배추 완전장 유전자 과발현 애기장대 형질전환체 활용 내염성 유전자 선발 및 유채 형질전환

홍준기 · 임명호 · 서은정 · 윤혜진 · 박지희 · 이연희*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부

Functional Screening of Salt Stress Tolerance Genes Using Transgenic *Arabidopsis thaliana* Lines Overexpressing *Brassica rapa* Full-length Genes and *Brassica napus* Transformation

Joon Ki Hong, Myung-Ho Lim, Eun Jung Suh, Hye-Jin Yoon, Jihee Park, and Yeon-Hee Lee*

Agricultural Biotechnology Department, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, 370 Nongsaengmyeong-ro, Jeonju 54874, Republic of Korea

Abstract Given that soil salinity significantly limits plant growth and production in agricultural land, research on salt stress is of particular agricultural relevance. In this study, for the purposes of functional screening of genes involved in salt stress responses, we selected approximately 651 transgenic *Arabidopsis* lines (157 independent full-length) from a transgenic *Arabidopsis* population overexpressing full-length *Brassica rapa* cDNAs. Initial screening indicated that the transgenic lines of 12 genes showed apparent salt tolerance phenotypes when exposed to NaCl at a concentration of 125 mM, among which, two genes (*BrATL30* and *BrZHD10*) were selected for detailed characterization. The T₃ progeny of these transgenic lines exhibited accelerated seed germination, often accompanied by faster root growth and higher survival rate, compared with wild-type plants under salt stress. Additionally, in order to examine the agricultural potential of the two selected *B. rapa* genes, we constructed *BrATL30*- and *BrZHD10*-overexpressing *Brassica napus* transgenic plants (*BrATL30*-OX and *BrZHD10*-OX), which showed apparent high salt stress-tolerant phenotypes compared with wild-type plants. Furthermore, we found that the basal expression of several salt- and abiotic stress-responsive genes was higher in transgenic plants than in wild-type plants. Taken together, this study will provide two valuable functional genes related to salt stress tolerance.

Keywords *Arabidopsis*, *B. napus*, Full length gene, Functional screening, Salt stress, Transgenic plant

Received on June 30, 2020. Revised on July 31, 2020. Accepted on August 11, 2020.

* Corresponding Author (E-mail: yhl2222@korea.kr, Tel: +82-63-238-4690, Fax: +82-63-238-4654)

서 언

애기장대 유전체 해독 기술을 시작으로 벼, 배추, 콩 등 작물에 서도 유전체 해독이 완료되었거나 진행 중이며 국내에서는 배, 도라지, 메밀, 결명자 등 특수 경제 작물에서도 유전체 해독이 진행되고 있다. 이러한 유전체 해독 정보는 궁극적으로 우수 품종 개발을 위한 분자표지 개발뿐만 아니라 우수 유용 유전자 선발 및 활용에 사용되어야 의의가 있다. *Brassica* 식물은 가장 널리 연구된 모델 식물인 애기장대를 포함하여 약 338속 3700종이 있는 배추과(Brassicaceae)에 속하는 작물로 배추, 양배추, 브로콜리, 유채 등이 있으며 채소와 오일 작물을 포함하고 전 세계 채소 생산의 약 10%, 전 세계 식용 채소 오일 생산의 약 12%를 차지할 정도로 주요한 작물이다(Anjum et al. 2012).

배추는 국내 주요 채소 작물 중의 하나로 김치의 주원료로서 2017년 국내시장 시장규모가 약 1조 4500억원에 달하고 2018년도 수출액이 약 1억 달러에 달하는 경제적, 산업적으로 그 중요성이 매우 높은 작물이다(2019 식품산업통계정보시스템). 배추 유전체는 우리나라 배추 지부 품종을 재료로 이용 하여 국제 컨소시엄을 통하여 2011년 유전체 해독을 완료하였다(Wang et al. 2011). 현재 이렇게 벼, 배추 등 작물 유전체 해독이 완료된 후 축적된 유전체, 전사체 등의 유전정보는 농업적으로 유용한 우수 유전자를 선발하고 기능 분석을 하는데 필수적으로 이용되고 있다.

작물에서 기능을 하는 유전자 수는 작물에 따라 다소 차이가 있으나 적어도 30,000개 이상으로 존재하는 것으로 추정된다. 이러한 대량의 유전자들의 기능을 분석하고 유용한 유전자를

선발하기 위해서 여러 가지 방법이 사용되었다. 유전자의 loss-of-function에는 T-DNA, Ac/Ds, Tos17 transposon 등의 삽입 변이체가 이용되었고, gain-of-function을 위해서 full-length (완전장) cDNA를 과발현시킨 FOX (Full-length cDNA overexpressing gene hunting system) 라인이 이용되었다(Ichikawa et al. 2006, Seki & Shinozaki 2009, Lee et al. 2010a, Lee et al. 2010b, Sakurai et al. 2011). 이러한 집단들의 제작은 유전체 및 전사체 정보가 많이 축적된 벼와 애기장대를 중심으로 이루어졌으며 이들 집단들의 특성을 분석함으로써 유전자들의 기능을 확인하는 연구가 지속적으로 수행되고 있다. 따라서 유전자 기능 연구를 위한 형질전환체 집단 소재 구축 및 활용, 형질평가 연구는 식물 생명공학 연구를 위한 기반 구축이라고 할 수 있다. 또한 이러한 형질전환 집단 특성 분석을 통한 유전자 기능 분석 연구는 전 세계적으로 문제가 되고 있는 기후변화 대응, 생산량 증대, 고부가 기능성 등 관련 유용 유전자를 확보하는 데에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있다. 배추는 애기장대와 같은 십자화과에 속하여 유사하다고는 하나 배추 유전자는 약 41,173개로 추정되고 있으며, 대부분의 유전자들이 family 형태로 존재하면서 배추 특이적으로 발현하는 유전자의 기능이 다를 것으로 추정된다(Jung et al. 2014). 따라서 배추 유전자들에 대한 형질전환 집단 구축 및 특성 평가와 유전자 기능 연구가 지속적으로 필요하다.

