(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0043974
(43) 공개일자 2011년04월28일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0100746
(22) 출원일자 2009년10월22일
심사청구일자 2009년10월22일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
이동희
서울특별시 종로구 부암동 296
변윤정
충청남도 아산시 탕정면 명암리 809번지 삼성트라펠리스 202동 1803호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

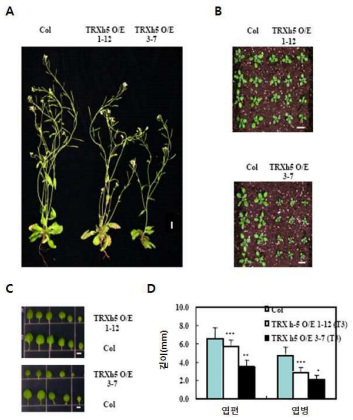
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 식물의 콜드 또는 프리징 저항성을 증가시키는 유전자 및 형질전환 식물체

(57) 요 약

본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 상기 서열이 삽입된 식물 발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스(abiotic stress) 저항성 향상용 조성물, 상기 조성물이 도입된 형질전환 식물체, 상기 형질전환 식물체의 제조방법 및 식물체의 비생물적 스트레스 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 콜드 또는 프리징 스트레스에 대한 식물체의 저항성 증대에 관여를 하며, 이를 이용하여 식물체를 형질전환 하면 상술한 스트레스에 대한 식물체의 저항성이 증가하여 식물체 재배 지역의 한계 극복할 수 있으며, 유채에 적용될 경우 저온에 강한 유채의 생산이 가능하여 생산력을 극대화시킬 수 있다.

대 표 도 - 도13



(72) 발명자

이준승

서울특별시 서대문구 대현동 럭키아파트 101동 1502호

정유정

서울특별시 관악구 낙성대동 1596-15 금강빌리지 201호

주혜준

서울특별시 노원구 중계4동 주공2단지아파트 205동 510호

최윤희

서울특별시 강서구 화곡5동 1057-28호 301호

황지혜

서울특별시 서대문구 대현동 110-42 403호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20070120103602602 / 20090076245 / 2006-0684-4-6

부처명 농촌진흥청 / 교과부 / 교과부

연구관리전문기관

연구사업명 공동연구사업(농업현장실용화기술) / 한국학술진흥재단-이공계일반연구자지원 / 한국과학재단-NCRC

연구과제명 유채의 환경 스트레스 관련 유전자 네트워크 진단 및 생명공학기법을 이용한 내재해성 유채 품종 개발 / 애기장대 근연종에서의 침수 스트레스 반응의 기능유전체학적 비교분석을 통한 복합 내재해성 증진 유망 유전자의 발굴 / 신호전달계 Target Validation

기여율

주관기관 이화여자대학교 산학협력단 / 이화여자대학교 산학협력단 / 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2007년 04월 01일 ~ 2009년 12월 31일 / 2009년 05월 01일 ~ 2010년 04월 30일 / 2009년 03월 01일 ~ 2010년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스(abiotic stress) 저항성 향상용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 비생물적 스트레스는 콜드 또는 프리징 스트레스인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

(a) 상기 제 1 항 내지 제 3 항의 뉴클레오타이드 서열; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스 저항성 향상용 조성물.

청구항 5

상기 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 식물세포.

청구항 6

상기 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물로 형질 전환된 식물체.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체를 제조하는 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계; 및

(b) 상기 식물세포로부터 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비돕시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스 저항성을 증가시키는 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계; 및

(b) 상기 식물세포로부터 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비돕시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 콜드 또는 프리징 저항성을 향상시키는 유전자 및 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물 생장에서 온도는 식물 종의 생존(performance) 및 분포에 영향을 미치는 환경적인 제한 요소들 중 하나이다. 식물의 생리학 및 생화학은 식물 종, 환경적 조건 및 어느 정도의 낮은 온도인가에 따라 다를 수 있을 지라도 많은 측면에서 콜드 스트레스에 의해 영향 받을 수 있다. 천연 식물들은 낮은 온도에 대한 반응을 지나 콜드 스트레스를 극복하기 위해 그들의 능력을 증가시키는 저온 순화(cold acclimation)라 알려진 프로세스를 실행할 수 있다(Levitt, 1980; Guy 1990; 및 Thomashow, 1999). 저온 순화는 세포 생물학 및 대사과정에서 많은 변화를 필요로 하는데, 이 과정은 많은 유전자 및 시그널 경로들을 포함한다(Xin and Browse, 2000; Chinnusamy *et al.*, 2004). 저온 순화 연구의 일차적인 목적은 콜드 반응성 유전자들을 동정하여 저온(low-temperatures) 상태의 식물 생존에서 그들의 역할을 규명하는 것에 집중되어 왔다. 콜드 스트레스의 기작 및 많은 저온 반응성 유전자들 및 조절 경로(예컨대, 콜드 스트레스 프로세스에 포함되어 있는 C-반복(CRT)/건조 반응성 엘리먼트(DRE)-결합 인자(CBF) 조절 유전자; Thomashow, 1999)를 조사하기 위해, 아라비돕시스가 모델 시스템으로서 널리 이용되어 왔다.

[0003] 또한, 식물에서 콜드 스트레스는 여러 가지 바이오-화학적, 생리학적 및 유전적 변화와 연관되어 있다. 콜드 스트레스 동안 일어나는 생화학적 변화들은 프럭탄 수용성 당, 항-프리즈 단백질 및 아미노산의 농도 상의 증가를 포함한다(Guy, 1990; Thomashow, 1999). 생리학적 및 유전적 변화들은 막 지질 구성, 단백질 인산화 및 칼슘 이온 흐름의 변화, 및 LTP(lipid transfer proteins) 단백질, LEA(late-embryogenesis abundant) 단백질, 알코올 디하이드로게나제, 번역 연장 인자를 인코딩하는 유전자 및 기능이 알려지지 않은 다른 유전자의 발현 변화를 포함한다(Griffith and Antikainen, 1996; Hughes and Dunn, 1996; Sakai and Larcher, 1987). 콜드 스트레스는 식물 대사 반응을 직접적으로 억제함으로써 식물이 완전한 유전적 능력을 발휘하는 것을 억제한다. 저온 순화에 대한 능력 및 저온 순화를 통한 최대한의 프리징 저항성을 획득하는 데 필요한 시간은 식물 종에 따라 매우 다양하다(Webb et al. 1994). 모델 식물인 애기장대(*A. thaliana*)는 콜드 스트레스에 저항할 수 있는 십자화과 식물이지만, 가까운 친척뻘인 브라시카종보다는 저항성이 낮다(Laroche, *et al.*, 1992). 아라비돕시스 및 브라시카가 유전적인 유사성을 가질 지라도, 생리학적 및 형태학적 특징에서 명백한 차이점이 존재한

다. 밀접한 두 종 간에 보여지는 프리징 저항성의 상이한 레벨은 비교 연구를 위해 유용하고 이는 두 종이 낮은 온도에 적응하기 위해 작동하는 보존적이고 독특한 기작을 동정하는 데 유용하다. 유채[세 개의 바이오-디젤 컬티바(내한, 영산 및 탐미) 및 두 유채종(유달 및 산동채)] 성장에서 프리징 처리의 효과를 조사하였다. 마이크로어레이 기법은 환경 자극들 또는 스트레스에 의해 유도되는 식물 유전자들을 동정하고 그러한 스트레스들에 대한 반응으로 유전자들의 발현 프로파일을 분석하기 위해 이용되는 강력한 수단으로 증명되었다(Kreps, *et al.*, 2002).

[0004] 한편, 멀지 않은 시기에 주요 이슈가 될 문제들 중 하나는 오일의 소진으로 인한 선택적인 에너지원의 개발이다. 특히, 바이오-에너지의 개발은 CO_2의 양을 감소시킴으로써 지구 온난화를 억제하기 위해 중요하다.

최근에, 기후 변화 및 가뭄, 고온과 같은 비생물적(abiotic) 스트레스로 인해 농업 생산률이 크게 감소하였다. 또한, 근래 들어 많은 주거지 및 빌딩을 세움으로써 농작 영역이 크게 제한되어 왔다. 따라서, 다른 측면에서의 해결책들이 시도되어져야만 한다. 바이오-에너지 개발을 위해 시도되는 여러 가지 방안들 중의 하나가 비생물적 스트레스-저항성 곡식을 개발하는 것이다. 또한, 바이오-에너지는 가솔린을 대체할 바이오-에탄올 또는 바이오-디젤를 제조하기 위해 곡식 자원을 이용하는 신규한 식물 에너지로 알려져 있다.

[0005] 공기 오염에 있어서, 한국의 메트로폴리탄 지역은 이미 환경적인 최적 수준을 넘어선 지 오래이다. 특히, 총 운송체들의 46%가 한 지역에 편중됨에 따라 거의 공기 오염물의 80%가 자동차 연료로부터 나온다.

[0006] 유채가 바이오-에너지 식물의 선두적인 역할을 맡는다면, 많은 효과를 기대할 수 있다. 유채는 세계적으로 오일을 생산하는 다섯 가지 곡식들 중의 하나로 유럽에서는 바이오-디젤의 80%가 유채로부터 생산된다. 이는 유채가 다른 오일 생산 곡식보다 더 많은 양의 오일을 함유하고 식물 당 더 많은 오일을 함유한 씨를 생산하기 때문이다. 유채는 봄 및 가을에 씨를 뿌리기 때문에, 한국에서 겨울에 강한 보리 식물을 대체할 가능성이 있는 것으로 보인다. 현재 한국에서 보유한 유채 종은 매우 다양하며 그 질 역시 다른 유럽 또는 캐나다 종들과 비교하여 매우 우수한 것으로 알려져 있다. 하지만, 유채의 기본적인 문제, 즉 경작 지역의 제한성은 아직 해결되지 않고 있는 문제이다. 한국에서 경작 지역의 제한은 유채를 재배하는 지역의 평균 온도가 1월에 적어도 -5℃ 이상이어야 한다는 것이다. 이것은 유채 재배 지역이 유채를 경작할 수 있는 겨울에 제주 아일랜드보다 더 높은 온도를 나타내야 하고 경작 지역이 낮은 온도 때문에 대전보다 북쪽 지방으로 확대될 수 없다는 것을 의미한다. 재배지의 이러한 한계로 인해, 온실 효과를 억제하기 위한 바이오-디젤의 생산 및 이산화탄소의 감소를 크게 제한한다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명자들은 식물체의 콜드 또는 프리징 스트레스에 대한 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 바람직하게는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열이 식물체에서 상술한 스트레스 저항성을 증가시키고 이를 이용하여 형질전환 식물체를 제조한 경우에 개선된 스트레스 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 획득할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 식물체의 비생물적 스트레스(abiotic stress) 저항성 향상용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 식물체의 비생물적 스트레스(abiotic stress) 저항성을 증가시키는 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스(abiotic stress) 저항성 향상용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 식물체의 콜드 또는 프리징 스트레스에 대한 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 바람직하게는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열이 식물체에서 상술한 스트레스 저항성을 증가시키고 이를 이용하여 형질전환 식물체를 제조한 경우에 개선된 스트레스 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 획득할 수 있음을 확인하였다.

[0015] 유채(*Brassica napus* L.)는 동물사료의 생산, 인간을 위한 식물성 오일 및 바이오-디젤을 위해 재배된다. *B. napus*의 씨는 올레산 및 리놀레인산 같은 지방산을 풍부하게 함유하고 있어서 인간을 위한 식물 오일 생산의 주요 소스들 중 하나이다. 전세계적으로 두 번째의 오일 씨 곡식인 대두와 비교하여, 생산성 증대 및 유전학적 교배를 통한 질적 향상에 집중된 수많은 연구들이 유채에서 실시되었으며 유전학적 및 생물학적 수단의 발달이 관련 연구들에 현저하게 기여해왔다.

[0016] 유채는 십자화과(*Cruciferae*)에 속하는 중요한 오일 씨 곡식이다. 유채 및 아라비돕시스는 십자화과의 멤버로, 두 종 간에는 단백질-인코딩 서열의 85% 이상이 보존되어 있으며 계통분류학적으로 매우 밀접한 관계이다(Galloway *et al*. 1998). 지놈 시퀀싱의 완료에 따라 아라비돕시스에서 cDNA 마이크로어레이가 상업적으로 유용하고(Horvath *et al*., 2003), 유채 및 아라비돕시스 간의 높은 서열 상동성으로 인해 아라비돕시스 cDNA 마이크로어레이를 이용하여 *B. napus*의 유전자 발현을 대규모로 모니터링하였다. 하지만, 유채 및 아라비돕시스 간의 높은 서열 상동성에도 불구하고 두 종 간의 생리학적 및 형태학적 특성들은 명백한 차이를 나타냈다. 그 중 하나가 저온에 대한 저항성에 관한 특성이다. 저온에 견디는 유채 식물체의 능력은 본질적으로 유채의 발달 및 그에 따라 형성된 경화의 정도에 따라 결정된다. 경화가 안 된 유채 식물체는 -4℃에서 생존할 수 있는 반면에 완전-경화된 봄형 유채는 -10℃에서 -12℃에서도 생존할 수 있다. 경화된 겨울형 유채는 -15℃ 내지 -20℃의 온도에 짧은 기간 노출되어도 생존할 수 있다. 따라서, 재배 지역의 한계 극복 및 유채의 생산을 증가시키기 위한 저온에 강한 유채의 생산을 위한 연구가 시급히 요구된다.

[0017] 본 발명에 따르면, 내한, 영산 및 탐미 같은 국제적으로 잘 알려진 우수한 종들이 선택되어 특이적 DNA 마이크로어레이를 이용하여 아라비돕시스의 저온 저항성에 관련된 유전자 네트워크가 비교되었다. 그 결과, 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 유전자를 삽입(supply)함으로써 비생물적 스트레스에 대한 유채의 저항성이 증가하였다.

[0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 식물체의 스트레스 저항성의 개선을 위하여 사용되는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열이다. 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.

[0019] 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈 (예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.

[0020] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio. 48:443(1970);* Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-

90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NBCI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (b)상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c)식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스(abiotic stress) 저항성 향상용 조성물을 제공한다.

[0022] 본 명세서에서 용어 "작동적으로 결합"은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.

[0023] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있다.

[0024] 본 발명에 적합한 프로모터는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, SP6 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, PM 프로모터, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 컬리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 씬타아제(nos) 프로모터, 피그워트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤멜리나 엘로우 모틀 바이러러스 프로모터, 리불로오스-1,5-비스-포스페이트 카르복실라아제 스몰 서브유티트(ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토졸 트리오스포스페이트 이소머라아제(TPI) 프로모터, 아라비돕시스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(APRT) 프로모터, 옥토파인 신타아제 프로모터 및 BCB(blue copper binding protein) 프로모터를 포함한다. 가장 바람직하게는 본 발명에 적합한 프로모터는 BCB 프로모터이다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열은 아그로박테리움 투메파시엔스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것(NOS 3' end)(Bevan *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385(1983)), 아그로박테리움 튜머페이션스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분, CaMV 35S 터미네이터 및 OCS 터미네이터(octopine synthase terminator)서열을 포함한다. 가장 바람직하게는 본 발명에 적합한 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-말단 폴리 A 시그널 서열은 NOS 서열이다.

[0026] 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자(예: 루시퍼라아제 및 β-글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제(예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 또는 제초제(예: 바스타) 내성 유전자(예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(*nptII*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제(*hpt*), 등)를 포함한다.

[0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물발현용 재조합벡터는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 바이너리 벡터이다.

[0028] 본 명세서에서 용어 "바이너리 벡터"는 Ti(tumor inducible) 플라스미드에서 이동에 필요한 부분인 LB(left border)와 RB(right border)를 가지는 플라스미드와 타겟 뉴클레오타이드를 옮기는데 필요한 유전자를 가진 플라스미드를 두 개로 나누어 놓은 벡터를 말한다. 본 발명의 형질전환용 아그로박테리움은 본 발명의 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적합한 것이면 어느 것이라도 좋고, 특히 본 발명에서 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) AGL1이 바람직하다.

[0029] 본 발명의 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 방법은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있으며, 예를 들면 입자 충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation), 형질감염법(transfection), 리튬아세테이트법(lithium acetate method), 열충격법(heat shock) 및 냉동-해빙법(freeze-thaw method) 등이 있으며, 가장 바람직하게는 냉동-해빙법(freeze-thaw method)을 이용한다.

[0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 뉴클레오타이드 서열 또는 식물발현용 재조합 벡터로 형질 전환된 식물세포를 제공한다.

[0031] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 뉴클레오타이드 서열 또는 식물발현용 재조합 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.

[0032] 본 발명의 형질전환 식물세포 및 형질전환 식물체를 제조하기 위하여 당업계에 일반적으로 공지된 방법(*Methods of Enzymology*, Vol. 153, (1987))에 따라 실시될 수 있다. 외래성 폴리뉴클레오티드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물을 형질전환시킬 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며(Chilton et ai. *Cell* 11:263:271(1977)), 직접 외래성 폴리뉴클레오티드를 식물 세포내로 도입시켜 식물을 형질전환시킬 수 있다(Lorz et ai. *Mol. Genet.* 199:178-182;(1985)). 예를 들어, T-DNA 부위를 포함하지 않는 벡터를 이용하는 경우에는 전기천공법(electroporation), 입자충격법(microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake)을 이용할 수 있다.

[0033] 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이 외래성 폴리뉴클레오티드로 형질전환 된 아그로박테리움 투메페이시언스(*Agrobacterium tumefaciens*)로 식물 세포나 종자 등을 감염시키는 방법이다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호). 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.

