



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

The logo of Jeju National University is located in the top left corner. It features a circular emblem with a stylized flame or flower shape in the center, surrounded by the text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952' and 'JEJU 1952'.

碩士學位論文

환경스트레스에 의해 유도되는  
크리핑벤트그라스 *NAC* family  
유전자들의 클로닝 및 기능 분석

Cloning and functional analysis of *NAC* family  
genes induced by environmental stresses in  
creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L. cv  
*penncross*)

濟州大學校 大學院

生命工學科

金寶花

2012年 2月

환경스트레스에 의해 유도되는  
크리핑 벤트그라스 *NAC* family  
유전자들의 클로닝 및 기능 분석

指導教授 李 孝 淵

金 寶 花

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2012年 2月

金寶花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)

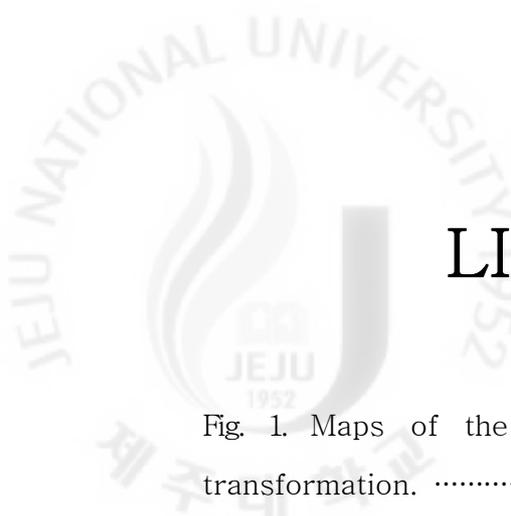
濟州大學校 大學院

2012 年 2月

# 목차

LIST OF FIGURES .....	iii
LIST OF TABLES .....	v
ABSTRACT .....	vi
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법	
1. 식물재료 .....	4
2. RNA 추출 및 first cDNA strand의 합성 .....	4
3. 환경스트레스에 유도되는 <i>AsNAC</i> 유전자 단편의 분리 .....	4
4. <i>AsNAC</i> 단편 유전자들의 발현 분석 .....	5
5. <i>AsNAC</i> 단편 유전자들의 상동성 분석 .....	6
6. Full-length <i>AsNAC</i> cDNA 유전자들의 클로닝 .....	6
7. Full-length <i>AsNAC</i> cDNA 유전자들의 기관별 발현분석 .....	6
8. Full-length <i>AsNAC</i> cDNA 유전자들의 스트레스별 발현분석 .....	7
9. Subcelluar localization 분석 .....	7
10. Binary vector 및 <i>Agrobacterium</i> 형질전환 .....	8
11. 애기장대 형질전환 및 선발 .....	10
12. T2세대 형질전환 식물체의 스트레스 처리 .....	10
13. 동형접합체 식물의 선발 .....	10
14. T3세대 형질전환체 식물의 스트레스 처리 .....	11
III. 결과 및 고찰	
1. <i>NAC</i> family 유전자들의 클로닝 .....	14
2. 환경스트레스에서 크리핑벤트그라스 <i>NAC</i> family 유전자들의 유도된 발현 .....	21

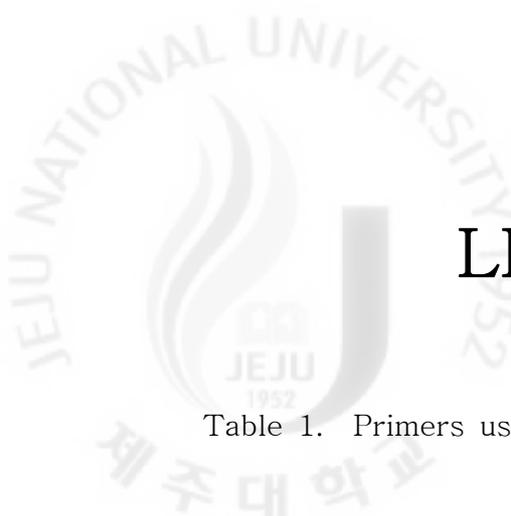
3. <i>AsNAC316</i> , <i>AsNAC317</i> , <i>AsNAC322</i> 의 full length유전자의 클로닝과 상동성 분석 .....	23
4. <i>AsNAC</i> family유전자의 기관별 발현 .....	26
5. <i>AsNAC</i> family유전자의 환경스트레스와 관련된 발현 .....	29
6. 양과세포를 이용한 <i>AsNAC317-1</i> 유전자산물의 Subcellular localization	33
7. 형질전환 식물체의 유전자 도입 및 발현 분석 .....	35
8. T2 형질전환 식물체의 표현형 분석 .....	37
9. T3 형질전환 식물체의 표현형 분석 .....	40
 IV. 종합고찰 .....	 48
 V. 참고문헌 .....	 51
 ACKNOWLEDGEMENTS .....	 59



# LIST OF FIGURES

Fig. 1. Maps of the T-DNA region of the binary plasmids for plant transformation. ....	9
Fig. 2. Cloning of <i>NAC</i> family genes depending on PCR from creeping bentgrass. ....	16
Fig. 3. Alignment of the cloned partial <i>AsNAC</i> genes by using the Clustal X program. ....	18
Fig. 4. Phylogenetic relationship of the partial <i>AsNAC</i> proteins with the <i>NAC</i> domains of several <i>NAC</i> proteins from <i>Arabidopsis</i> , rice, petunia and wheat. ....	20
Fig. 5. Expression of the <i>AsNAC</i> family genes by the treatment of heat, dark and senescence by RT-PCR. ....	22
Fig. 6. Comparison of amino acids deduced from each of two full-length cDNAs cloned from <i>AsNAC316</i> , <i>AsNAC317</i> and <i>AsNAC322</i> , respectively. ....	24
Fig. 7. Phylogenetic analysis of the three full-length <i>AsNAC</i> genes. ....	25
Fig. 8. Expression pattern of the cloned full-length <i>AsNAC</i> cDNAs by various organs by semi-quantitative RT-PCR ....	28

Fig. 9. Expression of the cloned full-length <i>AsNAC</i> cDNAs in senescent leaves induced under dark stress. ....	31
Fig. 10. Expression of the cloned full-length <i>AsNAC</i> cDNAs under mannitol and salt stresses. ....	32
Fig. 11. Subcellular localization of <i>AsNAC317</i> in onion epidermal cells. ·	34
Fig. 12. Outward appearance of the transgenic plants and expression of the transgenes in the plants. ....	36
Fig. 13. Phenotypic analysis of transgenic plants under salt stress. ....	38
Fig. 14. Phenotypic analysis of transgenic plants under drought stress. ·	39
Fig. 15. Leaf disk floating assays for an evaluation of drought tolerance in leaves of the transgenic pHG336 and pHG339 plants. ....	42
Fig. 16. Salt stress response of plants overexpressing <i>AsNAC317-1</i> . ....	43
Fig. 17. Drought stress response of plants overexpressing <i>AsNAC317-1</i> . ....	45
Fig. 18. Germination assay of plants overexpressing <i>AsNAC317-1</i> . ....	47



# LIST OF TABLES

Table 1. Primers used in this study. ....12



# Abstract

All kinds of crops including foods, feeds, and turf grasses are damaged frequently by various environmental stresses such as drought, salt, and high temperature, which cause the loss of agronomic productivity. Many abiotic stress responsive genes have been identified in plants and they have been applied to breed crops tolerant to environmental stresses through transgenic approach. Creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L. cv *pennncross*), commonly used for landscaping of home garden and golf course, is a valuable economic grass. In this study, NAC family genes that seem to be inducible by abiotic stresses were targeted and thus 9 partial cDNAs containing NAC domain sequence were isolated. Their mRNA expressions were responded to abiotic stress such as salt, drought, heat, or dark. From their deduced amino acid comparison, five of *AsNAC318*, *AsNAC319*, *AsNAC320*, *AsNAC323*, *AsNAC324* belonged to the non apical meristem (NAM) subfamily and the remaining four of *AsNAC316*, *AsNAC317*, *AsNAC321*, and *AsNAC322* (ATAF1). Especially, from three genes of *AsNAC316*, *AsNAC317*, and *AsNAC322* induced significantly by salt, drought, or dark stress as well as belonging to the ATAF1 subfamily, their full-length cDNAs were cloned by 5' and 3' RACE PCR. *AsNAC317* was confirmed to be localized into nucleus by transient assay using onion epidermal cells. Several kinds of binary vectors for plant transformation were constructed to analyze the biological role of the genes in plants. Each *AsNAC316*, *AsNAC317*, and *AsNAC322* placed under the control of *CaMV 35S* promoter were transformed into *Arabidopsis thaliana*.

# I. 서론

가뭄, 홍수, 저온, 고온, 고염분(salt)과 같은 여러가지 환경스트레스는 식물들의 성장과 적응에서 장애요인이 된다(Smirnoff et al., 1998). 흔히 관찰되는 변화는 성장지연과 더불어 종자 생산량의 감소(Westgate et al., 2000; Tuteja et al., 2005), 그리고 잎의 노화(Ranjan et al., 2001)가 대표적이다. 이러한 변화는 식용, 사료용, 공업용, 조경용 등을 포함한 모든 작물의 상품가치를 떨어뜨리는 주요 원인이 된다. 특히 잔디와 같은 조경식물은 공원, 스포츠공간, 골프장 등에 식재되어 일반작물 이상으로 환경스트레스에 대한 강한 저항성이 요구된다.

일반적으로, 스트레스저항성 품종은 전통육종 방법에 의해서도 육성될 수 있지만 한계가 있으며, 보다 우수한 품종을 육성하기 위해서는 스트레스에 대한 저항성 메커니즘을 분자적 수준에서 이해하고, 유용유전자를 발굴하는 연구와 노력이 필요하다(Tuteja et al., 2005). 식물들이 성장과 적응에 저해가 될 수 있는 스트레스에 노출되면 해당 스트레스를 인지함과 동시에 분자적 신호에 변화가 생긴다. 분자신호에 따라 환경스트레스에 반응하는 많은 유전자들이 전사 수준에서 조절되고, 이 유전자들의 산물이 최종적으로 스트레스에 대한 식물의 저항성을 높여 주고 건강한 상태가 유지되도록 한다 (Shinozaki et al., 2000, Shinozaki et al., 2003). 식물이 환경스트레스에 저항하기 위해서는 신호전달유전자, 효소유전자, 전사조절유전자 등을 포함한 다양한 종류의 유전자가 관여하는 것으로 알려져 있다(Chen et al., 2002, Cushman and Bohnert, 2000). 환경스트레스에 반응하는 대표적인 전사인자로는 DREB/CBFs, AREB/ABFs, NACs (NAM, ATAF, and CUC) 등이 알려져 있다(Ito et al., 2006, Kim et al., 2004, Kizis and Pages, 2002, Jeong et al., 2010, Xue et al., 2011, Hu et al., 2006). 그 중에서 NAC family protein은 N 말단 지역에 NAC domain을 가진 식물 특이적 전사인자로서, 보고된 바에 따르면 애기장대에서 117개, 벼에서는 151개의 유전자가 발견되었을 정도로 식물에서 많이 존재하고 있는 super family 전사인자이다(Kikuchi et al., 2003, Fang et al., 2008, Kikuchi et al.,

2010).

1992년에 애기장대의 *RESPONSIVE TO DEHYDRATION 26(RD26)*에서 처음 cDNA가 보고된 이후로(Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992), 1996년에 *Petunia*의 *no apical meristem (nam)* mutant 관한 실험에서 *NAM* 유전자가 배아 발생 동안에 shoot apical meristem (SAM, 줄기생장점) 형성에 중요하며 꽃의 분열조직에서 기관 시원체의 위치결정의 역할을 하는 기능이 처음으로 보고되었다(Souer et al., 1996). 그 후, NAC domain을 가진 *cuc1*과 *cuc2* 유전자가 꽃과 배아 발달에서 기관들의 분리를 조절한다고 알려져 왔으며(Takada et al., 2001, Vroemen et al., 2003), 이 때, *petunia*의 *NAM*을 포함하여 기존에 보고되어진 애기장대와 벼의 cDNA clone들을 비교한 결과, N말단에 보존된 서열을 확인하여, 이 서열을 NAC(*NAM*, *ATAF1,2*, *CUC2*) domain이라 명명하였다(Aida et al., 1997). 밑에서 보고된 NAC family인 *TtNAM-B1* 유전자는 grain protein, 그리고 아연과 철 함량을 증가 시킬 뿐만 아니라 노화와 관련되어 있다고 알려졌다(Uauy et al., 2006). 특히, 다양한 종류의 NAC transcription factor 중 ATAF subfamily에 속하는 유전자들은 여러 종류의 식물에서 저온, 고염, 가뭄 등의 스트레스 또는 잎의 노화와 관련있는 것으로 보고되었다(Ohnishi et al., 2005). 벼의 *STRESS-RESPONSIVE NAC1 (SNAC1)*은 가뭄 스트레스 상황에서 높은 전사수준을 보이며, *SNAC1*을 과발현시킨 벼 형질전환체는 가뭄과 염스트레스에서 22-34% 정도로 야생형에 비해 저항성이 높다고 알려져 있다(Hu et al., 2006). 최근에 밑에서 분리된 *TaNAC69*는 가뭄스트레스 상황에서 전사가 촉진되었고, 이 유전자를 밑에서 과발현 시켰을 때 가뭄스트레스에 대한 저항성을 향상 시키는 것으로 보고되었다(Xue et al., 2011). 이와 같이, NAC family 유전자는 식물의 발달과 스트레스에서 다양한 기능을 하며, 여러 가지 환경스트레스에 대한 저항성 기능의 획득과 관련하여 많이 연구되어지고 있는 유전자이다.

크리핑벤트그라스를 비롯한 여러 종류의 한지형 그라스류들은 고온스트레스에서 잎과 뿌리 등의 성장지연, 잎노화 심지어는 죽음을 일으킨다 (Duff and Beard, 1975, Huang et al., 1998a, b). 이러한 고온스트레스는 온도 자체에 의한 영향 뿐만 아니라 급격한 물의 증발로 인한 물의 부족을 수반하며, 이차적으

로는 다른 병원균 감염에 있어서 저항성을 약화 시킬 수 있다(Mark Tester and Antony Bacic. 2005). 따라서, 작물에 각종 이차적 피해를 일으키는 환경스트레스에 대한 저항성을 높혀줄 수 있는 연구가 요구된다.

본 연구는 크리핑벤트그라스에서 환경스트레스에 반응하는 NAC family 유전자를 클로닝하여 모델식물인 애기장대에 형질전환하여 유전자의 기능을 살펴보고, 우수한 기능을 가진 유전자가 분리 될 경우, 분자육종을 통하여 환경스트레스에 강한 품종개발 가능성을 모색해 볼 것이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료

본 연구는 유전자 클로닝을 위하여 한지형 잔디인 크리핑 벤투그라스 (*Agrostis stolonifera* L. cv. Penncross)를 사용하였으며, 유전자 기능 연구를 위한 형질전환 실험에는 모델식물인 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* L. cv. Columbia)를 이용하였다. 크리핑 벤투그라스와 애기장대는 모두 21°C, 장일조건 (16h light/8h dark)의 식물생장실에서 관리되었다.

### 2. RNA 추출 및 first cDNA strand의 합성

식물 RNA는 재료를 채취하자마자 액체질소에 급속 냉각 시켰다. 시료를 미리 냉각 시킨 막자사발에 넣고 액체 질소를 부어가며 완전한 분말형태가 될 때까지 분쇄시켰다. RNase-free 1.5ml micro tube (Axygen)에 Trizol reagent (MRC) 1ml을 미리 넣고 분쇄된 시료를 넣어 혼합한 후 제조사에서 제공된 실험 방법에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출이 잘 이루어 졌는지는 추출된 RNA를 1% 아가로스 겔에 1µg을 전기영동 하여 확인 하였다.

1st strand cDNA는 확인된 1µg의 RNA를 0.5µg의 oligo dT primer, M-MLV 5x reaction buffer, 10mM dNTP, 25unit RNasin Ribonuclease inhibitor, 200unit M-MLV reverse transcriptase (Promega), DEPC dH<sub>2</sub>O를 혼합한 후 M-MLV reverse transcriptase 제조사의 방법을 따라 42°C에서 1시간 반응으로 합성하였다.

### 3. 환경스트레스에 유도되는 *AsNAC* 유전자 단편의 분리

환경스트레스에 의해 유도되는 *AsNAC* 유전자들을 분리하기 위해 애기장대 microarray 데이터베이스(<http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress>)를 이용하여 가뭄, 염, 저온 등과 같은 환경스트레스 및 노화에 유도되는 애기장대 NAC

family 유전자들의 염기서열 정보를 수집한 다음, 모든 염기서열정보를 아미노산 서열로 치환한 후 ClustalX 프로그램을 이용하여 단백질 상동성을 비교하였다. NAC domain에서 서로 간에 상동성이 높은 부위를 택하여 NAC F1, NAC F2, NAC R1, NAC R2를 포함한 총 4개의 프라이머를 제작하였다 (Table 1). 고온 처리된 잎과 노화된 잎에서 추출한 RNA에서 합성된 1st strand cDNA를 주형으로 PCR을 진행하여 증폭된 혼합 DNA를 얻었다. 증폭된 DNA를 pGEMT easy 벡터(Promega)에 클로닝하였다. 증폭된 클론을 제거하기 위해 4개의 염기 (GTAC)를 인식하는 *RsaI* 제한효소를 이용하여 20여개의 후보 클론을 절단한 다음, 1.0% 아가로스 겔 상에서 밴드 패턴을 비교하였으며, 서열 분석을 통해 최종적으로 총 9개의 독립적인 단편 유전자를 확보하였다.

