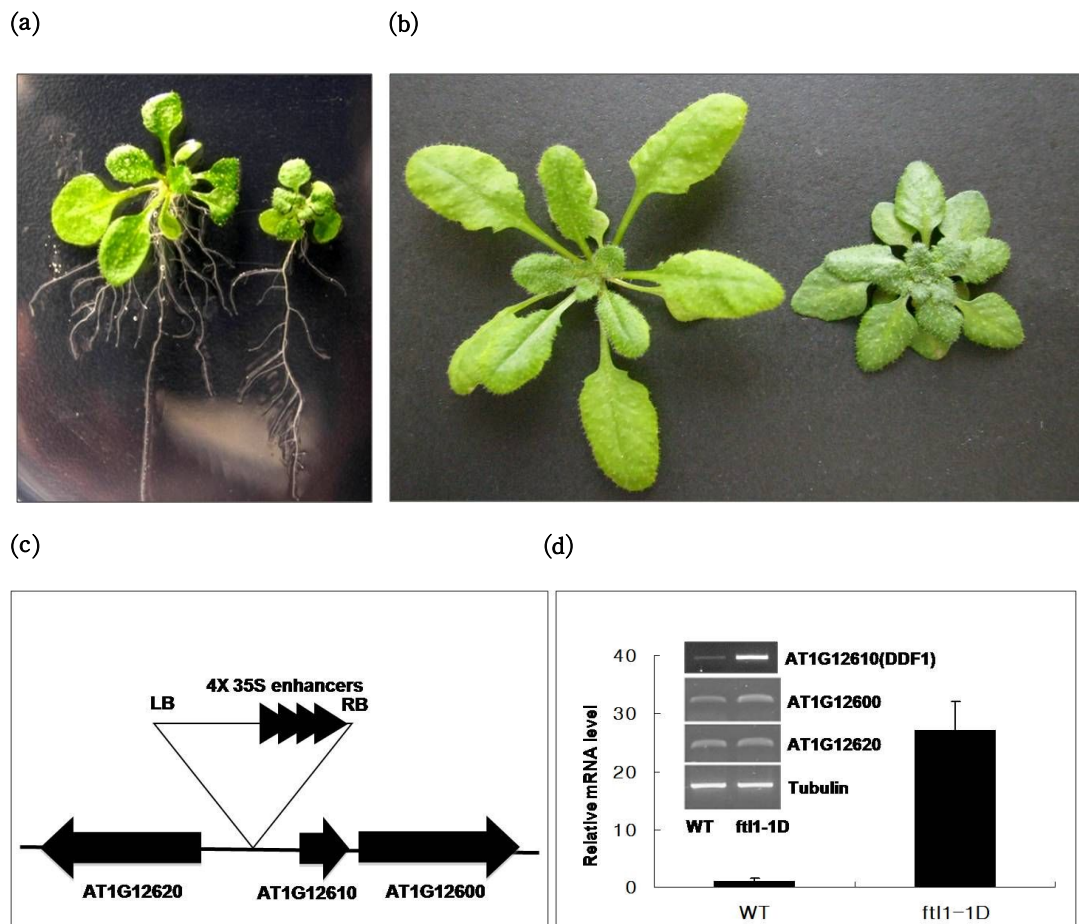


Figure 6. Characterization of gain-of-function mutant of *ftl1-1D*

(a)–(b) Each panel shows WT(left) and *ftl1-1D*(right) plants. Growth characterization of *ftl1-1D* mutant compared with WT. (c) The T-DNA insertion locus in *ftl1-1D* indicated by triangle. (d) Expression of *FTL1/DDF1* gene in 10-day-old WT and *ftl1-1D* mutants. Tubulin was used as a internal control.

5. *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 저온 저항성 표현형

선발된 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 저온에 대한 저항성의 표현형을 좀 더 자세히 분석하고자, T3 세대를 거쳐 선발된 동형접합성의 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체를 저온에 노출시켰고 이에 따른 표현형을 살펴보았다. 대조구인 야생형 애기장대와 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체를 동일한 조건에서 키웠다. 과중한 지 3주가 된 식물체들을 -5°C , 암조건 하에서 24시간 두어 저온에 노출시킨 후 다시 정상적인 생장 조건의 배양실로 옮겨 식물체를 회복시키며 표현형을 관찰하였다. 배양실로 옮긴 지 4일 후부터 식물체의 생존 여부를 육안으로 판별할 수 있었다. 돌연변이체는 일주일 후 모두 회복되었으나 야생형 애기장대는 모두 고사하였다 (Fig. 7a-b). 이 실험을 통하여, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체가 야생형 애기장대보다 저온에 대한 저항성이 강함을 확인하였다. 이러한 결과는 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 활성화된 *FTL1/DDF1* 유전자가 저온 스트레스에 대한 저항성과 관련된 기능을 갖는다는 것을 의미한다. 이와 유사하게 *FTL1/DDF1* 유전자과 높은 상동성을 보였던 *CBF1* 유전자는 애기장대에서 과발현시켰을 때, 저온에 대해 저항성을 표현을 보였다(Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). 동일한 family에 속하는 *DREB1B/CBF1*, *DREB1A/CBF3* 유전자를 애기장대에서 과발현시켰을 때, 저온, 가뭄, 고염에 대한 저항을 갖는다고 알려져 있으며(Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1998, Kasuga *et al.*, 1999), 벼에서부터 유래된 *OsDREB1A* 유전자를 과발현시킨 애기장대에서도 저온, 고염, 가뭄에 대한 저항성을 확인하였다(Dubouzed *et al.*, 2003, Ito *et al.*, 2006). 이외에도 동일한 subfamily에 속하는 *CBFs* 유전자를 애기장대에서 과발현시킨 결과, 저온에 대한 저항성을 보였으며, 저온에 노출됨에 따라 발현이 증가된다고 알려졌다(for reviews, see Q. Liu *et al.*, 1998; S.J. Gilmour *et al.*, 1998; Z.K. Shinwari *et al.*, 1998). 따라서 저온에 의해 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현이 유도될 것으로 기대된다.

(a)



(b)

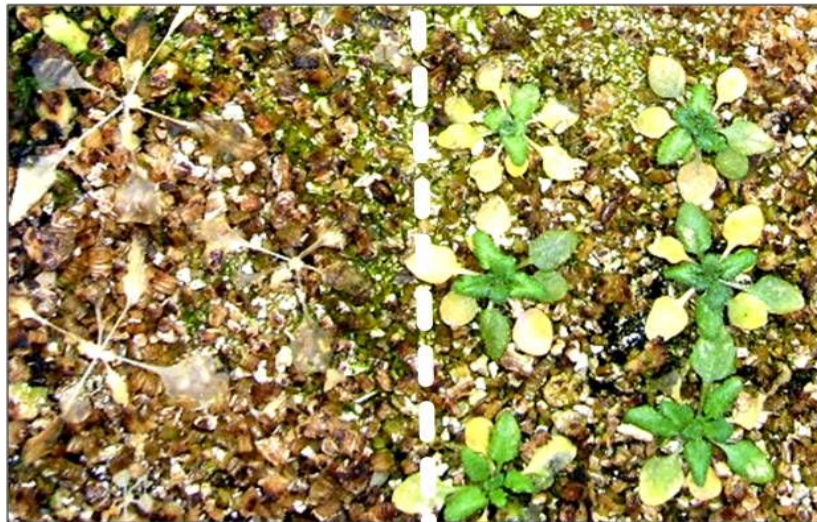


Figure 7. Response of *ft11-1D/ddf1* mutants to freezing stress.

(a)-(b) Each panel show WT(left) and *ft11-1D*(right) plants had grown in soil for 3 weeks(a), then incubated for 24h at -5°C (b).

6. 저온 처리 시간에 따른 상대적인 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현양상

저온에 대해 *FTL1/DDF1* 유전자가 반응을 하는지, 반응을 한다면 어떠한 패턴으로 발현을 보이는지 알아보기 위하여 야생형 애기장대를 식물체가 얼지 않는 낮은 온도에 노출시키고 시간별로 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현 패턴을 보았다.

그림 8에서 보이는 바와 같이 야생형 애기장대에 저온을 처리하였을 때, 4시간이 될 때까지 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현이 점차 증가하였다. 저온 처리 4시간 이후에는 점차 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현이 감소하였지만, 그 발현 수준이 저온 처리 전에 비하여 높음을 확인하였다. 이 결과를 통하여, *FTL1/DDF1* 유전자가 저온에 의해서 발현이 유도됨을 확인하였다. 이러한 결과는 *FTL1/DDF1* 유전자와 같은 family에 속하는 *DREB1/CBFs* 유전자에서도 유사한 결과가 보고된 바 있다. 애기장대에서 유래한 *AtDREB1* 유전자는 4°C에 노출된 지 10분이 지나자 발현이 유도되는 것을 확인할 수 있었으며(Liu *et al.*, 1998), *CBF* 유전자들도 동일한 온도에서 30분일 때부터 발현이 증가되더니 처리한 지 1시간이 되자 최고의 발현양을 볼 수 있었다(Medina *et al.*, 1999). 이외에도 *DREB1A/CBF3*, *DREB1B/CBF1*, *DREB1C/CBF2* 유전자는 애기장대에서 저온에서 유도가 된다고 알려졌다(for reviews, see Q, Liu *et al.*, 1998; S.J. Gilmour *et al.*, 1998; Z.K. Shinwari *et al.*, 1998).