[0034] 본 명세서에서, 용어 "식물(체)"는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.

[0035] 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물체는 특별하게 제한되지 않는다. 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물로는 상치, 배추, 감자 및 무를 포함하는 대부분의 쌍자엽 식물(dicotyledonous plant) 또는 벼, 보리, 바나나 등의 단자엽 식물 (monocotyledonous plant)을 모두 이용될 수 있으며, 특히 토마토와 같이 과피가 얇아 콜드 또는 프리징 스트레스에 따른 품질 저하가 급격히 나타나는 식용 채소 또는 과일 그리고 잎이 주된 상품으로 거래되는 식물 등에 적용할 경우 콜드 또는 프리징 스트레스에 대한 저항성을 높이는 데 효과적이다. 바람직하게는, 본 발명의 방법은 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비돕시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 식물체에 적용된다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 방법은 유채를 포함하는 특용작물류에 적용된다.

[0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다:

[0037] (a) 상기 뉴클레오타이드 또는 식물발현용 재조합 벡터를 식물 세포에 도입시키는 단계; 및

[0038] (b) 상기 식물세포로부터 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

[0039] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다:

[0040] (a) 상기 뉴클레오타이드 또는 식물발현용 재조합 벡터를 식물 세포에 도입시키는 단계; 및

[0041] (b) 상기 식물세포로부터 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

[0042] 식물발현용 재조합 벡터를 식물세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 실시될 수 있다.

[0043] 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제(예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물세포는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (nptII) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니

다. 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜드로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).

[0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비돕시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 상기 식물체는 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류이다.

효 과

[0045] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0046] (a) 본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 상기 서열이 삽입된 식물 발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스(abiotic stress) 저항성 향상용 조성물, 상기 조성물이 도입된 형질전환 식물체, 상기 형질전환 식물체의 제조방법 및 식물체의 비생물적 스트레스 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0047] (b) 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 콜드 또는 프리징 스트레스에 대한 식물체의 저항성 증대에 관여를 하며, 이를 이용하여 식물체를 형질전환 하면 상술한 스트레스에 대한 식물체의 저항성이 증가하여 식물체 재배 지역의 한계 극복할 수 있으며, 유채에 적용될 경우 저온에 강한 유채의 생산이 가능하여 생산력을 극대화시킬 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0049] **실시예**

[0050] **실험 재료 및 실험 방법**

[0051] ***식물 재료 및 성장 조건***

[0052] 아라비돕시스(*Arabidopsis thaliana* ecotype *Columbia*) 및 유채(*Brassica napus L. cv.* 내한, 산동채, 유달, 영산 및 탐미) 씨를 5% 소듐 하이포클로라이트 및 0.15% Triton-X 100에서 7분 동안 표면 살균하고 증류수로 세척한 후, MS 플레이트(0.5× Murashige-Skoog salts, pH 5.7; 1 % sucrose; 및 0.8% agar)에서 생장시켰다. 씨를 MS 배지에서 110 $\mu molm^{-2}s^{-1}$의 빛 강도 하에서 생장시킨 후, 16 h/8 h 낮:밤의 주기를 가지고 65% 습도를 유지하는 23℃ 챔버로 옮겨 생장시켰다. 4주된 아라비돕시스 식물체 또는 3주된 유채 유식물(seedling)을 프리징 테스트 실험에 이용하였다.

[0053] T-DNA 삽입 라인(*AtGSTF2 Salk_086446, LACS4 Salk_140210, 110108, 147467, LTI30 Salk_030173, 114914* 및 *AtTRXh5 Salk_144251, 144259*) 씨를 Ohio State University(Columbus, OH, USA)의 ABRC(Arabidopsis Biological Resource Centre)로부터 구입하였다.

[0054] 솔크 라인 씨는 5% 소듐 하이포클로라이트 및 0.15% Triton-X 100에서 3분 동안 표면 살균하고 증류수로 세척한 후, MS 플레이트(0.5× Murashige-Skoog salts, pH 5.7; 1 % sucrose; 및 0.8% agar)에서 생장시켰다. 씨를 MS 배지에서 110 $\mu molm^{-2}s^{-1}$의 빛 강도 하에서 생장시킨 후, 16 h/8 h 낮:밤의 주기를 가지고 60% 습도를 유지

하는 23℃ 챔버 안의 흙으로 옮겨 생장시켰다.

[0055] ***스트레스 처리 및 프리징 어세이***

[0056] 상술한 바와 같이, 한국 유채의 다섯 컬티바(*Brassica napus L. cv.* 내한, 산동채, 유달, 영산 및 탐미)를 생장시켰다. 3주된 유채 유식물을 하기의 조건으로 콜드 스트레스 처리에 이용하였다. 유채 조직 샘플의 세 번째 잎을 지정된 시간에 수득하여 -80℃에 보관하고 실험에 이용하였다.

[0057] 프리징 민감성에 대한 효과를 테스트하기 위해, 아라비돕시스 및 유채 식물체는 다음과 같은 프리징 온도 변화를 가지는 프리징 챔버에서 생장시켰다: 암 조건에서 8시간 동안 -1℃ 처리; 빛 조건에서 1시간 마다 1℃를 낮추면서 -1℃부터 -12℃까지 처리한 후 -12℃에서 4시간 동안 처리; 다시 암 조건에서 12시간 동안 4℃ 처리. 프리징 후, 식물체들을 정상 23℃ 성장 챔버에서 2주 동안 생장시켰다. 정상 성장 조건 하에서 2주 동안 회복시킨 후, 특정 온도에서 전체 식물체 중 살아있는 식물체의 백분율을 계산하여 저온 저항성을 평가하였다. 실험은 25개의 식물체들에서 서로 독립적으로 세 번씩 반복하였다. 막대는 평균값±표준편차를 나타낸다.

[0058] 아라비돕시스 Salk 씨를 5% 소듐 하이포클로라이트 및 0.15% Triton-X 100에서 3분 동안 표면 살균하고 증류수로 세척한 후, MS 플레이트(0.5× Murashige-Skoog salts, pH 5.7; 1 % sucrose; 및 0.8% agar)에서 생장시켰다. 씨를 MS 배지에서 110 $\mu molm^{-2}s^{-1}$의 빛 강도 하에서 생장시킨 후, 16 h/8 h 낮:밤의 주기를 가지고 65% 습도를 유지하는 23℃ 챔버 안의 흙으로 옮겨 생장시켰다. 콜드 스트레스를 처리한 후, 온도를 다음과 같이 변화시켰다: 암 조건에서 8시간 동안 -1℃ 처리; 빛 조건에서 1시간 마다 1℃를 낮추면서 -1℃부터 -11℃까지 처리한 후, -11℃에서 1시간 동안 처리; 다시 암 조건에서 12시간 동안 4℃ 처리. 콜드 스트레스 처리 후, 식물체들을 정상 23℃ 성장 챔버에서 2주 동안 생장시켰다. 정상 성장 조건 하에서 2주 동안 회복시킨 후, 특정 온도에서 전체 식물체 중 살아있는 식물체의 백분율을 계산하여 저온 저항성을 평가하였다. 실험은 25개의 식물체들에서 서로 독립적으로 세 번씩 반복하였다. 막대는 평균값±표준편차를 나타낸다.

[0059] ***플라스미드 제조***

[0060] ***AtGSTF2 바이너리 벡터 제조***

[0061] 유전자의 진단 분석방법에 의해 내한에서 특이적으로 발현하는 유전자를 약 20 ng의 애기장대 *Col-0*의 지놈 DNA 및 하기 표 1의 AtGSTF2 프라이머를 활용하여 PCR로 확보하였다. PCR은 1 unit의 Ex-Taq(Takara)을 이용하여 30 사이클(94℃ 30초; 64℃, 30초; 및 72℃, 1분)로 실시하였으며, 확보된 PCR 산물은 1% 아가로오스에서 슬라이스를 취하여 QIAEX II 젤 추출 키트(QIAGEN)로 회수하였다. 수득한 PCR 단편을 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 삽입하여 플라스미드를 제조하였다. 제조된 플라스미드를 *E. Coli* (Top 10')에 열충격 트랜스포메이션으로 주입한 후, 100 ㎍/㎖의 암피실린 및 40 ㎖의 2% X-gal을 포함하는 LB 플레이트에서 성장시켜 블루-화이트 선택에 의해 단일 콜로니를 획득하였다. 획득한 콜로니를 LB 액체 배체에서 배양하여 플라스미드를 대량으로 얻고 *Not* I 제한효소로 삽입 여부를 확인하였다. 염기서열 분석을 통해, 확인된 플라스미드가 ORF(open reading frame)를 포함하는 860 bp의 AtGSTF2 유전자를 포함한다는 것을 확인하였다.

[0062] pCAMBIA 3301를 *Hind* III 및 클레나우(Klenow) 효소로 처리하여 블런트 엔드로 만든 후, 다시 *Pml*I을 처리하여 2840 bp(pCAMBIA 3301 벡터의 lacZ 알파부터 히스티딘 택까지의 부위)를 제거한 후 자가 라이게이션(self ligation)시켰다. BCB 단백질(Blue copper binding protein, CA78771)의 1573bp 업스트림(upstream)부터 개시 코돈(ATG)까지의 서열을 상술한 벡터의 *EcoR*I 제한효소 부위에 삽입하였다. 이렇게 제조된 바이너리 벡터와 pGEM-T easy 벡터에 삽입된 AtGSTF2를 *BamH*I및 *Pst*I으로 처리하여 T4 리가제(Roche)를 이용하여 14℃에서 12시간 이상 반응시켜 연결하였다. 연결된 벡터를 *E. Coli*(Top 10')에 열충격 트랜스포메이션을 통해 주입한 후, 50 ㎍/㎖의 카나마이신을 포함하는 LB 배지에서 선별하여 플라스미드(pBI3301:BCB:AtGSTF2)를 생산하였으며 삽입 여부를 *BamH*I과 *Pst*I 제한효소를 이용하여 확인하였다.

[0063] ***LTI30 바이너리 벡터 제조***

[0064] 유전자의 진단 분석방법에 의해 내한에서 특이적으로 발현하는 유전자를 약 20 ng의 애기장대 *Col-0*의 지놈 DNA 및 하기 표 1의 LTI30 프라이머를 활용하여 PCR로 확보하였다. PCR은 1 unit의 Ex-Taq(Takara)을 이용하여 30 사이클(94℃ 30초; 64℃, 30초; 및 72℃, 1분)로 실시하였으며, 확보된 PCR 산물은 1% 아가로오스에서 슬라

이스를 취하여 QIAEX II 젤 추출 키트(QIAGEN)로 회수하였다. 수득한 PCR 단편을 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 삽입하여 플라스미드를 제조하였다. 제조된 플라스미드를 *E. Coli* (Top 10')에 열충격 트랜스포메이션으로 주입한 후, 100 ㎍/㎖의 암피실린 및 40 ㎖의 2% X-gal을 포함하는 LB 플레이트에서 성장시켜 블루-화이트 선택에 의해 단일 콜로니를 획득하였다. 획득한 콜로니를 LB 액체 배체에서 배양하여 플라스미드를 대량으로 얻고 *Not* I 제한효소로 삽입 여부를 확인하였다. 염기서열 분석을 통해, 확인된 플라스미드가 ORF(open reading frame)를 포함하는 585 bp의 LTI30 유전자를 포함한다는 것을 확인하였다.

[0065] 상술한 바와 같이, 클로닝된 LTI30을 이용하여 pBI3301:BCB:LTI30을 제조하였다.

[0066] ***AtTRXH5 바이너리 벡터 제조***

[0067] 유전자의 진단 분석방법에 의해 내한에서 특이적으로 발현하는 유전자를 약 20 ng의 애기장대 *Col-0*의 지놈 DNA 및 하기 표 1의 AtTRXH5 프라이머를 활용하여 PCR로 확보하였다. PCR은 1 unit의 Ex-Taq(Takara)을 이용하여 30 사이클(94℃ 30초; 64℃, 30초; 및 72℃, 1분)로 실시하였으며, 확보된 PCR 산물은 1% 아가로오스에서 슬라이스를 취하여 QIAEX II 젤 추출 키트(QIAGEN)로 회수하였다. 수득한 PCR 단편을 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 삽입하여 플라스미드를 제조하였다. 제조된 플라스미드를 *E. Coli* (Top 10')에 열충격 트랜스포메이션으로 주입한 후, 100 ㎍/㎖의 암피실린 및 40 ㎖의 2% X-gal을 포함하는 LB 플레이트에서 성장시켜 블루-화이트 선택에 의해 단일 콜로니를 획득하였다. 획득한 콜로니를 LB 액체 배체에서 배양하여 플라스미드를 대량으로 얻고 *Not* I 제한효소로 삽입 여부를 확인하였다. 염기서열 분석을 통해, 확인된 플라스미드가 ORF(open reading frame)를 포함하는 997 bp의 AtTRXH5 유전자를 포함한다는 것을 확인하였다.

[0068] 상술한 바와 같이, 클로닝된 AtTRXH5를 이용하여 pBI3301:BCB:AtTRXH5를 제조하였다.

[0069] ***RAV II 바이너리 벡터 제조***

[0070] 유전자의 진단 분석방법에 의해 내한에서 특이적으로 발현하는 유전자를 약 20 ng의 애기장대 *Col-0*의 지놈 DNA 및 하기 표 1의 RAVII 프라이머를 활용하여 PCR로 확보하였다. PCR은 1 unit의 Ex-Taq(Takara)을 이용하여 30 사이클(94℃ 30초; 64℃, 30초; 및 72℃, 1분)로 실시하였으며, 확보된 PCR 산물은 1% 아가로오스에서 슬라이스를 취하여 QIAEX II 젤 추출 키트(QIAGEN)로 회수하였다. 수득한 PCR 단편을 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 삽입하여 플라스미드를 제조하였다. 제조된 플라스미드를 *E. Coli* (Top 10')에 열충격 트랜스포메이션으로 주입한 후, 100 ㎍/㎖의 암피실린 및 40 ㎖의 2% X-gal을 포함하는 LB 플레이트에서 성장시켜 블루-화이트 선택에 의해 단일 콜로니를 획득하였다. 획득한 콜로니를 LB 액체 배체에서 배양하여 플라스미드를 대량으로 얻고 *Not* I 제한효소로 삽입 여부를 확인하였다. 염기서열 분석을 통해, 확인된 플라스미드가 ORF(open reading frame)를 포함하는 1072 bp의 RAVII 유전자를 포함한다는 것을 확인하였다.

[0071] 상술한 바와 같이, 클로닝된 RAVII를 이용하여 pBI3301:BCB:RAVII를 제조하였다.

표 1

[0072] 유전자-특이적 프라이머 서열들.

유전자 이름	프라이머 서열	PCR 단편크기
AtGSTF2	5' CGCGGATCCATGGCAGGTATCAAAGTTTTC 3' 5' CCAATGCATTGGTTCTGCAGAATTTCTCACTGAAC 3'	~ 860 bp
LTI30	5' CGCGGATCCATGAATTCTCACCAGAATC 3' 5' CCAATGCATTGGTTCTGCAGAATCTAGTGATGAC 3'	~ 585 bp
AtTRXH5	5' CGCGGATCCATGGCCGGTGAAGGAGAAGTG 3' 5' CCAATGCATTGGTTCTGCAGAATCAATCAAGCAGA 3'	~ 997 bp
RAVII	5' GGTGCCATGGATGGATTCTAGTTG 3' 5' ACTAGGTCACCTCACAAAGCATTG 3'	~ 1072 bp

[0073] ***T-DNA 삽입의 확인***

[0074] 다음의 프로토콜에 따라 동종접합(homozygous) 돌연변이체를 분리하였다. 개시 T-DNA 삽입 돌연변이체를 TAIR(www.arabidopsis.org) 및 Salk Insertional Mutant Databases (http://signal.salk.edu/tabout.html)로

부터 구입하였다. 흙에서 성장한 유식물을 개개의 식물체로부터 얻어서 PCR 반응을 위해 사용하였다. 돌연변이체 스크리닝을 위한 프라이머를 SIGnAL iSect Tools (http://signal.salk.edu/isects.html)에서 제공하는 프로그램을 이용하여 고안하였다. PCR을 이용하여 동정된 동종접합 돌연변이체를 확인하기 위해, 삽입 위치의 측면으로 프라이머가 고안되어졌다.

[0075] LBb1 프라이머 서열(5'-GCGTGGACCGCTTGCAACT-3')이 웹 사이트(http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html)에서 유용하다. 이용된 유전자-특이적 프라이머 서열은 다음과 같다: *SALK_086446*, 5'-TGCATGGAAAAGGTTCATACC-3'(정방향) 및 5'-AGCTGGTGCATTTGAGAAATG-3'(역방향); *SALK_140210*, 5'-CTTTCCATCTACAATCTCGCG-3'(정방향) 및 5'-CGGATATCAAAATCTCAAATTCTTG-3'(역방향); *SALK_147467*, 5'-TCAACCAAATTCATGCAACTG-3'(정방향) 및 5'-CCCTTTTCCCTCCACTATCAG-3'(역방향); *SALK_110108*, 5'-TCAACCAAATTCATGCAACTG-3'(정방향) 및 5'-TTTCCCTCCACTATCAGCAAC-3'(역방향); *SALK_030173*, 5'-CCTATCTGCGTGCAATCTTTC-3'(정방향) 및 5'-AGTAGCACCATGATGACCTGG-3'(역방향); *SALK_114914*, 5'-TAACAGGATTTGATCCTTGCG-3'(정방향) 및 5'-CGTCATTCCTTTCTTCTCGTG-3'(역방향); *SALK_144251* 및 *SALK_144259*, 5'-CTCGAATCATCTCTCTGTGCC-3'(정방향) 및 5'-TTCTCTTGTTATGTCCAGGGC-3'(역방향).