고염 스트레스는 식물의 생장과 발달을 저해하는 환경 스트레스 중 하나로 건조한 토양에서 과다한 염도는 식물에 스트레스로 작용하여 생육과 생장을 저해하고 생산성을 감소 시킨다(Zhu 2001). 본 연구에서는 배추 유전체 연구의 일환으로 축적된 배추 EST (Expressed sequence tags)로부터 full-length이면서 기능 미확인 유전자 또는 전사인자군(transcription factors)을 과발현시켜 제작된 형질전환 애기장대 집단을 활용하여 내염성 유전자를 선발하였다. 애기장대에서 선발된 유전자를 유체에 형질전환하여 내염성을 나타내는 것을 확인 하였으며 고염의 환경 스트레스에 대한 농업적 형질을 개선하기 위한 유전자로 이용될 수 있다는 것을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

배추 완전장 유전자 식물형질전환 벡터 제작

배추의 생장발달 단계별 또는 스트레스 처리된 시료를 이용하여 제작된 cDNA library에서 구축된 EST 정보로부터 완전장의 ORF를 포함하고 조직 또는 스트레스 특이적 발현을 나타내지만 애기장대 유전자들과 상동성이 낮은 약 300개 유전자들을

선발하였다. 애기장대에 형질전환을 위해서 선발된 유전자들은 제조제 Phosphinothricin (ppt) 분해 유전자 Phosphinothricin N-acetyltransferase (*bar*-ppt resistance) 부위를 포함하는 식물 형질전환 벡터 pB2GW7 벡터에 클로닝 되었고 CaMV 35S 프로모터와 35S 터미널(35S-ter) 사이에 융합하여 발현이 되도록 제작하였다. 또한 애기장대에서 내염성 기능이 확인된 유전자를 유체에 형질전환하기 위하여 하이그로마이신 저항성 유전자를 포함하는 pMDC32와 pH2GW7 벡터에 각각 CaMV 35S 프로모터와 *nopaline synthase* 터미널(*nos*-ter) 및 35S 터미널(35S-ter) 사이에 융합하여 벡터를 제작하였다. 제작된 벡터들은 freeze thaw 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 도입하여 애기장대 및 유체 형질전환에 사용하였다.

애기장대 형질전환 및 형질전환체 선발애기장대 형질전환은 애기장대 Col-0 (*Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0)를 파종 후 4°C에서 2일간 암 처리한 후, 23°C 장일조건(낮 16시간 /밤 8시간)인 생장상에서 약 4주간 생육시켰다. 4주된 애기장대 식물체의 일차 추대를 제거한 후 최소한 10 cm의 3-4개의 이차 추대를 유도하였다. *Agrobacterium* GV3101를 항생제가 포함된 50 ml의 LB배지에서 28°C에서 200 rpm으로 2일간 배양한 후 5% sucrose와 0.05% silwet L-77이 함유된 용액에 O.D 0.8 정도로 희석하여 현탁액을 제조하였다. 제조한 현탁액을 애기장대 꽃봉오리에 분사한 후 충분한 습도와 암 조건을 유지한 상태로 24시간 배양한 다음 23°C, 장일조건의 생장상에서 3-4일 더 배양시키고 동일한 방법으로 2회 형질전환을 반복하였다(Hong et al. 2012). 이 후, 23°C, 장일조건의 생장상에서 꼬투리(silique)가 갈색으로 완전히 성숙할 때까지 약 4-6주간 생육시킨 후 종자를 수확하였다. 수확된 종자를 파종하여 생육 2주째 1차, 4주째 2차로 0.3% 바스타를 살포하여 형질전환체를 선발하여 같은 조건으로 생육시킨 후 후대종자를 확보하였다. 형질전환체의 세대 진전을 위해 종자를 ppt 25 mg/L이 포함된 MS 기본 배지에 40개씩 파종하여 멘델의 유전 법칙에 의한 분리비가 약 3(저항성): 1 (감수성)로 나타나는 식물체를 선발하여 후대 육성을 한 후 실험에 사용하였다.

유체 형질전환체 제작 및 세대 육성

유체 형질전환은 아그로박테리움을 이용한 Hong et al. (2013)의 방법과 유사하게 하였다. 유체는 영산 품종을 본 실험에 사용하였다. 유체 종자를 MS 기본 배지에 파종하여 25°C 배양실에서 6-7일 발아시킨 후 하배축을 0.5 cm 크기로 절단하여 전배양 배지(MS basal medium, 1 mg/L NAA, 2 mg/L BA, 2 mg/L

AgNO₃, 3% sucrose, and 0.9% plant agar)에서 2일 동안 배양시켰다. 전배양된 하배축 조직을 아그로박테리움과 25°C, 암 상태에서 공동배양 배지(MS basal medium, 1 mg/L NAA, 2 mg/L BA, 2 mg/L AgNO₃, 100 μ M acetosyringone, 3% sucrose, and 0.9% plant agar)에서 3일 동안 공동 배양하였다. 공동배양한 하배축을 100 mg/L carbenicillin, 250 mg/L cefotaxime이 첨가된 멸균수로 5-6번 세척하여 아그로박테리움을 제거한 후 선발배지(MS basal medium, 1 mg/L NAA, 2 mg/L BA, 2 mg/L AgNO₃, 3% sucrose, 15 mg/L hygromycin, 100 mg/L carbenicillin, 250 mg/L cefotaxime, and 0.9% plant agar)에 치상하였다. 신초가 형성될 때까지 새로운 선발배지에서 2-3주 간격으로 계대배양하였다. 재분화되어 나온 신초를 식물 생장조절제가 포함되어 있지 않은 MS 배지로 옮겨 뿌리 형성을 유도하였다. 뿌리가 형성되어 생육이 왕성한 형질전환체를 순화시켜 준화처리(4°C, 30일 처리) 후 온실에서 재배하여 종자를 수확하였다.

형질전환체 유전자 도입 확인 및 발현 분석

Genomic DNA PCR과 RT-PCR을 통해 유전자 삽입 유무와 발현을 각각 확인하였다. 유체 식물체 잎으로부터 genomic DNA를 분리하였다(DNeasy Plant Kit, Qiagen, Hilden, 독일). 분리된 genomic DNA 100 ng을 사용하여 유전자 특이 프라이머를 이용한 PCR (95°C에서 3분, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 45초, 35 사이클, 72°C 10분)로 식물체내 유전자 도입을 확인하였다(Table 1). 형질전환체에 도입된 유전자 발현을 확인하기 위하여 형질전환 식물체의 잎으로부터 Hong et al. (2017, 2018)방법과 유사하게 total RNA를 분리하였다. Semi-quantitative RT-PCR 분석을 위해 역전사 효소(MMLV transcriptase RNase free, Toyobo, Toyobo, Osaka, 일본)를 이용하여 total RNA 5 μ g을 cDNA 라이브러리로 제작하고 3배 희석하여 2 μ l를 PCR 증폭에 사용하였다(Table 1). 유전자 특이 프라이머를 이용하여 PCR (95°C에서 3분, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 45초, 25 사이클, 72°C 10분)로 유전자 발현을 확인하였고

Table 1. Oligonucleotide primers used in RT-PCR.