#### 4. AsNAC 단편 유전자들의 발현 분석

대조구로 이용된 크리핑 벤트그라스 (*Agrostis stolonifera* L. cv. Penncross)는 지름 15cm, 높이 20cm의 화분에서 온도, 습도, 광주조건을 각각 21°C, 60%, 12h로 조절되는 생장실에서 유지되었다.

고온 (heat)스트레스는 대조구의 일부식물을 38°C, 60%, 12h light에서 하루에 한 번씩 38°C의 물을 관수시키면서 유지시켰다.

암 (dark)스트레스는 3mM의 MES buffer에 1년생의 크리핑 벤트그라스 잎을 담근 후 암스트레스 조건 (21°C, 60%, 24h dark)에서 노화를 진행시켰다.

기내 (*in vitro*)에서 자란 크리핑 벤트그라스에서 노화된 잎과 노화되지 않은 잎의 발현양의 차이를 보기위해 크리핑 벤트그라스의 종자의 종피를 제거한 후 100% EtOH와 2% NaOCl로 살균한 후 MS배지에 파종하였다. 파종된 크리핑 벤트그라스는 25°C에서 장일조건 (16h light/8h dark)으로 성장시켰으며 18주 후에 노화가 진행된 잎과 진행되지 않은 잎을 각각 분리하여 샘플을 채취하였다.

각각의 스트레스에 노출된 잎을 채취하여 -70°C에 보관 후에 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 스트레스에 따른 발현을 보기 위해 1µg의 RNA를 cDNA로 합성하였다. 독립적인 9개의 부분적 NAC유전자들의 보존된 서열 중에서 subdomain의 경계부분에서 각각의 유전자 특이적인 프라이머를 합성 (Table 1)한 다음 semi-quantitative PCR을 수행하였다.

## 5. AsNAC 단편 유전자들의 상동성 분석

AsNAC 단편 유전자들의 상동성을 분석하기 위해 기존에 보고된 몇몇 NAC 유전자 정보를 NCBI Genbank 데이터베이스를 통하여 수집하였다. 수집된 유전자 서열들과 AsNAC 단편 유전자들을 FASTA format으로 정렬한 다음 ClustalX 프로그램을 통하여 분석한 후 MEGA 프로그램을 통하여 neighbor joining 방법으로 Phylogenetic tree를 나타내었다.

## 6. Full-length AsNAC cDNA 유전자들의 클로닝

9개의 독립적인 단편 유전자 중에서 스트레스에 반응하는 세개의 유전자를 선택하였다. 선택된 세개의 후보유전자들은 각각 5'/3'-Full RACE(rapid amplification of cDNA ends) Core Set (Takara Bio Inc, USA)를 사용하여 전체 유전자 염기서열을 클로닝 하였다.

먼저, 3'RACE PCR을 위해서 3sites Adaptor가 달린 oligo dT를 이용하여 노화된 잎의 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 제조사에서 제공한 3sites Adaptor primer (5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3')와 각각의 upstream primer(Table 1)를 이용하여 PCR반응을 통해 NAC domain을 거쳐 특정서열을 증폭함으로써 3' 말단의 서열을 분석하였다.

5' RACE PCR은 기존에 알고 있는 서열을 바탕으로 5' 말단 끝을 인산화시킨 변형된 프라이머(Table 1)로 cDNA를 합성을 하였다. 합성된 cDNA는 T4 RNA ligase(Takara)로 단일가닥을 연결시켜 유전자의 알고자 하는 서열을 포함하여 디자인한 프라이머(Table 1)를 이용하여 특정 서열을 증폭시킴으로써 unknown 서열을 클로닝하였다.

## 7. Full-length AsNAC cDNA 유전자들의 기관별 발현분석

크리핑벤틀그라스의 꽃, 엽초, 포복경, 뿌리 그리고 한달정도 키운 크리핑벤틀그라스의 잎과 2년생의 크리핑벤틀그라스 잎, 그리고 개화시기의 크리핑벤틀그라스의 잎을 각각 샘플링 하여 -70℃에 보관한 후 RNA를 추출하여 각각의 특이적인 서열로 디자인된 프라이머(Table 1)들로 semi-quantitative PCR을 수행하였다.

PCR product들은 1.2%의 아가로스 겔에서 전기영동을 통해 발현양을 확인하였다.

## 8. Full-length *AsNAC* cDNA 유전자들의 스트레스별 발현분석

종피를 제거한 크리핑벤트그라스의 종자를 2% NaOCl로 세척한후 1/2 MS 배지에 과중였다. 과중된 종자는 25°C에서 24시간 빛을 주는 장일 조건으로 열흘간 배양하였다.

염 (Salt)스트레스를 테스트하기 위해 크리핑벤트그라스의 10일정도 자란 유묘를 뿌리가 다치지 않게 조심스럽게 배지로부터 제거한 후 50ml 튜브에 200mM NaCl 용액 10ml정도 넣고 유묘의 뿌리가 잠기도록 용액에 담근다. 그 후, 스트레스를 가한 크리핑벤트그라스는 12시간마다 샘플링을 한 후 -70°C에 보관하였다.

가뭄 (Drought)스트레스는 크리핑벤트그라스의 10일정도 성장시킨 유묘를 염스트레스와 동일한 방법으로 배지에서부터 조심스럽게 제거한 후 200mM의 Mannitol 용액에 담근 후, 12시간 마다 샘플링을 한 후 -70°C에 보관하였다.

염스트레스와 가뭄스트레스와 비교하기 위한 대조구는 NaCl용액과 Mannitol 용액을 만들기 위해 사용했던 1차증류수에 담근 후, 12시간마다 샘플링을 하여 -70°C에 보관하였다. 보관 해 두었던 샘플은 Trizol (MRC)를 이용하여 RNA를 추출한 후 미리 제작 해 두었던 프라이머(Table 1)로 semi-quantitative PCR을 수행함으로써 발현양상을 확인 하였다.

## 9. Subcelluar localization 분석

*AsNAC317*유전자의 종결코돈을 제외하여 PCR을 통해 증폭한 후 서열분석을 통해 확인된 단편을 *green fluorescent protein* (GFP) reporter유전자가 포함된 GFP fusion 벡터인 pGA3811 벡터(Kim et al, 2009)에 재조합 하였다. 클로닝 된 GFP fusion construct (pCaMV::*AsNAC317-1*-GFP)와 GFP fusion control (pCaMV35S:GFP)은 유전자의 subcelluar localization분석을 위하여 양과의 표피 세포에 도입시켰다.

particle bombardment를 수행하기 위하여 먼저, 양과의 표피를 벗겨 MS 배지 위에 잘 퍼서 올려 준비한 후, 금 입자에 GFP fusion construct와 GFP

fusion control을 각각 코팅하였다. 금 입자 코팅 방법은 다음과 같다. 먼저, 실험에 사용할 농축된 금입자들을 1.5ml micro tube(Axygen)에 덜어 넣고, 70% EtOH로 세정 한다. 그 후, 1shot당 0.8ul의 DNA를 넣고 8mM spermidine, 0.6M CaCl<sub>2</sub>, SDW를 300ul 부피가 되도록 넣는다. 그 다음 1/10배의 3M NaOAc와 2.5배의 100% 에탄올을 넣고 -20℃에서 20분간 정치한 후, 70% 에탄올로 세정 한다. 세정 후에 10배 정도의 100% 에탄올을 넣는다. Shot준비를 위해서 표적조직을 챔버안에 위치시킨 후, 홀더에 DNA가 코팅된 금입자 현탁액 20ul를 잘 도말하고 챔버내에 장착한다. 챔버 내압을 -76mmHg 로 감압한 후 particle bombardment를 수행하였다. 양과세포는 25℃, 암조건에서 24시간동안 MS배지상에서 배양된 후 형광현미경을 통하여 유전자가 도입된 양과세포를 관찰하였다.

#### 10. Binary vector 및 *Agrobacterium*형질전환

*Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 유전자를 도입하기 위하여 바이너리 벡터 pCAMBIA3301(www.cambia.org)는 사용되었다. 유전자 construct는 선발 마커로 제초제저항성을 위한 *bar* 유전자가 포함 되어 있으며, *AsNAC*유전자는 리포터 유전자인 인트론이 포함된  $\beta$ -glucuronidase 유전자 (*intron-gus*)를 제거한 위치에 삽입되었다. *bar* 유전자와 *AsNAC*유전자는 cauliflower mosaic virus(CaMV)35S promoter에 의해 조절된다(Fig 1). *bar*유전자는 글루타민 합성효소를 저해함으로써 phosphinotricin (PPT, 또는 glufosinate)과 bialaphos (phosphinotricyl-alanyl-alanine)에 대한 저항성을 수여하는 phosphinotricin acetyltransferase를 암호화한다. *A.tumefaciens* EHA105로 binary vector DNA를 도입하기 위하여 freeze-thaw방법을 사용하였다(An, G. 1987).

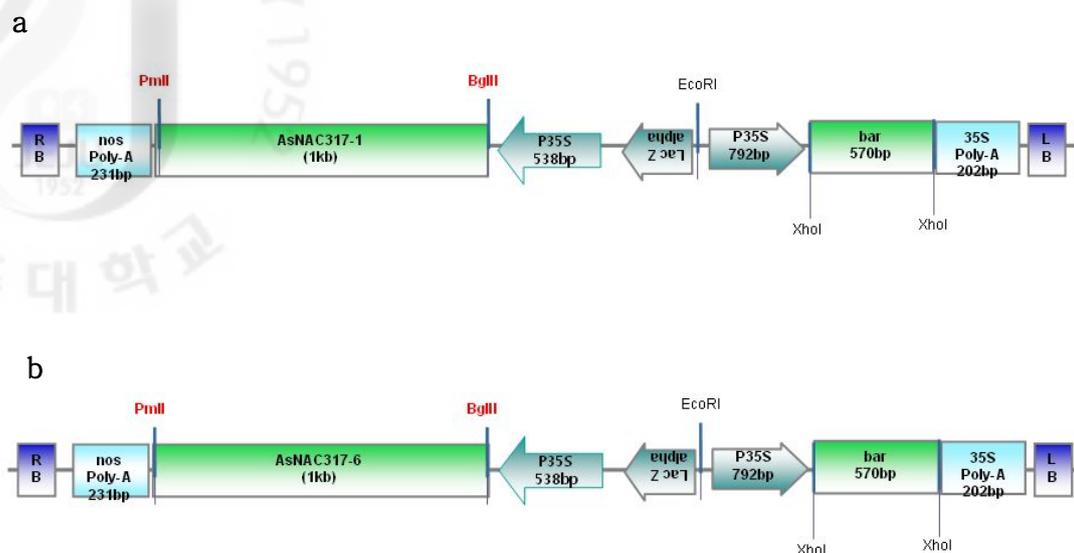


Figure 1. Maps of the T-DNA region of the binary plasmids for plant transformation. T-DNA regions of pCAMBIA3301-*AsNAC317-1* (a) and pCAMBIA3301-*AsNAC317-6* (b). RB, right border of T-DNA; LB, left border of T-DNA; P35S, CaMV35S promoter; nos poly-A, nopaline synthase gene terminator; *bar*, basta resistance gene; LacZ alpha, beta-galactosidase fragment.

## 11. 애기장대 형질전환 및 선발

애기장대에 유전자를 도입하기 위해 Floral Dip방법(Steven J. et al 1998)을 이용하였다. 그 방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. 애기장대는 21℃, 장일조건 (16h light/8h dark)의 식물생장실에서 4주 동안 성장시키고, 애기장대에 맺힌 종자들을 제거 하였다. *Agrobacterium tumefaciens* strain(EHA105)은 YEP 배지 30ml에서 16-24시간동안 OD<sub>600</sub> 0.6-0.8정도로 배양한 후 원심분리 (3000rpm, 15min, 4℃)하여 균을 수집하였다. 수집된 균주는 5% Sucrose와 0.05 silwet L-77을 포함한 용액을 동량 넣고 현탁하여 준비하였다. 현탁된 균주에 애기장대의 꽃을 5초가량 담근 후 비닐로 하룻동안 덮은 후 벗겨내었다. 형질전환 시킨 애기장대는 종자가 다시 맺힐때까지 21℃에서 성장시켰고, 성숙된 종자들은 수확하였다. 수확된 종자는 춘화처리 후 상토와 펄라이트가 적절히 섞인 토양에 파종하였다. 파종하고 1주일 후에 바스타(320ul/1L)를 처리하여 유전자가 도입된 애기장대를 선발하였다.

바스타를 처리하여 살아남은 애기장대의 잎에서 도입된 유전자를 확인하고 발현을 보기 위하여 잎을 각각 샘플링하였다. 샘플들은 액체질소를 이용하여 막자사발로 분쇄하였다. 분쇄되어진 샘플은 Trizol reagent(MRC)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라서 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 first cDNA (Promega M-MLV Reverse Transcriptase)를 합성하여 도입된 유전자의 서열로 디자인된 primer(Table 1)를 이용하여 PCR을 통해 유전자 도입과 발현양을 확인하여 최종적으로 형질전환체를 선발하였다.

## 12. T2세대 형질전환 식물체의 스트레스 처리

염스트레스에서의 반응을 살펴보기위해 21℃, 장일조건 (16h light/8h dark)의 애기장대 배양 조건에서 200mM의 NaCl 용액을 관수시키면서 공급하였으며 물기가 마르지 않게 하였다.

가뭄스트레스는 물을 주지않고 21℃, 장일조건 (16h light/8h dark)에서 2주 동안 잎의 변화를 관찰하였다.

## 13. 동형접합체(homozygous) 식물의 선발

형질전환된 식물체 중에서 동형접합체를 선별하기 위하여 Phosphinothricin (7.5µg/ml)을 첨가한 MS배지에 T2세대의 형질전환체의 종자를 과종하였다. 애기장대 종자는 각각 100% EtOH와 triton-X100이 첨가된 70% EtOH로 표면 살균 후 필터페이퍼 위에서 건조 시켜 각 배지위에 과종을 하였다. 과종 후 21℃, 장일조건 (16h light/8h dark)의 성장실에서 배양을 하였다.

#### 14. T3세대 형질전환체 식물의 스트레스 처리

형질전환체 식물의 가뭄스트레스 저항성을 보기 위해 Leaf disk floating assay를 하였다. 3mM의 MES buffer에 300mM의 Mannitol을 넣고 21℃, 장일조건(16h light/8h dark)에서 3주정도 성장시킨 애기장대의 잎을 띄운 후 25℃의 장일조건(16h light/8h dark)에서 일주일동안 잎의 변화를 살펴보았다. 광합성 효율은 Plant Efficiency Analyzer를 사용하여 측정하였다.

염스트레스에서의 형질전환체의 성장능력을 보기 위하여 정상적인 MS배지에서 일주일동안 키운 pHG336 line과 pHG339 line의 동형접합체들을 0mM, 100mM, 150mM, 200mM, 300mM의 NaCl이 첨가된 배지에 옮긴 후 25℃, 장일조건 (16h light/8h dark)에서 10일동안 관찰하였다. 염스트레스 조건에서 성장시킨 식물들의 Fresh weight을 측정하여 평균을 계산한 후 그래프화 하였다.

가뭄스트레스에서의 형질전환체의 성장능력을 보기 위하여 정상적인 MS배지에서 일주일동안 키운 pHG336 line과 pHG339 line의 동형접합체들을 0mM, 100mM, 150mM, 200mM, 300mM의 Mannitol이 첨가된 배지에 옮긴 후 25℃, 장일조건 (16h light/8h dark)에서 10일동안 관찰하였다. 가뭄스트레스 조건에서 성장한 식물들의 Fresh weight을 측정하여 평균을 계산한 후 그래프화 하였다.

가뭄스트레스에서의 형질전환체들의 발아능력을 보기 위하여 Mannitol을 100mM, 150mM, 200mM, 300mM의 농도별로 첨가된 MS배지를 만들고 표면 살균된 pHG336-1과 pHG339-3의 동형접합체의 종자를 과종하여 21℃, 장일조건 (16h light/8h dark)에서 14일간 성장시켜 발아된 애기장대 종자를 측정 한 후 그래프화 하였다.