[0076] PCR-기반된 유전자형 분석(genotyping)을 ExTaq 폴리머라제(TaKaRa, Shuzo, Japan)로 실시하였다. 반응 조건은 다음과 같다: 94℃에서 5분 동안 변성시키는 개시 단계; 25 사이클(94℃, 30초; 50℃, 30초; 및 72℃, 1분); 및 72℃에서 7분 동안 연장시키는 단계.

[0077] ***RNA 분리, 프로브 표지 및 마이크로어레이***

[0078] 1 g의 기본조직으로부터 RNeasy 식물 미니 키트(Quiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 폴리(A)$^+$ RNA를 cDNA 합성 키트(GibcoBRL, Rockville, MD, USA)로 이중-가닥 DNA로 전환시켰다. 본 연구실에서 고안된 콜드 스트레스를 위한 특별화된 cDNA 마이크로어레이가 사용되었다(Eom *et al*. 2006). 본 발명의 마이크로어레이는 추가적인 참조 유전자(reference genes) 뿐 아니라, SAGE 및 SSH(Suppression Subtractive Hybridization) 데이터로부터 선택된 1,482 cDNA 프로브를 포함하였다. 표지는 3DNA 어레이 350 발현 어레이 검출 키트(Genisphere, HatWeld, PA, USA)를 이용한 간접적 방법으로 실시되었다. 간략하게는, 5 ㎍의 총 RNA를 Cy3- 또는 Cy5-특이적 3DNA 캡처 서열로 태깅된 역전사 프라이머를 이용하여 역전사하였다. 이후, 특별하게 태깅된 cDNAs을 3DNA 캡처 시약을 이용하여 캡처 서열과 상보적인 Cy3-3DNA 또는 Cy5-3DNA로 형광 표지하였다. 각 마이크로어레이에서 두 개의 시료 간에 서로 반대로 표지된 다이를 포함하는 동일한 재료를 이용하여 두 개의 복제 실험을 실시하였다. 45℃에서 16시간 동안 혼성화시킨 후, 슬라이드를 세척하고 ArrayWoRx(Applied Precision, Issaquah, WA, USA)를 이용하여 스캔하였다. 결과적인 TIFF 파일의 쌍으로부터 ImaGene image analysis software package(BioDiscovery, LosAngeles, CA, USA)을 이용하여 강도 값(Intensity values)을 정량화하였다. 추가적인 분석을 위해, 데이터를 ImaGene에서 GeneSight 4.0(BioDiscovery)으로 옮겼다.

[0079] ***유전자 발현 분석***

[0080] RT-PCR 분석을 위해 고안된 *TRXh5*, *GSTF2*, *LACS4* 및 *LTI30*에 대한 유전자-특이적 프라이머들은 다음과 같다: GSTF2, 5'-TCCATGGCAGGTATCAAAGTTTTC-3'(정방향) 및 5'-TTCTGCAGAATTTCTCACTGAAC-3'(역방향); *LACS4*, Forward:5'-ATGTCGCAGCAGAAGAAATAC-3'(정방향) 및 5'-CTCTGGAAGCAAATTTTGCAT-3'(역방향); *TRXh5*, 5'-TCCATGGCCGGTGAAGGAGAAG-3'(정방향) 및 5'-TTCTGCAGAATCAAT CAAGCAG-3'(역방향); *LTI30*, 5'-TCCATGAATTCTCACCAGAATC-3'(정방향) 및 5'-TTCTGCAGAATCTAGTGATGAC-3'(역방향). 저온-처리된 3주된 식물의 잎 조직으로부터 총 RNA를 추출하였다. 반-정량적 RT-PCR 분석(Leblanc *et al*., 1999)을 위해, 2 ㎍의 총 RNA를 30 ㎕의 반응 완충액[1 ㎍의 올리고 $(dT)_{15}$ 프라이머, 2.5 mM dNTPs 및 역전사효소(New England Biolabs, Beverly)]에서 역전사하였다.

[0081] 일차 가닥 cDNA 합성에 이용된 동량의 분취액(aliquot)에 ExTaq 폴리머라제가 사용되었다. 반응 조건은 다음과 같다: 94℃에서 5분 동안 변성시키는 개시 단계; 25 사이클(94℃, 30초; 50℃, 30초; 및 72℃, 1분); 및 72℃에서 7분 동안 연장시키는 단계.

[0082] ***데이터 획득 및 분석***

[0083] 유채(내한, 산동채, 유달, 영산 및 탐미)의 저온 반응(cold stress)에 대한 진단을 위해, 마이크로어레이에서 스팟의 시그널 강도 및 백그라운드를 ImaGene 4.0 이미지 소프트웨어(BioDiscovery)를 이용하여 정량화하였다. GeneSight 소프트웨어(BioDiscovery)에 실시하는 것처럼, 각 어레이의 데이터를 하우스 키핑 유전자 세트(Weighted Lowess)로 로버스트 로컬-선형 회귀법(robust local-linear regression; Lowess)에 의해 표준화하였다. 한 슬라이드 또는 복제된(replicate) 슬라이드 상의 두 개의(duplicate) 스팟을 결합한 두 값의 평균이 사용되었다. 멀티플 실험으로부터 얻어진 발현 데이터의 비교는 계층적 군집(hierarchical clustering) GeneSight 소프트웨어를 이용한 유클리언 디스턴스 메트릭으로 실시하였다. 비-처리 콜드 스트레스가 처리되지 않은 0시간 시료를 기본값(baseline)으로 이용하여, 콜드 스트레스 하에서 1 h, 3 h, 8 h, 24 h 및 72 h 시료를 한 쌍의 비교군으로 실시하였다. 발현 프로파일 데이터의 해석을 용이하게 하기 위해, 기능 세트가 제작되어 이용되었다. 기능 세트는 MapMan BIN version 2.6.1로부터 유래한 데이터를 이용하여 구축하였다(Thimm, *et al.*, 2004).

[0084] ***GSEA를 이용한 마이크로어레이 데이터 분석***

[0085] GSEA는 전결정된(predefined) 유전자 세트들이 다른 표현형질들에서 서로 다르게 발현되는 지 여부를 결정하기 위한 통계적인 방법이다. 전결정된 유전자 세트는 알려진 대사 경로에 존재하는 유전자들, 세포유전적 밴드의 동일한 위치, 동일한 유전자 본체 카테고리의 공유, 또는 사용자가 정의한 세트일 수 있다. 따라서, GSEA는 서로 다르게 발현되는 유전자 세트를 동정할 수 있는 방법이다(Mootha, *et al.*, 2003; Subramanian, *et al.*, 2005). 유채(내한, 산동채, 유달, 영산 및 탐미)의 저온 반응(cold stress)에 대한 진단을 위해, 1.6K 콜드 스트레스 칩의 결과들을 네트워크 및 공동-발현의 유전자 세트를 이용하여 GSEA(Gene Set Enrichment Analysis; Subramanian *etal.*,2005)로 분석하였다. 상술한 유전자 세트들을 이용하여, GSEA가 GSEA 소프트웨어(http://www.broad.mit.edu/gsea)로 실시되었다. 인리치먼트 값(enrichment score, ES)의 중요성을 판단하기 위해, 택 표지들이 임의적으로 변경되어 ES를 2000번 반복적으로 계산(recalculate)하였다. 공동-발현된 유전자 세트에서 적용되는 ES의 중요성을 위한 컷오프는 0.05의 *p*-값 및 0.25의 오류발견률(false discovery rate, FDR)에 상응하는 값으로 정의되었으며, 네트워크 유전자 세트에서 적용되는 ES의 중요성을 위한 컷오프는 50% 정밀도로 0.10의 *p*-값 및 0.40의 FDR에 상응하는 값으로 정의되었다.

[0086] 내한이 민감성 컬티바인 영산 또는 탐미와 비교되었을 때, 공동-발현 유전자 세트로부터 얻어진 크로트 토크 및 증가 유전자 군들이 일치하였다. 유전자 발현 측정을 통한 크로스 토크는 정상(benign) 대조군 조건 및 아홉 가지의 환경 스트레스 조건(저온, 삼투압, 염, 가뭄, 유전독성, 산화성, UV, 상처 및 열 스트레스) 하에서 애기장대(*Arabidopsis thaliana, Col-0*) 상층부(shoot) 기관에서 실시되었다. 크게 증가한 발현을 보이는 선택된 공동-발현 유전자 세트는 크로스-토크 맵을 통해 매우 뚜렷하게(improbably large) 상향 및/또는 하향-조절 양상으로 아홉 가지 환경 스트레스 조건 모두에 반응하였다.

[0087] **실험 결과**

[0088] ***유채 및 아라비돕시스에서 콜드 스트레스 및 프리징 저항성 분석***

[0089] 본 발명자들은 다섯 종의 한국 유채 컬티바(내한, 산동채, 유달, 영산 및 탐미) 및 아라비돕시스의 프리징 민감성을 테스트하였다. 영도 이하의 온도를 지정된 시간 간격(1h, 3h, 8h, 24h 및 72h)으로 유채 및 아라비돕시스 식물체를 처리한 잎에서 유전자 발현 상에 콜드 스트레스 효과를 조사하였다(도 1). 다섯 종의 유채 컬티바들은 다른 저온 저항성을 가졌다. 아라비돕시스의 경우, 영도 이하의 온도에 하루 동안 놓여지면 로젯 잎이 쭈글쭈글해졌지만, 유달, 영산 및 탐미의 경우는 72시간 콜드 스트레스 처리에 의해서 유사한 증후를 나타냈다. 내한 및 산동채의 경우는, 콜드 스트레스에 매우 저항성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0090] 또한, 유채 및 아라비돕시스 간의 프리징 저항성을 비교하기 위해, 도 2A에서 제시된 방법에 따라 유채 및 아라비돕시스에서 프리징 어세이를 실행하였다. 아라비돕시스를 유전자 발현 및 생존율(survival rate)을 비교하기 위한 대조군으로 이용하였다. 식물 생존율은 정상 성장 조건에서 회복 후 2주 째에 측정하였다. 프리징 테스트 후에 모든 식물들은 심각한 성장 억제를 나타냈다.

[0091] ***콜드 스트레스 조건 하에서 유채 및 아라비돕시스의 유전자 발현 분석***

[0092] 콜드 스트레스 처리과정 동안, 식물체는 저온 반응성 유전자들의 유도로 특징화되는 유전자 발현 프로파일 상에 뚜렷한 변화를 나타낸다. 따라서, 콜드 스트레스 동아 유전자 발현 프로파일의 비교 분석은 고등 식물체에서 콜드 스트레스 반응의 분자적 기작을 설명하기 위해 필수적이다. 분자 레벨에서 생리학적 결과들을 확인하기 위해, 본 발명자들은 '콜드스트레스칩(Coldstresschip)'이라 불리는 저온 특화된 아라비돕시스 cDNA 마이크로어레이를 이용하였다. 콜드 스트레스 하에서 유전자 발현의 조사하는 동안 생물시계(circadian clock)의 효과를 차단하기 위해, 연속광(continuous light)을 적어도 5-7일 동안 처리하였다. 이전에, 본 발명자들은 콜드 스트레스 후 아라비돕시스 잎 및 수술에서 서로 다르게 발현되는 유전자들을 선택하기 위해 콜드스트레스칩을 제조하였다(Eom, *et al.*,2006). 콜드스트레스칩은 저온 반응에 동조화(synchronization)되어 주기적으로 발현되는 유전자들의 대규모(genome-wide) 동정을 분석하기 위해 사용되었다. 정상 반응 및 저온 반응 간의 유전자 전사의 변화를 0℃에서 다른 시간 간격(0 h, 1 h, 3 h, 8 h, 24 h 및 72 h)으로 다섯 종의 유채에서 조사하였다(도 3). 각 타겟 시료를 마이크로어레이로 혼성화한 후 공통의 레퍼런스와 비교하였다. 레퍼런스로, 비-처리된 아라비돕시스 Col-0를 이용하였다. 레퍼런스인 비-처리된 아라비돕시스 RNA 및 유채 RNA 세트가 각각 Cy3 및 Cy5 다이로 혼성화되었다. 혼성화된 마이크로어레이는 Cy3 및 Cy5 방출에 대한 두 개의 분리된 레이저 채널로 스캔하였다. 다양한 백그라운드 레벨을 보상하기 위해 마이크로어레이 슬라이드의 다른 위치를 스캐닝함으로써 다른 시료들로부터 Cy3/Cy5 시그널 강도가 표준화되었다. 즉, 로그2 시그널 비 값(log2 signal ratio value)이 시간별 저온-처리 유채 대 비-처리된 아라비돕시스 간의 전사 레벨 변화를 나타낸다.

[0093] 마이크로어레이의 유전적 변이성을 최소화하고 마이크로어레이 결과의 신뢰도를 높이기 위해, 각 처리에서 적어도 두 개의 독립적인 혼성화 실험을 실시하였다. 다이가 뒤바뀐 복제 실험군들 간의 재생산 값(reproducibility values, R^2)은 0.76에서 0.90으로 나타났는데, 이 값의 범위는 표지의 재생산을 의미한다. 콜드 스트레스 동안 유전자 발현 상의 변화들은 시간별 실험(time course)을 통해 다섯 종의 유채 및 아라비돕시스에서 비교되었다.

[0094] ***선택된 유전자 세트 중에서 멀티플 스트레스 저항성을 증가시키는 잠재적인 후보 유전자들의 동정***

[0095] 마이크로어레이 결과에 따라 선택된 23개의 유전자 세트들에 속하는 유전자들의 발현을 RT-PCR로 확인하였다(도 4 및 결과를 보이지 않음). 유전자 세트 발현으로부터 선택된 유전자가 크로스-토크에 관여할 가능성을 조사하였다. 아홉 가지 다른 환경 스트레스(저온, 삼투압, 염, 가뭄, 유전독성, 산화성, UV, 상처 및 열 스트레스) 조건에서 얻어진 아라비돕시스의 발현 데이터로부터 크로스-토크 맵을 작성하였다. 다른 환경 스트레스간의 크로트 토크와 내한의 공동-발현 유전자 세트로부터 얻어진 증가(enriched) 유전자 군이 일치하였다. 23개의 공동-발현된 유전자 세트들 중에서 아홉 유전자 세트(DR_43x52y, DR_56x47y, DR_60x56y, DR_56x52y, DR_66x33y, DL_56x46y, UR_56x46y, UL_45x54y 및 UL_56x46y)가 줄기에서 상향-조절되는 것으로 동정되었으며(도 5B), 여섯 개의 유전자 세트(DR_66x33y, DR_28x33y, DR_54x43y, DR_47x32y, UL_47x31y 및 UR_47x31y)가 하향-조절되는 것으로 확인되었다(도 5A 및 표 2). 아홉 공동-발현된 유전자 세트 중에서 DR_43x52y는 상처, UV-B, 삼투압 스트레스 및 가뭄 스트레스(콜드 스트레스 포함)와 관련되어 있다. 상술한 결과들은 DR_43x52y 유전자 세트의 두 개의 유전자가 내한에서 콜드-저항성과 관련되어 있다는 것을 나타냈다. 이 두 개의 유전자는 티오레독신 H형 5(*TRXH-5*) 및 디하이드린크세노2(*XERO2*)/저온-유발성 단백질 30(*LTI30*)로 확인되었다. 또한, 각각 여섯 개 및 일곱 개의 유전자로 구성된 DL_56x46y 및 UL_56x46y 유전자 세트에 속하는 세 개의 유전자가 저온-저항성과 연관되어 있었으며, 상처 및 UV-B 스트레스 반응에 관여하는 것으로 나타났다. 이들 유전자는 글루타티온-S-트랜스퍼라제 2(*AtGSTF2*) 및 장쇄-지방산-CoA 리가제(*LACS4*)로 확인되었다. LACS4 발현은 유채에서 콜드 스트레스 뿐 아니라, 상처 및 UV-B 스트레스와도 연관되어 있다. GSTF2 유전자는 유채에서 콜드 스트레스를 포함하는 상처와 관련되어 있다. 또한, 내한에서 콜드-저항성과 관련된 유전자 세트들은 상처 및 UV-B 스트레스와도 관계되어 있다. DR_56x47y 유전자 세트의 다섯 개 유전자는 콜드-저항성 뿐 아니라 UV-B 스트레스와도 관련되어 있다. 이들 유전자들은 *GSTF2*로 동정되었다. 또한, GST 및 칼모듈린-관련 단백질은 상처와 연관되어 있다. *RAVII*(REGULATOR OF THE ATPASE OF THE VACUOLAR MEMBRANE), 비병원성-반응성 단백질(*AIG*), 칼모듈린-관련 단백질(*TCH3*) 및 밴드 7 패밀리 단백질이 일반적으로 상처 및 UV-B 스트레스 반응에 참여한다. DR_44x53y 유전자 세트 중 두 유전자가 콜드-저항성에 관련되어 있으며, 상처 스트레스에도 포함되어 있다. 이들 유전자들은 Ras-관련된 GTP-결합 단백질(*RAB*) 및 발현 단백질(expressed protein)로 동정되었다. 또한, DR_60x56y 유전자 세트의 두 유전자는 콜드-저항성에 관련되어 있으며, UV-B 스트레스에도 포함되어 있

다. 이 유전자는 글루타메이트 수용체 패밀리 단백질(*GLR3*)로 동정되었다. 따라서, 크로스 토크의 평가에 따라 DR_43x52y, DR_56x47y, UL_56x46y 및 DL_56x46이 선택되었다. 유전자 세트에서 복제된 *TRXh5, LACS4, LTI30* 및 *GSTF2* 유전자들이 유용한 유전자로 채택되었다. 이들 유전자들이 환경 스트레스 저항성을 증가시키기 위한 타겟 유전자로 간주될 수 있다.