Target	Acc. no.	Primer sequences	Expected size (bp)
<i>ABI1</i>	At4g26080	5'-ATGGAGGAAGTATCTCCGGCGATCG-3' 5'-ATCGCCAATGGATCTCGACATGGCG-3'	951
<i>DREB2A</i>	At5g05410	5'-ATGGCAGTTTATGATCAGAGTGGAG-3' 5'-CCTGTATGAACCGTTGGCAACACTG-3'	879
<i>FRY</i>	At5g63980	5'-ATGGCTTACGAGAAAGAGCTTGATG-3' 5'-ACTATAGCACCAGCGACATGGTCC-3'	884
<i>HKT1</i>	At4g10310	5'-CGCTGTGACGTTGAGACTGTTACTG-3' 5'-CCATATGCACTGATAACTTCGAGAG-3'	916
<i>SOS1</i>	At2g01980	5'-ATGACGACTGTAATCGACGCGACG-3' 5'-ACGCCAGACCAATGCCTACAGCTCC-3'	727 613
<i>BnABI1</i>	XM_013885981	5'-ATGGAGGAAGTATCACCAGCCGTTG-3' 5'-ACGTGTCACCATCGCAGAGCATCGGC-3'	598
<i>BnDREB2A</i>	XM_013863571	5'-ATGGCGGTTTATGACCATAGCGGAG-3' 5'-ACTCGCTCAGCCAATCACTGCTTGG-3'	528
<i>BnFRY</i>	XM_013787640	5'-ATGTCATCTATAAATTGCTTTTGAAC-3' 5'-ACCTTCAGATGTGCCACAGTCGATG-3'	505
<i>BnSOS1</i>	ACA50526	5'-TGGCGACTGTAATCGACGCGCGATG-3' 5'-ACAGGATCTGTGGCACTTAAGAGTCC-3'	864
<i>BrATL30</i>	XM_009103253	5'-ATGCCGATAACGAAACCGCTCGGATC-3' 5'-TTAACTTTGGGATTCCGGTACAAGTG-3'	954
<i>BrZHD10</i>	XM_009141674	5'-ATGGATATGGCGACTCATACAACAA-3' 5'-TCACGACGACGACGACCCGTTTACG-3'	1220
<i>AtActin</i>	At3g18780	5'-ATGGCTGAGGCTGATGATATTCAA-3' 5'-TTAGAAACATTTTCTGTGAACGATT-3'	516
<i>Bactin</i>		5'-TGGCATCACACTTTTCTACAA-3' 5'-CAACGGAATCTCTCAGCTCC-3'	961
<i>HPT</i>		5'-AGCCTGAACCTACCGCGACGTCTGTCGAGAAGTTTC-3' 5'-TCTACACAGCCATCGTCCAGACGCGCGCTTCTG-3'	
<i>Gw-S</i>		5'-ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT-3' 5'-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'	

DNA 염기서열 분석을 통해 도입된 유전자의 발현을 최종 확인하였다. 내재 유전자 *Bactin*의 유전자 발현 수준은 정량적 대조군으로 사용되었으며 모든 실험은 3반복으로 수행하였다(Yao et al. 2005, Hong et al. 2010).

형질전환 애기장대 및 유채 내염성 분석

고염 스트레스에 저항성을 보이는 형질전환 애기장대를 선발하기 위하여 125 mM NaCl이 포함된 1/2MS 기본 배지에 종자를 파종 후 15일 동안 배양하여 발아 및 성장 속도를 관찰하였다. 뿌리 길이 성장 측정은 비형질전환체와 형질전환체 종자를 1/2MS 기본 배지에 파종 후 2일째 125 mM NaCl이 포함된 1/2MS 기본 배지에 이식 후 12일간 수직으로 배양하여 주근의 길이를 측정하였다. 또한 토양에서 고염 스트레스 내성을 측정하기 위하여 토양에서 14일 동안 생장시킨 형질전환 애기장대에 0, 150, 200 mM NaCl을 2일 간격으로 5번 공급 한 후 10일 뒤에 애기장대의 생존율을 측정하였다.

고염 스트레스에 대한 유채 형질전환체의 내염성을 분석하기 위하여 Song et al. (2014)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 비형질전환 및 T₁ 형질전환 유채 종자를 원예용 상토에 파종한 후 20일 정도 성장하여 본엽이 4-5장 되었을 때 300 mM NaCl을 2일 간격으로 3번 처리하고 350 mM NaCl을 2일 간격으로 2번 처리한 후 10일 뒤에 생존율을 조사하고 내염성을 검정하였다.

내염성 관련 유전자 발현 분석형질전환 식물체에서 내염성 관련 유전자들의 발현 수준을 확인하기 위하여 형질전환 식물체의 잎으로부터 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국)을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 유전자 특이 프라이머들을 사용하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다(Table 1). Semi-quantitative RT-PCR 결과로부터 Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, 미국; Hong et al. 2018)과 GelQuant.NET (<http://biochemlabsolutions.com/GelQuantNET.html>)을 이용하여 상대적 발현 수준을 측정하였으며 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.

결과 및 고찰

배추 완전장 유전자 애기장대 형질전환 및 내염성 분석

건조한 토양에서의 고염 스트레스는 식물체의 성장을 저해하고 생산성을 감소 시키기 때문에 이러한 환경 재해에서 생장이 원활 할 수 있는 내염성 작물을 개발하는 연구가 진행 중이다

(Vallejo et al. 2010, Baek et al. 2014). 따라서 본 연구에서는 배추 조직(꽃, 화분, 뿌리, 켈러스) 및 생장발달 단계, 염과 저온 스트레스 처리 후에 발현되는 EST 정보로부터 약 300개의 완전장 유전자를 선별하여 독립적으로 과발현시켜 제작한 형질전환 애기장대 집단을 활용하여 내염성 기능을 갖는 고염 유전자를 선별하고자 하였다. 유전자 발현이 안정적으로 유지되는 계통 선별을 위해서 T₁ 종자를 ppt 25 mg/L에서 발아시켜 제초제 저항성과 감수성을 조사하여 비율이 3:1로 나타나는 157개 유전자가 도입된 651 형질전환 계통을 최종적으로 선별하였다. 이들 계통으로부터 확보한 종자를 고염(125 mM NaCl)이 포함된 배지에 키워 비형질전환체 보다 백화현상이 낮고 생장이 좋은 독립된 T₂ 세대 12계통을 선별하였다. 이렇게 선별된 T₂ 세대 식물체에서 벡터 특이 프라이머를 이용해 genomic DNA PCR로 유전자를 분리하고 염기서열을 다시 분석하여 Brassica database (BRAD, <http://brassicadb.org/brad/index.php>)에서 확인 후 최종적으로 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 유전자 정보를 재확인하였다(Table 2). 이들 중에서 기능이 잘 알려져 있지 않은 Bra025008 (*BrATL30*, *B. rapa* RING-H2 finger protein *ATL30*)과 Bra025644 (*BrZHD10*, *B. rapa* zinc-finger homeodomain protein 10) 유전자를 각각 포함하는 B267과 B288 계통의 T₂ 종자를 파종하여 100% 제초제 저항성을 나타내는 형질전환체를 T₃ 세대까지 진전시켜 호모계통을 육성하여 고염 스트레스 저항성 특성을 분석하였다.