Table 1. Gene-specific PCR primers used for semi-quantitative RT-PCR

Gene	Oligo name	Oligo sequence (5'→3')	Use for
NAC	NAC-F1	GGNTTYCGNTTYCAYCCNAC	NAC domain
	NAC-R1	TAYTCRTGCATDATCCA	
	NAC-F2	CTGCAGGNTTYCGNTTYCAYCC	
	NAC-R2	TAYTCRTGCATNACCCA	
pHG316	pHG316-F	CCTGCCCATCGCCGCTCCCGTG	pHG316
	pHG316-R	ATGCCACGGCGCGGGGGAGCCCA	
AsNAC316	AsNAC316-F2	CGCCTCGCTGATGTTGATCGA	AsNAC316
	full316-F	ATTCCAATCTTCCCCAAGAGC	
	full316-R	GAAGCTTGCACGGCTAATTAG	
	KHG60	AGCACGTGCGGCTGTTTCTGAC	
	316A1	ATGCTGGTAGAACCCGTAGT	5'RACE of AsNAC316
	316A2	GAGTGCGTTGTTGGACTTCT	
	316S1	TTCGTCATCGACGAATCCCT	
	316S2	ATCCGTCAGAAACAGCCGCA	
	A316P	TGTTAGTGGGCTAGG	
	316A1	ATGCTGGTAGAACCCGTAGT	
316A2	GAGTGCGTTGTTGGACTTCT		
316S1	TTCGTCATCGACGAATCCCT		
316S2	ATCCGTCAGAAACAGCCGCA		
AsNAC316-1	KHG67	TGCACACGGACTCCAGCTCC	AsNAC316-1
	KHG68	CCTTCATTATTCAGAACGGC	
AsNAC316-3	KHG69	TGCACACGGACTCCGGCTCG	AsNAC316-3
	KHG70	CCTTCATTGTTTCAGAAGGGT	
pHG317	pHG317-F	GCAGGCTGCCTCCATGCCCTGC	pHG317
	pHG317-R	TGTTCTCGCTCGCCGGCGTCA	
	HG317rc-R	CCTGGTCAGAGAAGTTG	
	HG317rc-F1	AACGGTATGAAGAGGAAGAGATC	
	HG317rc-R1	ACACGTGGCTAGATGCTTGACAA	
AsNAC317	H3-317-1F	GAAGCTTATGCCGAGCTCCGCC	AsNAC317
	Spe1-317-1R	GACTAGTCATCTGCAGCTGCTG	
	BgLI_317_F	GAGATCTATGCCGAGCTCCGCCAC	
AsNAC317-1	317-1F	TTCTCCTCCTTGCACCCATC	AsNAC317-1
	317-1R	AATTTACAGCCTTGTACTAAACG	
AsNAC317-6	317-6F	TCTTCTCCTTCTCCTCCAGCTA	AsNAC317-6
	317-6R	TAATTTACAGCCTTGTACTAGCT	
5'RACE of AsNAC317	1S317-6	CCGCCCTTGCTGCCTTTCAG	5'RACE of AsNAC317
	2A317	CGGTAATCGTGCATGATCCA	
	2S317	AGCCCGCTGATCTACGGGCA	
	A317P	TAATCACGGTTCATCT	
	*1A317-1	TGTTGTTGAGGGAGTCCTCA	
	1A317-6	TGTTGTTGAGGGAGTCCTCC	
	1S317-1	CCGGCGCCATGGCGACTTTT	
AsNAC317-1	KHG63	TGGCGACTTTTCAGCCCGGAG	AsNAC317-1
	KHG64	GCACGCCGCTGTAAGTCTGAA	
	KHG58	AAGCTTCATCTGCAGCTGCTGG	

Gene	Oligo name	Oligo sequence (5'→3')	Use for	
AsNAC317	KHG65	CGTCGTCCGATGCCGCCGCCCTT	AsNAC317-6	
	KHG66	GCACGCCGCTGTACTGATCTGCT		
	KHG59	AAGCTTCATCTGCAGCCGCTGG		
AsNAC318	pHG318-F	CAAGGTCTCCGACTTCGGCTTC	pHG318	
	pHG318-R	ATCCCGACCAGCCTGCCGCCGT		
AsNAC319	pHG319-F	GCTCAAGGTCGACGCCATCGCC	pHG319	
	pHG319-R	TCTTCATCCCGACGACCCTGGC		
AsNAC320	pHG320-F	GCGCTCGACCACCGCTTCTGCT	pHG320	
	pHG320-R	CGAGGATGCCCCGCCACGGAA		
AsNAC321	pHG321-F	CGCAAGGCGGCCGGGCAGCGC	pHG321	
	pHG321-R	ATCCCATGGTCCGTCCCCCA		
AsNAC322	pHG322-F	AACCGCGCCGCCTCCGTGCAG	pHG322	
	pHG322-R	CTGCCCGGTGGCGCGTCGTG		
AsNAC322	322A1	TTCTGCAGGTAAGTCTGTTG	5'RACE of AsNAC322	
	322A2	GAGACGTTGCGGAACTTGAT		
	322S1	ATCTCTGAACCAGCTCCTCT		
	322S2	CTCAAGGGTTCATGCTTCGA		
	A322P	CCCAATCAGATTCCT		
	322A1	TTCTGCAGGTAAGTCTGTTG		
	322A2	GAGACGTTGCGGAACTTGAT		
	full322-F	TGGCCACCATTCTCGAGATA		AsNAC322
	full322-R	GCATCTGCAAGATTGTTGGTG		
	KHG61	AAGATCTCATGTCGACGGCGA		AsNAC322-2
KHG62	TCACGTGCAAGATTGTTGGTG			
KHG71	TCGCCGACTACGAGAACTTC	AsNAC322-2		
KHG72	GTCGAACATCTGCGCGAGCG			
KHG73	TCGTTGACTATGAGAGCTT	AsNAC322-4		
KHG74	GTCGAACATCTGCGCGAGCC			
AsNAC323	pHG323-F	GCTCAAGGTCGACGCCATCGCA	pHG323	
	pHG323-R	TCTTCATCCCAACGATCCTTGG		
AsNAC324	pHG324-F	AAGCTCACCGGCCGCGAGCAT	pHG324	
	pHG324-R	TGCATCGCCGGCGCCAGTGATG		
AsActin	AsActin1-F	TCTGGCATCACACCTTCTACAAC	AsActin	
	AsActin1-R	CAGTGTGGCTGACACCATCACCA		
Ascab	Ascab-F	TTCCACATTGTCCAGTACCTG	Ascab	
	Ascab-R	GTTCAGGGCCTCAAGTCCAC		

### III. 결과 및 고찰

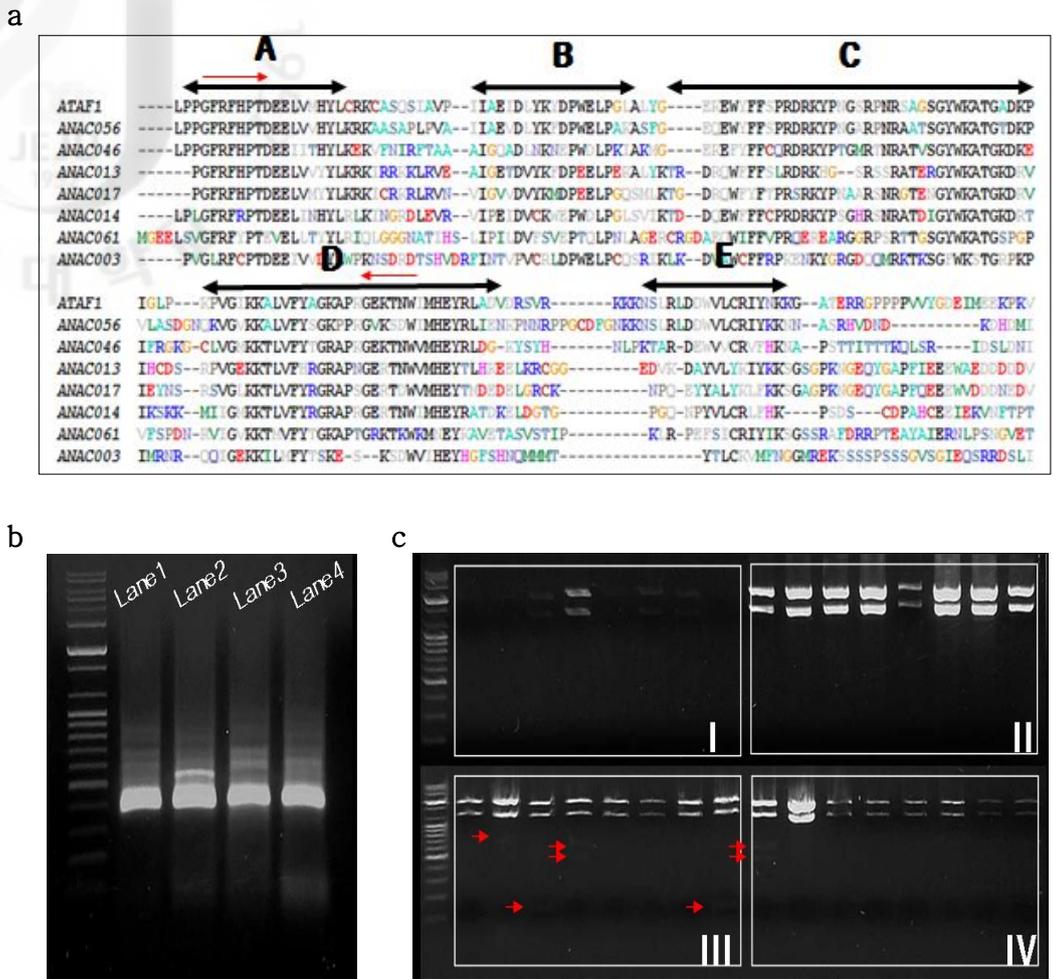
#### 1. NAC family 유전자들의 클로닝

데이터베이스를 통해 환경스트레스에 반응하는 8개의 애기장대 NAC family 유전자들을 기반으로 A subdomain과 D subdomain사이에서 degenerate 프라이머를 디자인(Fig2-a)하여 PCR을 수행한 결과, 400bp정도의 예상된 사이즈의 DNA가 증폭되었고(Fig2-b), 이 증폭된 DNA를 pGEMT easy 벡터에 삽입하였다. pGEMT easy 벡터에 삽입된 DNA는 동일한 클론이 아니라 family유전자 이므로 여러 종류의 유전자 단편이 혼합되어 있을 것으로 예상 된다. 따라서, 독립된 유전자 단편들을 얻기 위한 방법으로 네 개의 염기서열(GATC)을 인식하는 제한효소인 *RsaI*을 이용하여 각 클론의 제한효소 단편을 비교하였다. 이러한 과정을 거쳐서, pHG316, pHG317, pHG318, pHG319, pHG320, pHG321, pHG322, pHG323, pHG324의 총 9개의 독립적인 유전자 단편을 얻었다(Fig2-c). 독립적인 9개 유전자 단편의 domain서열을 가지고 아미노산 상동성을 비교한 결과, 보존된 domain내에서도 40%-90%정도의 상동성을 보이는 서로 다른 유전자라는 것을 확인 할 수 있었으며, 기존에 보고된 것처럼, Ia-c와 IIa-c와 같은 특정 모티프들을 확인하였다(Jeong et al., 2010). 또한 모티프들의 차이로 인해 독립적인 계통으로 분리될 수 있었다(Fig3-a,b). 각 클론들 상호간의 상동성 분석에서 pHG317과 pHG322, pHG316과 pHG321은 각각 70%정도의 상동성이 있었고, pHG318과 pHG320은 75%정도의 상동성, 그리고 pHG319와 pHG323은 90%이상의 높은 상동성을 보였다(Fig3-c). 크리핑벤트그라스에서 클로닝한 9개의 독립적인 클론들과 기존에 보고된 NAC family유전자들과는 어떠한 유사성을 보이는지 확인하기 위하여 크리핑벤트그라스에서 클로닝된 9개의 NAC domain서열과 기존에 보고된 유전자의 NAC domain서열을 비교하여 계통 분석을 하였다. 그 결과, NAC family유전자는 크게 두 개의 그룹으로 나눌 수 있었으며, 보고된 NAC family유전자들의 기능들을 통해 식물 발달과 스트레스와 관련하여 유사한 기능을 할 것이라고 예상할 수 있었다.

크리핑벤틀그라스에서 클로닝된 9개 유전자 중에서 pHG318, pHG319, pHG320, pHG323, pHG324가 같은 그룹에 속하였으며, pHG316, pHG317, pHG321, pHG324가 같은 그룹으로 구분지어졌다(Fig 4).

pHG316, pHG317, pHG321, pHG322가 포함되어 있는 그룹에 속한 유전자들은 스트레스에 의해서 유도가 되거나 스트레스에 대한 저항성을 나타내었다. 대표적으로, *SNAC1*(*Stress-responsive NAC1*) 유전자는 가뭄, 염스트레스에 대한 저항성을 증가시켰다는 보고가 있었고(Hu et al., 2006), *OsNAC4*는 면역 반응의 특징인 HR cell death의 유도를 매개한다(Kaneda et al., 2009). 또한, *OsNAC5*와 *OsNAC6*는 벼에서 스트레스에 의해 유도되는 유전자인 *OsLEA3* 등의 유전자들의 발현을 조절함으로써 환경스트레스에 대한 저항성을 높인다는 보고가 있었다(Takasaki et al., 2010).

따라서, 이 결과를 통하여 클로닝한 9개 유전자 중에서 pHG316, pHG317, pHG321 그리고 pHG322는 환경스트레스에 의해 유도가 되거나 과발현시 저항성을 획득할 수 있는 유용유전자일 것이라고 예측을 할 수 있었다.



**Figure 2. Cloning of NAC family genes depending on PCR from creeping bentgrass.** **a** Comparison of amino acids of stress or senescence inducible NAC gene in *Arabidopsis* for the design of primers. The conserved subdomains are underlined. The red arrows indicate parts of designed primer. **b** Amplification of NAC family genes by PCR with the cDNA from senescent leaf of creeping bentgrass. Lane1, between the NAC-F1 and NAC-R1 primers; Lane2, between the NAC-F1 and NAC-R2 primers; Lane3, between the NAC-F2 and NAC-R1 primers; Lane4, between the NAC-F2 and NAC-R2 primers. **c** Digestion of cloned *AsNAC* genes to pGEMT easy vector (*Rsa*I). The red arrows indicate specific patterns. I, Clones of lane1; II, Clones of lane2; III,



Clones of lane3; IV, Clones of Lane4. Red arrows indicated the unique band patterns.

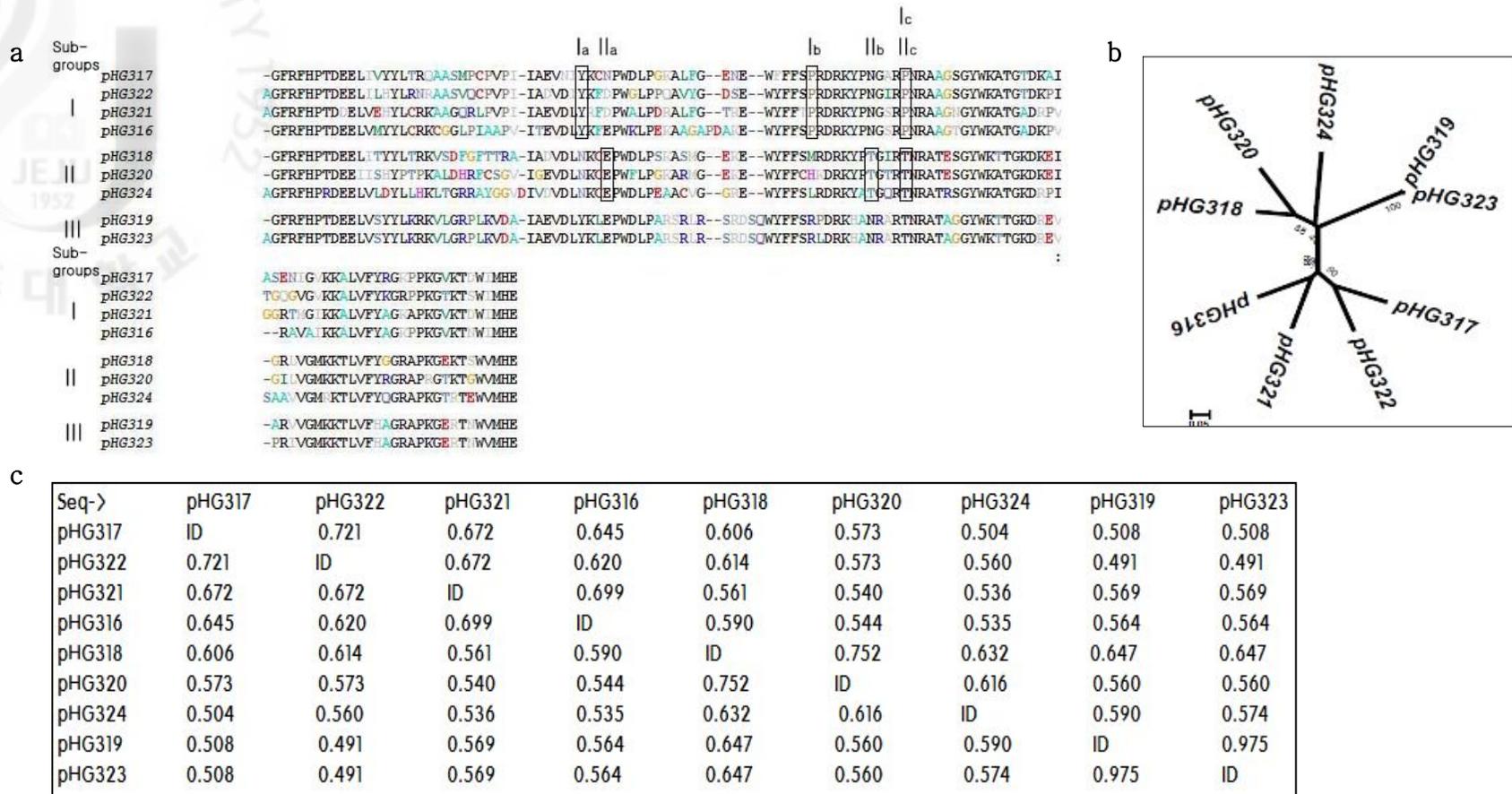
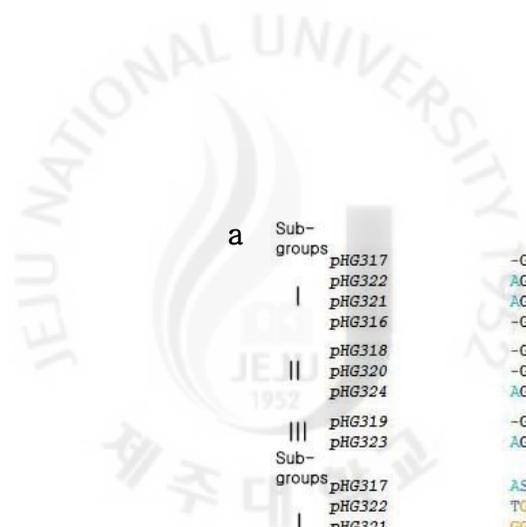


Figure 3. Alignment of the cloned partial *AsNAC* genes by using the Clustal X program. a Comparison of amino

acids of partial *AsNAC* genes. **b** Phylogenetic relationship of *AsNAC* partial genes. **c** Similarity comparison of *AsNAC* partial genes. Multiple sequence alignment was performed using ClustalX, and the phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining method with amino acid sequences of each *AsNAC* partial genes.