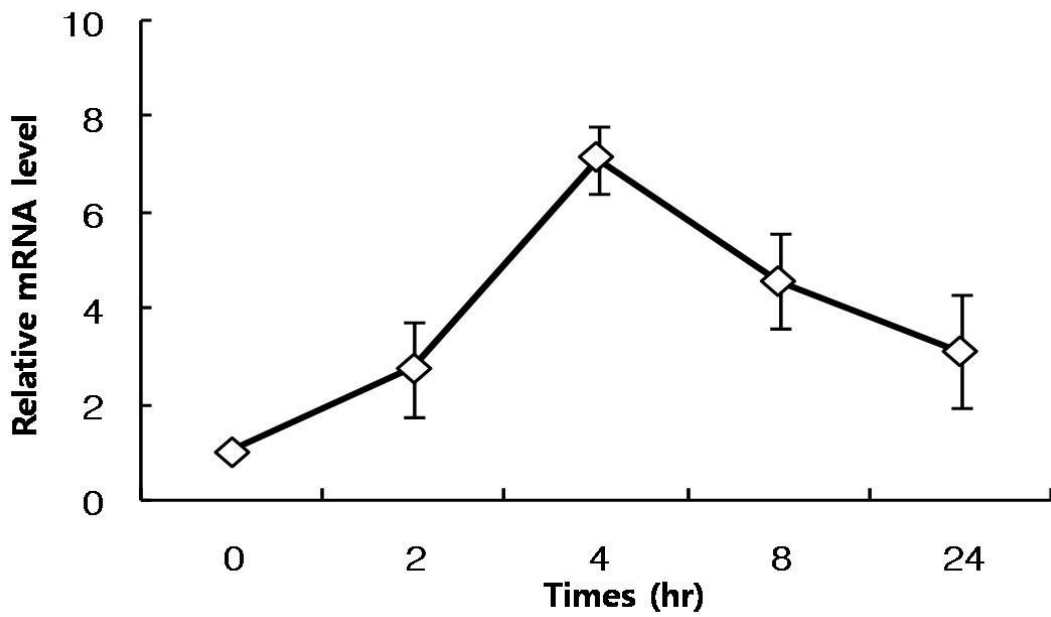


Figure 8. Expression of *FTL1/DDF1* at low temperature

Real-time PCR analysis was used to determine transcript abundance in 12-day-old plants following expose to cold stress for the times indicated. Each values indicates relative quantities with the non-treated sample (0h) set at 1.0.

7. 저온 순화(cold-acclimation) 처리에 따른 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 저온 저항성 표현형

얼지 않는 낮은 온도에 노출되었던 식물체(cold-acclimation)들은 노출되지 않았던 식물체(non-acclimation)에 비해서 저온 저항성이 증가된다고 알려졌다(Kirsten *et al.*, 1998). *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체가 저온 순화에 의해 저온에 대한 저항성이 얼마나 증가하는지 확인하기 위하여, 동일한 조건에서 키운 야생형 애기장대와 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체를 저온 순화 처리구와 미 처리구로 나누고, 저온 스트레스를 처리하였다.

스트레스 처리가 끝난 화분은 다시 정상적인 성장 조건의 배양실에 옮겨 회복을 시키며 표현형을 관찰하였다. 그 결과, 저온 순화 처리구의 야생형 애기장대는 -8°C 저온에서 0% 생존율을 보이는 반면에, 미 처리구의 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체는 동일한 온도에서 20%의 생존율을 보였다(Fig. 9). 이러한 결과로, 저온 순화 처리구의 야생형 애기장대보다 미 처리구의 돌연변이체가 저온에 대한 저항성이 강함을 확인하였다. 저온 순화 처리에 따른 야생형 애기장대의 생존율을 살펴보면, 미처리구의 야생형은 -6°C 에서 0%가 생존하였고 처리구는 약 60%가 생존하였다(Fig. 9). *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 경우는 -10°C 에서 저온 순화 미처리구의 돌연변이체는 0%, 처리구의 생존율이 80%의 생존율로 야생형과 돌연변이체 모두에서 저온 순화에 의하여 저온에 대한 저항성이 증가했음을 알 수 있었다(Fig. 9). 따라서 저온 순화 처리구의 야생형보다 미처리구의 돌연변이체가 더 강한 저항성을 보였고, 저온 순화 처리로 인하여 야생형 애기장대와 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 모두 저온에 대한 저항성이 증가하였다.

식물이 얼지 않는 낮은 온도(cold-acclimation)에 노출되면 저온에 대한 저항성에 관련된 대사 물질의 변화나 경로에 관련된 효소의 변화, 유전자의 발현 변화로 저항성의 표현형이 증가된다(Kirsten *et al.*, 1998). 따라서 위 결과는 저온 순화 처리를 통하여 저온에 대한 저항성에 관련된 생화학 반응이나 경로에 관련된 효소, 대사물질, 유전자의 발현 등의 변화로, 야생형과 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 모두 저온 순화 미처리에 비하여 저항에 대한 저항성이 증가하였다고 생각된다.

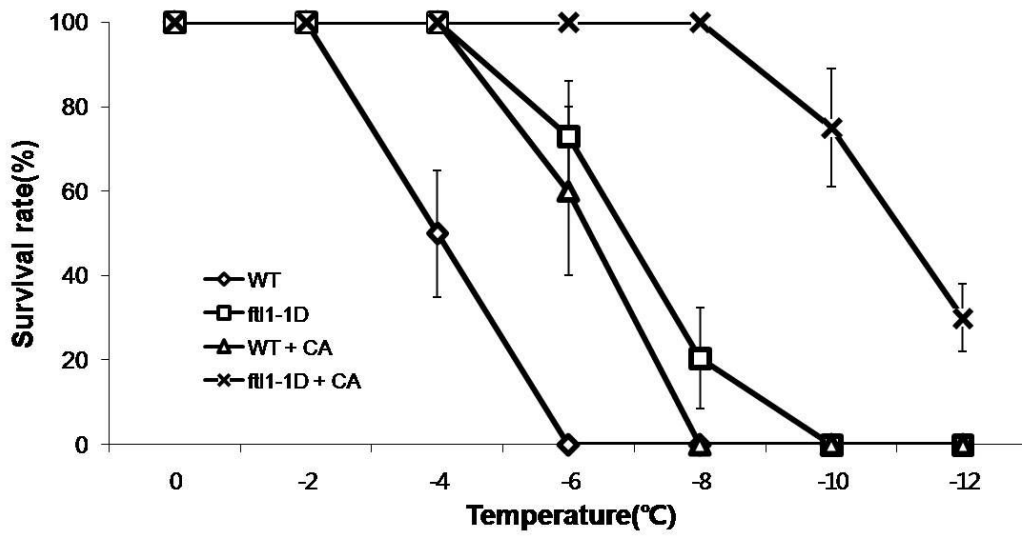


Figure 9. Enhanced freezing-tolerance of *ft11-1D/ddf1* mutants by cold-acclimation(CA).

Survival of WT and *ft11-1D/ddf1* plants without or with cold acclimation at low temperatures. Cold acclimation was induced for 4d at 4°C under continued light. 3-weeks-old plants exposed freezing stress for 24h at indicated temperature, then returned to normal growth condition.

8. GA₃ 처리에 따른 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 저온 저항성 표현형

GA 생합성과 관련이 있다고 알려진 *DDF1* 유전자를 애기장대에서 과발현 시켰을 때, 야생형보다 활성형의 GA가 적은 GA 결핍 돌연변이체와 유사한 짙은 녹색, 왜성, 만기 개화의 표현형을 보인다. 또한, *DDF1* 과발현체는 염 스트레스에 대한 저항성의 표현형을 갖는다고 알려져 있다. 그러나 *DDF1* 과발현체가 활성형의 GA에 노출되면, 야생형과 동일한 표현형으로 복구되고 과발현체의 염 스트레스에 대한 저항성의 표현형도 야생형과 동일한 수준으로 감소된다고 알려졌다(Magome and colleagues *et al.*, 2004). 따라서 활성형의 GA를 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에 노출시키게 되면, 저온에 대한 저항성의 표현형에도 변화를 줄 것으로 생각하였고, GA₃을 처리에 따른 돌연변이체의 저온에 대한 저항성의 표현형을 관찰하였다.