내염성 식물체를 선별하는 대표적인 방법은 고염 스트레스에서 유묘 생장과 뿌리 발달 분석을 하는 것으로 알려져 있다(Zhu et al. 1998). 선별된 애기장대 형질전환체의 유묘 생장이 고염 스트레스에 대한 저항성을 나타내는지 확인하기 위하여 125 mM NaCl이 포함된 배지에서 종자를 발아시켜 생존율을 조사하였다(Fig. 1A, 1B). 그 결과 비형질전환체는 대부분 종자 발아 초기에 백화현상이 나타나며 생존율이 10% 미만으로 나타났으나 형질전환체 B267과 B288의 생존율은 각각 평균 74, 65%로 비형질전환체보다 각각 약 64%, 55% 높은 생존율을 보였다(Fig. 1C, 1D). 또한 선별된 B267과 B288 애기장대 형질전환체 종자를 기본배지에 발아 후 2일 째 125 mM NaCl 배지로 옮겨 뿌리 길이 성장을 12일 동안 측정한 결과 비형질전환체는 백화현상이 발생하며 뿌리 생장이 저해 받은 것에 비해서 형질전환체는 백화현상이 발생하지 않으며 뿌리가 거의 정상적으로 성장하였다(Fig. 2A, 2B). 유묘 생장발달 동안 주근(Primary root)의 길이를 측정한 결과 비형질전환체에서는 주근 생장이 억제 받고 길이가 짧아졌으나 B267과 B288 애기장대 형질전환체 주근은

Table 2. Selection of salt-tolerance lines from 157 full-length *B. rapa* cDNAs-OX transgenic *Arabidopsis* plants.

Plant line name	Chlorotic seedlings (%)	<i>B. rapa</i> gene ID	NCBI acc. no.	Gene name
Wt (Col-0)	100			
B156	67.2	Bra017664	XM_009140057	<i>B. rapa</i> bZIP transcription factor 11
B158	61.5	Bra000453	XM_009135568	<i>B. rapa</i> transcription factor MYB12
B161	73.4	Bra010808	XM_009111387	<i>B. rapa</i> seipin-2
B162	78.9	Bra039748	XM_009129217	<i>B. rapa</i> translation initiation 3 subunit J
B222	44.9	Bra035792	XM_009147396	<i>B. rapa</i> ethylene-responsive transcription factor 7
B223	41.7	Bra009112	XM_033281883	<i>B. rapa</i> dehydration-responsive element-binding protein 2A
B227	73.1	Bra022770	XM_033288507	<i>B. rapa</i> dehydration-responsive element-binding protein 1B
B236	59.1	Bra035137	XM_009108486	<i>B. rapa</i> 3-isopropylmalate dehydrogenase
B267	59.5	Bra025008	XM_009103253	<i>B. rapa</i> RING-H2 finger protein ATL30
B282	39.4	Bra002441	XM_033282376	<i>B. rapa</i> E3 ubiquitin-protein ligase RZFP34
B288	54.5	Bra025644	XM_009141674	<i>B. rapa</i> zinc-finger homeodomain protein 10
B299	50.9	Bra026210	XM_009150581	<i>B. rapa</i> PHD finger protein ALFIN-LIKE 7

Fig. 1. Salt stress tolerance phenotypes of transgenic *Arabidopsis* B267 and B288 lines. (A) and (B) B267 and B288 transgenic line seeds were germinated on 1/2MS agar medium with 125 mM NaCl, respectively. Photographs were taken after 15 days. (C) and (D) The survival rate of B267 and B288 transgenic lines (100 plants per line) are shown for experiment (A) and (B), respectively. Bars represent the means±standard error of three replicates. Asterisks represent significant differences from the untransformed wild-type (**; p -value <0.01, Student's t -test). Wt, untransformed wild-type plants; lanes #1-#3, selected transgenic lines, respectively.

정상적으로 성장하였다(Fig. 2C, 2D). 또한 주근으로부터 발생한 측근의 수는 비형질전환체에서 1.2개로 급격하게 감소하였으나 형질전환체는 4-5개로 정상적으로 발생하였다(Fig. 2A, 2B).

Fig. 2. Comparison of seedling growth in transgenic *Arabidopsis* B267 and B288 lines under salt stress conditions. (A) and (B) B267 and B288 transgenic lines germinated on 1/2MS agar medium for 2 days, and then transferred onto 1/2MS agar medium with 125 mM NaCl. Plants were incubated vertically and photographed after 12 days, respectively. (C) and (D) Time course of primary root elongation in days after germination for B267 and B288 transgenic lines (100 plants per line) on 1/2MS plates with 125 mM NaCl supplement, respectively. Similar primary root elongation kinetics were obtained from three independent experiments. Bars represent the means±standard error of three replicates. Asterisks represent significant differences from the untransformed wild-type (*; $0.01 < p$ -value <0.05, **; p -value <0.01, Student's t -test). Wt, untransformed wild-type plants; lanes #1-#3, selected transgenic lines, respectively.

토양에서 애기장대 형질전환체의 내염성을 분석하기 위해 원예용 상토에 14일 성장한 형질전환 애기장대에 0 mM, 150 mM, 200 mM NaCl을 2일 간격으로 5번 공급 한 후 10일 뒤에 생존율을 조사하였다. 그 결과 200 mM NaCl에서는 비형질전환체와

큰 차이 없이 생존율이 낮았으나 150 mM NaCl에서는 생존율이 비형질전환체가 약 22%이며 B267과 B288 애기장대 형질전환체의 생존율은 각각 평균 74%, 89%로 비형질전환체보다 각각 약 52%, 67%로 더 높은 생존율을 나타냈다(Fig. 3A-3D). 이러한 결과들로부터 애기장대 형질전환체는 *BrATL30*과 *BrZHD10* 유전자 도입에 의해 고염 스트레스에 대한 내성이 증가한 것으로 보인다.

토양에서 높은 농도의 염은 건조한 환경의 토양에서 더 큰 스트레스로 상승하여 식물의 성장과 발달을 저해하여 생산성을 감소시키는 중요한 환경 스트레스 이다(Parvaiz & Satyawati 2008). 식물체가 고염에 노출되면 삼투압 반응에 의한 급격한 수분 포텐셜의 변화로 수분이 흡수되는 방해와 세포 내 나트륨 농도 증가로 인해 이온 독성의 증가로 성장과 발육이 저해된다(Yun 2005, Jiang et al. 2007, Munns & Tester 2008). 이러한 환경 스트레스에 생육이 가능한 식물과 작물의 기능을 개선하기 위하여 내염성 식물에서 고염 스트레스 저항성 유전자를 발굴하여 활용하는 연구들이 진행 되었다. 특히 내염 식물과 비내염 식물체의 유전체 비교 분석을 통해 환경 스트레스에 특이적 발현을 나타내는 유전자들을 확인 하였다(Dassanayake et al. 2013). 또한 유전자 집단을 식물체나 작물에 과발현 시키거나

결론 시켜 고염 스트레스에 대한 민감도나 내성을 가지는 계통을 선별하여 내염성 유전자를 발굴 하였고 이러한 방법을 통해 *SOS* (*SALT OVERLY SENSITIVE*)가 고염 스트레스 내성에 관여하는 기능을 가진 유전자로 밝혀졌다(Zhu 2001). Baek et al. (2014)은 모델식물 애기장대와 유사한 염생 식물인 salt cress의 완전장 cDNA 집단을 포함하는 식물 형질전환용 벡터를 제작하여 애기장대에 도입하였고 고염 스트레스 조건하에서 내성을 가지는 형질전환체로부터 해당 유용유전자를 확보하였다. 본 연구에서는 배추 완전장 유전자를 과발현시킨 애기장대 집단에 염 처리를 하여 고염 스트레스에서 생장이 우수한 계통을 선별하였으며, 그 결과 *BrATL30*과 *BrZHD10* 유전자는 고염 스트레스에서 성장, 생육, 뿌리 발달이 저해 받지 않은 내염성의 특성을 가지는 유용 유전자로 예측된다.