표 2

[0096] 네 가지 다른 환경 스트레스 하에서 선택된 유전자 세트의 중첩 정도.

선택된 유전자 세트		콜드 스트레스-처리된 유채로부터 선택된 유전자 세트의 핵심 유전자						크로스 토크의 신뢰성
이름	1.5K 어레이 상의 유전자 개수	이름	로커스 ID	다른 스트레스와의 관련성				
				상처	UV-B	삼투	가뭄	
DR_43x52y	2	티오레독신 h5(TRXh5)	At1g45145	+	+	+	+	진실 (true)
		저온 유발성 단백질 30(LTI30)	At3g50970	+	+	+	+	
DR_44x53y	3	발현된 단백질	At1g10410	+				일부분 (partial)
		밴드 7 패밀리 단백질	At3g01290		+			
		Ras-연관 GTP-결합 단백질(RAB)	At5g47200	+				
DL_56x46y	7	글루타티온 S-트랜스퍼라제 F2(GSTF2)	At4g02520		+			진실
		장쇄 아실-CoA 리가제 4(LACS4)	At4g23850	+	+			
UR_56x46y	17	글루타티온 S-트랜스퍼라제 F7(GSTF7)	At1g02920	+	+			일부분
		감마 인터페론 리소조멀 티올 환원효소(GILT)	At1g07080					
		RAVII(ATPase regulator of vacuolar membrane)	At1g68840		+			
		갈락토실 트랜스퍼라제 7(GT7)	At2g22900					
		밴드 7 패밀리 단백질	At3g01290					
		어비룰런스-반응성 단백질(AIG)	At3g28940		+			
		글루타티온 S-트랜스퍼라제 F2(GSTF2)	At4g02520		+			
UL_56x46y	6	밴드 7 패밀리 단백질	At3g01290		+			진실
		글루타티온 S-트랜스퍼라제 F2(GSTF2)	At4g02520		+			
		장쇄 아실-CoA 리가제 4(LACS4)	At4g23850	+	+			
DR_56x47y	8	글루타티온 S-트랜스퍼라제 F7(GSTF7)	At1g02920	+	+			진실
		RAVII(ATPase regulator of vacuolar membrane)	At1g68840		+			
		칼모듈린-연관 단백질(TCH3)	At2g41100	+	+			
		밴드 7 패밀리 단백질	At3g01290		+			
		어비룰런스-반응성 단백질(AIG)	At3g28940		+			
DR_56x55y	6	호메오도메인 루이신 지퍼 클래스 Ⅰ(HD-Zip Ⅰ)	At2g22430					거짓 (false)
		루이신-풍부 반복 단백질(LRP)	At5g21090					

DR_60x56y	10	글루타메이트 수용체 패밀리 단백질(GLR3)	At1g35710		+			거짓
		β-1,3 글루카나제(BG2)	At3g57260					
		제너럴 조절 인자(RCI1A)	At5g38480					
DR_66x33y	10	엑스텐신-유사 단백질(ELP)	At1g12090		+			거짓
		알코올 디하이드로게나제	At1g64710					
		발현된 단백질	At1g65490					
		스테롤 디새츄라제	At3g02580					
		AMP-의존성 합성효소	At3g48990					
		In2-1 단백질	At5g02790					
UL_45x54y	2	밴드 7 패밀리 단백질	At3g01290					거짓
UL_47x31y	4	밴드 7 패밀리 단백질	At3g01290					일부분
		글라이코실 하이들롤라제	At3g26720		+			
UR_47x31y	4	밴드 7 패밀리 단백질	At3g01290					거짓
		글라이코실 하이들롤라제	At3g26720		+			
DR_47x32y	3	밴드 7 패밀리 단백질	At3g01290					거짓
DR_28x33y	3	RGP2(reversibly glycosylated polypeptide 2)	At5g15650					거짓

* 핵심 유전자(core gene)와 관련되지 않은 스트레스들은 회색으로 표시되었다.
* 핵심 유전자와 중첩되는 정도를 +로 마크하였다.
* 핵심 유전자는 다양한 스트레스 반응에 포함된 일반적으로 인리치먼트된 유전자 세트 중에서 크로스-토크 유전자 세트의 실제성을 동정하는 데 중요한 역할을 하는 유전자를 의미한다.

[0097] ***아라비돕시스에서 콜드 스트레스 민감성에 대한 잠재적인 후보 유전자들의 관련성 확인***

[0098] 유채에서 콜드 스트레스 반응의 비교 분석에 기반하여, 멀티플 비생물적 스트레스 저항성을 증가시키는 후보 유전자들 중 네 개의 유전자(*TRXh5, LACS4, LTI30* and *GSTF2*)이 보다 상세하게 연구되었으며 식물에서 콜드 스트레스에 필요하다는 것을 발견하였다. 네 유전자들 중 민감성 식물체에서 콜드 내성 강화에 기여할 수 있는 유전자를 얻기 위하여, 네 유전자들의 T-DNA 삽입 라인들을 이용하여 돌연변이에 대한 스크리닝을 통하여 애기장대 돌연변이체들을 분리하였다. 네 유전자들은 cDNA 마이크로어레이의 혼성화에서 콜드 스트레스에 대해 다른 발현을 나타냈다. RT-PCR 결과에 따르면, 이 유전자들은 콜드 스트레스에 의해 상향-조절되는 것이 확인되었다. *trxh5* 돌연변이체(*SALK_144251* 및 *SALK_144259*)의 T-DNA는 *AtTRXh5*(At1g45145; 두 개의 엑손이 존재) 유전자의 개시 코돈(ATG) 이후 두 번째 엑손에 존재하는 1004 bp 및 1039 bp의 위치에 각각 삽입되었다(도 6A). 역전사효소-PCT 분석은 *AtTRXh5* mRNA의 발현 레벨이 검출되지 않았음을 나타낸다(도 6E). 어떠한 밴드도 검출되지 않았는데, 이는 *trxh5*(*SALK_144251* and *SALK_144259*)가 넉-아웃(K/O) 돌연변이체라는 것을 의미한다.

[0099] *lacs4* 돌연변이체(*SALK_140210, SALK_110108* 및 *SALK_147467*)의 T-DNA는 *AtLACS4*(At4g23850) 유전자의 5'-비번역 부위(UTR), 5'-UTR의 5'-말단 업스트림(713 bp 및 586 bp)에 각각 삽입되었다(도 6B). 역전사효소-PCT 분석에 따르면, 희미한 밴드가 *lacs4*(*SALK_140210* 및 *SALK_110108*)에서 검출되었는데, 이는 넉-다운(K/D) 돌연변이체라는 것을 의미한다(도 6E). *gstf2* 돌연변이체(*SALK_086446*)의 T-DNA는 *AtGST2*(At4g02520) 유전자의 5'-말단 비번역 부위(UTR), 5'-UTR의 5'-말단 520 bp 업스트림에 삽입되었다(도 6C). 역전사효소-PCT 분석에 따르면, 희미한 밴드가 *gstf2*(*SALK_086446*)에서 검출되었는데, 이는 *gstf2*(*SALK*_086446)가 넉-다운(K/D) 돌연변이체라는 것을 의미한다(도 6E). *lti30* 돌연변이체(*SALK_114914* 및 *SALK_030173*)의 T-DNA는 LTI30(At3g50970) 유전자의 5'-비번역 부위(UTR), 5'-UTR의 5`-말단 803 bp 업스트림에 각각 삽입되었다(도 6D). 역전사효소-PCT 분석에 따르면, 희미한 밴드가 *lti30*(*SALK_114914 and SALK_030173*)에서 검출되었는데, 이는 넉-다운(K/D) 돌연변이체라는 것을 의미한다(도 6E). 이들 SALK 라인 식물체들의 표현형은 감소된 발현 레벨에도 불구하고 야생형(WT)과 유사하였다(도 7).

[0100] 선택된 유전자들이 아라비돕시스에서 콜드-저항성에 관여하는 지 여부를 결정하기 위해, 이 SALK 라이 돌연변이체 식물체들을 야생형과 함께 콜드 스트레스를 처리하였다. *AtTRXh5* K/O 돌연변이 식물체들은 콜드에 노출된 이후에 WT 대조군이 나타내는 것보다 더욱 더 민감한 생존율을 보였다(도 8). 프리징 테스트에서 *AtTRXh5* K/O 돌연변이 식물체들(*SALK_144251* 및 *SALK_144259*)은 WT 식물체과 비교하여 각각 3.4% 및 2.8%의 생존율을 나타냈으며(도 9B), *lacs4* K/D 돌연변이 식물체들(*SALK_140210* 및 *SALK_110108*)은 각각 6.3% 및 5.0%의 생존율을 나타냈다(도 9C). *gstf2* K/D 돌연변이 식물체(*SALK_086446*)는 결국 죽는 반면에 WT 식물체는 33%가 생존하였다(도 9D). 프리징 테스트에서 *lti30* K/D 돌연변이 식물체들(*SALK_114914* 및 *SALK_030173*)은 WT 식물체과 비교하여 각각 15.0% 및 0%의 생존율을 나타냈다(도 9E). 프리징 처리는 살아있는 WT 및 SALK 라인 식물체의 잎에서 전형적인 손상 및 네크로시스 증후를 야기시켰다. 또한, WT 식물체의 잎은 K/O 및 K/D 식물체들의 잎과 비교하여 시각적으로 덜 손상된 표현형을 나타냈다(도 8). 상술한 결과는 이 유전자들의 축적이 온도의 갑작스런 하강으로 야기된 손상에 대한 보호 기능을 제공하는 프리징 저항성의 증가와 연관되어 있다는 것을 의미한다. 본 연구는 네 유전자들(*TRXH5, LACS4, LTI30* 및 *GST2*)이 콜드 스트레스에 대해 식물체를 보호하는 기능을 하고 유채에서 콜드 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 데 기여할 수 있다는 증거를 제공한다.

[0101] ***과다발현된 트랜스제닉 식물체의 제조***

[0102] 실험 재료 및 실험 방법에 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 과다발현 컨스트럭트들을 제작하였다(도 10A). 제조된 과발현 컨스트럭트들은 애기장대에 침지법(floral dipping)을 통해 식물체에 형질전환시켰으며, 확보된 T1 종자를 상토에 심은 후 0.01%의 글루포시네이트 암모늄을 포함하는 Basta 용액을 사용하여 형질환체를 선별하고, 개체 별로 T2 종자를 확보하였다. T2 종자들을 0.5× MS, 1% 수크로오스및 50 ㎍의 DL-포스피노트리신(DL-phosphinothricin, PPT)을 첨가한 배지에 파종하여 Basta 저항성을 가지는 개체와 민감한 개체의 수를 측향하고 콰이-스퀘어 검정법으로 *p*-값이 0.05 미만인 라인을 과다발현된 T-DNA가 한 카피가 삽입된 것으로 간주하였다(표 3).

표 3

[0103] T2 세대에서 각 유전자를 한 카피 포함하는 라인의 선별 결과.

한 카피의 TRXH5를 과다발현시키는 식물체 선택

바스타^R, 바스타 저항성; 바스타^S, 바스타 민감성; X^2값은 3:1의 기대비율: $X^2 = (o-e)^2/e(\text{바스타}^R) + (o-e)^2/e(\text{바스타}^S)$; X^2값이 3.84 이하인 경우, $p>0.05$.

T2 과다발현 라인					카이-스퀘어의 적합성 검정					
#	총 식물체	바스타^R	바스타^S	비-발아 식물체	관찰치	기대치	(o-e)	$(o-e)^2$	$(o-e)^2/e$	X^2
#1	150	98	36	16	100.5	98	2.5	6.25	0.06	0.24
					33.5	36	-2.5	6.25	0.17	
#3	140	104	32	4	102	104	-2	4.00	0.04	0.16
					34	32	2	4.00	0.13	
#7	154	109	35	10	108	109	-1	1.00	0.01	0.04
					36	35	1	1.00	0.03	

한 카피의 LTI30를 과다발현시키는 식물체 선택

바스타^R, 바스타 저항성; 바스타^S, 바스타 민감성; X^2값은 3:1의 기대비율: $X^2 = (o-e)^2/e(\text{바스타}^R) + (o-e)^2/e(\text{바스타}^S)$; X^2값이 3.84 이하인 경우, $p>0.05$.

T2 과다발현 라인					카이-스퀘어의 적합성 검정					
#	총 식물체	바스타^R	바스타^S	비-발아 식물체	관찰치	기대치	(o-e)	$(o-e)^2$	$(o-e)^2/e$	X^2
#3	172	123	43	6	124.5	123	1.5	2.25	0.02	0.07
					41.5	43	-1.5	2.25	0.05	
#5	276	203	62	11	198.75	203	-4.25	18.06	0.09	0.38
					66.25	62	4.25	18.06	0.29	
#6	227	166	59	2	168.75	166	2.75	7.56	0.05	0.17
					56.25	59	-2.75	7.56	0.13	

한 카피의 RAVII를 과다발현시키는 식물체 선택

바스타^R, 바스타 저항성; 바스타^S, 바스타 민감성; X^2값은 3:1의 기대비율: $X^2 = (o-e)^2/e$(바스타^R) + $(o-e)^2/e$(바스타^S); X^2값이 3.84 이하인 경우, p>0.05.

T2 과다발현 라인					카이-스퀘어의 적합성 검정					
#	총 식물체	바스타^R	바스타^S	비-발아 식물체	관찰치	기대치	(o-e)	$(o-e)^2$	$(o-e)^2/e$	X^2
#1	113	79	26	8	78.75	79	-0.25	0.06	0.00	0.00
					26.25	26	0.25	0.06	0.00	

한 카피의 GSTF2를 과다발현시키는 식물체 선택

바스타^R, 바스타 저항성; 바스타^S, 바스타 민감성; X^2값은 3:1의 기대비율: $X^2 = (o-e)^2/e$(바스타^R) + $(o-e)^2/e$(바스타^S); X^2값이 3.84 이하인 경우, p>0.05.

T2 과다발현 라인					카이-스퀘어의 적합성 검정					
#	총 식물체	바스타^R	바스타^S	비-발아 식물체	관찰치	기대치	(o-e)	$(o-e)^2$	$(o-e)^2/e$	X^2
#1	116	87	23	6	82.5	87	-4.5	20.25	0.23	1.11
					27.5	23	4.5	20.25	0.88	
#9	128	91	33	4	93	91	2	4.00	0.04	0.17
					31	33	-2	4.00	0.12	
#14	184	142	41	1	137.25	142	-4.75	22.56	0.16	0.71
					45.75	41	4.75	22.56	0.55	

[0104] 선별된 각 T2 라인들의 로젯 잎에서 총 RNA를 분리하여 각 유전자의 과다발현 정도를 각 유전자들에 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR로 확인하였다. 과다발현이 검증된 T2 식물체는 개별적으로 T3 종자를 확보하여 T3 세대에서 다시 Basta 선별과정을 거쳐 호모 라인을 선별하였다. 선별된 호모 라인의 식물체의 로젯 잎에서 다시 총 RNA를 분리하여 각 유전자의 과다발현 정도를 각 유전자들의 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR로 검출하였다. 그 결과, 각 유전자 발현 정도는 WT 애기장대(*Col-0*)와 비교하여 크게 증가하였음을 확인할 수 있었다(도 10B).

[0105] ***AtTRXh5 과다발현된 트랜스제닉 식물체의 콜드 스트레스에 대한 저항성***

[0106] 콜드 스트레스에 대한 유채의 저항성을 증가시키기 위해, 상응하는 유전자들을 특이적 프라이머 세트를 이용하여 아라비돕시스에서 클로닝하였다. 이 유전자들은 유채 컬티바에서 콜드 스트레스에 대해 서로 다르게 발현한다는 것을 cDNA 마이크로어레이를 통해 확인하고 콜드 스트레스에 의해 상향-조절된다는 것을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 크로스-토크 분석에 따라, 이 유전자들은 콜드 스트레스 뿐 아니라 여러 스트레스에 관여할 것으로 생각된다. 마이크로어레이 분석에 따르면, 상응하는 유전자들의 특성은 다양한 스트레스에 대한 유채의 저항성을 증가시키는 것으로 판단되었다. 선택된 유전자들 중 하나인 AtTRXh5 유전자에서 콜드 스트레스에 대한 식물 반응의 유전적 조절을 연구하기 위해, 애기장대 돌연변이체를 분리하였다. AtTRXh5 유전자를 아라비돕시스 지놈 DNA로부터 바이너리 벡터인 pCAMBIA3301 벡터(GUS 부위가 제거되고 BCB(blue copper binding) 프로모터로 대체된 벡터)에 클로닝(도 10A)한 후, 아라비돕시스에 형질전환시켰다. 침지법을 이용하여 BCB 프로모터-유도된 AtTRXh5 유전자를 가지는 25개의 제초제-저항성 아라비돕시스 형질전환체를 T2 세대에서 *AtTRXh5*의 발현 레벨에 관하여 추가적으로 분석하였다. AtTRXh5 과다발현(O/E)하는 동종접합 라이들을 T3 세대에서 선택적 항생제 마커를 이용한 분리 분석(segregation analysis)을 통해 선택한 후, AtTRXh5 발현 레벨에 따라 분리하였다: *AtTRXh5* O/E #1-12 식물체와 비교하여 가장 높은 발현 레벨을 보이는 *AtTRXh5* O/E #3-7 식물체(도 10B).