대조구인 야생형 애기장대와 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체를 동일한 조건에서 키웠고, GA₃ 처리구는 10⁻⁶M 농도의 GA₃을 식물체의 잎에 살포하였으며, 미 처리구에는 GA₃을 제외한 물을 식물체의 잎에 살포하였다. 또한, 저온 순화 처리에 의해 증가되었던 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 저온에 대한 저항성도 GA₃로 인하여 변하는지 확인해 보고자, GA₃ 처리구와 미 처리구를 각각 저온 순화 처리구와 미 처리구로 나누어 저온에 대한 표현형을 살펴보았다. 그 결과, GA₃ 처리로 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 GA₃ 미 처리한 돌연변이체보다 생존율이 현저하게 감소하였다(Fig. 10b). 특히, 저온 순화 처리한 돌연변이체의 경우, -8°C에서 100%의 생존율을 보였던 GA₃ 미 처리구(Fig. 10a)와 비교하여 GA₃ 처리구에서는 동일한 온도에서 약 50%의 생존율로 감소하였다(Fig. 10b). 이러한 결과를 통하여, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 저온에 대한 저항성이 GA₃ 처리로 인하여 감소하는 것을 확인하였고, 저온 스트레스에 대한 저항성과 GA의 생합성 경로가 연관되어 있음을 예측할 수 있다. 실제로, *DDF1* 유전자와 상동성이 높은 *CBF1* 유전자를 매개로 이루어지는 저온에 대한 저항성 메커니즘이 GA 생합성 경로와 상호 연관성(crosstalk)을 갖는다고 알려졌으며(Achard *et al.*, 2008), *DDF1* 유전자를 매개로 한 염 스트레스에 대한 저항성 메커니즘에서도 GA 생합성 경로와 상호 연관성이 있을 것으로 예측하고 있다(Magome and colleagues *et al.*, 2008).

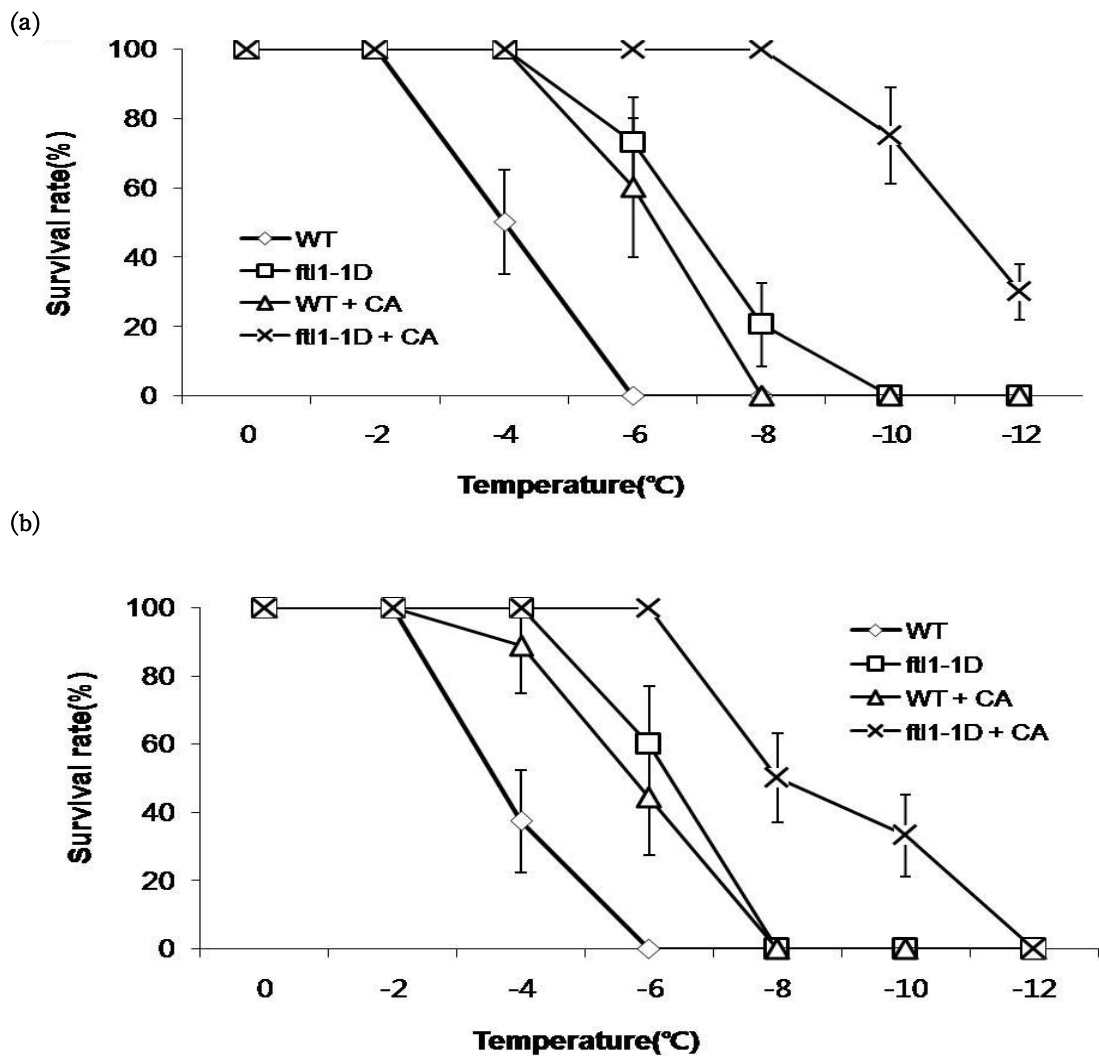


Figure 10. Response of *ft11-1D/ddf1* mutant to freezing stress with GA treatment.

Plants had first grown for 4-week-old plants with GA₃ treatment or without, then exposed freezing stress for 24h at indicated temperature, then returned to normal growth condition.

(a) Survival of WT and *ft11-1D/ddf1* plants without or with cold acclimation at low temperatures without GA treatment. Cold acclimation was induced for 4d at 4°C under continued light. (b) Survival of WT and *ft11-1D/ddf1* plants without or with cold acclimation at low temperatures in GA treated plants. Cold acclimation was induced for 4d at 4°C under continued light.

9. *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 고온 저항성 표현형

앞선 실험을 통하여, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체가 저온에 대해 저항성을 갖는다는 것을 확인하였고, *DDF1* 과발현체가 염 스트레스에 대한 높은 저항성을 갖는다는 것을 이미 보고되었다(Magome *et al.*, 2008). 따라서, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체가 여러 환경스트레스에 대해서 저항성을 가질 것으로 예상되었다. *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체과 야생형 애기장대를 동일한 조건에서 키운 후 고온에 노출시키고 그 표현형을 살펴보았다.

우선, 12일간 1/2 MS 배지에서 기내(*in vivo*) 배양된 식물체에 고온 스트레스를 처리하여 저항성의 표현형을 관찰하였다. 기내 배양한 식물체를 45°C, 습도 90% 로 설정된 성장실에서 두고 각기 다른 시간(0, 10, 20, 30, 40, 50, 60min)동안 고온 스트레스에 노출 시킨 후, 다시 정상적인 성장 조건의 배양실에서 두고 회복시켰다. 배양실로 옮긴 후 4일이 지나자 식물체의 생존 판별이 육안으로 가능하였고, 일주일 후 생존한 식물의 개체수를 세어 고온 처리 시간에 따른 식물체의 생존율을 계산한 후 그래프로 나타내었다. 그 결과, 그림 11a-g 에서 보이는 것처럼, 야생형 애기장대는 30분간 고온을 처리한 경우 잎이 누렇게 변하였지만 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서는 동일한 고온 처리 시간에 녹기를 좀 더 유지하는 것을 볼 수 있었다. 생존율을 살펴보면, 30분간 고온을 처리하였을 때 야생형 애기장대의 생존율이 0%인데 반하여 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체는 100%의 생존율을 보였고, 돌연변이체는 고온 처리 시간이 60분이 되어야 0%의 생존율을 나타냈다(Fig. 11h). 이와 유사한 결과는 *FTL1/DDF1* 유전자와 동일한 AP2 전사인자의 DREB subfamily에 속하는 유전자를 과발현 시킨 애기장대에서 환경스트레스에 대한 저항성을 보인다고 알려져 있다(K. Nakashima, *et al.*, 2000, Q. Liu, *et al.*, 1998, Y. Sakuma, *et al.*, 2002, Y. Sakuma, *et al.*, 2006b) 특히 DREB2 subgroup에 속하는 *DREB2A* 유전자를 과발현 시킨 애기장대에서 고온 저항성을 보았고, 고온에 반응하는 하위 유전자의 발현을 유도시켜 고온에 대해 저항성이 증가됨을 확인하였다(Y. Sakuma, *et al.*, 2006b).