애기장대 형질전환체 내염성 관련 유전자 발현 분석

고염의 환경에서 식물체나 작물은 NaCl에 의해 유발되는 보상 기작의 활성화로 세포 내 증가된 이온의 독성을 해독하고 삼투압 현상에 의한 수분포텐셜의 급격한 변화를 억제함으로써 항상성을 유지하여 생존하는데 이러한 환경에서 항상성을 조절하지 못한 식물체는 세포 사멸이 유도되어 생존할 수 없게 된다(Jinag et al. 2007, Munns & Tester 2008). 지금까지 보고된 경우를 보면, 고염 스트레스에 내성을 나타내는 유전자들은 NaCl에 대한 반응과 내성에서 이온 교환이나 신호전달 구성요소에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌다(Munns & Tester 2008). 또한 환경 스트레스에서 성장과 생존을 촉진하는 보상 메커니즘에 관여하는 전사조절 유전자들이 고염 스트레스 내성에 관여하는 것으로 보고되었다(Nakashima et al. 2000, Qiu et al. 2004, He et al. 2005).

따라서 선별된 애기장대 형질전환체에서 이온 변화나 환경 스트레스에 관련된 유전자들의 발현 조절을 통해 고염 스트레스 내성에 영향을 주었을 것으로 예상되어 이들 유전자들의 특이 프라이머를 제작하여 발현 양상을 조사하였다. T₃ 세대 애기장대 형질전환체에서 *BrATL30*과 *BrZHD10* 유전자가 과발현되는 것을 확인할 수 있었으며 도입된 유전자 모두 안정적으로 삽입되어 유전되었다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4A, 4B). *BrALT30* 과발현 애기장대에서 *SOS1* (Salt overly sensitive1), *HKT1* (High-affinity K⁺ transporter 1), *ABII* (Absciscic acid-insensitive1), *FRY1* (Fiery1), *DREB2A* (Dehydration-responsive element-binding protein 2A) 유전자들은 비형질전환체보다 발현량이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 그러나 *BrZHD10* 과발현 애기장대

Fig. 3. Salt stress tolerance phenotypes of transgenic *Arabidopsis* B267 and B288 lines in soil. (A) and (B) Fourteen-day-old soil-grown transgenic plants of B267 and B288 lines were irrigated with water (0 mM) or 150 mM NaCl or 200 mM NaCl at 2-day intervals for 5 times, respectively. Pictures were taken 10 days after the treatment. (C) and (D) The survival rate of transgenic *Arabidopsis* B267 and B288 lines (100 plants per line) is shown for experiment (A) and (B), respectively. Bars represent the means ± standard error of three replicates. Asterisks represent significant differences from the untransformed wild-type (**; *p*-value < 0.01, Student's *t*-test). Wt, untransformed wild-type plants; lanes #1-#3, selected transgenic lines, respectively.

에서는 환경 스트레스 관련 *DREB2A* 유전자의 발현은 증가하였으나 이온 항상성 관련 *HKT1* 유전자 발현은 반대로 감소하였으며 다른 유전자들의 발현은 확인 할 수 없었다(Fig. 4B).

SOS 유전자는 고염 스트레스에서 세포 내부의 나트륨 증가로 이온 농도가 높아지면 발생하는 독성을 제거하기 위해 다양한 인자들을 활성화 시켜 염에 대한 저항성을 강화 한다(Bahmani et al. 2015). 실제 *SOS*가 결실된 돌연변이체에서는 염 스트레스에 대한 감수성이 증가 하였고 과발현 애기장대에서는 염 저항성이 증가하는 결과를 보고 하였다(Liu et al. 2000, Shi et al. 2002, Yang et al. 2009). *HKT1* 유전자 또한 세포내 나트륨의 농도를 조절하여 염에 대한 저항성을 증가 시키는 역할을 수행한다고 보고되었다(Rus et al. 2001, 2006, Xiong & Zhu 2002). *FRY1* 유전자는 저온, 염, 건조, ABA에 반응하여 발현이 유도되며 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시킨다고 보고 되었다(Quintero et al. 1996, Xiong et al. 2001). *ABI1*은 식물 스트레스

호르몬 ABA생합성 경로에 관련 유전자로 염 스트레스에서 나트륨 이온의 확산을 감소시키는 장벽의 역할을 담당하는 세포내 ABA 증가를 유도하는 것으로 알려져 있다(Leung et al. 1994, Bartels & Sunkar 2005, Duan et al. 2013). 전사조절인자인 *DREB* 유전자계는 NaCl 저항성을 포함한 비생물학적 스트레스에서 중요한 역할을 담당한다(Lata & Prasad 2011). Sakuma et al. (2006)은 *DREB2A* 유전자가 건조, 열 충격, 고염에 의해 발현이 증가되고 과발현된 애기장대에서 다양한 환경스트레스 관련 유전자들의 발현 증가를 통해 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 것으로 보고하였다.

이러한 사실에 미루어 볼 때 애기장대 형질전환체에 도입된 *BrALT30* 유전자는 기존 연구와 유사하게 이온 항상성 및 환경 스트레스 관련 유전자들의 발현을 증가시킴으로써 고염 스트레스에 대한 저항성 증가를 유도하는 것으로 예상할 수 있다. 그러나 배추 *BrZHD10* 유전자는 애기장대에서 환경 스트레스 관련

Fig. 4. Expression patterns of salt and environment stress tolerance genes in transgenic *Arabidopsis* B267 (A) and B288 (B) lines. Bars represent the means±standard error of three replicates. Asterisks represent significant differences from the untransformed wild-type (*; $0.01 < p\text{-value} < 0.05$, **; $p\text{-value} < 0.01$, Student's t-test). Wt, untransformed wild-type plants; lanes #1-#3, selected transgenic lines, respectively. *BrATL30*; *B. rapa* RING-H2 FINGER PROTEIN ATL30, *BrZHD10*; *B. rapa* ZINC-FINGER HOMEODOMAIN PROTEIN 10, *ABI1*; ABSCISIC ACID-SENSITIVE1, *DREB2A*; DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2A, *FRY1*; FIERY1, *HKT1*; HIGH-AFFINITY K^+ TRANSPORTER1, *SOS1*; SALT OVERLY SENSITIVE11.