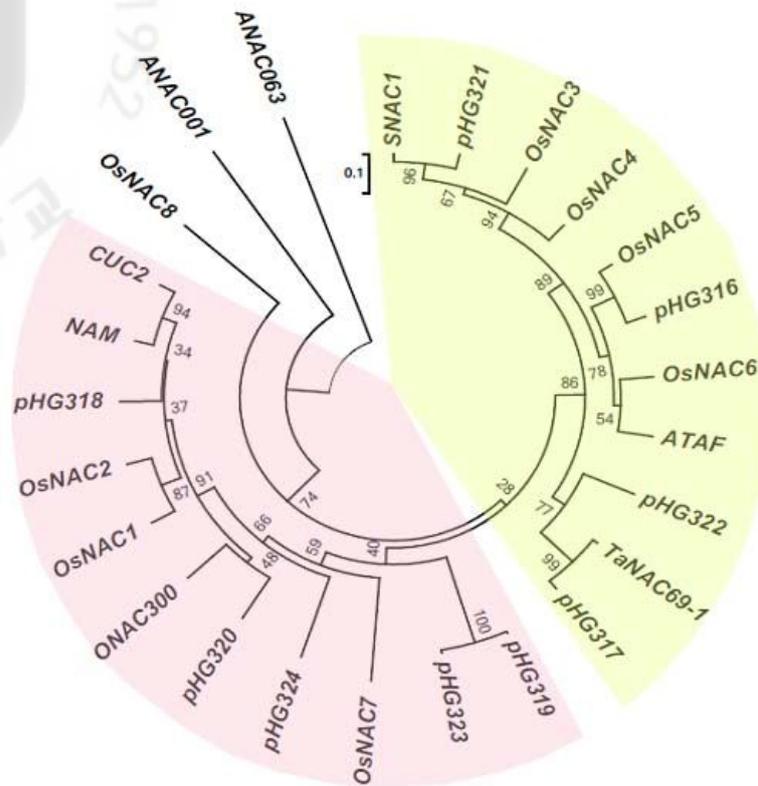


Figure 4. Phylogenetic relationship of the partial AsNAC proteins with the NAC domains of several NAC proteins from *Arabidopsis*, rice, petunia and wheat. The red box indicate a group related development, and green box indicate a group related stresses. The accession numbers of selected NAC genes listed as follows: the Arabidopsis *ANAC036*, NM\_127259.3; *ANAC001*, NM\_099983.2; *CUC2*, NM\_124774.2; *ATAF*, NM\_100054.2; the petunia *NAM*, CAA63101.1; the rice *OsNAC8*, AB028209.2; *OsNAC2*, AB028181.1; *OsNAC1*, AB028180.1; *ONAC300*, AB182278.1; *OsNAC7*, AB028186.1; *OsNAC6*, AB28185.1; *OsNAC5*, AB028184.1; *OsNAC4*, AB028183.1; *OsNAC3*, AB028182.1; *SNAC1*, DQ394702.1; the wheat *TaNAC69-1*, AY625682.1.

## 2. 환경스트레스에서 크리핑벤티그라스 NAC family 유전자들의 유도된 발현

클로닝한 유전자들이 실제로 환경스트레스에 대해 반응을 하는지에 대해 알아보기 위하여 크리핑벤티그라스에서 클로닝한 독립적인 NAC 유전자의 domain 서열에서 스트레스에 따른 각각의 발현양상을 보았다. 스트레스와 관련한 그룹에 속해 있는 유전자들의 발현패턴을 살펴보면, pHG316은 노화된 잎에서 발현이 높아졌으며, 고온과 암스트레스에서는 특이적인 발현패턴을 보이지 않았다. 또한, pHG317과 pHG322는 고온스트레스, 암스트레스 그리고 노화된 잎에서 발현이 재현성 있게 높아졌다. pHG321 유전자는 고온스트레스에서는 발현이 높아졌으나, 암스트레스나 고온스트레스에 경우에는 반응에 큰 차이는 보이지 않았다. 반면에, 다른 그룹에 속해 있는 유전자들은 암스트레스에서 스트레스가 진행될 수록 높은 발현을 보인 pHG324를 제외한 유전자 대부분이 고온이나 암스트레스 그리고 노화에서 별다른 특징을 보이지 않았다(Fig 5).

환경스트레스나 노화에 반응하는 pHG316, pHG317, pHG321, pHG322와 같은 그룹에 속해 있는 *SNAC1*는 가뭄, 염, ABA, 저온스트레스에서 발현이 높아지는 것이 보고되었고(Hu et al., 2006), *OsNAC5*도 마찬가지로 저온, 가뭄, 염, 그 외의 여러 가지 식물호르몬에 의해 발현이 높아지는 것을 확인하였다(Takasaki et al., 2010). 또한, *OsNAC6*(Ohnishi et al., 2005)도 저온, 염, 가뭄, ABA처리에 의해 발현이 높아졌다. 이렇게 다양한 환경스트레스에 의해 발현이 유도되는 유전자들 대부분이 환경스트레스에 의한 저항성을 향상시켰기 때문에, pHG316, pHG317, pHG321, pHG322도 마찬가지로 환경스트레스에 저항성을 향상시킬 것이라고 예측되었다.

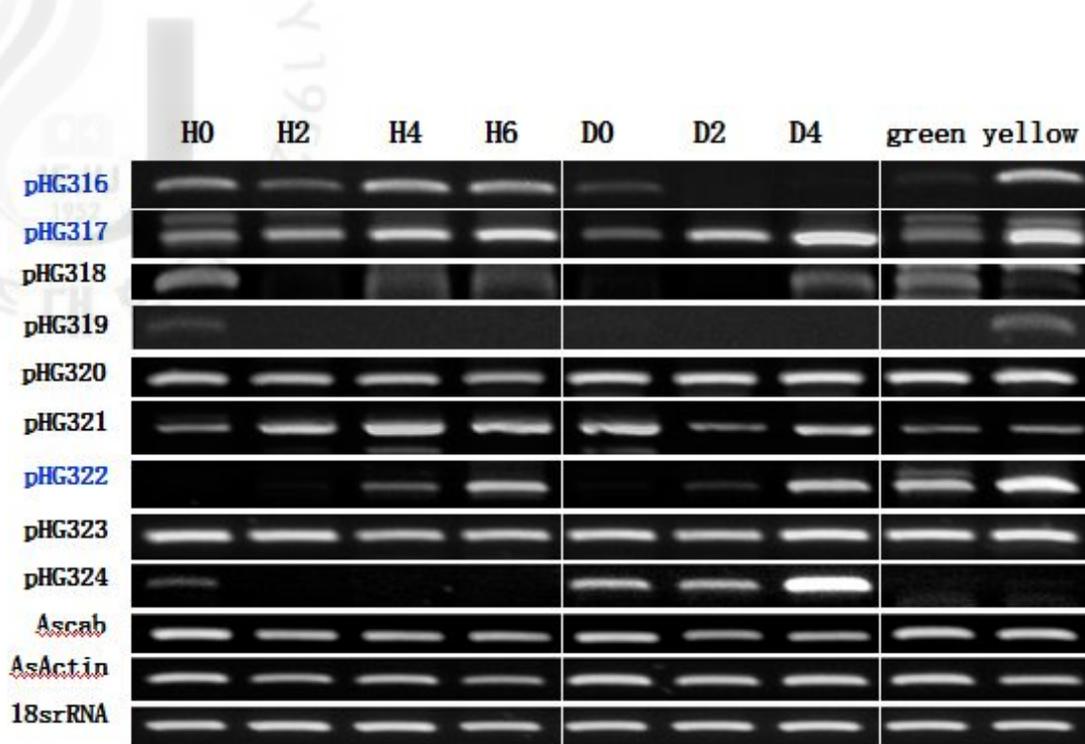


Figure 5. Expression of the *AsNAC* family genes by the treatment of heat, dark and senescence by RT-PCR. pHG316, Partial *AsNAC316*; pHG317, Partial *AsNAC317*; pHG318, Partial *AsNAC318*; pHG319, Partial *AsNAC319*; pHG320, Partial *AsNAC320*; pHG321, Partial *AsNAC322*; pHG323, Partial *AsNAC323*; pHG324, Partial *AsNAC324*; H0, Control; H2, Heat treatment for 2days; H4, Heat treatment for 4days; H6, Heat treatment for 6days; D0, Control; D2, Dark treatment for 2days; D4, Dark treatment for 4days; green, green leaf of creeping bentgrass; yellow, senesced leaf of creeping bentgrass. The blue texts indicate partial *AsNAC* genes having significant expression patterns.

### 3. *AsNAC316*, *AsNAC317*, *AsNAC322*의 full length 유전자의 클로닝과 상동성 분석

환경스트레스에서 반응하는 pHG316, pHG317, pHG322 유전자의 기능을 살펴보기 위하여 각각의 full-length cDNA 유전자를 분리하였고, 분리된 full-length 유전자들은 각각 *AsNAC316-1, -3*, *AsNAC317-1, -6*, *AsNAC322-2, -4* 라고 명명하였다. 분리하는 과정에서 약 90%의 상동성을 보이는 homologous 유전자들을 각각 함께 분리하였다. 각각의 유전자들은 N말단에서 C말단에 이르기 까지 적게는 10개, 많게는 39개의 아미노산들이 치환되거나 삽입이 되어있었다(Fig.6-a,b,c). superfamily 유전자는 40억년 전부터 분기되어져 왔고 유전자 복제의 과정을 거치면서 주로 점돌연변이에 의해 변화가 생긴다. 유전자는 이러한 변화로 인해 구조나 기능이 달라 질수 있고, 이러한 차이가 유전자 발현의 조절에서 변화가 생길 것으로 예상이 된다(Dayhoff et al., 1975).

full length cDNA 유전자인 *AsNAC316-1*, *AsNAC316-3*, *AsNAC317-1*, *AsNAC317-6*, *AsNAC322-2*, *AsNAC322-4*의 전체 ORF부분을 기존에 기능이 알려진 다른 식물들의 NAC family 유전자들과 함께 계통적 분석을 수행하였다. 그 결과, NAC domain만 가지고 분석한 이전의 결과와 동일하게 ATAF subfamily 그룹으로 분류되었다(Fig.7). NAC family 유전자는 기존에 보고에 따르면 ATAF, OsNAC3 그리고 NAM, 이렇게 세 개의 subfamily로 나뉘어지는데, 실제로 ATAF subfamily 그룹에 속하는 유전자들은 스트레스와 관련이 깊다(Ohnishi et al., 2005). *AsNAC316-1*과 *AsNAC316-3*은 염저항성을 증가시킨다고 보고되어진 *OsNAC5*(Takasaki et al., 2010)와 약 72%의 높은 상동성을 보였다. 또한, *AsNAC317-1*과 *AsNAC317-6*는 최근에 가뭄스트레스에서 적응력 향상에 기능을 하는 *TaNAC69*(Xue et al., 2011)과 약 80% 정도로 높은 상동성을 보였으며, *AsNAC322-2*와 *AsNAC322-4*는 대나무에서 클로닝 된 노화와 관련 있는 유전자인 *BeNAC1*(Chen et al., 2011)와 약 55%의 상동성을 보였다. 이 결과로 보아, *AsNAC316*, *AsNAC317* 그리고 *AsNAC322*는 각각 가뭄스트레스와 염스트레스와 같은 환경스트레스에 관련이 있을 것으로 예상된다.



a

```

AsNAC316-1 MDLGGGALELPPGFRFHPTDEELVMYYLCRKCGGLPIAAPVITEVDLYKFEPWKLPEKAAGAPDAKEWYFFSPRDRKYPNGSRPNRAAGTGYWKATGADK
AsNAC316-3 .....
AsNAC316-1 PVGSPRAVAIKKALVFIYAGKPKGKVTNWIMHEYRLADVDRSAAARKKSINNALRDDWVLCRIYKKGVIKIDTVSDAAQVKPAAAPPARNQRAGHY
AsNAC316-3 .....I.....E.....P.P....
AsNAC316-1 VVPAMKIELSDYGFYQHPSPPATEMLCF-----DRSGSADRSDHHSLLPLHDTSSSSDRALHSPSPDFPDMDYAESQH
AsNAC316-3 .....L.....GRSGSADRSDHHSLLPLHADSRSF.....G.....E.....
AsNAC316-1 DDAARCGGGG--WLGDEWCGCIDDDGFVIDESLIFDPPSPGGFAFDRDAAAFDMLTFLLQKPF
AsNAC316-3 .....Y...GA...D...A.....L.....

```

b

```

AsNAC317-1 MPSSATMPVLPFGFRFHPTDEELIVYYLTRQAAAMPQCPVPIIAEVNIIYKCNPDWLPKALPGENEWFPPSPRDRKYPNGARPNRAAGSGYWKATGTDKAI
AsNAC317-6 .....
AsNAC317-1 LSTPASENIGVKALVFIYRGPVKGVKTWIMHEYRLTAADNKTKRGGSSMRLLDDWVLCRIHKCSNLANFSDQEQEQESSTVEDSLNNIN--TVASP
AsNAC317-6 .....S.....H...NN....
AsNAC317-1 KSEALDGDGDDQVQLQFCPMAMTKSCSITDLLNTVDYAELSQLLLDGGGS--SSDAAGAMATFQPPESPLIYGQPPWQTLNYYNNIVDVSQDLDYDYG-
AsNAC317-6 .....AE.....GGG..SD.A.L.A..A.....H.....F.C...H...P.....AN
AsNAC317-1 -NKYNGMKRRKSSSSLYCNQLQLPSDQYSGVLVHFFLNQQLQM
AsNAC317-6 G.....A.....I.....R...