[0107] AtTRXh5가 아라비돕시스의 콜드-저항성에 기능하는 지 여부를 결정하기 위해, 이들 트랜스제닉 식물체들을 야생형 또는 넉-아웃 돌연변이와 함께 콜드 스트레스를 처리하였다. 33%의 WT 식물체만이 프리징 테스트에서 생존한 반면에, *AtTRXh5* O/E 식물체인 #3-7 및 #1-12 라인들은 프리징 테스트에서 야생형 *Col* 식물체에 비해 각각 64% 및 50% 정도 생존하였다(도 12A 및 도 14A). 대부분의 WT 식물체 잎에서 스트레스에 의한 손상의 사인으로 잎의 황화(leaf yellowing)가 발생하는 반면에, *AtTRXh5* O/E 식물체들의 잎은 프리징 처리 동안 약하고 지속적인 황화를 나타냈다(도 11A). 이러한 결과는 *AtTRXh5* mRNA의 축적이 갑작스런 온도 하강에 따라 야기된 손

상에 대한 보호 기능을 수행하는 프리징 저항성의 증가와 연관되어 있다는 것을 의미한다. 콜드 저항성 표현형 이외에도, *AtTRXh5* O/E 돌연변이 라인들 및 야생형 식물체들 간에 현저한 차이가 관찰되었다. 영양생장(vegetative growth) 초기 단계에서, *AtTRXh5* O/E 식물체들의 로젯 잎은 야생형 *Col-0* 식물체들의 잎보다 더 작았으며 이러한 난장이 표현형은 성장 4주(완전한 성장 시기)까지 지속되었다(도 13B 및 도 13C). 정상 생장 조건 하에서 WT, *AtTRXh5*-OE #3-7 및 *AtTRXh5*-OE #1-12 식물체의 엽편 치수(dimensions)는 각각 6.6±1.1 mm(n = 50), 5.7±0.7 mm(n = 50) 및 3.5±0.7 mm(n = 50)로 측정되었다(도 13D). WT, *AtTRXh5*-OE #3-7 및 *AtTRXh5*-OE #1-12 식물체의 엽병 길이는 각각 4.9±0.9 mm(n = 50), 2.7±0.6 mm(n = 50) 및 2.1±0.5 mm(n = 50)로 측정되었다(도 13D). 생장 5주 차에 접어들면서, *AtTRXh5* O/E 식물체들의 로젯 잎은 야생형보다 더 빠르게 성장하여 어느 정도 잎의 크기를 회복하였으며 이러한 표현형은 트랜스제닉 식물체에서 트랜스유전자의 발현 레벨과 연관되어 있었다(도 14). 한편, 야생형 및 *AtTRXh5* O/E 식물체들 간의 개화 시기에서 차이는 없었다. 이러한 초기 단계에서 일어나는 TRXh5 유전자 레벨의 증가는 콜드 스트레스 저항성과 연관될 수 있다. 따라서, 이러한 결과들은 아라비돕시스 TRXh5 유전자가 트랜스제닉 아라비돕시스에서 콜드 스트레스 저항성을 증가시킬 수 있다는 것을 제시해 준다.

[0108] ***AtGSTF2 과다발현된 트랜스제닉 식물체의 콜드 스트레스에 대한 저항성***

[0109] *AtTRXh5*에서 처럼, *AtGSTF2*도 마이크로어레이 결과로부터 콜드 저항성을 증가시키는 유용한 유전자 후보로서 선택되었다. 콜드 스트레스에 대한 유채의 저항성을 증가시키기 위해, 상응하는 유전자들을 특이적 프라이머 세트를 이용하여 아라비돕시스에서 클로닝하였다. 선택된 유전자들 중 하나인 AtGSTF2 유전자에서 콜드 스트레스에 대한 식물 반응의 유전적 조절을 연구하기 위해, 애기장대 돌연변이체를 분리하였다. AtGSTF2 유전자를 바이너리 벡터인 pCAMBIA3301 벡터(GUS 부위가 제거되고 BCB(blue copper binding) 프로모터로 대체된 벡터)에 클로닝(도 10A)한 후, 아라비돕시스에 형질전환시켰다. 아라비돕시스(*Col-0*) 식물체를 BCB 프로모터(많은 스트레스 조건 하에서도 끊임없이 발현하는 프로모터)로부터 *AtGSTF2* cDNA를 발현하는 벡터로 형질전환시켰다. 포스피노트리신을 바스타에 대한 저항성을 제공하는 선택 마커로 이용하였다. 침지법을 이용하여 BCB 프로모터-유도된 ATGSTF2 유전자를 가지는 20개의 항생제-저항성 아라비돕시스 형질전환체를 제조하였다. 이후, 모든 과다발현 라인들을 T2 세대에서 *AtGSTF2*의 발현 레벨에 관하여 분석하였다. T2 라인에서 *AtGSTF2* 전사체의 발현 레벨을 RT-PCR을 이용하여 조사하였다. AtGSTF2 과다발현(O/E)하는 동종접합 라이들을 T3 세대에서 선택적 항생제 마커를 이용한 분리 분석(segregation analysis)을 통해 선택한 후, AtGSTF2 발현 레벨에 따라 세 그룹으로 나누었다(도 10B). AtGSTF2 과다발현(O/E)하는 트랜스제닉 아라비돕시스 #1-6 식물체가 가장 높은 발현 레벨을 나타냈으며, *AtGSTF2* O/E 식물체의 표현형은 높아진 발현 레벨에도 불구하고 야생형과 유사하였다. *AtGSTF2*의 과다발현이 표현형 변화를 야기하지 않기 때문에(결과를 보이지 않음), 프리징 조건 하에서 *AtGSTF2* O/E 식물체의 반응성(responsiveness)을 모니터링한 결과, *AtGSTF2* O/E 식물체는 콜드에 노출된 이후에 야생형 대조군과 비교하여 더 높은 생존율을 나타냈다(도 12C). 33%의 WT 식물체만이 콜드 스트레스에 의해 유발되는 잎에서의 전형적인 손상 및 괴사의 표현형을 보이면 생존한 반면에, *AtGSTF2* O/E 식물체인 #1-6, #9-12 및 #14-5 라인들은 각각 덜 손상받고 93%, 87% 및 75% 정도 생존하였다(도 12C). 이러한 결과는 *AtGSTF2*의 축적이 갑작스런 온도 하강에 따라 야기된 손상에 대한 보호 기능을 수행하는 프리징 저항성의 증가와 연관되어 있다는 것을 의미한다.

[0110] ***LTI30 및 RAVII 과다발현된 트랜스제닉 식물체의 콜드 스트레스에 대한 저항성***

[0111] LTI30 과다발현 식물체(#6-5 및 #3-6)와 WT 식물체(*Col-0*)를 인공 배양실에서 23℃ 장일 조건으로 3주 간 생장시켜 콜드 스트레스를 가한 후, 정상적인 조건에서 2주 동안 회복시켜 생존율을 측정하였다. WT 식물체는 잎의 황백화 현상과 함께 콜드 스트레스에 대해 33%의 생존율을 나타내었지만, LTI30 과다발현된 식물체(#6-5 및 #3-6)들은 각각 약 80% 및 45%의 생존율을 나타냈다. 따라서, LTI30 과다발현 식물체는 콜드 스트레스에 대해 저항성을 가지며, 저항성의 정도가 LTI30의 발현 레벨과 일치한다는 것을 확인하였다(도 10-12).

[0112] RAVII 과다발현 식물체(#1-1)와 WT 식물체(*Col-0*)를 인공 배양실에서 23℃ 장일 조건으로 3주 간 생장시켜 콜드 스트레스를 가한 후, 정상적인 조건에서 2주 동안 회복시켜 생존율을 측정하였다. WT 식물체는 잎의 황백화 현상과 함께 콜드 스트레스에 대해 33%의 생존율을 나타내었지만, RAVII 과다발현된 식물체(#1-1)는 70%의 생존율을 나타냈다. 따라서, RAVII 과다발현 식물체는 콜드 스트레스에 대해 저항성을 가지며, 저항성의 정도가 RAVII의 발현 레벨과 일치한다는 것을 확인하였다(도 10-12).

[0113] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0114] **참조 문헌**

[0115] **Asada K** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1999: 601-639(1999).

[0116] **Balmer Y, Vensel, WH, Tanaka CK, Hurkman, WJ, Gelhaye E., Rouhier N, Jacquot, JP., Manieri W, Sch, P, Droux M, Buchanan BB** Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 2642-2647(2004).

[0117] **Bartling DB, Radzio R, Steiner U, Weiler EW** A glutathione *S*-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. Molecular cloning and functional characterization. Eur. J. Biochem. 216:579-586(1993).

[0118] **Basia Vinocur, Arie Altman** Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Curr Opin Plant Biol 16: 123-132(2005).

[0119] **Basso K, Margolin AA, Stolovitzky G, Klein U, Dalla-Favera R, Califano A** Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. Nat Genet. 37: 382-90(2005).

[0120] **Buchanan BB, Balmer Y** Redox regulation: A broadening horizon. Annu. Rev. Plant Biol. 56: 187-220(2005).

[0121] **Boyer JS** Plant productivity and environment. Science 218: 443-448(1982).

[0122] **Cavell AC, Lydiate DJ, Parkin AI, Dean CP, Trick M** Collinearity between a 30-centimorgan segment of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions with in the Brassica napus genome. Genome 41: 62-69(1998).

[0123] **Cabrillac D, Cock JM, Dumas C, Gaude T** Exercising self-restraint in plants. Nature. 410: 220-223(2001).

[0124] **Chris Bowler, Robert Fluhr** The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance, Trends Plant Sci. 5: 241-246(2000).

[0125] **Close TJ** Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. Physiol. Plant. 100: 291-96(1997).

[0126] **Cummins I, Cole JD, Edwards R** A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. Plant J 18: 285-292(1999).

[0127] **Denby K, Gehring C** Engineering drought and salinity tolerance in plants: lessons from genome-wide expression profiling in *Arabidopsis*. Trends Biotech. **23:** 547-552(2005).

[0128] **Dewey TG, Galas DJ** Dynamic models of gene expression and classification. Funct Integr Genomics. 1: 269-78(2001).

[0129] **Fowler S, Thomashow MF** *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(2002).

[0130] **Fujino G, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H** Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. Semin. Cancer Biol. 16: 427-435(2006).

[0131] **GK, KK, Gabriella S, Marie-Pierre D, ZoltB, GG** Abiotic stress-induced changes in glutathione and

thioredoxin *h* levels in maize. Environ. Exp. Bot 52: 101-112(2004).

[0132] **Galloway GL, Malmberg RL, Price RA** Phylogenetic utility of the nuclear gene arginine decarboxylase: an example from *Brassicaceae*. Mol Biol Evol 15: 1312-1320(1998).

[0133] **Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP** The plant thioredoxin system. Cell. Mol. Life Sci. 62: 24-35(2005).

[0134] **Gilmour SJ, Artus NN, Thomashow MF** cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 18: 13-21(1992).

[0135] **Guy CL** Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 41: 187-223(1990).

[0136] **Holter NS, Maritan A, Cieplak M, Fedoroff NV, Banavar JR** Dynamic modeling of gene expression data. Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 1693-8(2001).

[0137] **Horvath DP, Schaffer R, West M, Wisman E** *Arabidopsis* microarrays identify conserved and differentially expressed genes involved in shoot growth and development from distantly related plant species. Plant J. 34: 125-134(2003).

[0138] **Hughes TR, Marton MJ, Jones AR, Roberts CJ, Stoughton R, Armour CD, Bennett HA, Coffey E, Dai H, He YD, Kidd MJ, King AM, Meyer MR, Slade D, Lum PY, Stepaniants SB, Shoemaker DD, Gachotte D, Chakraburtty K, Simon J, Bard M, Friend SH** Functional discovery via a compendium of expression profiles. Cell 102: 109-126(2000).

[0139] **Jarillo JA, Capel J, Leyva A, MartJM, Salinas J** Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. Plant Mol Biol. 25: 693-704(1994).

[0140] **Ju HW, Koh EJ, Kim SH, Kim KI, Lee H, Hong SW** Glucosamine causes overproduction of reactive oxygen species, leading to repression of hypocotyl elongation through a hexokinase-mediated mechanism in *Arabidopsis*. J Plant Physiol. 26:53-60(2008).

[0141] **Judy S, Jay S, John B** The acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* Is essential for Normal Cuticle Development in *Arabidopsis*. Plant Cell. 16: 629-642(2004).

[0142] **Kazuhiko Y, Takanori K, Makoto I, Masaru T, Tomoko Y, Takashi Y, Masaaki A, Eiko S, Takayoshi M, Yasuko T, Nobuhiro H, Takaho T, Mikako S, Takashi O, Akiko T, Motoaki S, Kazuo S, Shigeyuki Y** Solution structure of the B3 DNA binding domain of the *Arabidopsis* cold-responsive transcription factor RAV1. Plant Cell. 16: 3448-3459(2004).

[0143] **Kim CS, Kwak JM, Nam HG, Kim KC, Cho BH** Isolation and characterization of two cDNA clones that are rapidly induced during the wound response of *Arabidopsisthaliana*.PlantCellRep.13: 340-343(1994).

[0144] **Kocsy G, Kobrehel K, Szalai G, Duviau MP, BuzZ, Galiba G** Abiotic stress-induced changes in glutathione and thioredoxin *h* levels in maize. Env. Exp. Bot. 52: 101-112(2004).

[0145] **Krebs JA, Wu Y, Chang H-S, Zhu T, Wang X, Harper JF** Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. Plant Physiol 130: 2129-2141(2002).

[0146] **Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF** Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. Plant Physiol. 130: 2129-41(2002).

[0147] **Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld JP** The Arabidopsis cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. Plant Physiol. 134: 1006-1016(2004).

[0148] **Leblanc C, Falciatore A, Watanabe M, Bowler C** Semi-quantitative RT-PCR analysis of photoregulated gene expression in marine diatoms. Plant Mol Biol. 40: 1031-1044(1999).

[0149] **Lee H, Guo Y, Ohta M, Xiong L, Stevenson B, Zhu JK** LOS2, a genetic locus required for cold responsive transcription encodes a bi-functional enolase. EMBO J. 21: 2692-2702(2002).

[0150] **Levine M and Davidson EH** Gene regulatory networks for development. Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 4936-42(2005).

[0151] **Lozano RM, Wong JH, Yee BC, Peters A, Kobrehel K, Buchanan BB** Overexpression of thioredoxin *h* leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. Planta 200: 100-106(1996).

[0152] **Marrs KA** The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 127-158(1996).

[0153] **Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. Plant J. 38: 982-993(2004).

[0154] **Masutani H, Ueda S, Yodoi J** The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. Cell Death Differ. 12: 991-998(2005).

[0155] **Marx C, Wong JH, Buchanan BB** Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. Planta 216: 454-460(2003).

[0156] **McKersie BD, Bowley SR, Jones KS** Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. Plant Physiol. 119:839-47(1999).

[0157] **Meyer Y, Riondet C, Constans L, Abdelgawwad MR, Reichheld JP, Vignols F** Evolution of redoxin genes in the green lineage, Photosynth. Res. 89: 179-192(2006).

[0158] **Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV** Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol. 45: 263-79(2001).

[0159] **Pastori GM, Foyer CH** 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(2002).

[0160] **Polisensky DH, Braam J** Coldshock regulation of the *Arabidopsis TCH* genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. Plant Physiol. 111: 1271-79(1996).

[0161] **Reichheld JP, Mestres-Ortega D, Laloi C, Meyer Y** The multigenic family of thioredoxin h in Arabidopsis thaliana: Specific expression and stress response. Plant Physiol. Biochem. 40: 685-690(2002).

[0162] **Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE** Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. Plant Cell 12: 707-719(2000).

[0163] **Rorat T, Havaux M, Irzykowski W, Cuine S, Becuwe N, Rey P** PSII-S gene expression, photosynthetic activity and abundance of plastid thioredoxin-related and lipid-associated proteins during chilling stress in *Solanum* species differing in freezing resistance. Physiol. Plant. 113: 72-78(2001).

[0164] **Roxas VP, Smith RK Jr, Allen ER, Allen RD** Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. Nat. Biotech. 15: 988-991(1997).

[0165] **Sakai A, Larcher W** Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag, Berlin: 41-47(1987).

[0166] **Schu¨rmann P, Jacquot, JP** Plant thiredoxin systems revisited. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 371-400(2000).

[0167] **Sen Gupta A, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 162933(1993).

[0168] **Serrato AJ, Cejudo FJ** Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. Planta 217: 392399(2003).

[0169] **Serrato AJ, Perez-Ruiz JM, Cejudo FJ** Cloning of thioredoxin *h* reductase and characterization of the thioredoxin reductasethioredoxin *h* system from wheat. Biochem. J. 15491-15497(2002).

[0170] **Smith AP, Nourizadeh SD, Peer WA, Xu JH, Bandyopadhyay A, Murphy AS, Goldsbrough PB** Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione-S-transferase that interacts with flavanoids. Plant J 36: 433-442(2003).

[0171] **Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP** From the Cover: Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 102: 1554515550(2005).

[0172] **Takahashi H, Yamazaki M, Saskura N, Wantabe A, Leustek T, Engler A, Engler G, Van Montagu M, Saito K** Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1110211107(1997).

[0173] **Tegner J, Yeung MK, Hasty J, Collins JJ** Reverse engineering gene networks: integrating genetic perturbations with dynamical modeling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 5944-9(2003).

[0174] **Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M** MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. Plant J 37:914939(2004).

[0175] **Thomashow MF** Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 571599(1999).

[0176] **Van Someren EP, Wessels MJ, Reinders T, Backer E** Robust genetic network modeling by adding noisy data. In Proceedings of 2001 IEEE-EURASIP Workshop on Nonlinear Signal and Image Processing(2001).