식물이 과도한 스트레스를 받게 되면 식물체 내에서 산소가 반응성이 높은 독성의 활성산소종(ROS : Reactive Oxygen Species)으로 변하게 된다(Allen *et al.*, 1995). 이러한 점을 착안하여, 고온 스트레스 처리 후 식물체에서 발생하는

활성산소종을 전해질 침출량으로 측정하였다. 기내 배양한 식물체를 45°C, 습도 90%로 설정된 생장실에서 각기 다른 시간(0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240min)동안 고온 스트레스에 노출 시킨 후, 식물의 잎에서 전해질 침출량을 측정하였다. 그 결과, 야생형 애기장대의 전해질 침출율을 나타낸 그래프에 비해 돌연변이체의 그래프가 완만한 것을 확인할 수 있다(Fig. 11i). 그림 11i에서 보이는 바와 같이 고온 처리 시간별 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 침출율이 야생형보다 낮았다. 스트레스를 받은 식물체는 활성산소종을 생성하고 체내에 활성산소종이 과도하게 축적되면 세포 사멸을 일으키며, 이러한 과정을 전해질 침출을 통하여 확인하였다(Allen *et al.*, 1995). 따라서 위의 결과는 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체가 야생형보다 고온 스트레스로 인한 세포 손상이 적음을 의미한다. 이와 같이 전해질 침출법을 통하여 환경스트레스에 의한 식물체의 저항성을 비교한 사례는 다양한 스트레스 관련 유전자의 기능 분석 연구에서 수행된 바 있다(for reviews, see; Campos *et al.*, 2003).

ftl1-1D/ddf1 돌연변이체의 고온에 대한 저항성의 표현형이 GA₃ 처리에 의해서 감소하는지 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 토양에서 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체와 대조구인 야생형 애기장대 종자를 과종하고 정상적인 생장 조건의 배양실에서 4주 동안 키웠다. GA₃ 처리구는 10⁻⁶M 농도의 GA₃을 식물체의 잎에 살포하였고, GA₃ 미 처리구는 GA₃가 제외한 동량의 물을 식물체의 잎에 살포하였다. 고온 스트레스는 50°C에 처리하였고 이 때 습도를 90%로 설정하여 가뭄 스트레스에 대한 조건을 최소화시켰으며, 스트레스 처리 후 정상적인 생장 조건의 배양실에 옮겨 회복시켰다. 그 결과, 그림 12b,d에서 보이는 것처럼 고온 스트레스로 인하여 야생형 애기장대는 회복되지 못하였고 GA₃ 처리 하지 않은 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체는 회복하는 것을 확인하였다. 그러나 GA₃를 처리한 돌연변이체에서는 야생형과 유사하게 잎이 마르고 회복하지 못하였다(Fig. 12d). 이 결과로, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체가 고온에 대한 저항성을 나타내고, GA₃ 처리에 의해 고온에 대한 저항성이 야생형 수준으로 감소하는 것을 확인하였다. 애기장대에서 GA₃ 처리에 의해 발현이 유도되는 유전자 그룹 중 일부가 고온에 대한 저항성을 보인다는 보고가 있다(C. B. Ko *et al.*, 2007). 따라서, GA가 고온에 대한 저항성 메커니즘에 연관이 있을 것으로 예측된다.

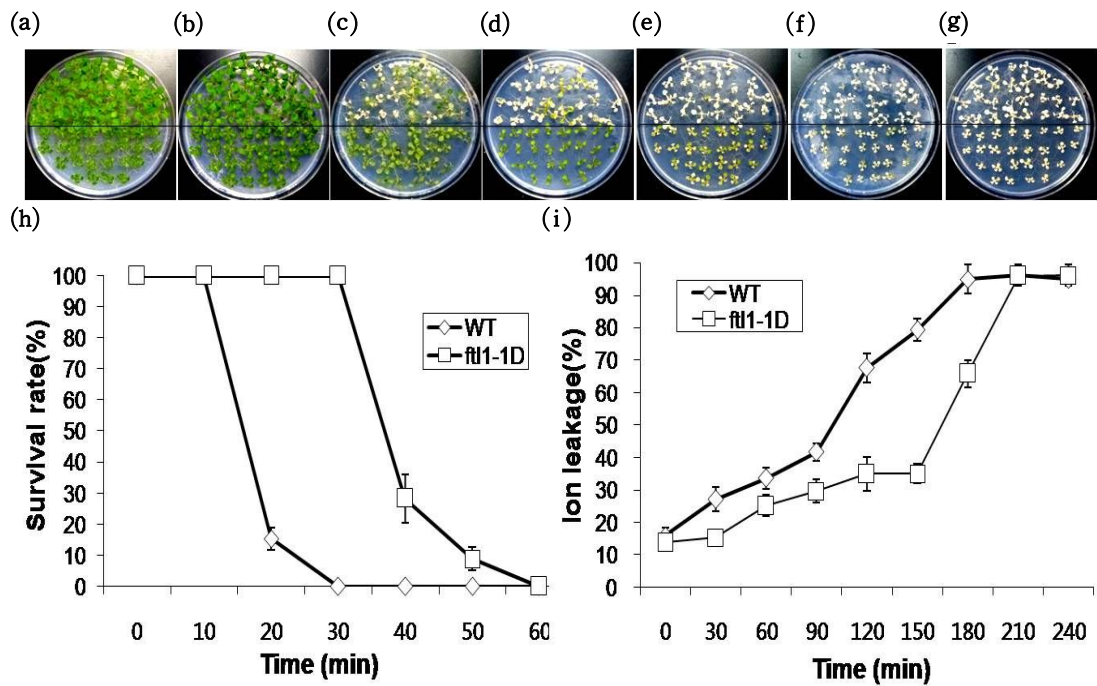


Figure 11. Response of *ftl1-1D/ddf1* mutant to heat stress at seedling stage.

(a)–(g) Each panel shows WT(upper) and *ftl1-1D/ddf1*(lower) plants at seedling stage on MS media. Plants were exposed to 45°C for 0, 20, 30, 40, 50, 60min, respectively and photographed 7d after return to normal growth condition. (h) Survival rate of WT and *ftl1-1D/ddf1* plants under heat stress. Plants at seedling stage on MS media, then exposed heat stress to 45°C at indicated time, then returned to normal growth condition. (i) Ion leakage of WT and *ftl1-1D/ddf1* plants under heat stress. Plants at seedling stage on MS media, then exposed heat stress to 45°C at indicated time, then returned to normal growth condition.



Figure 12. Response of *ftl1-1D/ddf1* mutant to heat stress.

(a)–(d) Each panel shows WT(left) and *ftl1-1D/ddf1*(right) plants. Plants had grown for 4 weeks in soil without(a,b) or with(c,d) GA treatment, then incubated at 50°C for 7d(b,d) after return to normal growth condition.

10. *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 가뭄 저항성 표현형

앞서 실험을 통하여, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체가 저온, 고온에 대한 저항성이 야생형 애기장대보다 높음을 확인하였다. 또 다른 환경스트레스인 가뭄 스트레스에 대한 저항성이 있을 것으로 예측 할 수 있어 스트레스 처리에 따른 식물체의 표현형을 조사하였다. 동일한 조건에서 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체와 야생형 애기장대를 키우고 가뭄 스트레스를 처리 한 후, 표현형을 관찰하였다. 또한, GA₃ 처리에 따라 가뭄에 대한 저항성에는 어떠한 변화를 일으키는지 살펴 보았다. 동일한 조건에서 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체와 야생형 애기장대를 4주간 키우고, 12일간 물을 주지 않는 방법으로 건조 스트레스를 처리하였다. 다시 물을 관수하여 회복기를 두며 식물체의 표현형을 관찰하였다. 그 결과, 그림 13a,b에서 보이는 것처럼 야생형 애기장대는 다시 관수한 지 일주일도 지나도 회복하지 못하고 고사하였으며, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체는 회복하는 것을 볼 수 있었다. 회복 시간이 길어지자 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체는 정상적인 성장을 계속적으로 유지하였다. 이 결과로, 가뭄 스트레스에 대해서 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체가 야생형 애기장대보다 저항성이 강함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 *FTL1/DDF1* 유전자와 동일한 DREB family에 속하는 *DREB1s/CBFs* 유전자를 과발현 시킨 애기장대에서 유사한 결과를 보았다(K. Nakashima, *et al.*, 2000, Y. Sakuma, *et al.*, 2006a, Y. Sakuma, *et al.*, 2006b). 이러한 유전자의 하위에서 스트레스에 반응을 하는 유전자를 발현시켜 가뭄에 대한 저항성을 보였다(V. Haake. *et al.*, 2002, Y. Sakuma *et al.*, 2006a). 이외에도 애기장대에서 *DREB2A* 유전자(Y. Sakuma, *et al.*, 2006b), *DREB1A* 유전자(Kasuga *et al.*, 1999)를 과발현시켰을 때, 가뭄에 대한 저항성이 증가하였다.

앞에서 수행한 실험과 같이, GA₃ 처리에 의해서 가뭄에 대한 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 저항성이 야생형 애기장대 수준으로 감소하는지 보기 위하여, GA₃ 처리구와 미 처리구에서 스트레스에 따른 식물체의 표현형을 관찰하였으며, 식물의 수분 손실률을 측정하였다. 동일한 조건에서 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체와 야생형 애기장대를 4주간 키우고, 식물체의 잎에 10⁻⁶M 농도의 GA₃를 살포하였다. 건조 스트레스는 12일간 물을 주지 않는 방법으로 처리하였고, 다시 물을 관수하여 회복기를 두면서 식물체의 표현형을 관찰하였다. 회복한 지 4일

이 지나도 GA₃를 처리한 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체는 야생형 애기장대와 유사하게 잎이 마르고 회복되지 못하였으며, 일주일 후에는 그러한 변화가 더 확연하게 드러났다(Fig. 13c,d).