```

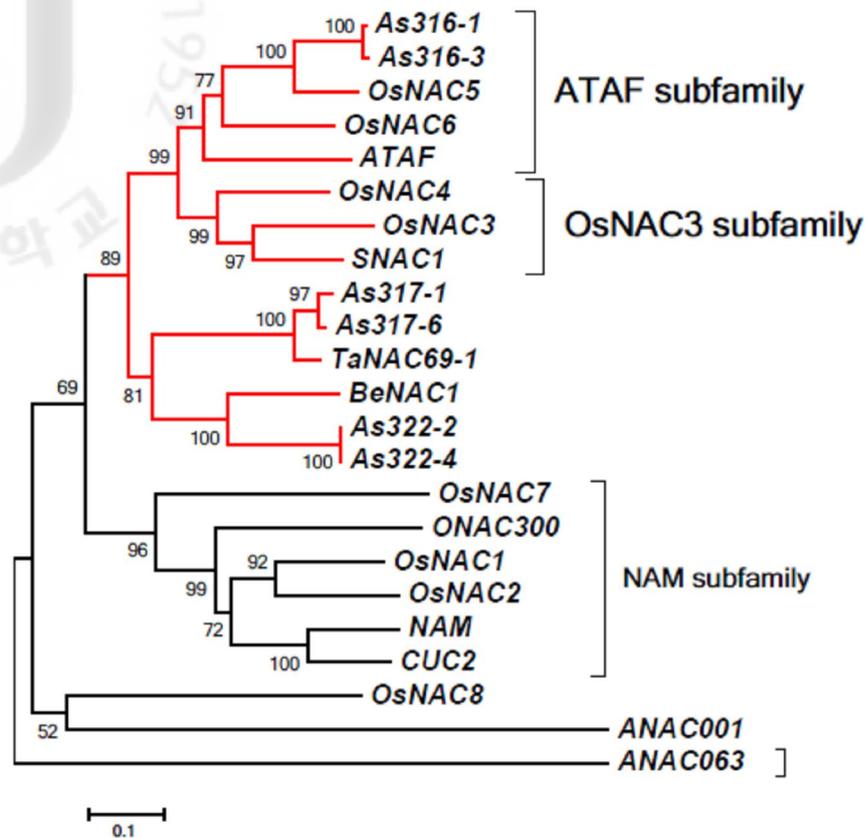
c

```

AsNAC322-2 MSTATSLPPGFRFHPTDEELILHYLRNRAASVQCPVPIIADVDIYKFPDWDLPQAVYGDSEWYFFSPRDRKYPNGIRPNRAAGSGYWKATGTDKPIHDA
AsNAC322-4 .....
AsNAC322-2 ATGQGVGVKALVFIYKGRPPKGTKTSWIMHEYRLAAADPLAAAVNTYRPIKFRNVMRLDDWVLCRIYKKTDRASPMAPPLADYENFVDHDDLGGGGG
AsNAC322-4 .....M.....V...S.....
AsNAC322-2 SFDDATGFTYTPSSNSSTCRMTITHHQOQ----PHAGRLLTIPPISELFDDYALAQMFDTQAEHLAVHPSLNQLLSVSDSTAHVEPSYIAPSSSSPVGSAG
AsNAC322-4 .....Q...OQOQ.....G.....E.....
AsNAC322-2 KRKTASPEECAGVGHSSSEKRLKGS CFDAPPQSARGLQAASAVLGGLNHQMLPQF
AsNAC322-4 .....

```

Figure 6. Comparison of amino acids deduced from each of two full-length cDNAs cloned from *AsNAC316*, *AsNAC317* and *AsNAC322*, respectively. a Comparison of amino acids of *AsNAC316*. b Comparison of amino acids of *AsNAC317*. c Comparison of amino acids of *AsNAC322*.



**Figure 7.** Phylogenetic analysis of the three full-length *AsNAC* genes. Multiple sequence alignment was performed using ClustalX, and the red relation lines are stress-inducible genes. phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining method with amino acid sequences of each NAC protein. The red The accession numbers of selected NAC genes are listed as follows: the *Arabidopsis ANAC036*, NM\_127259.3; *ANAC001*, NM\_099983.2; *CUC2*, NM\_124774.2; *ATAF*, NM\_100054.2; the petunia *NAM*, CAA63101.1; the rice *OsNAC8*, AB028209.2; *OsNAC2*, AB028181.1; *OsNAC1*, AB028180.1; *ONAC300*, AB182278.1; *OsNAC7*, AB028186.1; *OsNAC6*, AB28185.1; *OsNAC5*, AB028184.1; *OsNAC4*, AB028183.1; *OsNAC3*, AB028182.1; *SNAC1*, DQ394702.1; the wheat *TaNAC69-1*, AY625682.1; the *Bambusa emeiensis BeNAC1*, HM626401.1.

#### 4. *AsNAC* family 유전자의 기관별 발현

*AsNAC316*과 *AsNAC317*, 그리고 *AsNAC322* 유전자가 있을 포함한 다른 기관에서도 발현을 하는지, 발현을 한다면 어느 기관에서 발현이 높은지 알아보기 위해 기관별로 유전자 발현을 보았다. 스트레스와 관련 있을 것이라고 예상되는 6개의 *AsNAC* family 유전자는 모두 공통적으로 포복경과 뿌리에서 발현을 하였고 가장 강한 발현패턴을 보였다. *AsNAC316-1*과 *AsNAC316-3*의 발현을 각각 살펴보면, *AsNAC316-1*은 꽃에서는 발현이 아주 적었고 잎에서의 발현은 한 달 정도된 잎과 개화시기의 잎에서 발현이 있었다. 엽초에서는 발현이 없었으며 포복경과 뿌리에서는 발현을 보였다. *AsNAC316-3*은 *AsNAC316-1*과는 다르게 개화시기까지 노화가 진행되는 잎에서 발현이 점점 강해졌고 개화시기의 잎에서는 발현이 강했다. 또한 포복경과 뿌리에서도 마찬가지로 발현이 강했다. *AsNAC316*과 상동성이 높은 벼의 *OsNAC5*는 등숙기의 지엽과 이삭에서 가장 높은 발현을 보이고 줄기와 뿌리에서는 낮은 발현을 보인다고 보고되었다(Raul et al., 2009). *AsNAC316*과의 이러한 기관별 발현에 차이는 상동성이 높은 유전자일 지라도 차이가 나타날 수 있으며, 또한, 벼와 잔디라는 종간의 차이와 전사량 검출방법의 차이로 인해 다를 수 있다(Raul et al., 2009).

*AsNAC317-1*과 *AsNAC317-6*은 두 개의 유전자가 발현패턴이 거의 비슷한 양상을 보였다. 모든 기관에서 발현을 하였으며 특히, 꽃과 포복경 그리고 뿌리에서 가장 강한 발현을 보였다. *AsNAC317*과 상동성이 높은 *TaNAC69*는 정상적인 환경에서 잎보다 뿌리에서 200배 높은 발현양을 보였다(Xue et al., 2006). *AsNAC317* 또한 잎보다 뿌리에서 높은 발현양상을 보이고 있기 때문에, *TaNAC69*와 유사한 기능을 할 것이라는 예측을 할 수 있었다.

*AsNAC322-2*와 *AsNAC322-4*는 꽃에서의 발현은 거의 없었으며 포복경과 뿌리에서 발현이 가장 높았다. 그리고 *AsNAC322-2*는 개화된 잎에서 발현이 높았던 반면에 *AsNAC322-4*는 발현이 없었다(Fig 8).

이 결과를 종합해서 보면, 클로닝된 유전자들은 주로 뿌리에서 강한 발현을 하였는데, 보고된 바에 따르면, 보리의 *HVA1*과 같은 여러 가지 탈수조건에서 높게 조절되는 유전자들은 곡류 식물의 뿌리에서 발현된다고 알려졌다(Xue and Loveridge, 2004). 또한, *OsNAC10*은 뿌리와 꽃에서 높은 발현을 보인다고 보

고가 되었는데, 이 유전자가 전체적으로 과발현된 형질전환체 식물 보다 뿌리 특이적으로 유전자를 과발현시킨 형질전환체 식물이 가뭄, 염등과 같은 스트레스에서 높은 곡식산출량을 보였으며, 뿌리의 두께도 대조구보다 증가하였다고 보고되었다(Jeong et al., 2010). 따라서, 클로닝된 AsNAC유전자들은 여러 가지 스트레스 반응에서 역할을 할 뿐만 아니라 정상적인 조건에서도 측면 뿌리의 발달과 같은 뿌리 세포성 활성화의 기능이 예상된다.

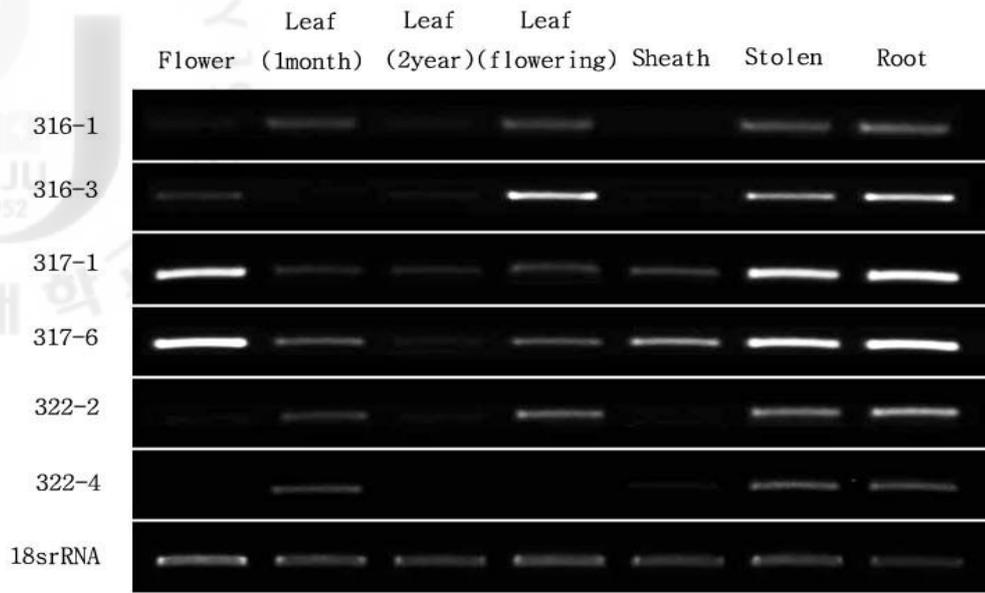


Figure 8. Expression pattern of the cloned full-length *AsNAC* cDNAs by various organs by semi-quantitative RT-PCR

## 5. *AsNAC* family 유전자의 환경스트레스와 관련된 발현

환경스트레스에 대하여 유전자가 반응을 하는지, 반응을 한다면 어떠한 패턴의 발현을 보이는지 알아보기 위하여 동일한 조건에서 키운 크리핑벤트그라스 잎을 암처리 하여 암스트레스 조건에서의 유전자 발현을 보았고, 또한, 정상적으로 동일한 조건에서 10일동안 배양된 유식물체를 NaCl 용액과 Mannitol 용액에 각각 담궈서 염스트레스와 가뭄스트레스 조건에서 유전자의 발현 차이 분석을 실시하였다.

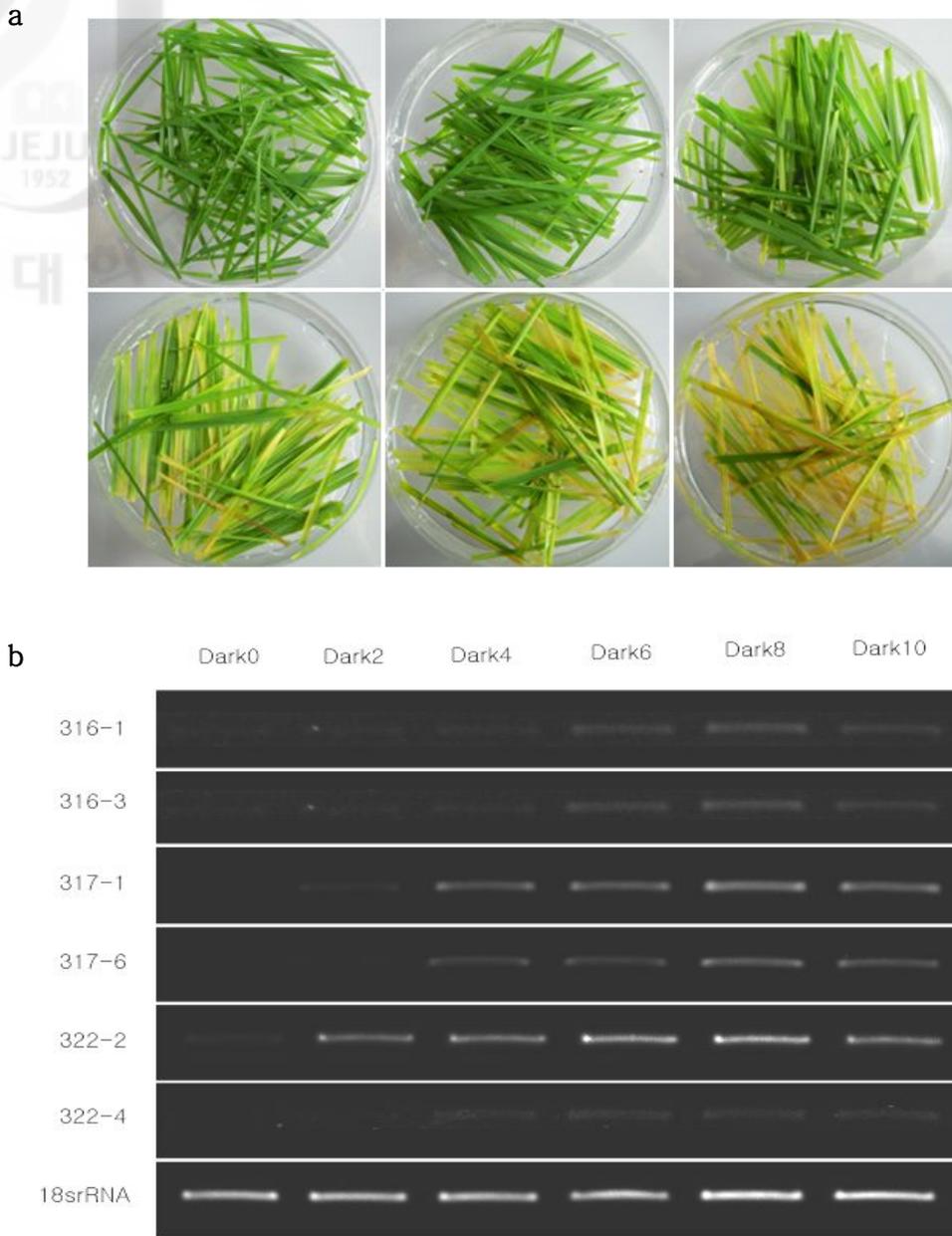
암스트레스에 대한 반응을 보기 위하여 3mM MES buffer에 크리핑벤트그라스의 잎을 담궈서 암처리한 결과 암처리 후 4일에서 잎의 표면에서 노화가 되는 것을 시각적으로 볼 수 있었으며 10일에서는 거의 대부분의 잎에서 노화가 된 것을 볼 수 있었다(Fig9-a). 노화된 잎에 따른 발현패턴은 암처리를 안한 샘플에서는 대부분의 유전자들이 발현이 없거나 아주 약했으며, 시각적으로 노화된 표현형이 보이기 시작했던 암처리 후 4일째 된 잎에서 대부분의 유전자들의 발현이 강해졌다.

가뭄스트레스와 염스트레스에 대한 *AsNAC* family 유전자들의 발현패턴을 보기 위하여 각각의 잎에서 유전자 발현을 분석하였다. *AsNAC316-1*과 *AsNAC316-3*은 발현은 강하지 않았지만 대조구보다는 Mannitol과 NaCl을 처리한 샘플에서 비교적 높은 발현을 보였다. 그리고 NaCl 처리구에서는 초기 12시간에서 높았다가 시간이 지날수록 발현이 줄어들었다. *AsNAC317-1*과 *AsNAC317-6* 유전자들은 Mannitol과 NaCl에서 초기 12시간부터 36시간동안 처리한 샘플 모두에서 유사하게 높은 발현을 보였다. *AsNAC322-2*와 *AsNAC322-4* 유전자들은 대조구와 스트레스 처리한 샘플에서 모두 발현양이 낮았으며 그중에서도 *AsNAC322-2*는 Mannitol과 NaCl 처리구에서 대조구보다는 비교적 높은 발현을 보였다 (Fig 10).

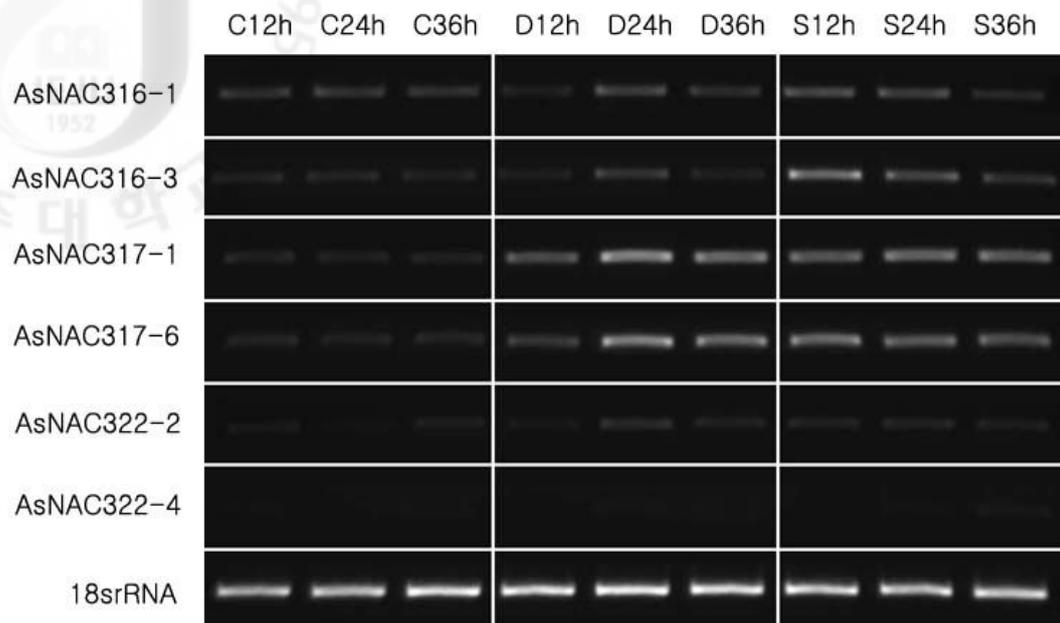
*OsNAC5*는 PEG, NaCl 처리조건에서 발현이 높아진다는 것이 보고되었다 (Song et al., 2011). 또한, 유전자를 과발현 시켰을 때, 야생형에 비해 높은 성장을 보였으며, RNAi를 이용하여 유전자를 knockout했을 때는 그 반대로 야생형에 비해 낮은 성장을 보였다.