경로를 통한 유전자의 발현을 조절함으로써 고염 스트레스에서 저항성을 나타낸 것으로 추측되며 *BrALT30* 유전자와는 반대로 이온 항상성 관련 경로에서는 감수성에 관련된 유전자로 예측된다.

유채 형질전환체 내염성 분석 및 유전자 발현 분석

애기장대에서 내염성 증대에 효과가 있다고 확인된 *BrATL30* 과 *BrZHD10* 유전자를 유채에 형질전환 하여 고염 스트레스에 대해 내성을 가지는 내염성 유채 작물 개발에 활용하고자 하였다. T₀ 유채 형질전환체를 독립적인 계통으로 *BrATL30*는 9 계통, *BrZHD10*는 19 계통을 확보하여 종자를 수확하였다(Fig. 5A, 5B). 수확한 종자를 하이그로마이신 30 mg/L에서 발아시켜 항생제 저항성과 감수성이 3:1 비율로 나타내면서 고염 스트레스 내성을 보이는 계통들에서 *BrATL30*는 3 계통, *BrZHD10*는 3 계통을 선발하였다. T₁ 식물체에서 각 유전자의 특이 프라이머를 이용한 semi-quantitative RT-PCR을 수행한 결과 *BrATL30*과

BrZHD10 유전자가 과발현 됨을 최종 확인하였다(Fig. 5C-5F).

고염농도의 토양에서 *BrATL30*과 *BrZHD10* 형질전환 유채의 내염성 검정을 분석하기 위해 300 mM NaCl과 350 mM NaCl을 순차적으로 처리하여 생존율을 비교하였다. 그 결과 비형질전환체의 생존율은 약 21% 이하였으나 *BrATL30*과 *BrZHD10* 형질전환 유채의 평균 생존율은 85%, 70%로 각각 약 64%, 49% 더 높게 나타났다(Fig. 6E, 6F). 고염을 처리한 토양에서 성장한 형질전환체와 비형질전환체의 잎 조직의 성장을 비교한 결과 비형질전환체의 잎은 고염에 의해 심한 성장 저해를 받고 있으나 형질전환체의 잎은 모두 정상적으로 성장하였다(Fig. 6C, 6D). 또한 고염의 토양에서 비형질전환체 주근의 길이 성장과 측근 발생이 모두 감소하였으나 형질전환체는 주근의 길이 성장과 측근 발생이 모두 정상적으로 발생하였다. 이 결과들로부터 *BrATL30*과 *BrZHD10* 과발현 애기장대 형질전환체와 유사하게 형질전환 유채 또한 고염 스트레스에 대한 내성이 증가하였으며

Fig. 5. The expression of *BrATL30* and *BrZHD10* in transgenic *B. napus* plants. (A) and (B) Structure of the 35S-Pro::BrATL30 and 35S-Pro::BrZHD10 constructs for expression in *B. napus*, respectively. (C) and (D) Genomic DNA PCR analysis of *BrATL30*-OX and *BrZHD10*-OX transgenic *B. napus* plants respectively. The presence of *BrATL30*, *BrZHD10*, and *hpt* transgenes was verified by PCR amplification using specific primers. (E) and (F) Semi-quantitative RT-PCR for *BrATL30* and *BrZHD10* genes in transgenic *B. napus* plants (upper panel), respectively. Relative expression level of *BrATL30* and *BrZHD10* transgene (lower panel), respectively. *Bactin* gene expression level was used as a quantitative control. Bars represent the means±standard error of three replicates. Asterisks represent significant differences from the untransformed wild-type (*; 0.01 < *p*-value < 0.05, **; *p*-value < 0.01, Student's *t*-test). Lanes: M, molecular size marker; Wt, untransformed wild-type plants; lanes #1-#6, selected transgenic lines, respectively.

있고 뿌리 생장이 저해를 받지 않는다는 것을 확인 할 수 있었다.

내염성 형질을 나타낸 *BrATL30*과 *BrZHD10* 형질전환 유채에서 이 유전자들이 과발현된 형질전환 애기장대와 유사하게 이온 변화나 환경 스트레스 관련 유전자들의 발현이 내염성 증대에 영향을 주었는지 조사하였다. 본 연구에서 사용된 애기장대 내염성 관련 유전자들과 가장 높은 상동성을 나타내는 유전자들을 유채 유전체 정보 및 NCBI database에서 선발한 후 특이 프라이머를 제작하여 형질전환 유채에서 RT-PCR을 수행하였다(Table 1). *BrATL30* 유전자가 도입된 형질전환 유채에서 *BnABI1*, *BnFRY1*, *BnDREB2A*, *BnSOS1* 유전자들은 애기장대 형질전환체와 유사하게 비형질전환체보다 발현량이 현저히 증가한 것을

확인 할 수 있었다(Fig. 4A, Fig. 7A). *BrZHD10* 유전자는 애기장대 형질전환체와는 다르게 형질전환 유채에서 *DREB2A*뿐만 아니라 *ABI1*, *FRY1*, *SOS1* 유전자들의 발현도 증가시켰다(Fig. 4B, Fig. 7B). 그러나 애기장대 형질전환체에서 도입된 유전자에 따라 특이적 발현을 나타낸 *HTK1* 유전자는 유채에서는 발현의 변화를 확인 할 수 없었다(data not shown). 이러한 결과는 *BrATL30* 유전자는 식물의 종류에 상관없이 유사하게 내염성 및 환경 스트레스 관련 유전자들의 발현을 조절하고 *BrZHD10* 유전자는 식물체나 작물의 종류에 따라 다른 경로로 관련 유전자들의 발현을 조절함으로써 고염 스트레스 내성을 나타내는 것으로 예측 된다.

Fig. 6. Tolerance of transgenic *B. napus* to salt during the vegetative stage. (A) and (B) 20-day-old soil grown of *BrATL30*-OX and *BrZHD10*-OX transgenic *B. napus* were irrigated with 300 mM NaCl at 2-day intervals for 3 times and then were irrigated with 350 mM NaCl at 2-day intervals for 2 times, respectively. Pictures were taken 10 days after the treatment. (C) and (D) Leaf and root growth of *BrATL30*-OX and *BrZHD10*-OX transgenic *B. napus* plants are shown for experiment (A) and (B), respectively. (E) and (F) The survival rates of *BrATL30*-OX and *BrZHD10*-OX transgenic *B. napus* (90 plants per line) are shown for experiment (A) and (B), respectively. Bars represent the means±standard error of three replicates. Asterisks represent significant differences from the untransformed wild-type (**; p -value < 0.01, Student's t -test). Wt, untransformed wild-type plants; lanes #1-#6, selected transgenic lines, respectively.

Fig. 7. Expression patterns of salt and environment stress tolerance genes in transgenic *B. napus* transformed with *BrATL30* (A) and *BrZHD10* (B). Bars represent the means±standard error of three replicates. Asterisks represent significant differences from the untransformed wild-type (*; 0.01 < *p*-value < 0.05, **; *p*-value < 0.01, Student's *t*-test). Wt, untransformed wild-type plants; Wt+S, untransformed wild-type plants with 300 mM NaCl treatment for 2 days; lanes #1-#3, selected transgenic lines, respectively. *ABI1*; *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE1*, *DREB2A*; *DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2A*, *FRY1*; *FIERY1*, *SOS1*; *SALT OVERLY SENSITIVE1*.