가뭄 스트레스에 대한 저항성을 정량적으로 분석하기 위하여 동일한 조건에서 키운 야생형 애기장대와 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 잎에 GA₃를 살포한 GA₃ 처리구와 GA₃ 미 처리구로 나누었다. 뿌리가 제거된 rosette을 건조된 필터 페이퍼 위에 올려놓고, 정상적인 성장조건의 배양실에 두어 각 시간(0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240, 300min)별로 생 체중을 측정하고 수분 손실율을 계산하였다. 그 결과, 야생형 애기장대는 GA₃ 처리 유무에 의해 수분 손실율이 거의 차이가 없는 반면에 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 경우에는 GA₃ 미 처리구에 비하여 GA₃ 처리구에서 수분 손실율이 높아졌다(Fig. 13e). 이와 유사하게 가뭄에 대한 저항성을 갖는 경우 스트레스 조건에서 야생형보다 수분 손실율이 감소할 의미한다(Hsiao *et al.*, 1973). 따라서, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체가 가뭄에 대하여 야생형 애기장대보다 저항성이 강하며, GA₃ 처리에 의해서 저항성이 야생형 수준으로 감소함을 확인하였다.

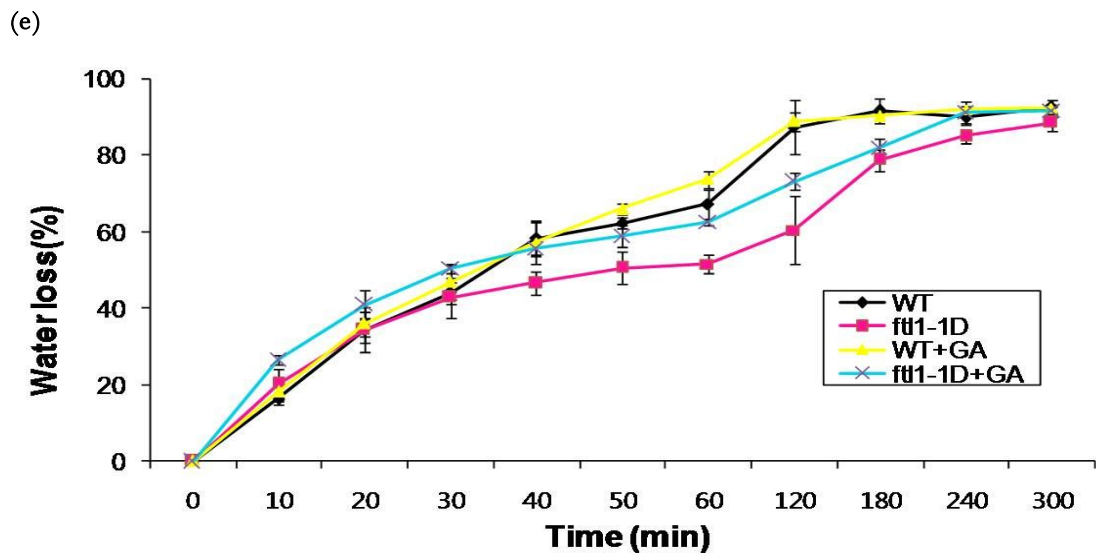
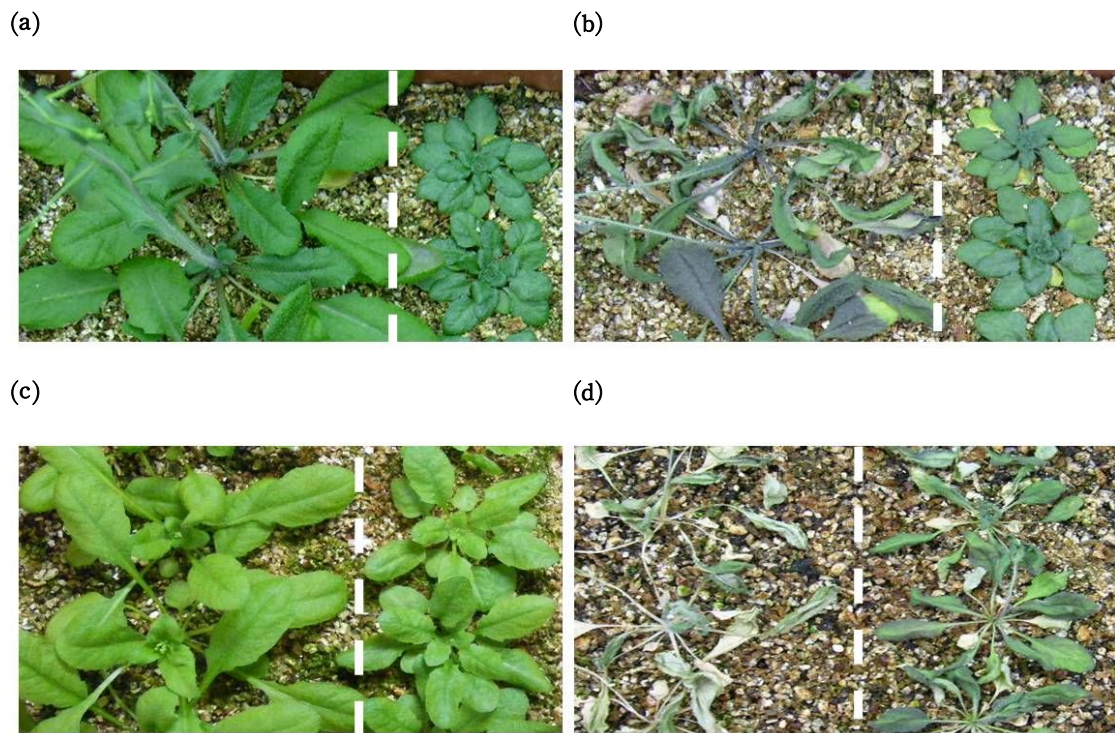


Figure 13. Response of *ftl1-1D/ddf1* mutant under drought stress.

(a)–(d) Each panel shows WT(left) and *ftl1-1D/ddf1*(right) plants without(a,b) or with GA treatment(c,d). Plants grown for 4 weeks in soil with watering, then stopped watering for additional 12d. (e) Water-loss-analysis of WT and *ftl1-1D/ddf1* plants without or with GA treatment.

11. 환경스트레스 처리에 따른 야생형 애기장대 내 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현 양상

FTL1/DDF1 유전자가 염 스트레스(high salinity) 하에서 강하게 발현된다고 보고 된 바 있으며(Magome *et al.*, 2004), 앞서 실험을 통하여 식물이 낮은 온도에 노출되었을 때 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현이 유도됨을 확인하였다. 이와 유사하게 식물이 고온과 가뭄에 노출되면 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현이 유도될 것으로 예상된다. 따라서 환경스트레스에 따른 유전자의 발현 양상을 분석하기 위해서 애기장대를 1/2 MS 배지에 야생형 과종하여 키운 후 2주가 된 식물체에 저온, 고온, 가뭄, 염 스트레스를 각기 다른 시간(0, 2, 4, 8, 24hr)별로 처리하였다. 스트레스를 처리한 식물체로부터 total RNA를 추출하고 real-time PCR을 이용하여 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현 양상을 시간별로 살펴보았다. 그 결과, *FTL1/DDF1* 유전자는 각 스트레스 별로 다른 발현 양상을 보였다(Fig. 14a-d). 저온을 처리한 지 4시간이 지나자, *FTL1/DDF1* 유전자의 발현이 스트레스 처리 전보다 7배 증가하였다가 점차적으로 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 14b). 그림 14b에서 보이는 바와 같이 가뭄을 처리하자마자 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현이 급격하게 증가하였으며, 다른 스트레스 처리구에 비하여 증가된 발현양이 매우 높았다. 고온을 처리하였을 때, 서서히 발현이 증가하였고 처리 후 4시간이 지나자 발현이 더 이상 증가하지 않고 유지되었다(Fig. 14c). 식물이 염에 노출되었을 때에는 그림 14d에 보이는 것처럼 처리하자마자 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현이 급격히 증가하였으나 처리 후 2시간 이후에는 발현이 조금씩 줄어드는 것을 확인하였다. 이러한 결과로, 식물체에 처리한 스트레스에 따라 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현량과 시간 별 발현 양상은 각기 다르지만 저온, 고온, 가뭄, 염 스트레스에 의해서 유전자가 발현하는 것을 확인하였다. 이와 유사한 결과로, *FTL1/DDF1* 유전자와 동일한 DREB subfamily에 속하는 *DREB2A*와 *DREB2B* 유전자가 저온뿐만 아니라 가뭄, 염, 고온에 의해 발현이 증가됨을 확인하였다 (for reviews, see Q, Liu *et al.*, 1998; K. Nakasthima *et al.*, 2000; Y. Sakuma *et al.*, 2006). 이는 *FTL1/DDF1* 유전자가 비생물학적 또는 환경스트레스에 대한 식물의 저항성 메커니즘에 관련된 유전자임을 암시하는 것이다.