*TaNAC69*는 가뭄, 고염, ABA, 저온을 비롯한 노화와 같은 스트레스 처리에

서 발현이 증가한다는 것이 확인되었으며(Xue et al., 2006), 밑에서 *TaNAC69* 유전자를 과발현 시켰을 때, 가뭄에 대한 적응력이 높아 지는 것으로 알려졌다(Xue et al., 2011). 따라서 이 연구를 통해 클로닝한 *AsNAC* family 유전자들이 가뭄과 염스트레스에서 높은 발현을 보이며, 이전에 보고된 유전자들과 유사하게 스트레스 저항성과 관련된 기능을 할 것이라고 기대할 수 있었다.



**Figure 9.** Expression of the cloned full-length *AsNAC* cDNAs in senescent leaves induced under dark stress. **a** Leaf senescence of creeping bentgrass by dark stress. Control (up, left); Dark2 (up, middle); Dark4 (up, right); Dark6 (down, left); Dark8 (down, middle); Dark10 (down, right). **b** Detection of *AsNACs* transcripts under dark stress by semi-quantitative PCR



**Figure 10. Expression of the cloned full-length *AsNAC* cDNAs under mannitol and salt stresses.** In this study, were used the seedlings of creeping bentgrass grown for 10days after germination. Detection of *AsNACs* transcripts under drought and salt stresses by semi-quantitative PCR. C12h, water treatment for 12hour (control); C24h, water treatment for 24hour (control); C36h, water treatment for 36hour (control); D12h, 300mM mannitol treatment for 12hour; D24h, 300mM mannitol treatment for 24hour; D36h, 300mM mannitol treatment for 36hour; S12h, 200mM NaCl treatment for 12hour; S24h, 200mM NaCl treatment for 24hour; S36h, 200mM NaCl treatment for 36hour.

## 6. 양파세포를 이용한 *AsNAC317-1* 유전자산물의 Subcellular localization

클로닝된 유전자들이 전사조절 유전자의 기능을 가진다면 각각의 유전자 단백질들은 핵으로 이동하여야 한다. 여섯 개의 유전자 중에서 대표적으로 *AsNAC317-1* 유전자가 정상적으로 핵으로 이동하는 단백질을 생산하는지를 입증하기 위하여 양파 표피 세포를 이용한 transient subcellular localization assay를 수행하였다. 리포터단백질인 GFP 유전자를 가진 pGA3811(Kim et al., 2009)을 사용하여 GFP fusion construct (pCaMV35S::*AsNAC317-1*-GFP)를 제작하였다. 이 GFP fusion construct와 대조구인 pGA3811(pCaMV35 S:GFP)을 양파의 표피세포에 particle bombardment를 사용하여 각각 도입시켰다. 도입된 양파세포는 형광현미경을 통하여 관찰하였다. *AsNAC317-1*-GFP fusion construct는 형질전환된 양파세포의 핵에 localization된 것을 확인 하였으며 control은 전체 양파세포의 세포질과 핵에 localization된 것을 확인 할 수 있었다(Fig 11).

전사조절자들은 핵에서 활동한다. 그리고 이 단백질들은 핵으로 이동할 수 있는 nuclear localization sequence (NLS)를 가지고 있는데, NAC 단백질들은 NAC domain의 C와 D subdomain에 NLS 서열이 존재하는 것으로 알려졌다(Kikuchi et al., 2000). 이 결과를 통하여, 클로닝된 *AsNAC317-1* 유전자가 기존에 보고와 같이 NLS 서열을 포함하고 있으며, 정상적으로 핵에 localization된다는 것을 입증 하였다.

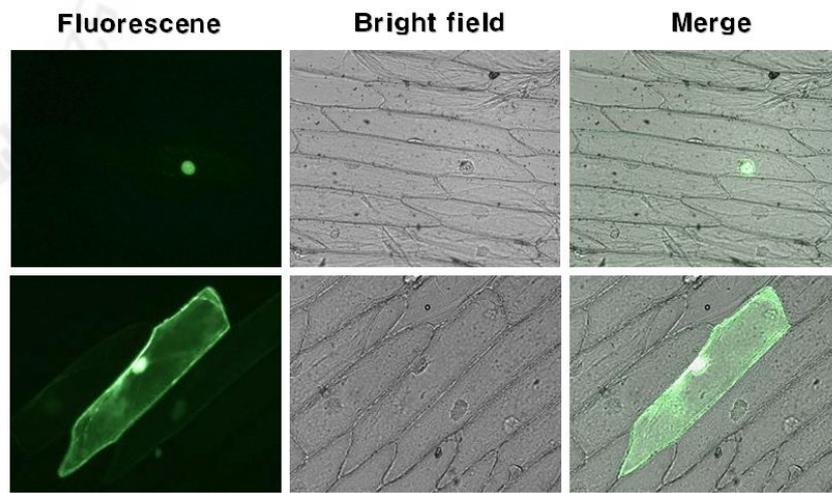


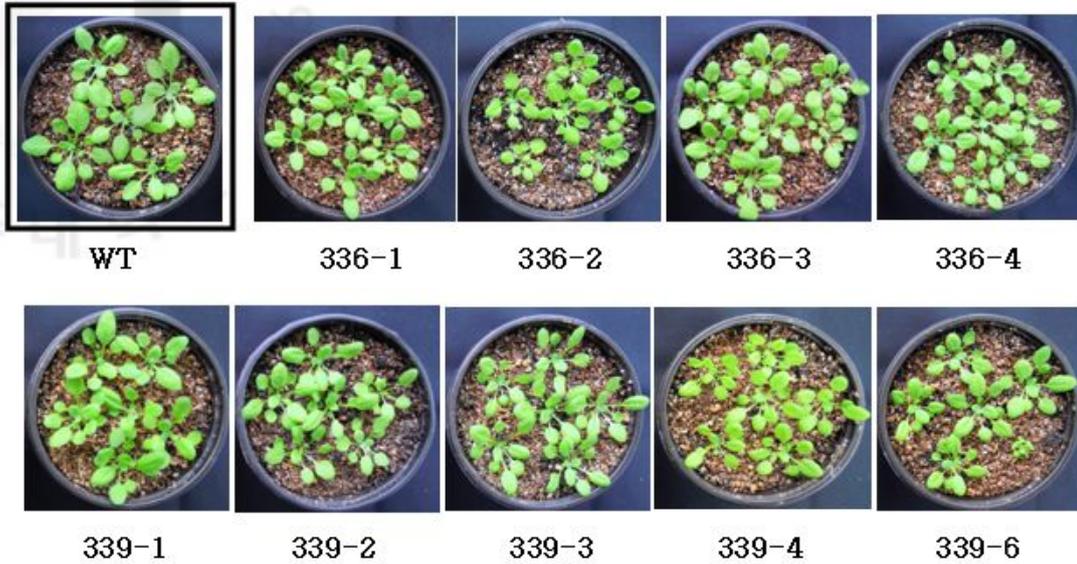
Figure 11. Subcellular localization of *AsNAC317* in onion epidermal cells. GFP and *AsNAC317*-GFP fusion protein were driven under the control of the CaMV 35S promoter.

## 7. 형질전환 식물체의 유전자 도입 및 발현 분석

*AsNAC317*의 2개의 homologous 유전자를 각각 애기장대에 도입된 T1세대 중 *AsNAC317-1*이 도입된 형질전환체는 pHG336, *AsNAC317-6*이 도입된 형질전환체는 pHG339라고 명명하였다. pHG336 line은 총 T1세대에서 15개체를 얻었고, pHG339 line은 T1세대에서 총 41개체를 얻었다. 도입된 유전자는 계놈 상 어떤 부위에 삽입되었느냐에 따라서 발현양이 다를 수 있고 발현양에 따라서 기능의 차이가 나타날 수도 있다. 그러므로 T1세대에서 pHG336-1~4, pHG339-1~7을 대상으로 semi-quantitative PCR을 수행하였다. negative control로는 야생형 타입의 애기장대를 사용하였으며 pHG336 line과 pHG339 line의 각각 특이적인 프라이머를 사용하였다. pHG336 line에서는 pHG336-1과 pHG336-3의 발현이 높았으며, 반면에, pHG336-2가 낮은 발현을 보였다. 또한 pHG339 line은 pHG339-2, pHG339-3, pHG339-4, pHG339-6 line에서 비교적 높은 발현을 보였다(Fig12-b). T1계통 중 pHG336-1, pHG336-2, pHG336-3, pHG336-4, pHG336-5, pHG339-1, pHG339-2, pHG339-3, pHG339-4, pHG339-6은 파종하여 T2식물체를 얻었다.

T2 식물체들은 21℃, 장일조건 (16h light/8h dark)의 정상적인 환경에서 야생형 타입의 애기장대와는 특별하게 다른점은 없었다(Fig 12-a). 식물의 발달과 관련있는 NAM(Souer et al., 1996), CUC(Takada et al., 2001, Vroemen et al., 2003)에서 나타난 특이적인 표현형과는 다르게 ATAF subfamily에 속하는 스트레스와 관련된 유전자들의 대부분은 정상적인 조건에서 대조구와 큰 차이를 보이지 않는다. 따라서, 본 실험을 통하여 얻은 형질전환체 식물들은 식물의 발달과정에서의 역할보다는 스트레스에 대한 반응에 역할을 할 가능성이 높다는 것을 예측 할 수 있었다.

a



b

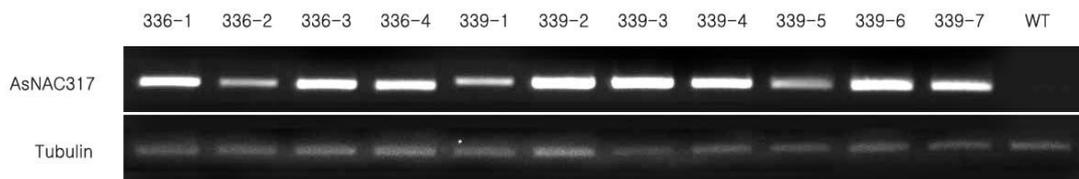


Figure 12. Outward appearance of the transgenic plants and expression of the transgenes in the plants. **a** Comparison of phenotype of transgenic plants with wild type. **b** Transcripts confirmation of transgenes in transgenic plants by semi-quantitative PCR. AsNAC317-1 lines: 336-1, 336-2, 336-3, 336-4. AsNAC317-6: 339-1, 339-2, 339-3, 339-4, 339-5, 339-6, 339-7. wild type (Col-0): WT. The primers are common in two lines, 336 and 339.

## 8. T2 형질전환 식물체의 표현형 분석

*AsNAC317-1*과 *AsNAC317-6*이 도입된 pHG336과 pHG339 형질전환체 각각의 T2식물체에서 염스트레스와 가뭄스트레스를 처리하여 표현형을 살펴보았다. pHG336-1과 pHG339-3의 T2 식물체들을 200mM NaCl용액을 3일 동안 씩 관수를 통하여 염스트레스에 대한 내성을 관찰하였다. 처리 후 일주일 지나자 336-1과 339-3 T2 line의 대부분이 야생형보다 노화가 덜 진행되는 것처럼 관찰되었다. 2주 후에는 그러한 변화가 더 확연하게 드러났다(Fig13).

가뭄스트레스에 대한 저항성을 보기위하여 물을 주지 않고 2주 후에 표현형을 관찰하였다. 야생형의 애기장대에서는 잎이 마르고 녹기가 없어져 페닐프로파노이드의 축적으로 인해 잎이 붉은 색이 도는 반면에 pHG336-1, pHG339-3의 T2 애기장대에서는 녹기가 약간 남아있으며 잎도 마르는 속도가 더디게 진행되었다(Fig14). 잎이 붉게 변하는 것은 식물스트레스의 대표적인 징후이다 (Dixon et al., 2002, Cam era et al., 2004, Solecka, 2007). 이러한 결과를 통해 *AsNAC317* 스트레스에 대한 저항성과 관련된 기능을 할지도 모른다고 예측 하였다. 또한, 보다 정확한 실험을 수행하기 위하여 동형접합체 (homozygote)의 T3계통을 선발하였다.

a



336-1

WT

b



339-3

WT

Figure 13. Phenotypic analysis of transgenic plants under salt stress. a Comparison of pHG336-1 and wild type. b Comparison of pHG339-3 and wild type.

a



WT

336-1

b



WT

339-6

Figure 14. Phenotypic analysis of transgenic plants under drought stress. **a** Comparison of wild type and pHG336-1. **b** Comparison of wild type and pHG339-6.

## 9. T3 형질전환 식물체의 표현형 분석

T2세대에서 얻은 종자 중에서 pHG336-1, pHG336-2, pHG339-1, pHG339-3 T3세대의 동형접합체 계통을 가지고 스트레스 조건에서의 표현형 분석을 실시하였다.

먼저, *in vitro* 방법으로 형질전환식물체의 가뭄에 대한 저항성의 변화를 보기 위하여 Leaf disk floating assay를 수행하였다. 300mM Mannitol 용액에 형질전환체와 야생형 식물의 잎을 담근 후 25°C의 장일조건에서 일주일동안 잎의 변화를 살펴보았다. 대체적으로 야생형과는 크게 차이는 없었지만 좀 더 녹기가 지속되는 것처럼 보였다(Fig15-a). 광합성 효율을 측정한 결과 야생형과 형질전환체들은 약 75% 내외로 비슷한 광합성 효율을 보였다(Fig15-b).

염스트레스에서 형질전환식물체의 생장을 보기 위하여 pHG336-1, pHG336-2, pHG339-1, pHG339-3 T3세대의 동형접합체들과 야생형의 애기장대를 MS배지에 과중하여 일주일정도 성장시킨 유묘를 0mM, 100mM, 150mM, 200mM, 300mM의 NaCl이 포함된 배지에 옮겨 10일동안 관찰하였다. 그 결과, 야생형과 형질전환체 모두 NaCl이 첨가되지 않은 배지에서는 정상적이고 빠른 생장을 보였고, NaCl이 100mM이 첨가된 배지에서는 잎과 뿌리의 생장이 저해되기 시작하다가 300mM에서는 생장이 정지되었다(Fig16-a). NAC family 유전자는 식물의 발달(Souer et al., 1996, Takada et al., 2001, Vroemen et al., 2003), 노화(Uauy et al., 2006), 환경스트레스(Ohnishi et al., 2005, Hu et al., 2006)뿐만 아니라 옥신신호와 관련있다고 알려져 있으며, 옥신은 측면뿌리 형성과 관련하여 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Xie et al., 2000). 따라서 뿌리와 관련한 표현형을 관찰하였을 때, 정상적인 환경에서 pHG336-2의 측면뿌리가 야생형에 비해 많이 형성된 것처럼 보였으나, NaCl을 처리를 했을 때는 야생형과 비교하여 별다른 차이가 없었다. 또한, 생체중(Fresh weight)을 측정한 결과에서도 야생형과 형질전환체를 비교하여 유의성 있는 결과를 얻지 못하였다(Fig16-b).

가뭄스트레스에서 형질전환식물체의 생장을 보기 위하여 pHG336-1, pHG336-2, pHG339-1, pHG339-3 T3세대의 동형접합체들과 야생형의 애기장대를 MS배지에 과중하여 일주일정도 성장시킨 유묘를 0mM, 100mM, 150mM,

200mM, 300mM의 Mannitol이 포함된 배지에 옮겨 10일동안 관찰하였다. 그 결과, 야생형과 형질전환체 모두 Mannitol이 100mM 포함된 배지에서부터 뿌리가 더딘 생장을 보였고, 잎이 작고 색이 진하며, 300mM의 Mannitol이 포함된 배지에서는 형질전환체와 야생형 대부분의 생장이 멈추었으며, 뿌리와 관련한 표현형에서도 야생형과는 크게 다른점이 없어보였다(Fig17-a). 또한, 생체중을 측정한 결과에서도 야생형과 형질전환체를 비교하여 유의성 있는 결과를 얻지 못하였다(Fig17-b)

가뭄스트레스에서의 종자 발아율을 측정하기 위해 Mannitol을 첨가한 MS배지에 야생형과 pHG336-1, pHG339-3의 종자들을 과종하여 2주 동안 정상적인 환경에서 배양하였다. 야생형과 형질전환체는 Mannitol을 첨가한 배지에서 생장이 더디었고, 잎도 작으며 색이 진한 것이 확인이 되었다(Fig 18-b). 잎과 뿌리 등의 발아를 살펴보면, 100mM의 Mannitol을 첨가한 배지에서는 야생형과 형질전환체 모두가 100%의 발아율을 가졌으며, 형질전환체들은 300mM로 농도를 높였을 때도 96% 이상의 높은 발아율을 나타냈다. 반면에, 야생형은 150mM에서 92% 급감하면서 300mM에서 74%정도로 발아율이 낮아지는 것을 확인하였다(Fig 18-a).