지금까지 보고된 경우를 보면, 다양한 식물체에서 다유전자군 (multi-gene family)으로 존재하는 RING-H2 finger 유전자 *ATL* (*Arabidopsis Toxicos en Levadura*)는 환경스트레스에서 식물이 적응하는데 중요하게 작용하는 전사조절인자로 알려져 있다 (Guzmán 2012, Jiménez López et al. 2018, Song et al. 2018). 특히 애기장대 *AthATL56* ortholog인 카사바 *MeRZF* (*Manihot esculenta* RING zinc finger)는 염 스트레스에서 유전자 발현이 증가하는 것으로 나타났다 (dos Reis et al. 2012). 콩 대두의 *ATL* 유전자 *GmRFP1* (*Glycine max* RING-finger protein 1)은

스트레스와 ABA 신호에서 중요한 역할을 담당하는 유전자로 보고되었다 (Du et al. 2010). 최근 Song et al. (2016)은 건조, 염, 삼투압 등의 스트레스에 의해 발현이 강하게 조절 받는 *ShATL78L* (*Solanum habrochaites* *ATL78-like*) 유전자가 과발현된 토마토가 저온, 건조, 산화적 스트레스 (oxidative stress)에 대한 내성을 나타냈다고 보고하였다. 이러한 내성은 다양한 환경 스트레스에 반응하는 RAV2 (Related to ABI3/VP1 2) 전사조절 인자가 *ShATL78L* promoter에 결합하여 유전자 발현을 유도하고, Ca^{2+} 채널의 활성을 조절하는 CSN5B (COP9 signalosome complex subunit 5b)와 *ShATL78L*의 상호작용에 의해 유도된 것으로 확인되었다. Zinc finger-homeodomain (ZHD)은 homeodomain (HD)과 C2H2-type zinc finger motif로 구성된 단백질로 식물의 성장, 발달, 스트레스 반응에서 중요한 역할을 담당하는 식물 특이적 전사조절인자로 *C4* 식물 *Flaveria*에서 유전자군이 처음 보고되었으며 이 후 다양한 식물체에서 유전자군이 밝혀졌다 (Windhovel et al. 2001, Wang et al. 2014). Tran et al. (2007)은 염, 과도한 증산작용 (high transpiration), ABA에 의해 발현이 유도되는 애기장대 *AtZHD1*와 스트레스 관련 *NAC* (*NAM/ATAF1*, *2/CUC2*) 유전자가 동시에 과발현된 애기장대에서 가뭄 스트레스에 대한 내성이 증가한 것을 보고 하였다. 또한 이 형질전환체에서 *AtZHD1*과 *NAC*의 상호작용은 가뭄 스트레스 관련 *ERD1* (*EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION STRESS 1*) 유전자의 발현을 증가시키는데 전사활성인자 *AtZHD1*이 *ERD1* promoter에 특이적으로 결합하는 것으로 보고되었다 (Tran et al. 2007, Wang et al. 2014). 토마토 *ZHD* 유전자 대부분은 염 스트레스에 반응을 나타냈고, 후추 (*Capsicum annuum* L.) *CaZHD6*, *CaZHD7*, *CaZHD3*, *CaZHD8*은 고온, 건조, 염, 저온 스트레스에서 유전자 발현이 유도된 것으로 나타났으며, 포도 (*Vitis vinifera* L.) *ZHD* 유전자들도 환경 스트레스에 반응하여 발현이 증가한 것으로 보고되었다 (Wang et al. 2014, Khatun et al. 2017, Hu et al. 2018, Shalmani et al. 2019). 따라서 본 연구에서 선발된 *BrATL30*와 *BrZHD10* 유전자는 중요한 내염성 전사조절인자로서 고염의 스트레스에서 Na^{+} 이온 transporter *SOS1* 유전자의 발현을 증가시켜 세포내 나트륨 농도 조절을 통해 이온 항상성을 유지하는 것으로 예상할 수 있다. 또한 다양한 경로에서 염 저항성 특성을 가진 환경 스트레스 관련 *ABI1*, *DREB2A*, *FRY* 유전자들의 발현 증가를 유도하여 나트륨의 확산을 방지하는 세포내 ABA 농도를 증가시키고 다른 경로의 환경 스트레스 저항성 관련 인자들을 직·간접적으로 활성화 시킴으로써 염 스트레스에 대한 내성을 증대시킨 것으로

추측된다.

본 연구 결과 고염 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 효과를 나타낸 배추 *BrATL30*과 *BrZHD10* 유전자는 환경 스트레스에 적응 가능한 작물의 농업적 형질을 개선할 수 있는 유용 유전자원으로 이용이 가능하다.

적 요

본 연구에서는 배추로부터 분리된 완전장 유전자들을 과발현시켜 제작한 애기장대 형질전환 집단을 활용하여 내염성 유용 유전자를 선발하였다. 125 mM NaCl 조건하에 내성을 나타내는 12종의 유전자 도입 형질전환체를 먼저 선발 하였다. 선발된 형질전환체 중에서 기능이 잘 밝혀져 있지 않은 2종 유전자 (*BrATL30*과 *BrZHD10*)가 도입된 형질전환체 내염성을 분석한 결과, 형질전환체는 대부분 염 스트레스에 대응하여 종자 발아 및 뿌리 신장 모두 비형질전환체에 대비하여 우수한 표현형을 나타냈다. 또한 형질전환체에서 염과 환경 스트레스에 관여하는 유전자들의 발현이 증가하였다. 이러한 결과를 바탕으로 선발된 배추 *BrATL30*과 *BrZHD10* 유전자는 내염성 및 환경 스트레스 관련 유전자를 조절함으로써 형질전환 식물체가 내염성을 가지게 하는데 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 따라서 본 연구 결과로 선발된 유전자들은 생명공학기술을 활용하여 고염 스트레스에 적응하는 농업적 형질을 개선하기 위한 유전자원으로 이용될 수 있을 것이다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 어젠다사업(과제번호: PJ011813)의 지원에 의해 이루어진 것이다. 또한 본 연구는 2020년도 농촌진흥청 국립농업과학원 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것이다.