실제로, 저온에 의해서 발현이 증가된다고 알려진 *CBF1* 유전자가 암호화하는 전사인자가 저온 스트레스에 대한 저항성 메커니즘에 관련하여 조절자로서 역할

을 수행한다고 알려졌으며(Anchard *et al.*, 2008), *FTL1/DDF1* 유전자가 염 스트레스에 대한 식물의 저항성 메카니즘에서 중요한 조절자로서 역할을 수행할 것으로 예측하고 있다(Magome *et al.*, 2008). 따라서 본 실험을 통하여, *FTL1/DDF1* 유전자가 염 뿐만 아니라 저온, 고온, 가뭄에 대한 저항성 메카니즘에 관련된 유전자로 예측된다.

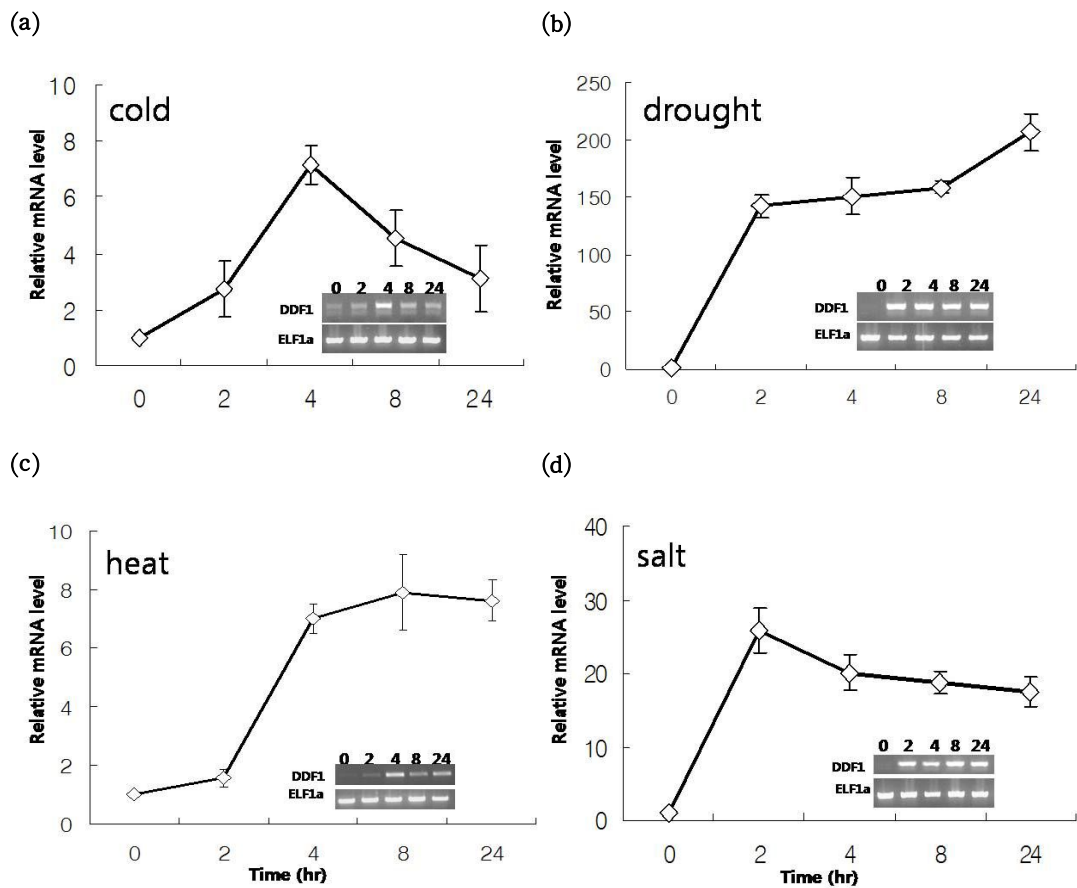


Figure 14. Expression levels of *FTL1/DDF1* under abiotic stresses.

Time course of transcript levels under abiotic stress. Wild type plants at seedling stage were exposed cold(a), drought(b), heat(c), salt(d) stress at indicated time. Each values indicates relative quantities with the non-treated sample (0h) set at 1.0. *ELF1a* was used as a internal control(Anchard *et al.*, 2008).

12. *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체 내 스트레스 관련 유전자들의 발현 양상

FTL1/DDF1 유전자와 높은 상동성을 보이는 *CBF* 유전자가 암호화 하는 *CBF/DREB1* 전사인자는 저온에 대한 식물의 저항성 메카니즘에서 중요한 조절자로 작용하며, 이들에 의해서 조절이 되는 하위 유전자들(*CBF regulons*)은 스트레스에 반응하는 유전자들로 알려져 있다. 대표적인 예로는 *COLD-REGULATED 15A(COR15A)*, *RESPONSIVE TO DESSICATION 29A(RD 29A)*, *RESPONSIVE TO ABA 18(RAB 18)*, *KIN*, *COLD-REGULATED 15B(COR15B)*이 있다(Anchard *et al.*, 2008).

FTL1/DDF1 유전자가 저온에 대한 식물의 저항성 메카니즘에 연관 있는지 확인해 보고자, 야생형 애기장대와 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 *CBF* 유전자군 (*CBFs*)와 *CBF/DREB1* 전사인자에 의해 조절되는 유전자(*CBF regulons*)들의 상대적인 발현양상을 살펴보았다. 그 결과, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 과발현된 *FTL1/DDF1* 유전자의 발현 수준에 비하여 *CBFs* 유전자들은 야생형 애기장대와 큰 발현 차이는 없었지만, *CBF/DREB1* 전사인자에 의해 조절되는 유전자들(*CBF regulons*)인 *COR15A*, *RD 29A*, *RAB 18*, *KIN*, *COR 15B* 유전자는 야생형에 비해 발현양이 증가하였다(Fig. 15). 이와 유사한 결과를 *DREB1s/CBFs* 유전자를 과발현 시킨 애기장대에서 확인된 바 있으며, 이러한 유전자의 하위에서 스트레스에 반응을 하는 유전자를 발현시켜 여러 환경스트레스에 대한 저항성을 보였다(for reviews, see Q, Liu *et al.*, 1998; Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). 또한, 벼로부터 유래한 *OsDREB2B* 유전자를 애기장대에 과발현 시켰을 때, *DREB2A* 전사인자에 의해서 조절되는 하위 유전자들의 발현을 증가시켜 가뭄, 고온에 대한 저항성을 확인한 바 있다(Matsukara *et al.*, 2010). 이러한 결과를 통하여, *FTL1/DDF1* 유전자는 저온에 대한 저항성 메카니즘에 관련되어 있는 것으로 예상되며, 그 기능이 *CBFs* 유전자와 유사할 것으로 예측된다.

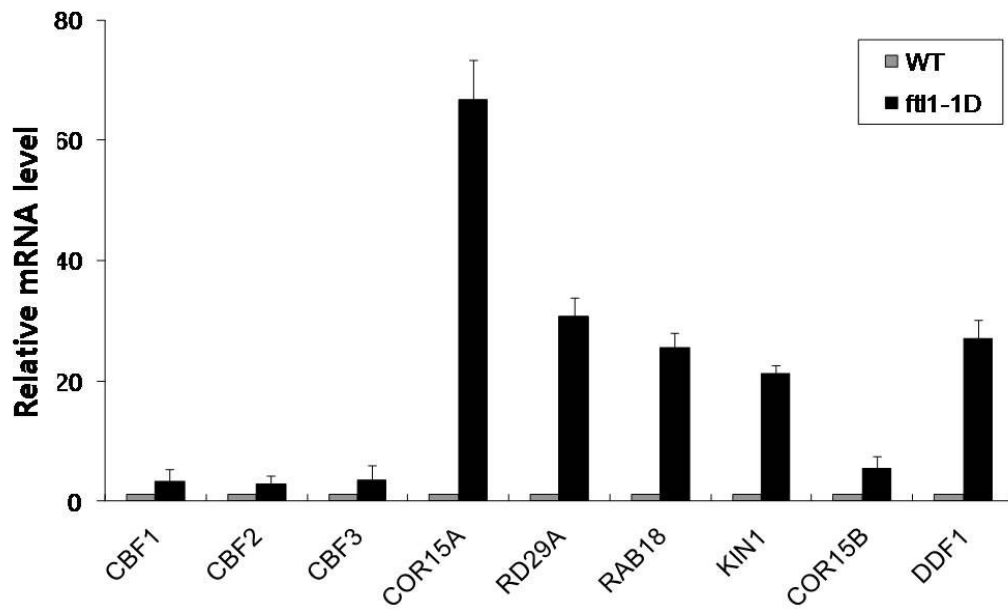


Figure 15. Relative expression levels of *CBFs* and *CBF regulon* in *ft11-1D/ddf1* mutant.

2-week-old plants of WT and *ft11-1D/ddf1* plants grown on 1/2 MS agar plate. Expression levels of *CBFs* and *CBF regulons* in *ft11-1D/ddf1* mutant, compared with WT. Each values indicates relative quantities with WT set at 1.0.