[0177] **Wanner LA, Junttila O** Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. Plant Physiol 120: 391-39(1999).

도면의 간단한 설명

[0178] 도 1은 콜드 스트레스 처리에 대한 다섯 종의 한국 유채종(내한, 산동채, 유달, 영산 및 탐미)의 변화를 나타내는 결과이다. 콜드 스트레스 처리(0℃)에 대한 3주된 한국 유채 컬티바 및 애기장대의 시간별(0h, 1h, 3h, 8h, 24h 및 72h) 반응을 보여준다.

[0179] 도 2는 유채의 프리징 저항성을 테스트한 결과이다. 도 2A는 4주된 애기장대 식물체 또는 3주된 유채 식물체들의 프리징 저항성 어세이의 도면을 나타낸다. 본 연구에서 이용된 실험적 도면으로 프리징 온도 변화를 보여주고 있다. 도 2B는 프리징에 대한 다섯 종의 한국 유채종(내한, 산동채, 유달, 영산 및 탐미) 및 애기장대의 표현형 비교를 나타내는 결과이다. 프리징 처리 후 2주 째에 사진을 찍었다. 대표적인 식물체들이 보여진다. 도 2C는 도 2B의 방법과 동일하게 프리징 처리하고 2주 동안의 회복 기간을 거친 후, 유채 및 애기장대의 프리징 저항성 어세이에서 생존율을 나타내는 그래프이다. 실험은 서로 독립적으로 세 번씩 반복하였으며, 세 개의 복제 항아리는 총 25개의 식물체를 포함하였다.

[0180] 도 3은 콜드 스트레스 하에서 유채 및 애기장대의 유전자 발현 패턴의 계층적 군집(hierarchical clustering) 분석한 마이크로어레이 결과이다. 각 컬티바 별로 유전자 발현 패턴을 보여주고 있다. 유도(또는 억제)는 배수-변화(fold-change) 눈금 막대(scale bar)로 연노랑(pale)부터 완전한(saturated) 빨강(또는 녹색)까지의 범위로 표시된다. 눈금 막대는 컬러 강도 및 로그2비 값 간의 연관관계(relationship)를 표시한다. 식물체 상의 가지 길이는 처리 조건들에 따른 상관관계(correlation)를 나타낸다. 짧은 가지는 긴 가지보다 더 가까운 상관관계를 표시한다. 콜드 스트레스에서 서로 다르게 발현된 유전자들은 유클리디안을 이용하여 클러스터로 선택되었다. 각 배수 변화로 지시되는 컬러를 나타내는 대수적 막대는 클러스터의 오른쪽에 표시된다. 약자: 내한, nh; 산동채, sd; 영산, ys; 탐미, tm; 애기장대, ara.

[0181] 도 4는 RT-PCR 분석을 이용하여 선택된 여섯 유전자의 변화된 발현을 시간별로 조사한 결과이다. 유채에서 여섯 유전자의 발현 패턴에 대한 RT-PCR 분석을 나타낸다. 실험 재료 및 실험 방법에 기재된 바와 같이 생장되

고 지시된 시간에 0℃ 챔버에서 이동된 식물체로부터 추출된 RNA를 이용하여 각 유전자에 대한 RT-PCR 분석을 실시하였다. 동시에 증폭된 하우스키핑 유전자인 β-튜블린의 레벨을 참조하여 유전자 발현의 변화를 측정하였다. 상응하는 마이크로어레이 비를 각 레인의 하단에 나타냈다. 시그널 비율 값이 시간별로 콜드-처리된 유채 대 비-처리된 애기장대의 비율 값을 의미하며 이는 전사체 레벨의 변화를 나타낸다.

[0182] 도 5는 크로스-토크 맵 상에 선택된 공동-발현 유전자 세트의 위치를 나타낸다. 도 5A는 통상적으로 하향-조절된 크로스-토크 점들에 위치하는 유전자 세트를 나타낸다. 도 5B는 통상적으로 상향-조절된 크로스-토크 점들에 위치하는 유전자 세트를 나타낸다.

[0183] 도 6은 후보 유전자들의 분자적 특성을 보여주는 결과이다. 도 6A-6D는 각 유전자의 T-DNA 삽입 위치를 나타낸다. 검은색 박스 및 파란색 박스는 각각 엑손 및 비번역 부위를 나타낸다. 삼각형은 T-DNA 삽입 위치를 나타낸다. 약자: bp, 염기 쌍. 도 6A는 AtTRXH5 유전자에 T-DNA가 삽입된 애기장대 *SALK_144251* 및 *SALK_144251* 라인의 지놈 구성을 나타낸다. 도 6B는 AtLACS4 유전자에 T-DNA가 삽입된 애기장대 *SALK_140210, SALK_110108* 및 *SALK_147467* 라인의 지놈 구성을 나타낸다. 도 6C는 AtGSTF2 유전자에 T-DNA가 삽입된 애기장대 *SALK_086446* 라인의 지놈 구성을 나타낸다. 도 6D는 LTI30 유전자에 T-DNA가 삽입된 애기장대 *SALK_130173* 및 *SALK_114914* 라인의 지놈 구성을 나타낸다. 도 6E는 각 유전자들(*ATTRXH5, ATLACS4, ATGSTF2* 및 *LTI30*) 전사체들을 WT 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 T-DNA-삽입된 돌연변이 라인들에서 분석한 RT-PCR 결과이다. 정상 조건에서 3주 동안 생장된 전체 식물체에서 총 RNA를 추출하였다. 유전자-특이적 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 실시하였으며, 튜블린 발현 레벨을 내적 대조군으로서 분석하였다.

[0184] 도 7은 후보 유전자들에 대한 T-DNA 넉-아웃 돌연변이체들의 표현형을 보여주는 결과이다. 발아 후 3주 동안 생장된 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 T-DNA 넉-아웃 돌연변이 라인들의 표현형을 보여진다. 도 7A는 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 *Attrxh5* 돌연변이 식물체들(*SALK_144251* 및 *SALK_144251*)의 표현형을 보여주는 결과이다. 도 7B는 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 *Atgstf2* 돌연변이 식물체들(*SALK_086446*)의 표현형을 보여주는 결과이다. 도 7C는 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 *Atlacs4* 돌연변이 식물체들(*SALK_140210* 및 *SALK_110108*)의 표현형을 보여주는 결과이다. 도 7D는 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 *lti30* 돌연변이 식물체들(*SALK_130173* 및 *SALK_114914*)의 표현형을 보여주는 결과이다.

[0185] 도 8은 콜드 스트레스에 대한 후보 유전자 T-DNA 넉-아웃 돌연변이 라인들의 표현형을 비교한 결과이다(프리징 저항성 어세이). 도 8A-8D는 프리징에 대한 야생형(*Col-0*) 및 T-DNA 넉-아웃 돌연변이 라인들의 표현형을 비교한 결과이다. 사진들은 프리징을 처리하고 2주 후에 찍었다. 대표적인 식물체들이 보여지고 있다. 도 8A는 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 *Attrxh5* 돌연변이 식물체들(*SALK_144251* 및 *SALK_144251*)의 표현형을 비교한 결과이다. 도 8B는 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 *Atlacs4* 돌연변이 식물체들(*SALK_140210* 및 *SALK_110108*)의 표현형을 보여주는 결과이다. 도 8C는 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 *Atgstf2* 돌연변이 식물체들(*SALK_086446*)의 표현형을 보여주는 결과이다. 도 8D는 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 *lti30* 돌연변이 식물체들(*SALK_130173* 및 *SALK_114914*)의 표현형을 보여주는 결과이다.

[0186] 도 9는 콜드 스트레스에 대한 후보 유전자 T-DNA 넉-아웃 돌연변이 라인들의 반응을 나타내는 결과이다(프리징 저항성 어세이). 도 9A는 프리징 저항성 어세이의 도면을 나타낸다. 도 9B-9D는 3주된 애기장대 식물체들의 프리징 저항성 어세이 결과이다. 프리징에 노출된 후 2주 동안 회복된 WT 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 SALK 돌연변이 식물체들의 프리징 저항성에서의 생존율을 측정한 결과이다. 실험은 서로 독립적으로 3-6번씩 반복하였다(n = 16). 별표는 대조군과 비교하여 다음과 같은 확률로 *t*-테스트에 의해 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다: $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$. 도 9B는 프리징 저항성 어세이에서 WT 및 *Attrxh5* 식물체(*SALK_144251* 및 *SALK_144251*)의 생존율을 나타내는 그래프이다. 도 9C는 프리징 저항성 어세이에서 WT 및 *Atlacs4* 식물체(*SALK_140210* 및 *SALK_110108*)의 생존율을 나타내는 그래프이다. 도 9D는 프리징 저항성 어세이에서 WT 및 *Atgstf2* 식물체(*SALK_086446*)의 생존율을 나타내는 그래프이다. 도 9E는 프리징 저항성 어세이에서 WT 및 *lti30* 식물체(*SALK_130173* 및 *SALK_114914*)의 생존율을 나타내는 그래프이다.

[0187] 도 10은 식물 형질전환용 바이너리 벡터의 제작 및 형질전환된 식물체에서 각 유전자의 과다발현을 확인한 결과이다. 도 10A는 각 유전자의 식물 형질전환용 바이너리 벡터의 맵을 보여주는 도식이다. 도 10B는 각 유전자로 형질전환된 식물체의 T3 세대에서 *AtTRXH5*, *AtGSTF2*, *LTI30* 및 *RAVII* 과다발현(overexpression, O/E) 돌연변이체에서 각 유전자의 과다발현을 확인한 결과이다.

[0188] 도 11은 각 유전자가 과다발현된 애기장대 식물체에서 프리징 처리에 대한 표현형을 관찰한 결과이다. 도 11A-11D는 각각 TRXh5 O/E(1-12 및 3-7), LTI30 O/E(3-6 및 6-5), GSTE2 O/E(1-6, 9-12 및 14-5) 및 RAVII

O/E(1-1)의 결과를 나타낸다.

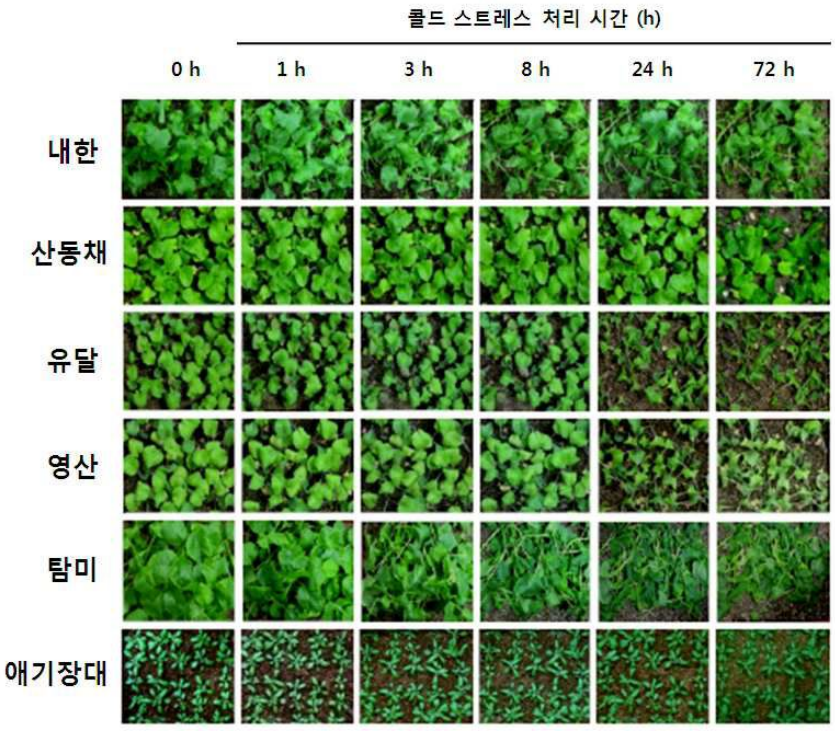
[0189] 도 12는 유전자가 과다발현된 애기장대 식물체에서 프리징 처리에 대한 생존율을 측정한 결과이다. 도 8에서 실시한 방법과 같이, 3주된 애기장대 식물체들의 프리징 저항성 어세이 결과이다. 프리징에 노출된 후 2주 동안 회복된 WT 콜롬비아 에코타입(*Col-0*) 및 과다발현된 식물체들의 프리징 저항성에서의 생존율을 측정한 결과이다. 도 12A-12D는 각각 TRXh5 O/E(1-12 및 3-7), LTI30 O/E(3-6 및 6-5), GSTE2 O/E(1-6, 9-12 및 14-5) 및 RAVII O/E(1-1)의 결과를 나타낸다.

[0190] 도 13는 AtTRXh5 과다발현 돌연변이체의 성장을 관찰한 결과이다. 도 13A는 7주된 야생형(*Col-0*; 왼쪽) 및 AtTRXh5 과다-발현된 돌연변이 식물체들(#1-12, 중간; 및 #3-7, 오른쪽)의 표현형을 비교한 결과이다. 도 13B는 동일 단계에서 3.5주된 야생형 *Col-0* 및 AtTRXh5 과다발현 트랜스제닉 식물체의 로젯 잎을 관찰한 결과이다. 모든 이미지에서 눈금 막대 = 1 cm. 도 13C는 야생형 *Col-0* 및 AtTRXh5 과다발현 트랜스제닉 식물체의 로젯 잎 간의 여러 성장 변수들의 양적 분석 결과이다. 엽편 길이(n = 50), 엽병 길이(n = 50)를 3.5주된 식물체에서 측정하였다. 별표는 대조군과 비교하여 다음과 같은 확률로 *t*-테스트에 의해 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다: $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$. 도 13D는 3.5주된 야생형 *Col-0*(왼쪽) 및 AtTRXh5 과다발현 트랜스제닉 식물체(오른쪽)의 잎의 길이를 측정한 결과이다.

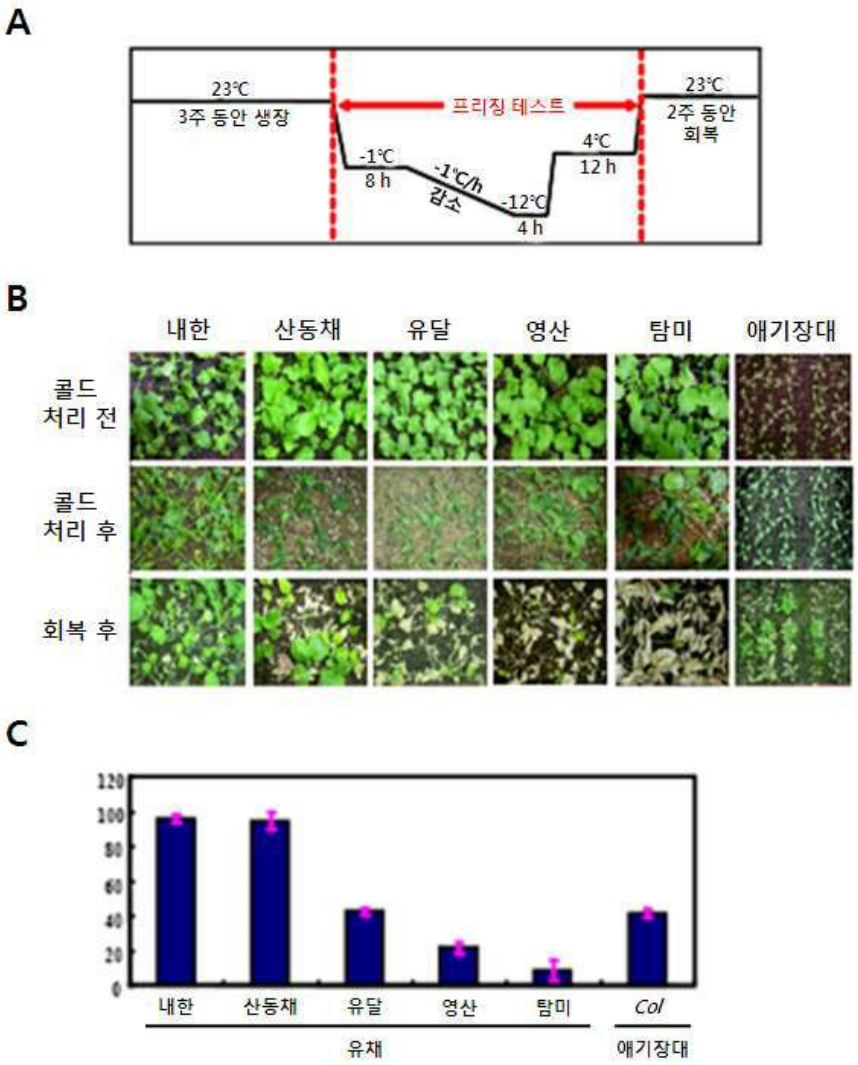
[0191] 도 14는 발생 단계 동안 AtTRXh5 과다발현 애기장대 트래스제닉에서의 발현을 조사한 결과이다. 도 14A는 흙에서 생장한 로젯 잎의 성장을 관찰한 결로, 3주(위 패널), 4주(중간 패널) 및 5주(아래 패널) 째에 WT *Col-0* 및 AtTRXh5 과다발현 트랜스제닉 식물체의 표현형을 관찰한 결과이다. 모든 식물체들은 동일한 발생 단계에 있었다. 모든 이미지에서 눈금 막대 = 2 cm. 도 14B는 발생 단계에서 AtTRXh5 유전자의 발현을 지시된 발생 단계 별로 추출된 총 RNA를 이용하여 RT-PCR을 이용하여 분석하였다.