종합적으로, T2세대의 형질전환체에서 염스트레스와 가뭄스트레스에서의 표현형을 본 결과, 야생형보다는 저항성을 나타내는 듯하게 보였으나 T3세대에서는 야생형과는 별다른 차이를 보이지 않았다. 뿌리생장 실험에서 환경스트레스에 의한 저항성 뿐만 아니라, 뿌리세포활성과 관련한 표현형에서도 유의성있는 결과를 얻지 못하였다. 또한, 가뭄스트레스에서는 발아율이 야생형보다 높았지만, 종자상태나 보관환경 등에서 영향을 받을 수 있으므로 재실험이 요구된다.

a



b

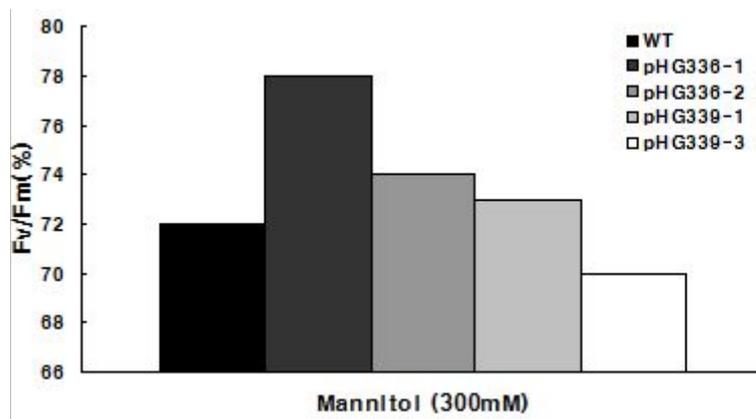
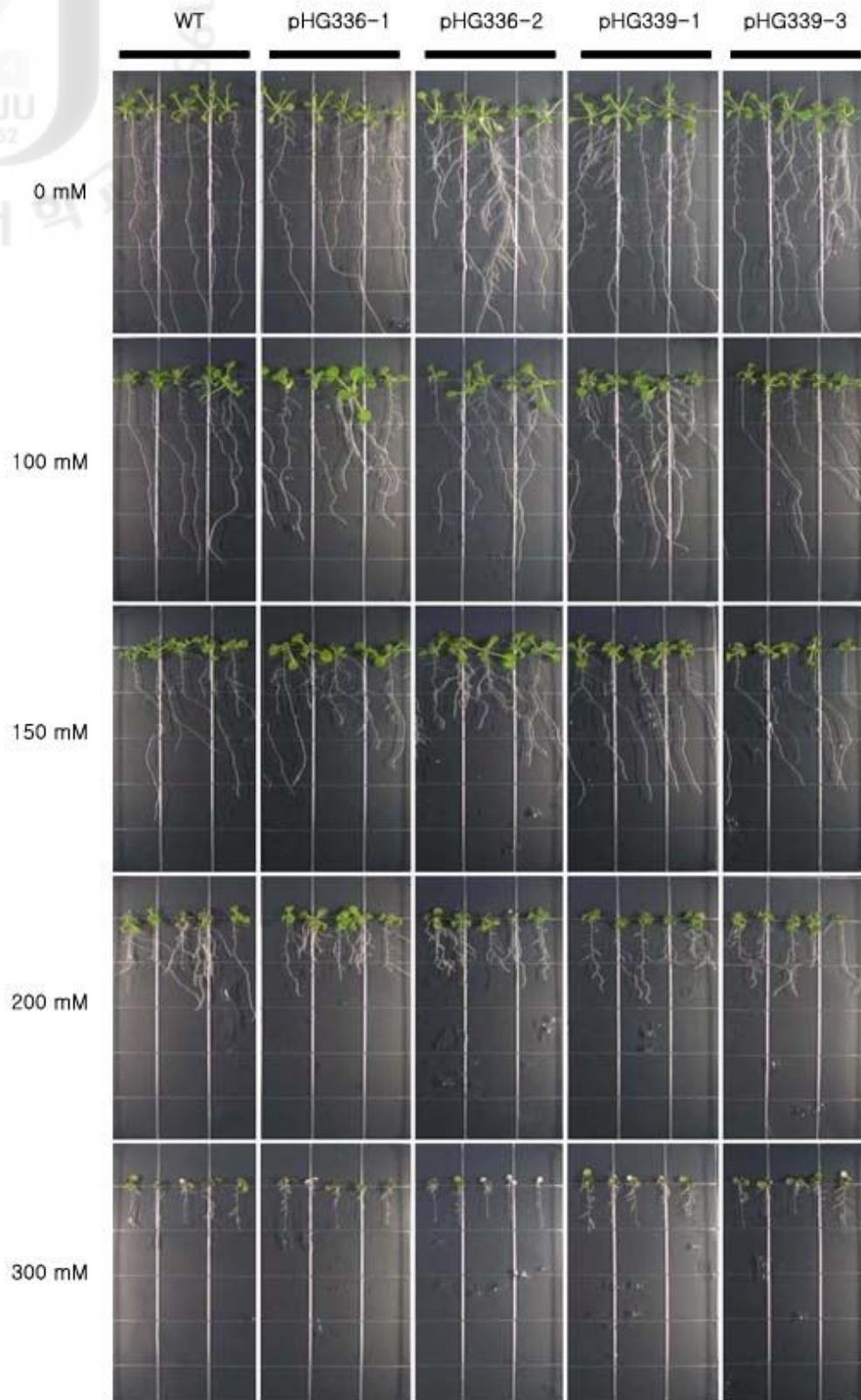


Figure 15. Leaf disk floating assays for an evaluation of drought tolerance in leaves of the transgenic pHG336 and pHG339 plants. a Representative picture that shows phenotypic differences in leaf disks. b % of photosynthesis retention from leaf segments of WT and transgenic lines plants after incubation in 300mM Mannitol solution.

a



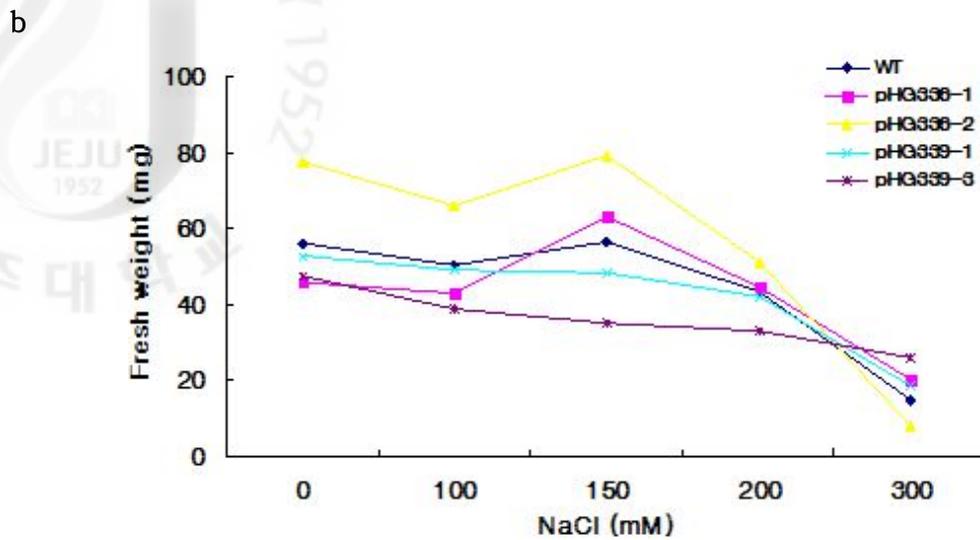
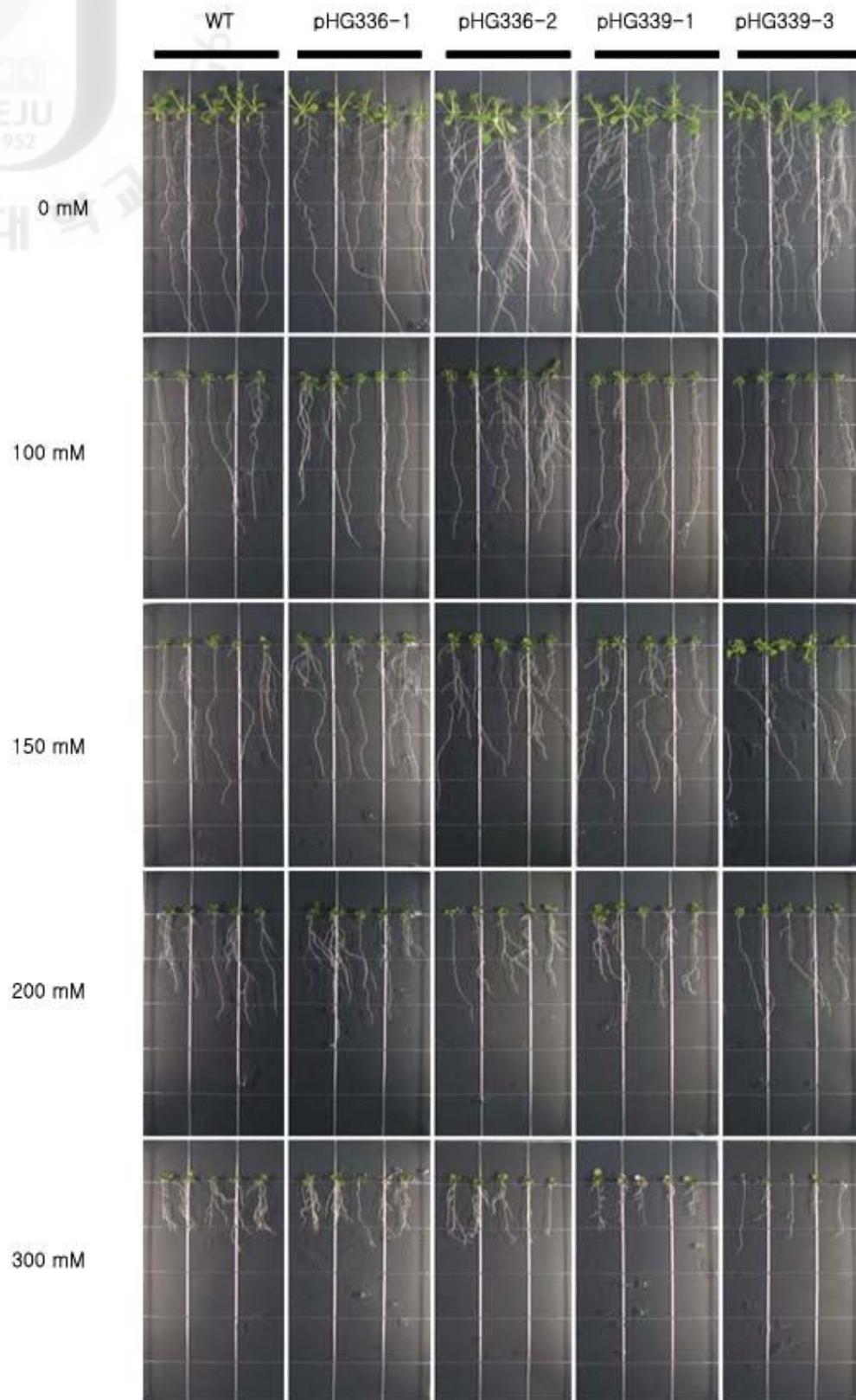


Figure 16. Salt stress response of plants overexpressing *AsNAC317-1*. a Response of WT, *AsNAC317-1* and *AsNAC317-6* OX seedlings after NaCl treatments. b Fresh weights of WT, *AsNAC317-1* and *AsNAC317-6* measured after NaCl treatments.

a



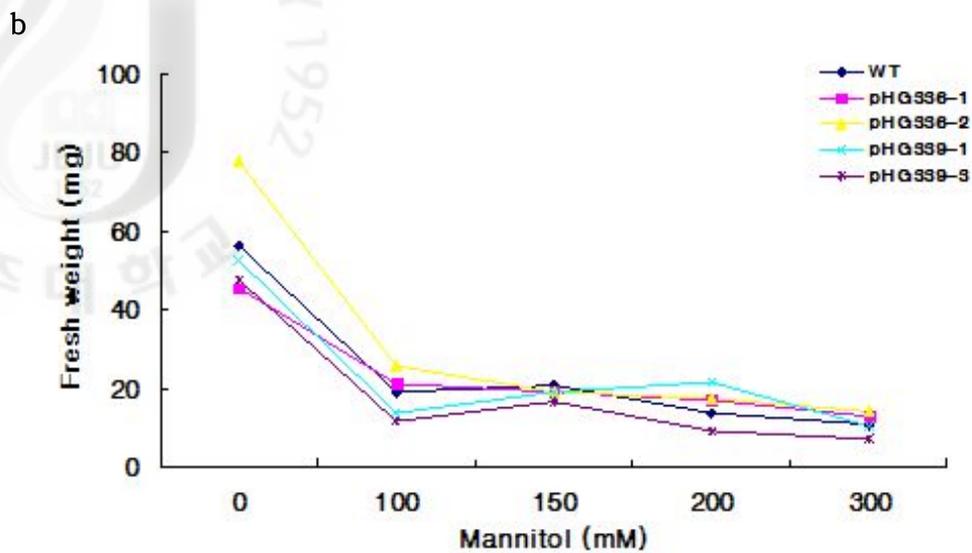


Figure 17. Drought stress response of plants overexpressing *AsNAC317-1*. **a** Response of WT, *AsNAC317-1* and *AsNAC317-6* OX seedlings after Mannitol treatments. **b** Fresh weights of WT, *AsNAC317-1* and *AsNAC317-6* measured after Mannitol treatments.

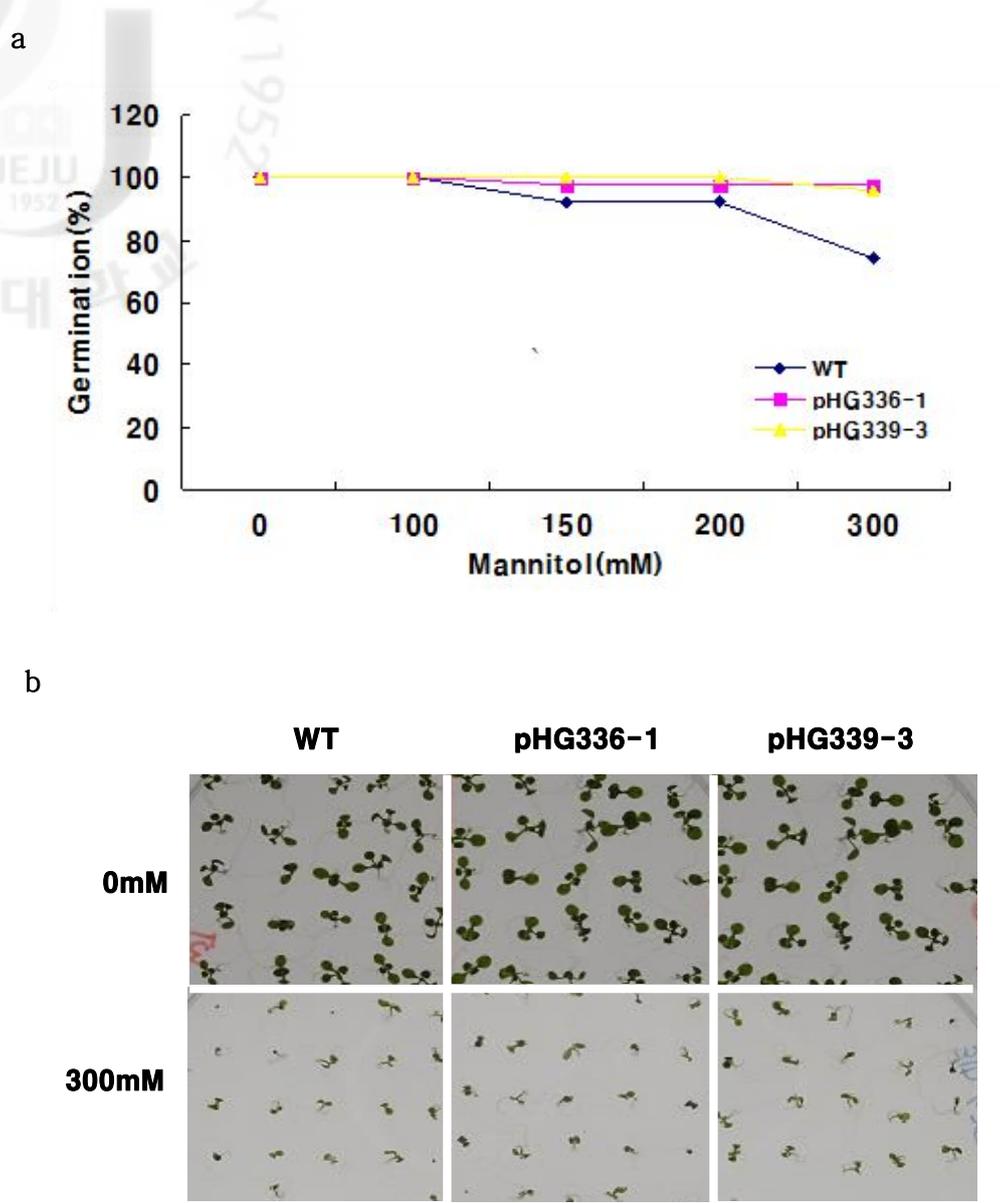


Figure 18. Germination assay of plants overexpressing *AsNAC317-1*. **a** Germination assays in drought stress. **b** Photograph of germination on MS medium with 300mM mannitol at 2 weeks after incubation at 22°C.