IV. 종합고찰

저온, 고온, 가뭄, 염과 같은 여러 가지 환경스트레스는 식물의 생존, 성장, 발달에 장애요인으로써, 작물의 생산성과 질을 떨어뜨리게 된다(Smirnoff *et al.*, 1998). 따라서 식물의 환경 적응성을 개선함으로써 작물의 경제적 가치를 높이기 위하여 식물 스트레스에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Grover *et al.*, 2003). 특히 모델 식물을 이용하여 환경스트레스 저항성에 관여된 유전자를 발굴하고 그 기능을 분석하는 기초 연구가 주로 연구되고 있다(BioWave <http://bric.postech.ac.kr/webzine>). 따라서 본 연구는 *Agrobacterium*을 매개로 활성 표지 T-DNA을 모델 식물인 애기장대에 도입시킨 기능 획득 돌연변이 집단에서부터 저온에 대한 저항성의 돌연변이체를 선발하고 분석하였다. 약 80000여개의 T1 개체로부터 약 22개의 저온 저항성 돌연변이체를 확보하였으며, 이 중 짙은 녹색, 왜성, 만기 개화의 표현형을 보인 우성의 돌연변이체를 선발하고 *freezing tolerant line1 -1Dominant(ftl1-1D)*로 명명하였다. *ftl1-1D* 돌연변이체는 Basta 선발을 통하여 T3 세대에서 도입 T-DNA에 대한 동형접합체(homozygote)을 확보하였다. 플라스미드 회수 기법을 이용하여 *ftl1-1D* 돌연변이체 내에 삽입된 T-DNA의 주변 genomic DNA을 회수하였고 돌연변이체에서 *Freezing Tolerant Line1/Dwarf and Delayed Flowering 1(FTL1/DDF1)* 유전자의 전사가 활성화됨을 확인하였다.

FTL1/DDF1 유전자는 Gibberellin(GA) 생합성과 관련된 유전자로, 애기장대에서 과발현시킨 식물체는 체 내에 활성형의 GA가 결핍된 돌연변이체로, *ftl1-1D* 돌연변이체와 유사한 표현형을 갖는다(Magome *et al.*, 2004). *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 기존에 알려진 *DDF1* 과발현체의 염 스트레스 저항성의 표현형(Magome *et al.*, 2004) 외에도 저온에 대한 저항성의 표현형을 확인하였다. 따라서 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체가 여러 환경스트레스에도 저항성을 보여 줄 것으로 기대하였다. *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 저온, 가뭄, 고온 스트레스에 대한 저항성을 야생형 애기장대와 비교 분석하기 위하여, 저온, 고온,

가뭄 조건하에서 화분에서의 생장, 가뭄 조건하에서 화분 내 식물체의 수분 손실을, 고온 조건 하에서 기내 (*in vivo*) 유식물체의 생존을 실험을 통해 조사하였다. 모든 스트레스 처리 실험에서 돌연변이체가 대조구인 야생형 애기장대와 비교하여 저온, 고온, 가뭄 스트레스 저항성이 증가하였다. 이 결과를 통하여, *FTL1/DDF1* 유전자가 여러 환경스트레스에 대한 저항성과 관련된 유전자로 예측할 수 있었다.

활성형의 GA가 적은 *FTL1/DDF1* 과발현체에 활성형의 GA을 처리하게 되면 야생형과 동일한 표현형으로 복귀되고, 염에 대한 저항성도 야생형 수준으로 감소한다고 알려졌다(Magome *et al.*, 2004). GA₃ 처리에 의해서 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 저온, 고온, 가뭄에 대한 표현형을 관찰한 결과, 저항성이 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통하여, *FTL1/DDF1* 과발현체에서 활성형의 GA가 환경스트레스에 대한 저항성 메카니즘과 관련되어 있음을 예측된다. 실제로, GA 생합성 경로와 *CBF* 유전자와 관련된 저온에 대한 저항성 메카니즘이 일부 상호 연관성이 있다(Anchard *et al.*, 2008). 또한 염 스트레스에 대한 *FTL1/DDF1* 유전자와 관련된 저항성 메카니즘에서 GA 생합성 경로와 상호 연관성이 있다고 알려져 있으며(Magome *et al.*, 2008), 이외의 환경스트레스와도 연관이 있을 것으로 예측된다.

FTL1/DDF1 유전자는 저온, 고온, 가뭄, 염 스트레스에 의해서 발현이 유도되었고 이와 유사하게 *FTL1/DDF1* 유전자와 동일한 DREB1/CBF subfamily에 속하는 많은 유전자들이 특정한 스트레스 또는 여러 환경스트레스에 대해서 반응한다고 알려졌다(for reviews, see Q. Liu *et al.*, 1998; K. Nakasthima *et al.*, 2000; Y. Sakuma *et al.*, 2006). 특히 저온에서 발현이 유도되는 *CBF1* 유전자가 암호화하는 전사인자는 저온에 대한 저항성 메카니즘을 조절에 관여한다고 알려졌다(Anchard *et al.*, 2008). 따라서, *FTL1/DDF1* 유전자가 저온, 가뭄, 고온, 염과 같은 환경스트레스에 대한 식물의 저항성 메카니즘에서 조절자로서 중요한 역할을 수행 할 것으로 예상된다. 환경스트레스에 대한 식물의 저항성 메카니즘과 *FTL1/DDF1* 유전자의 연관성을 보기 위해 저온 스트레스 저항성 메카니즘에서의 상위 유전자로 작용하는 *CBFs* 유전자와 *CBF1* 유전자에 의해 조절되는 하위의 스트레스 관련 유전자들(*CBF regulon*)을 분자적 마커로 사용하여 분

식물 조사하였다(Magome *et al.*, 2008, Anchard *et al.*, 2008). 그 결과, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 과발현된 *FTL1/DDF1* 유전자에 비해 *CBFs* 유전자 발현은 대조구인 야생형 애기장대와 그다지 큰 차이가 없었지만 *CBF regulon* 유전자들은 야생형에 비하여 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 높은 발현 양상을 보였다. 이러한 결과를 통하여, *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체에서 *FTL1/DDF1* 유전자가 저온에 대한 저항성 메커니즘에서 *CBFs*와 유사한 조절자로서 역할을 수행할 것으로 예측된다. 따라서 *FTL1/DDF1* 유전자에 의해 조절되는 유전자의 발현과 환경스트레스에 대한 저항성 간의 관계를 규명한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로, 애기장대에서 활성 표지 선별법을 이용하여 저온에 대한 저항성이 증진된 돌연변이체를 분석하여 *FTL1/DDF1* 유전자를 동정하였다. *FTL1/DDF1* 유전자가 기존의 보고된 염 스트레스 저항성 이외에도 저온, 고온, 가뭄 스트레스에 대해 저항성을 보였고, 스트레스에 의해서 유전자의 발현이 유도됨을 확인하였다. 이로써, *FTL1/DDF1* 유전자가 환경스트레스에 대한 식물의 저항성 메커니즘에 관련된 유전자임을 예측할 수 있었다. 특히, *FTL1/DDF1* 유전자와 높은 상동성을 보였던 *CBFs* 유전자와 그 하위 유전자(*CBF regulons*)을 분자마커로 이용하여 저온에 대한 저항성 메커니즘에 관련된 유전자임을 확인하였다. 이외에도 *FTL1/DDF1* 유전자와 다른 환경스트레스간의 연관성을 분자적 수준으로 연구할 필요가 있다고 사료된다. 또한, 이전에 보고된 연구 결과와 유사하게 활성형 GA_3 처리에 의해서 환경스트레스에 대한 *ftl1-1D/ddf1* 돌연변이체의 저항성이 감소함을 보았다. GA 생합성 경로와 *FTL1/DDF1* 유전자와 관련된 스트레스 저항성 메커니즘 간의 상호 연관성이 있을 것으로 예측되며, 추후 실험을 통하여 분자적 수준에서의 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이상의 연구 결과는 *FTL1/DDF1* 유전자의 저온, 고온, 가뭄에 대한 저항성을 증명한 최초의 보고이며, 본 결과를 토대로 *FTL1/DDF1* 유전자가 향후 환경스트레스 내성 작물 개발에 있어서 유용한 유전자원으로 활용될 것으로 기대된다.