도면

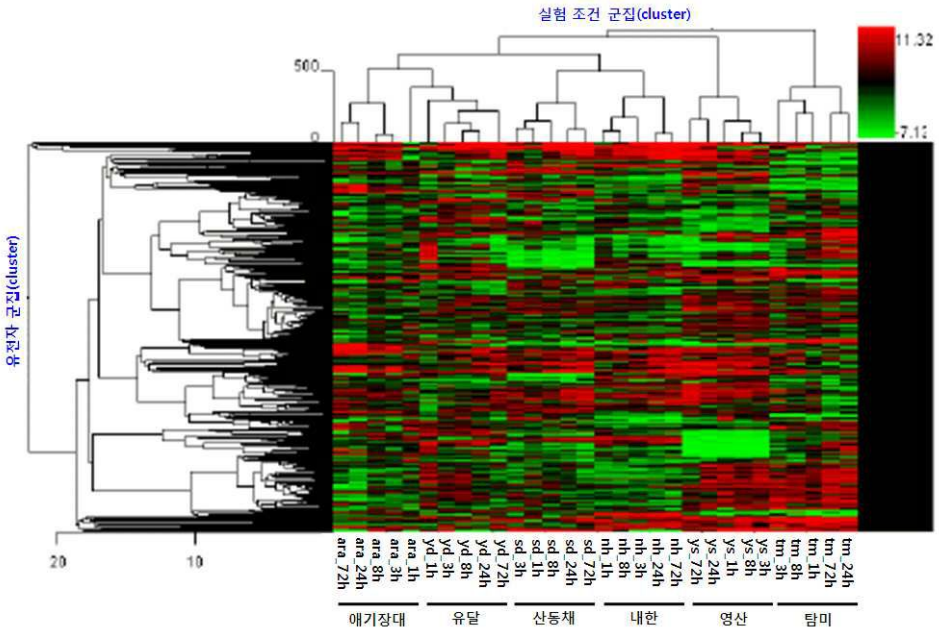
도면1



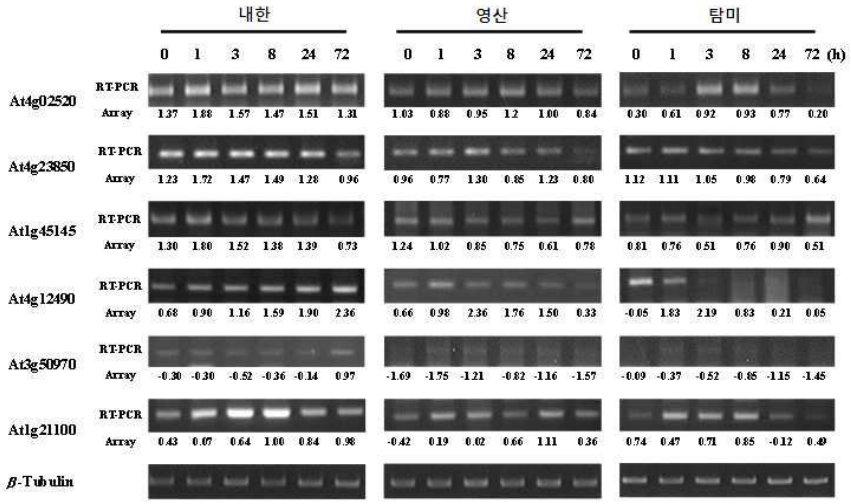
도면2


A
23℃
3주 동안 생장
프리징 테스트
-1℃
8 h
-1℃/h
감소
-12℃
4 h
4℃
12 h
23℃
2주 동안
회복
B
내한
산동채
유달
영산
탐미
애기장대
콜드
처리 전
콜드
처리 후
회복 후
C
120
100
80
60
40
20
0
내한
산동채
유달
영산
탐미
Col
유채
애기장대

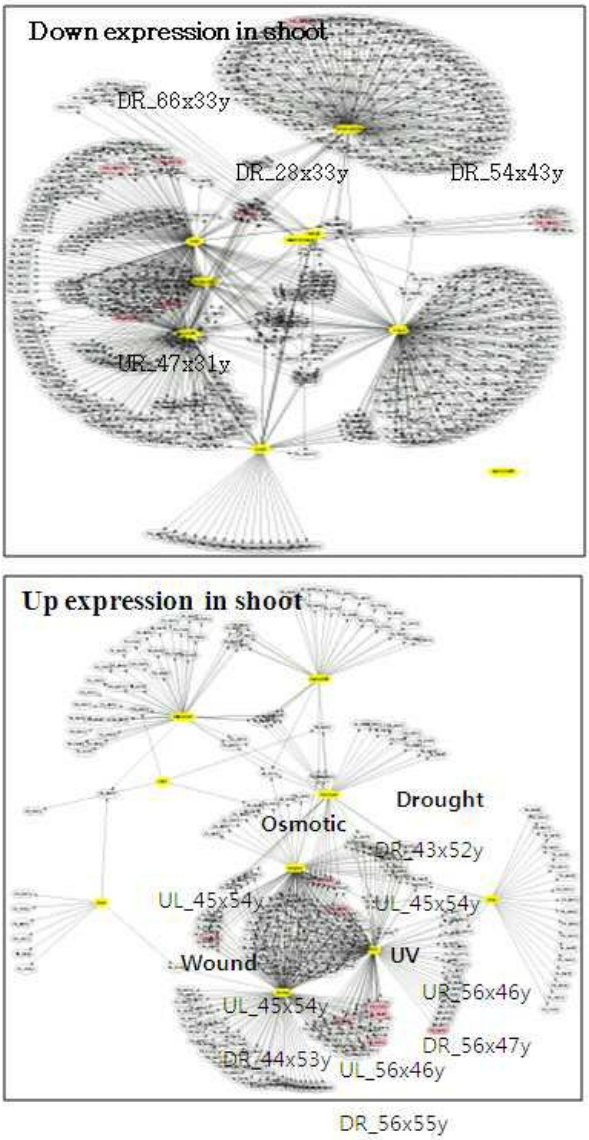
도면3


실험 조건 군집(cluster)
11.32
-7.11
500
0
유전자 군집(cluster)
20
10
ara_72h
ara_24h
ara_8h
ara_3h
ara_1h
yd_1h
yd_3h
yd_8h
yd_24h
yd_72h
sd_3h
sd_1h
sd_8h
sd_24h
sd_72h
nh_1h
nh_3h
nh_8h
nh_24h
nh_72h
ys_72h
ys_24h
ys_1h
ys_3h
ys_8h
tm_8h
tm_1h
tm_72h
tm_24h
애기장대
유달
산동채
내한
영산
탐미

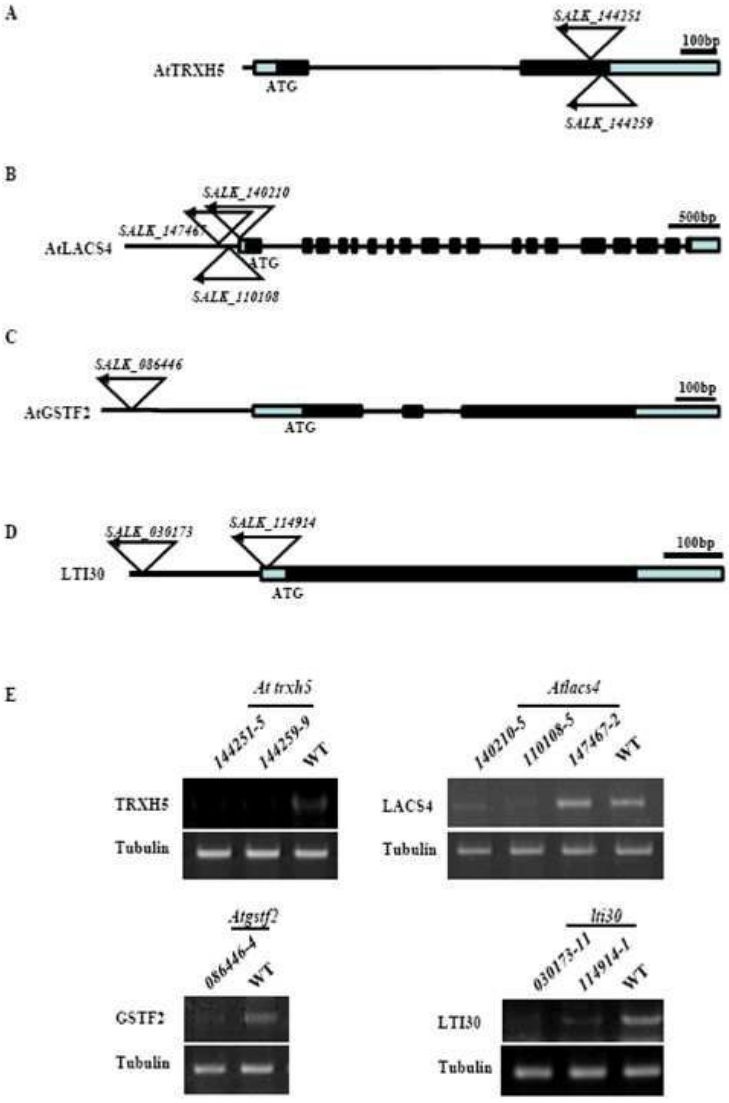
도면4


내한
영산
탐미
0 1 3 8 24 72 0 1 3 8 24 72 0 1 3 8 24 72 (h)
At4g02520
RT-PCR
Array 1.37 1.88 1.57 1.47 1.51 1.31 1.03 0.88 0.95 1.2 1.00 0.84 0.30 0.61 0.92 0.93 0.77 0.20
At4g23850
RT-PCR
Array 1.23 1.72 1.47 1.49 1.28 0.96 0.96 0.77 1.30 0.85 1.23 0.80 1.12 1.11 1.05 0.98 0.79 0.64
At1g45145
RT-PCR
Array 1.30 1.80 1.52 1.38 1.39 0.73 1.24 1.02 0.85 0.75 0.61 0.78 0.81 0.76 0.51 0.76 0.90 0.51
At4g12490
RT-PCR
Array 0.68 0.90 1.16 1.59 1.90 2.36 0.66 0.98 2.36 1.76 1.50 0.33 -0.05 1.83 2.19 0.83 0.21 0.05
At3g50970
RT-PCR
Array -0.30 -0.30 -0.52 -0.36 -0.14 0.97 -1.69 -1.75 -1.21 -0.82 -1.16 -1.57 -0.09 -0.37 -0.52 -0.85 -1.15 -1.45
At1g21100
RT-PCR
Array 0.43 0.07 0.64 1.00 0.84 0.98 -0.42 0.19 0.02 0.66 1.11 0.36 0.74 0.47 0.71 0.85 -0.12 0.49
β-Tubulin

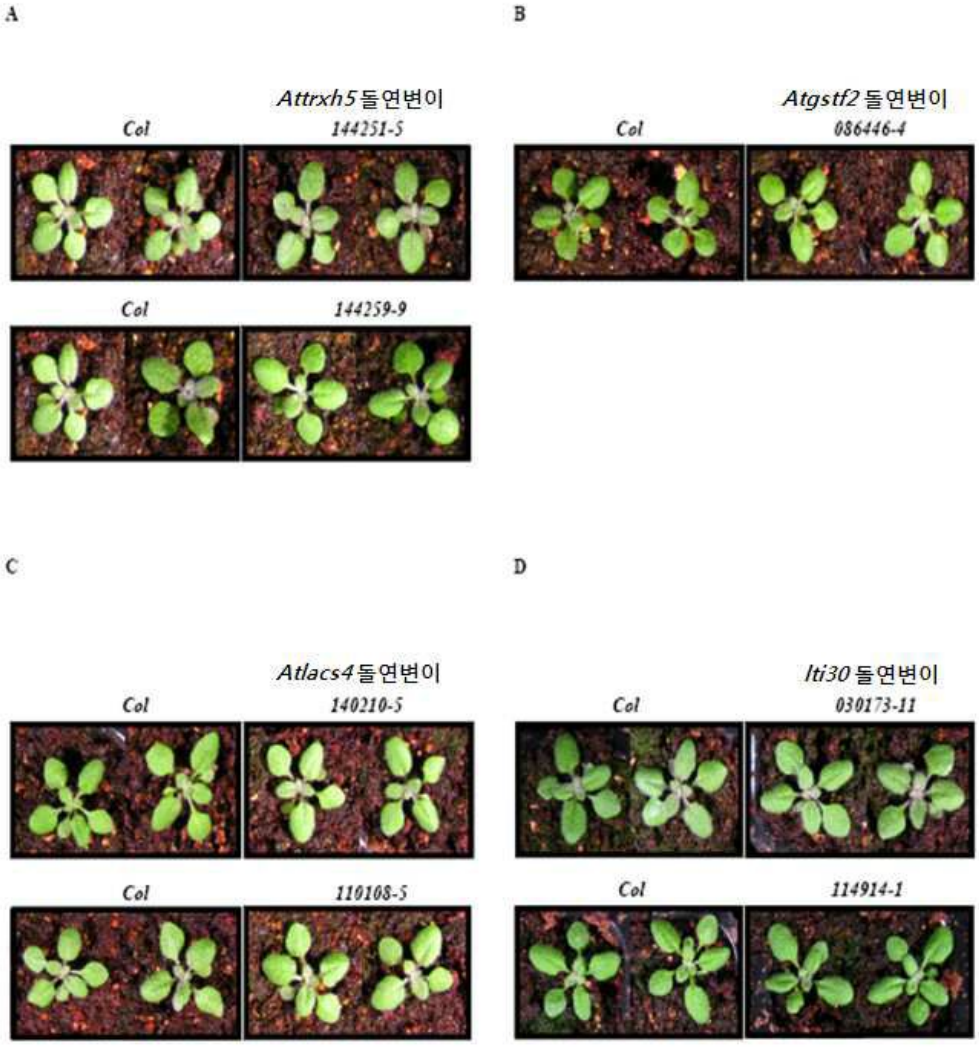
도면5


Down expression in shoot
DR_66x33y
DR_28x33y
DR_54x43y
UR_47x31y
Up expression in shoot
Drought
Osmotic
DR_43x52y
UL_45x54y
UL_45x54y
Wound
UV
UR_56x46y
UL_45x54y
DR_56x47y
DR_44x53y
UL_56x46y
DR_56x55y

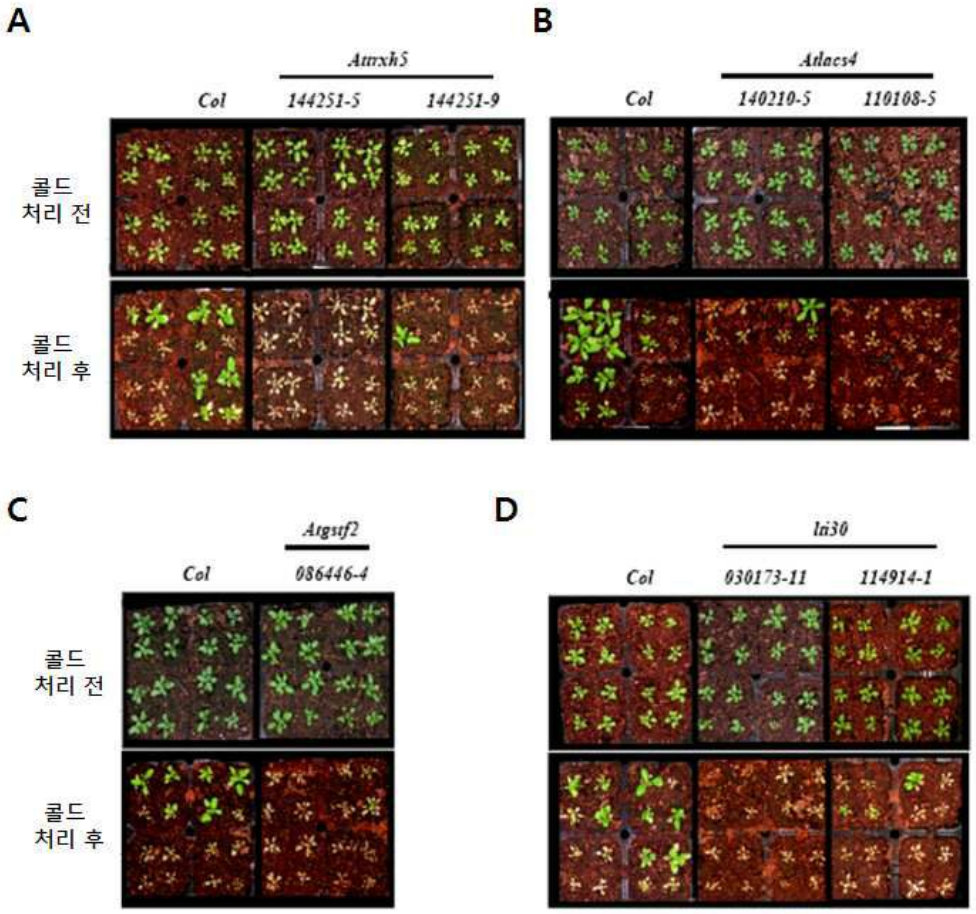
도면6


A
AtTRXH5
ATG
SALK_144251
SALK_144259
100bp
B
AtLACS4
ATG
SALK_140210
SALK_147467
SALK_110108
500bp
C
AtGSTF2
ATG
SALK_086446
100bp
D
LTI30
ATG
SALK_036173
SALK_114914
100bp
E
At trxh5
144251-5
144259-9
WT
TRXH5
Tubulin
Atlacs4
140210-5
110108-5
147467-2
WT
LACS4
Tubulin
Atgstf2
086446-4
WT
GSTF2
Tubulin
lti30
030173-11
114914-1
WT
LTI30
Tubulin