## IV. 종합고찰

본 연구에서는 크리핑벤트그라스에서 환경스트레스에 저항성의 기능을 하는 NAC family 유전자를 클로닝 하기 위해서 실험을 진행하였다. NAC family protein은 보고되어진 바와 같이 N 말단 지역에 총 5개의 subdomain (A,B,C,D,E)으로 구성되어진 NAC domain을 가진 식물 특이적인 전사인자로서, 애기장대에서 117개, 벼에서는 151개의 유전자가 발견되었을 정도로 식물에서 많이 존재하고 있는 super family 전사인자이다 (Kikuchi et al., 2003, Fang et al 2008, Kikuchi et al., 2010).

크리핑벤트그라스의 총 15개의 유전자의 partial cDNA의 서열을 분석하여 그 중에서 독립적인 서열을 가진 9개의 클론을 확보하였고, 그들 중 pHG318, pHG319, pHG320, pHG323, pHG324는 *no apical meristem (NAM)* subfamily에 속하고 나머지 pHG316, pHG317, pHG321, pHG322는 크게 ATAF subfamily에 속하였다. 그 중에서도 고온, 염, 가뭄, 암 (dark) 스트레스에서 상향조절 (up-regulation)되는 *AsNAC316*, *AsNAC317*, *AsNAC322* 유전자로부터 클로닝 과정에서 각각의 유전자로부터 서로 90% 이상의 상동성을 보이는 클론을 포함하여 총 6개의 full-length cDNA를 클로닝 하였고 각각 *AsNAC316-1*, *AsNAC316-2*, *AsNAC317-1*, *AsNAC317-2*, *AsNAC322-1*, *AsNAC322-2*로 명명하였다.

*AsNAC316* 유전자는 노화과정에서 유도되고 여러 가지 환경스트레스에 대한 저항성이 보고된 벼의 *OsNAC5*와 전체염기서열의 72%의 상동성이 있었고 (Takasaki et al., 2010), *AsNAC317*은 가뭄에 대한 저항성이 보고된 밀의 *TaNAC69* 유전자와 80%의 상동성 (Xue et al., 2011), 그리고 *AsNAC322*는 잎 노화를 조절한다고 보고된 대나무의 *BeNAC1* 유전자와 55%의 상동성을 보였다 (Chen et al., 2011). 이러한 상동성을 기반으로, 클로닝 된 유전자가 기존에 알려진 유전자들과 유사한 기능을 보여 줄 것으로 기대하며 다음 연구를 진행하였다.

클로닝된 유전자들은 대부분의 식물체 기관에서 발현 하였는데, 특히, 포복경과 뿌리에서는 높은 발현양상을 보였다. 또한 스트레스 조건에 따른 발현 실험에서, 암, 가뭄, 염 스트레스에서 유전자의 발현이 상향 조절되었다. 이에 따라서 클로닝된 유전자들은 유전자 상동성 뿐만 아니라, 발현양상을 통해서도, 노화 뿐만 아니라 가뭄 또는 염 스트레스에서 중요한 역할을 할 것으로 예측하였다.

양과 표피세포를 이용한 transient assay를 통해 *AsNAC317-1* 유전자가 예측한 대로 핵에 localization되는 것을 확인하였다. 이 결과로, nuclear localization signal (NLS)을 가진 transcription factor인 다른 NAC 유전자 (Kikuchi et al., 2000) 처럼 *AsNAC317-1*도 핵 내에서 전사조절 기능을 할 것으로 예측되었다.

유전자의 기능을 연구하기 위해 *CaMV 35S promoter*의 조절을 받도록 *AsNAC316-1*, *AsNAC316-2*, *AsNAC317-1*, *AsNAC317-2*, *AsNAC322-1*, *AsNAC322-2*을 재조합하였고, 이들 재조합 유전자를 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물체에 도입하였다. 각각의 재조합체로부터 적어도 10개 이상의 T1 형질전환 식물체를 얻었고, 무작위로 선택한 일부 형질전환 식물체에서 RT-PCR을 이용하여 도입된 유전자가 과발현되고 있음을 확인하였다.

*AsNAC317-1*과 *AsNAC317-2*의 형질전환 식물체는 T3세대에서 각각 도입 유전자에 대한 동형접합체 2계통씩 (homozygous line)을 확보하였으며, 이들 형질전환 식물체가 야생 대조구 식물에 비해 염, 가뭄, 암 스트레스에 대한 저항성이 증가되었는지를 기내 (*in vitro*) 종자발아, 기내 유식물체의 성장, 개화직전의 성숙 식물체 잎의 노화 양상, 염과 가뭄 조건의 화분에서의 성장 등의 실험을 통해 조사하였다. 하지만, 모든 실험결과에서 형질전환체와 대조구 사이에서 유의성 있는 차이를 발견하지 못하였다. 원인을 정확하게 알 수는 없지만, 유전자 과발현에 의해 스트레스 저항성을 획득하지 못한 원인을 몇 가지 추론해 보고자 한다. 첫째, 단자엽식물인 크리핑 벤투그라스의 유전자가 다른 식물, 특히 쌍자엽식물인 애기장대에서 기능을 발휘하지 못할 수 있다. 크리핑 벤투그라스와 애기장대는 서로 생활 주기 및 생리적 환경에 대한 반응이 서로 다르기 때문에 환경 스트레스에 반응하는 유전자의 기능도 차이를 일으킬 수도 있다 (Tester et al., 2005). 이 유전자와 매우 상동성이 높은 밀의 *TaNAC69*가 밀에 과발현 되었을

때 가뭄에 대한 저항성이 증가된 사례가 있다 (Xue et al., 2011). 그러므로 현재 이들 유전자는 크리핑벤트그라스와 형질전환이 비교적 쉬운 벼에 도입을 시도하고 있다.

둘째, 유전자의 중복성이다. NAC family 유전자는 각 식물에서 풍부하게 존재하고 있으며, 기능 또한 중복되는 경우가 많다 (Nowak et al., 1997). 크리핑벤트그라스에서 클로닝한 AsNAC317-1과 AsNAC317-6의 기능이 약할 수가 있는데, 이 유전자를 과발현을 시켜 유전자의 기능을 배가시켰을 지라도 유사한 기능을 하는 유전자들로 인해 유전자의 역할이 확연하게 드러나지 않을 수도 있다.

마지막으로, 현재의 방법으로 발견하기 어려운 표현형에 관여하거나 유전자의 기능이 없는 경우이다. 실제로, 애기장대와 벼에서 100여개가 넘는 NAC family 유전자들이 확인이 되었다 (Ooka et al., 2003, Fang et al., 2008). 하지만, 실제로 기능적으로 확인된 유전자들은 몇 가지에 지나지 않는다 (Zheng et al 2009). NAC family 유전자는 식물의 발달 (Souer et al., 1997, Aida et al., 1997, Sablowski et al, 1998, Xie et al., 2000, Takada et al., 2001, Vroemen et al., 2003, Weir et al., 2004) 방어(Xie et al., 1999, Collinge et al., 2001, Hegedus et al., 2003) 환경스트레스에 대한 반응(Collinge et al., 2001, Hegedus et al., 2003, Tran et al., 2004, Fujita et al., 2004)등 다양하기 때문에, AsNAC317-1과 AsNAC317-6의 과발현이 애기장대에서 다른 역할을 할 가능성도 있지만 위에서 언급한 바와 같이 아예 특별한 기능을 가지지 않을 수도 있다.

결론적으로, 본 연구를 통해 크리핑벤트그라스에서는 최초로 NAC family 유전자를 클로닝 하였으며, 이들 유전자가 여러 가지 환경스트레스에서 유도되고 있음을 확인하였다. AsNAC317-1과 AsNAC317-6 뿐 만 아니라 클로닝된 나머지 유전자들도 애기장대 이외의 벼와 같은 단자엽식물에서 과발현 시켜 환경스트레스 저항성과 관련된 유전자의 기능을 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## V. 참고문헌

An G. (1987). Binary Ti Vectors for plant transformation and promoter analysis *Methods in Enzymology* 153:292-305

Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H and Tasaka M (1997) Genes Involved in Organ Separation in Arabidopsis, An Analysis of the cup-shaped cotyledon Mutant *The Plant Cell* 9: 841-857

Collinge M and Boller T (2001) Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol. Biol.* 46:521-529

Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T (2004) Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol Rev* 198:267-284

Chen W, Provart N, Glazebrook J, Katagiri F, Chang H, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham S, Budworth P, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps J, Harper J, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl J, Wang X, and Zhu T (2002) *The Plant Cell* 14: 559-574

Chen Y, Qiu K, Kuai B, ding Y (2011) Identification of an NAP-like transcription factor BeNAC1 regulating leaf senescence in bamboo (*Bambusa emeiensis*'Viridiflavus') *Physiologia Plantarum* 142:361-371

Cushman J and Bohnert H (2000) Genomic approaches to plant stress

tolerance *Current Opinion in Plant Biology* 3:117-124

Dayhoff M. O., McLaughlin P. J., Barker W. C., and Hunt L. T. (1975) Evolution of Sequences within Protein Superfamilies. *Naturwissenschaften* 62:154-161

Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Reddy MS, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence: a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 3:371-390

DUFF T and BEARD J (1975) Supraoptimal Temperature Effects upon *Agrostis palustris*. *Physiologia Plantarum* 32:18-22

Fang Y, You J, Xie K, Xie W, Xiong L (2008) Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Mol Genet Genomics* 280:547-563

Fujita M. et al., (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J.* 39:863-876

Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, and Xiong L (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice *PNAS* 29;103(35):12987-92

Huang, B., X. Liu, and J.D. Fry. (1998b) Effects of high temperature and poor soil aeration on root growth and viability of creeping bentgrass. *Crop*

Sci. 38:1618-1622

Hegedus, D. et al., (2003) Molecular characterization of Brassica napus NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Mol. Biol* 53:383-397

Han Q, Zhang J, Li H, Luo Z, Ziaf K, Ouyang B, Wang T, Ye Z (2011) Identification and expression pattern of one stress-responsive NAC gene from *Solanum lycopersicum*. *Molecular Biology Reports* 39:1713-1720

Ito Y, et al., (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.*, 47:141-153

Jeong J, Kim Y, Baek K, Jung H, Ha S, Choi Y, Kim M, Reuzeau C, and Kim J (2010) Root-Specific expression of OsNAC10 Improves Drought Tolerance and Grain Yield in Rice under Field Drought Conditions. *Plant Physiology* 153: 185-197

Kikuchi K, Ueguchi-Tanaka M, Yoshida K.T, Nagato Y, Matsusoka M, Hirano H.-Y. (2000) Molecular analysis of the NAC gene family in rice *Mol Gen Genet* 262:1047-1051

Kizis D and Pages M (2002) Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J.*, 30:679-689

Kim S, Lee D, Yang J, Moon S, An G (2009) Cloning Vectors for Rice *J. Plant Biol.* 52:73-78

Kim S, Kang J, Cho D, Park J and Kim S (2004) ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J.*, 40:75-87

Kaneda T, Taga Y, Takai R, Iwano M, Matsui H, Takayama S, Isogai A and Che F (2009) The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death *The EMBO Journal* 28:926-936

Mahajan S. & Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139-158

Martin A. Nowak, Maarten C. Boerlijst, Jonathan Cooke & John Maynard Smith (1997) Evolution of genetic redundancy *Nature* 388:10

Nuruzzaman M, Manimekalai R, Most Sharoni A, Satoh K, Kondoh H, Ooka H, Kikuchi S (2010) Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* 465:30-44

OOKA H, SATOH K, DOI K, NAGATA T, OTOMO Y, MURAKAMI K, MATSUBARA K, OSATO N, KAWAI J, CARNINCI P, HAYASHIZAKI Y, SUZUKI K, KOJIMA K, TAKAHARA Y, YAMAMOTO K, and KIKUCHI S (2003) Comprehensive Analysis of NAC Family Genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* *DNA RESEARCH* 10: 239-247

Ohnishi T, Sugahara S, Yamada T, Kikuchi K, Yoshida Y, Hirano H and Tsutsumi N (2005) OsNAC6, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice. *Genes Genet. Syst.* 80: 135-139

Ren, T. et al (2000) *HRT* gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* 12:1917-1925

Raul A. Sperotto, Felipe K. Ricachenevsky, Guilherme L. Duarte, Tatiana Boff, Karina L. Lopes, Edilena R. Sperb, Michael A. Grusak, Janette Palma Fett (2009) Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta* 230:985-1002

Ranjan R, Bohra S, Asija MJ (2001) Plant senescence: physiological, biochemical and molecular aspects. *Agrobios* (India)

Saini H.S. & Westgate M.E. (2000) Reproductive development in grain crops during drought. *In Advances in Agronomy* (ed. D.L.Spartes) 68:59-96

Steven J. Clough and Andrew F. Bent (1998) Floral dip, a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(6): 735-743

Sablowski, R.W.M. and Meyerowitz, E.M. (1998) A homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA* *Cell* 92:93-103

Solecka D (2007) Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiol Plant* 19:257-268

Shinozaki K, Yamaguchi-shinozaki K, Seki M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6:410-417

Souer E, Van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, and Koes R(1996) The No Apical Meristem Gene of Petunia Is Required for Pattern Formation in Embryos and Flowers and Is Expressed at Meristem and Primordia Boundaries *Cell* 85: 159-170

Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature, differences and cross-talk between two stress signaling pathways *Current Opinion in Plant Biology* 3:217-223

Smirnoff N. et al., (1998) Plant resistance to environmental stress *Current Opinion in Biotechnology* 9:214-219

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y and Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31(3):279-292

Song S, Chen Y, Chen J, Dai X, Zhang W (2011) Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress. *Planta* DOI 10.1007/s00425-011-1403

Tester M and Bacic A (2005) Abiotic Stress Tolerance in Grasses. From Model Plants to Crop *Plants Plant Physiology* 137:791-793

Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K (2010) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice *Mol Genet Genomics* 284(3):173-83

Takada, S. et al., (2001) The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128:1127-1135

Tran, L.S. et al., (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought responsive *cis*-element in the *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION STRESS 1* promoter. *Plant Cell* 16:2481-2498

Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J (2006) ANAC Gene Regulating Senescence Improves Grain Protein, Zinc, and Iron Content in Wheat *SCIENCE* 314: 1298

Vroemen, C.W. et al., (2003) The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:1563-1577

Weir, I. et al., (2004) *CUPULIFORMIS* establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* 131:915-922

Xie, Q. et al., (2000) *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Gene Dev.* 14:3024-3036

Xie, Q. et al., (1999) GRAB protein, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Mol. Biol.* 39:647-656

Xue, G.P., and Loveridge, C.W. (2004) HvDRF1 is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably to a CT-rich element. *Plant J.* 37:326-339.

Xue G, M. Way H, Richardson T, Drenth J, Joyce P.A and Lynne McIntyre C (2011) Overexpression of TaNAC69 Leads to Enhanced Transcript Levels of Stress Up-Regulated Genes and Dehydration Tolerance in Bread Wheat. *Molecular Plant* 4: 1-16

Xue G, I. Bower N, Lynne McIntyre C, A. Riding G, Kazan K and Shorter R (2006) TaNAC69 from the NAC superfamily of transcription factors is up-regulated by abiotic stresses in wheat and recognises two consensus DNA-binding sequences. *Functional Plant Biology* 33:43-57

Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua N (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development *Genes Dev* 14:3024-3036

Zheng X, Chen B, Lu G, Han B (2009) Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379:985-989



# ACKNOWLEDGEMENTS

힘들었던 2010년이 지나가고, 정신없었던 2011년이 지나면서 어느덧 졸업 문턱까지 다다랐습니다. 그동안 저를 도와주시고, 슬픈 일, 힘든 일, 기쁜 일을 함께 해준 여러 교수님들, 선후배님들, 학과 동기와 친구들 마지막으로 사랑하는 내 가족들에게 감사의 말씀을 전해드리고 싶습니다.