V. 참고문헌

Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seko, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Arabidopsis AtMYC2(bHLH) and AtMOB2(MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78

Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK (2006) Role of DREB transcription factor in abiotic and biotic stress tolerance in plant. *Plant Cell Reports* 25: 1263-1274

Allen, R. D. (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physio.* 107: 1049-1054

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.k., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* 301(5633): 653-657

Ancheol Chang (2011) Agricultural biotechnology : opportunities and challenges associated with climate change. *J. Plant Biotechnol* 38: 117-124

An G, Lee S, Kim SH, Kim SR (2005) Reverse genetic approaches for functional genomics of rice. *Plant Mol Biol* 59: 111-123

Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA (1997) T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth. *Trends Genet* 13: 152-156

Bouche N, Bouchez D (2001) Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted. *Curr. Opin Plant Biol.* 4: 111-117

Bray, E., Bailey-Serresand, J., and Weretilnyk, E. (2000) Responses to abiotic stresses. *In Biochemistry and Molecular Biology of Plant, B. Buchana, W. Gruissem, and J.R. Rockville, eds(Rockville MD: American Society of Plant Biologists), PP.* 1158-1203

Chang-Beom Ko, Young-Min Woo, Dong Ju Lee, Myung-Chul Lee, Cheol Soo Kim (2007) Enhanced tolerance to heat stress in transgenic plants expressing the *GASA4* gene. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 722-728

Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., and Kim S.Y. (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* 275: 1723-1730

Dubouzet, JG, Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dobouzet, EG., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 33: 751-763

Duval M. (2002) Molecular characterization of AtNAM : A member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. *Plant Mol. Biol.* 50: 237-248

D. Weigel (1998) Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122:

1003-1013

Fischer G, Shah M, Velthuizen H (2002) Climate change and agricultural vulnerability. *IIASA, Bienna, Austria*

Fowler, S., and Thomashow, M. F. (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14: 1675-1690

Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., and Thomashow, M.F. (1998) Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant J.* 16: 433-442

Grover A, Agarwal PK, Kapoor A, Kariyar-Agawal S, Agarwal M, Chandramouli A (2003) Addressing abiotic stresses in agriculture through transgenic technology. *Curr. Sci.* 84: 355-367

Gutterson, N., Reuber, TL. (2004) Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 465-471

Guy, C.L. (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance : Role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 187-223

Gu YQ, Yang D, Thara VK, Zhou J, Martin GB (2000) Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* 12: 771-786

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271-282

H. Magome (2004) *dwarf and delayed-flowering 1*, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant J.* 56: 720-729

H. Magome (2008) The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, *GA2ox7*, under high-salinity stress in *Arabidopsis*. *Plant J.* 56: 613-626

Hsiao, T.C. (1973) Plant response to water stress. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24; 519-570

Hyeong Cheol Park (2011) Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* BLH 8, BEL1-Like Homeodomain 8 involved in environmental stresses. *J. Plant Biotechnol* 38: 162-168

Ingram, J., and Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377-403

Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., and Thomashow, M.F. (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106

Jeong DH, An S, Kang HG, Moon S, Han JJ, Park S, Lee HS, An K, An G

(2002) T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiol* 130: 1636-1644

Jeong DH (2006) Generation of a flanking sequence-tag database for activation tagging lines in japonica rice. *Plant J.* 45: 123-132

강태진 (2005) 생물학연구정보센터 BioWave(<http://bric.postech.ac.kr/webzine>) Vol. 7 no. 22

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* 17: 287-291

Kavar T, Maras M, Kidric M, Sustar-Vozlic J, Meglic V (2007) Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding* 21: 159-172

K. Nakashima (2000) Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol. Bio.* 42: 657-665

Knight H, Knight MR (2011) Abiotic stress signalling pathways : specificity and cross-talk. *Trend in Plant Sci* 6: 262-267

Liu, Q, Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (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: 1391-1406

Lorenzo O, Prqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165-178

Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J.* 38: 982-993

Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Comprehensive analysis of rice DTEB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Molecular Genetics and Genomics* 283: 185-196

McGrath KC., Dombrechi, B., Manners JM., Schenk, PM., Edgar CI., Maclean DJ., Scheible, WR., Udvardi, MK., Kazan, K. (2005) Repressor- and activator-type ethylene response factor functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-side screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiol* 139: 949-959

Medina, J., Bargues, M., Terol, J., Perez-Alonso, M., and Salinas, J. (1999) The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.* 119: 463-469

Nakano, T., Suzuki, K, Fujimura, T., Shinshi, H. (2006) Genome wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol* 140: 411-432

Na Ri Ji (2011) Stress-induced biphasic ethylene and ROS biosynthesis are synergistically interacted in cell damage. *J. Plant Biotechnol* 38: 22-29

Ohta M, Ohme-Takagi M, Shinshi H (2000). Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant J.* 22: 29-38

P. Achard (2008) The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repression DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell.* 20: 2117-2119

Pastori, G.M., and Foyer, C.H. (2002) Common components networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* 129: 460-468

Perata P, Voesenek LA (2007) Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. *Trends Plant Sci.* 12: 43-46

Pre' M., Atallah, M., Champion, A., De Vos M., Pieterse CM., Memelink J. (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* 147: 1347-1357

S. Clough (1998) A simplified method for *Agrobacterium* mediated

transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735–743

Seki, M., Kamer, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2003) Molecular responses to drought, salinity and frost : Common and different paths for plant protection. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 194–199

Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61–72

Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature : Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 217–223

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Seki M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 410–417

Smirnoff N. (1998) Plant resistant to environmental stress *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 214–219

Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., and Thomashow, M.F. (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1035–1040

Tani H (2004) Activation tagging in plants ; a tool for gene discovery. *Funct Integr Genomics* 4: 258–266

Thomashow, M.F. (1994) *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In *Arabidopsis*, E.M. Meyerowitz and C.R. Somerville, eds (Cold Spring Harbor, NY; Cold Spring Harbor Laboratory Press), PP. 807–834

Thomashow, M.F. (1999) Plant cold acclimation : Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571–599

Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11632–11637

V. Haake, D. Cook, J. Riechmann, O. Pineda, M.F. Thomashow, J.Z. Zhang (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 130: 639–648

Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankjauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguten JT, Sato S, Wang ZY, Xia Y, Dizon RA, Harrison MJ, Lamb DJ, Yanofsky MF, Chory J (2000) Activation tagging in Arabidopsis. *Plant Physiol* 122: 1003–1013

Xu k, XU X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ (2006) Sub1 A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance

to rice. *Nature* 442: 705-708

Y. Sakuma (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res commun* 290: 98-1009

Y. Sakuma, K. Marutama, F. Qin, Y. Osakabe, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-chinozaki, (2006a) Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 18822-18827

Y. Sakuma, K. Maruyama, Y. Osakabe, F. Qin, M. Seki, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki (2006b) Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 1292-1309

Zhang H, Huang Z, Xie B, Chen Q, Tian X, Zhang X, Zhang H, Lu X, Huang D, Huang R (2004) The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco. *Planta* 220: 262-270

Zhang J, Xu RJ, Elliott MC, Chen DF (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of elite indica and japonica rice cultivars. *Mol Biotechnol* 8: 223-231

Zhu, J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53: 247-273

감사의 글

아무것도 모르는 학부생 때부터 시작한 연구실 생활이 어느덧 시간이 흘러 이렇게 석사 과정을 마치게 되었습니다. 그 동안 연구실 생활을 돌아보며, 저를 도와 주신 모든 분들께 한 분씩 찾아뵙지 못하고 이렇게 지면으로나마 감사의 인사를 드리고자 합니다.

먼저, 학부생부터 석사 과정까지 연구에 매진할 수 있도록 아낌없는 격려와 지도를 해주신 이효연 교수님과 임평옥 교수님 두 분의 교수님께 진심으로 감사드립니다. 교수님의 연구하시는 모습에서 연구에 대한 열정을 비롯한 많은 것들을 배울 수 있었습니다. 연구와 강의로 바쁘신 가운데도 실험뿐만 아니라 연구실 환경 곳곳까지 세심하게 신경 써 주시며, 자상하게 지도해주신 은혜 잊지 않도록 하겠습니다. 그리고 논문 심사를 맡아주시고, 세미나 시간에 날카로운 지적과 따끔한 충고를 해주신 강홍규 교수님께도 감사의 말씀 전합니다. 항상 학생들에게 소중한 충고와 조언을 해주시고 늘 따뜻하게 대해주신 진일두 교수님, 항상 밝게 웃으시는 모습으로 대해주신 최정근 교수님과 고석민 교수님, 항상 친절하게 가르침을 주신 선현진 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 부족한 제가 실험을 처음 접할 때부터 자상하게 조언과 상담을 해주신 송인자 교수님, 배태웅 교수님께도 깊은 감사드립니다.

지금까지 변함없이 저를 응원해주시는 사랑하는 우리 가족들께 감사의 마음을 전합니다. 이외에 제가 미처 언급하지 못한 고마운 분들이 너무나 많습니다. 그 분들의 이름 하나 하나를 되새기지 못함을 죄송하게 생각하며, 그동안 저를 아끼고 사랑해주신 모든 분들께 다시 한번 진심으로 감사드립니다.

졸업 후 어느 곳에서 무엇을 하던, 인생의 선배로서 그리고 친구로서 많은 관심과 애정을 가지고 저를 지켜 봐주셨던 모든 분들께 부끄럽지 않은 모습으로 훗날 다시 뵈 수 있도록 어디서든 최선을 다하겠습니다.

짧은 글로 지난 연구실 생활 동안의 고마움을 표할 수는 없겠지만, 저를 지도해주신 교수님들, 연구실 사람들, 친구들 그리고 사랑하는 가족들 모두에게 이렇게 짧게나마 감사의 뜻을 전합니다.