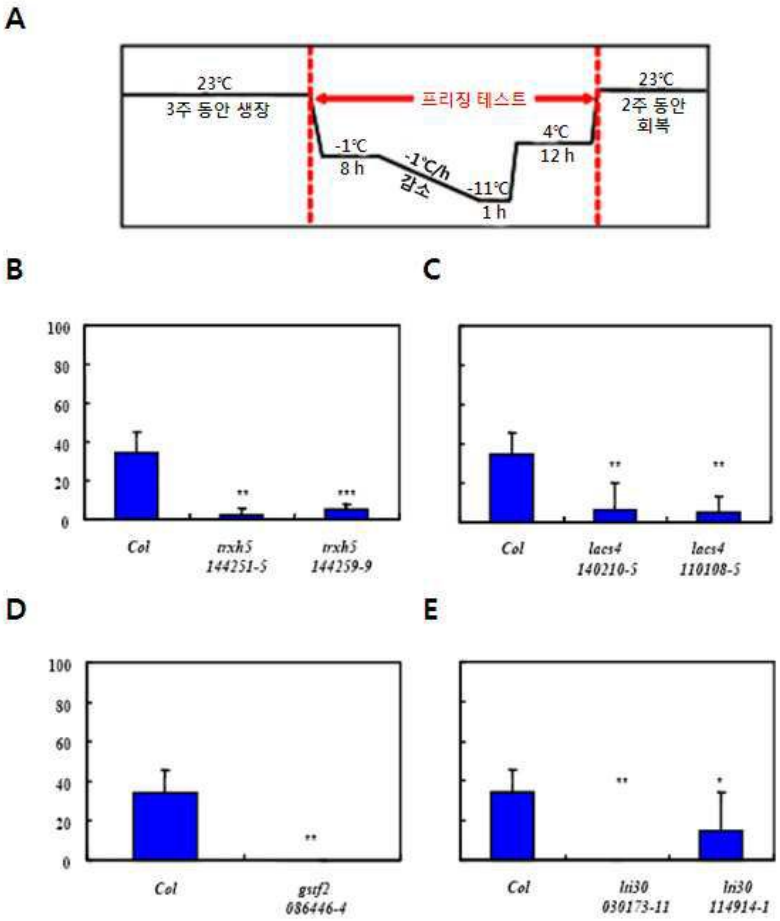
도면7


A
Attrxh5 돌연변이
Col
144251-5
Col
144259-9
B
Atgstf2 돌연변이
Col
086446-4
C
Atlacs4 돌연변이
Col
140210-5
Col
110108-5
D
Iti30 돌연변이
Col
030173-11
Col
114914-1

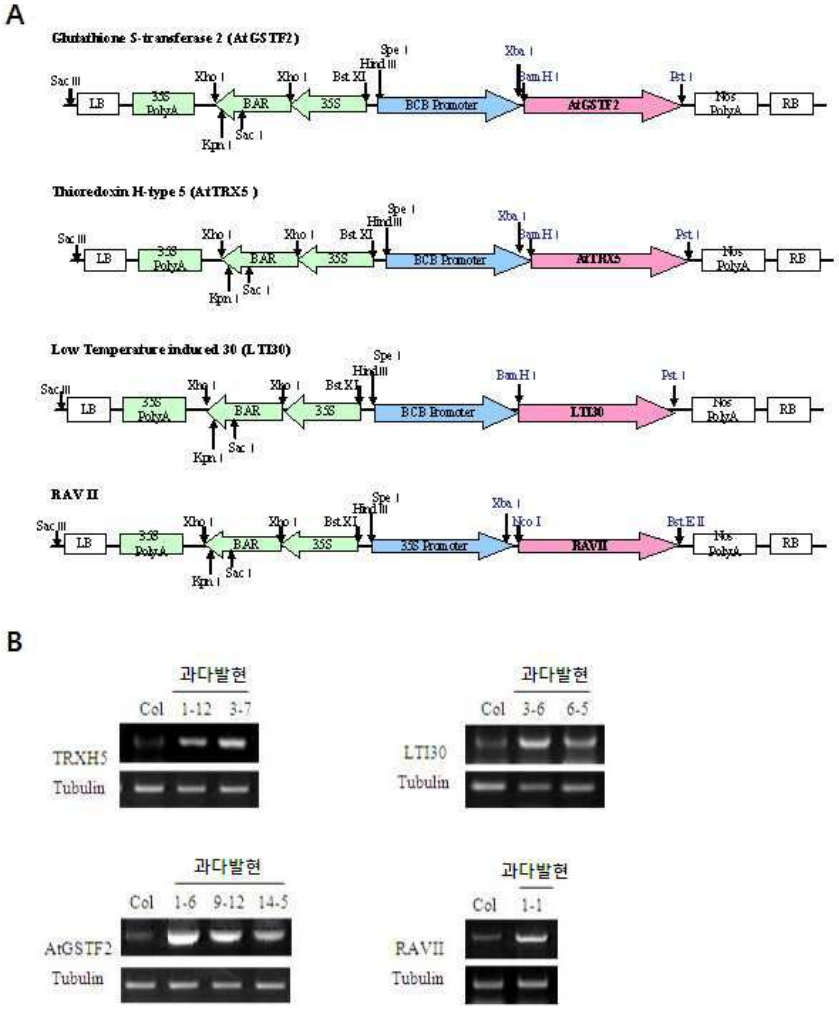
도면8


A
Atnxh5
Col
144251-5
144251-9
콜드 처리 전
콜드 처리 후
B
Atlacs4
Col
140210-5
110108-5
C
Atgsif2
Col
086446-4
콜드 처리 전
콜드 처리 후
D
lti30
Col
030173-11
114914-1

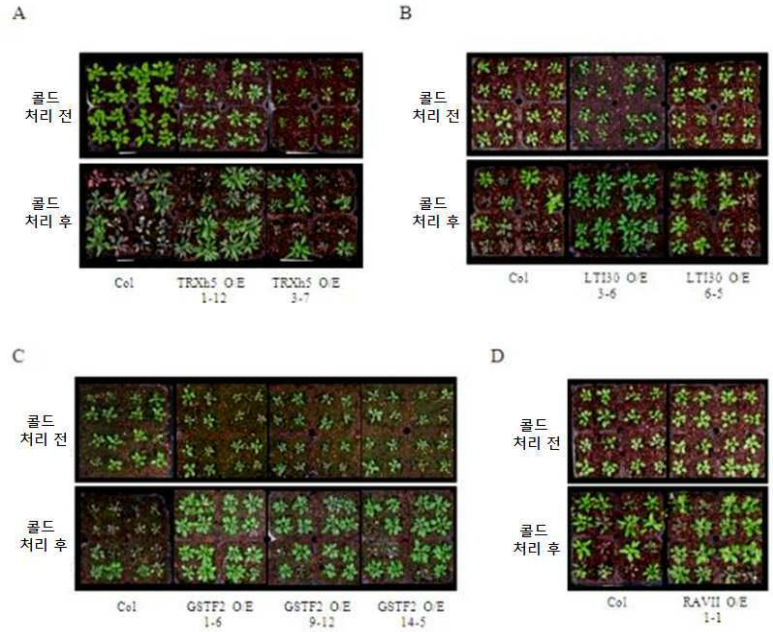
도면9


A
23℃
3주 동안 생장
프리징 테스트
23℃
2주 동안
회복
-1℃
8 h
-1℃/h
감소
-11℃
1 h
4℃
12 h
B
C
100
80
60
40
20
0
Col
trxh5
144251-5
trxh5
144259-9
Col
lacs4
140210-5
lacs4
110108-5
D
E
Col
gstf2
086446-4
Col
lti30
030173-11
lti30
114914-1

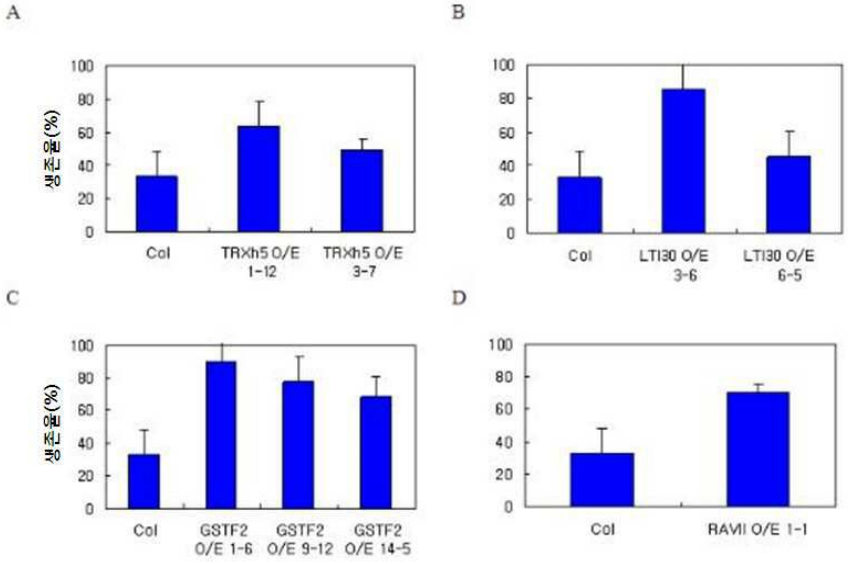
도면10


A
Glutathione S-transferase 2 (AtGSTF2)
Thioredoxin H-type 5 (AtTRX5)
Low Temperature induced 30 (LTI30)
RAV II
LB
35S PolyA
BAR
35S
BCB Promoter
35S Promoter
AtGSTF2
AtTRX5
LTI30
RAVII
Nos PolyA
RB
Sac III
Xho I
Kpn I
Sac I
Spe I
Hind III
Bst XI
Xba I
BamH I
Pst I
Nco I
BstE II
B
과다발현
Col
1-12
3-7
TRXH5
Tubulin
3-6
6-5
LTI30
1-6
9-12
14-5
AtGSTF2
1-1
RAVII

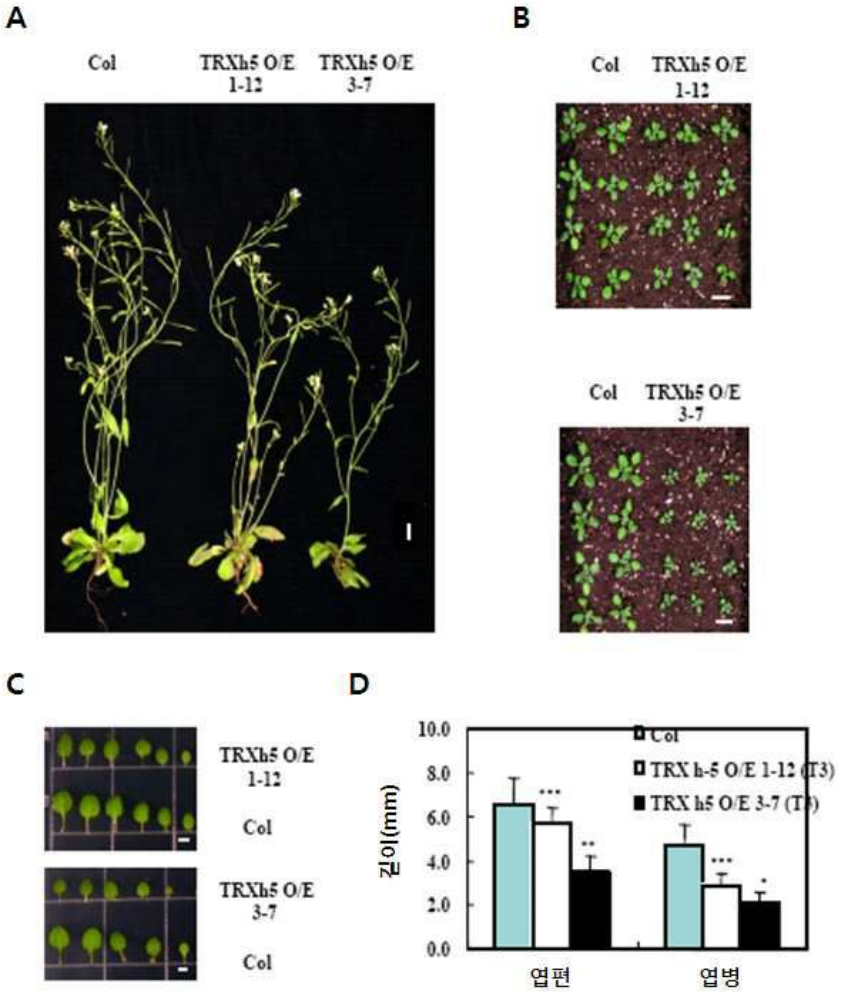
도면11


A
콜드 처리 전
콜드 처리 후
Col
TRXh5 O/E 1-12
TRXh5 O/E 3-7
B
콜드 처리 전
콜드 처리 후
Col
LTI30 O/E 3-6
LTI30 O/E 6-5
C
콜드 처리 전
콜드 처리 후
Col
GSTF2 O/E 1-6
GSTF2 O/E 9-12
GSTF2 O/E 14-5
D
콜드 처리 전
콜드 처리 후
Col
RAVII O/E 1-1

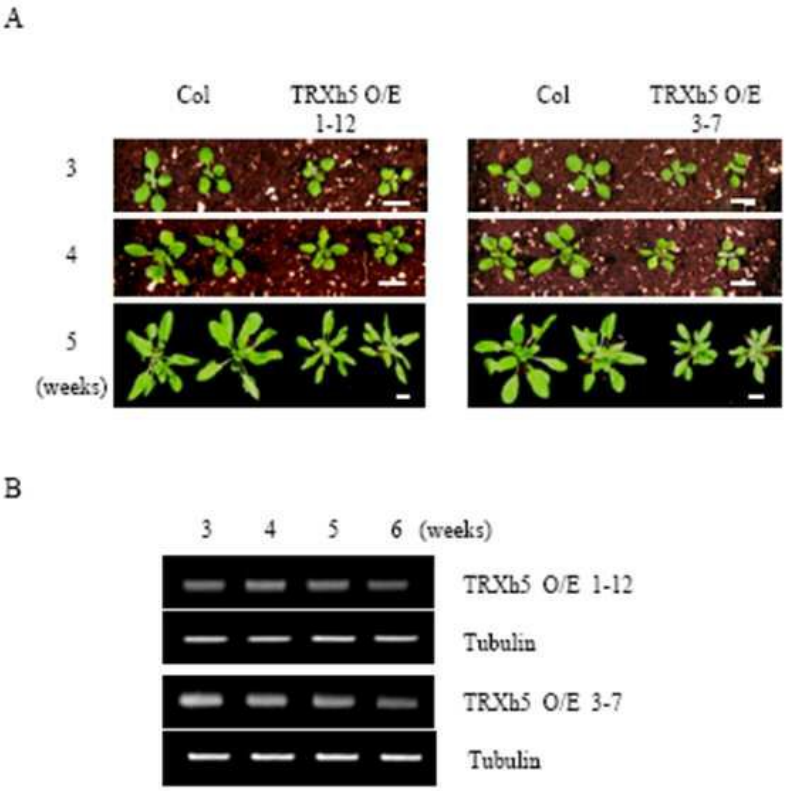
도면12


A
생존율(%)
100
80
60
40
20
0
Col
TRXh5 O/E 1-12
TRXh5 O/E 3-7
B
Col
LTI30 O/E 3-6
LTI30 O/E 6-5
C
생존율(%)
Col
GSTF2 O/E 1-6
GSTF2 O/E 9-12
GSTF2 O/E 14-5
D
Col
RAVII O/E 1-1

도면13


A
Col
TRXh5 O/E 1-12
TRXh5 O/E 3-7
B
Col
TRXh5 O/E 1-12
Col
TRXh5 O/E 3-7
C
TRXh5 O/E 1-12
Col
TRXh5 O/E 3-7
Col
D
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
길이(mm)
Col
TRX h-5 O/E 1-12 (T3)
TRX h5 O/E 3-7 (T3)
***
**
***
*
엽편
엽병

도면14



서 열 목 록

<110> Ewha Womens University
<120> Genes Implicated in Enhancement of Cold or Freezing Tolerance and Transgenic Plants Using the Same

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 357
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1
atggccggtg aaggagaagt gattgcttgc cataccctcg aagtttggaa cgagaaggtc 60

aaagacgcca atgaatccaa gaaactgatt gtgatagact tcacagcatc atggtgtcca 120

ccttgccgtt tcattgcacc agtgtttgca gagatggcta agaagttcac taatgttgtc 180

ttcttcaaga tcgatgttga tgaattgcaa gctgttgctc aggaattcaa agttgaggca 240

atgcctactt ttgttttcat gaaagaaggc aacatcattg atcgtgttgt cggtgctgcg 300

aaagatgaga tcaatgagaa gctgatgaag catggtggtc ttgtagcttc tgcttga 357

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2
Met Ala Gly Glu Gly Glu Val Ile Ala Cys His Thr Leu Glu Val Trp
1 5 10 15

Asn Glu Lys Val Lys Asp Ala Asn Glu Ser Lys Lys Leu Ile Val Ile
20 25 30

Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Pro Pro Cys Arg Phe Ile Ala Pro Val
35 40 45

Phe Ala Glu Met Ala Lys Lys Phe Thr Asn Val Val Phe Phe Lys Ile
50 55 60

Asp Val Asp Glu Leu Gln Ala Val Ala Gln Glu Phe Lys Val Glu Ala
65 70 75 80

Met Pro Thr Phe Val Phe Met Lys Glu Gly Asn Ile Ile Asp Arg Val
85 90 95

Val Gly Ala Ala Lys Asp Glu Ile Asn Glu Lys Leu Met Lys His Gly
100 105 110

Gly Leu Val Ala Ser Ala
115