REFERENCES

1. Anjum NA, Gill SS, Ahmad I, Pacheco M, Duarte MC, Umar S, Khan NA, Pereira ME. 2012. The Plant Family Brassicaceae: An Introduction, pp. 1-33. In: Anjum NA, Ahmad I, Pereira ME, Duarte A, Umar S, Khan NA. (Eds.) The Plant Family Brassicaceae: contribution towards phytoremediation. Springer, Netherlands.
2. Bahmani K, Noori SAS, Darbandi AI, Akbari A. 2015. Molecular mechanisms of plant salinity tolerance: a review. Aust J Crop Sci 9: 321-336.
3. Baek D, Choi W, Kang S, Shin G, Park SJ, Kim C, Park HC, Yun D-J. 2014. Screening of salt-tolerance plants using transgenic Arabidopsis that express a salt stress cDNA library. J Plant Biotechnol 41: 81-88.
4. Bartels D, Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. Crit Rev Plant Sci 24: 1-36.
5. Dassanayake M, Oh D-H, Hass J, Hernandez A, Hong H, Ali S, Yun D-J, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ, Cheeseman JM. 2013. The genome of extremophile crucifer *Thellungiella parvula*. Nat Genet 43: 913-918.
6. Duan L, Dietrich D, Ng CH, Chan PM, Bhalarao R, Bennett MJ, Dinneny JR. 2013. Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in Arabidopsis seedlings. Plant Cell 25: 324-341.
7. dos Reis SP, de Souza Conceicao Tavares L, de Nazaré Monteiro Costa C, Brígida ABS, de Souza CRB. 2012. Molecular cloning and characterization of a novel RING zinc-finger protein gene up-regulated under in vitro salt stress in cassava. Mol Biol Rep 39: 1-7.
8. Du QL, Cui WZ, Zhang CH, Yu DY. 2010. *GmRFP1* encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase in Soybean (*Glycine max*). Mol Biol Rep 37: 685-693.
9. Guzmán P. 2012. The prolific ATL family of RING-H2 ubiquitin ligases. Plant Signaling Behavior 7: 1014-1021.
10. He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY. 2005. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. Plant J 44: 903-916.
11. Hong JK, Kim JA, Kim JS, Lee SI, Koo BS, Lee Y-H. 2012. Overexpression of *Brassica rapa* *SHI-RELATEDSEQUENCE* genes suppresses growth and development in *Arabidopsis thaliana*. Biotechnol Lett 34: 561-566.
12. Hong JK, Kim JS, Kim JA, Lee SI, Lim MH, Park BS, Lee YH. 2010. Identification and characterization of *SHI* family genes from *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. Genes Genom 32: 309-317.
13. Hong JK, Kim S-Y, Kim K-S, Kwon S-J, Kim JS, Kim JA, Lee SI, Lee Y-H. 2013. Overexpression of a *Brassica rapa* MADS-box gene, *BrAGL20*, induces early flowering time phenotypes in *Brassica napus*. Plant Biotechnol Rep 7: 231-237.
14. Hong JK, Oh S-W, Kim JH, Lee SB, Suh EJ, Lee Y-H. 2017. Overexpression of *Brassica rapa* *GROWTH-REGULATING*

- FACTOR* genes in *Arabidopsis thaliana* increases organ growth by enhancing cell proliferation. J Plant Biotech 44: 271-286.
15. Hong JK, Suh EJ, Lee S-B, Yoon H-J, Lee Y-H. 2018. Effects of overexpression of *Brassica rapa* *GROWTH REGULATING FACTOR* genes on *B. napus* organ size. Korean J Breed Sci 50: 378-386.
16. Hu J, Gao Y, Zhao T, Li J, Yao M, Xu X. 2018. Genome-wide identification and expression pattern analysis of zinc-finger homeodomain transcription factors in tomato under abiotic stress. J Amer Soc Hort Sci 143: 14-22.
17. Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Iizumi H, Kuroda H, Kondou Y, Tsuchida Y et al. 2006. The FOX hunting system: An alternative gain-of-function gene hunting technique. Plant J 48: 974-985.
18. Jiang Y, Yang B, Harris NS, Deyholos MK. 2007. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. J Exp Bot 58: 3591-3607.
19. Jiménez-López D, Muñoz-Belman F, González-Prieto JM, Aguilar-Hernández V, Plinio Guzmán P. 2018. Repertoire of plant RING E3 ubiquitin ligases revisited: New groups counting gene families and single genes. PLoS ONE 13: e0203442.
20. Jung HJ, Dong X, Park JI, Thamilarasan SK, Lee SS, Kim YK, Lim YP, Nou IS, Hur Y. 2014. Genome-wide transcriptome analysis of two contrasting *Brassica rapa* doubled haploid lines under cold-stresses using Br135K oligomeric chip. PLoS ONE 9: e106069.
21. Khatun K, Nath JK, Robin AHKR, Park J-I, Lee D-J, Kim M-B, Kim CK, Lim K-B, Nou IS, Chung M-Y. 2017. Genome-wide analysis and expression profiling of zinc finger homeodomain (ZHD) family genes reveals likely roles in organ development and stress responses in tomato. BMC Genomics 18: 165.
22. Lata C, Prasad M. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. J Exp Bot 62: 4731-4748.
23. Lee G-S, Park SH, Yun D-W, Ahn B-O, Kim C-K, Han C-D, Yi G, Park D-S, Eun MY, Yoon U-H. 2010a. Current status of Ac/Ds mediated gene tapping systems for study of rice functional genomics in Korea. J Plant Biotechnol 37: 125-132.
24. Lee I-H, Jung Y-J, Park J-I, Nou-I-S, Kang K-K. 2010b. Systematic approaches to identify functional genes using the FOX-hunting system in Chinese cabbage. J Plant Biotechnol 37: 174-185.
25. Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Chedfor F, Giraudat J. 1994. *Arabidopsis* ABA-response gene ABI1: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. Science 264: 1448-1452.
26. Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim C-S, Zhu J-K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. Proc Natl Acad Sci USA 97: 3730-3734.
27. Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Ann Review Plant Biology 59: 651-681.
28. Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Organization and expression of two *Arabidopsis* *DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. Plant Mol Biol 42: 657-665.
29. Parvaiz A, Satyawati S. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants - A review. Plant Soil Environ 54: 88-99.
30. Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu JK. 2004. Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. J Biol Chem 279: 207-215.
31. Quintero FJ, Garcíadeblas B, Rodríguez-Navarro A. 1996. The *SAL1* gene of *Arabidopsis*, encoding an enzyme with 3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotide and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. Plant Cell 8: 529-537.
32. Rus A, Baxter I, Muthukumar B, Gustin J, Lahner B, Yakubova E, Salt DE. 2006. Natural variants of AtHKT1 enhance Na^+ accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. PLoS Gen 2: 1964-1973.
33. Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM. 2001. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na^+ entry into plant roots. Proc Natl Acad Sci USA 98: 14150-14155.
34. Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 103: 18822-18827.
35. Sakurai T, Kondou Y, Akiyama K, Kurotani A, Higuchi M, Ichikawa T, Kuroda H, Kusano M, Mori M, Saitou T, Sakakibara H, Sugano S, Suzuki M, Takahashi H, Takahashi S, Takatsuji H, Yokotani N, Yoshizumi T, Saito

- K, Shinozaki K, Oda K, Hirochika H, Matsui M. 2011. RiceFOX: A database of Arabidopsis mutant lines overexpressing rice full-length cDNA that contains a wide range of trait information to facilitate analysis of gene function. *Plant Cell Physiol* 52: 265-273.
36. Seki M, Shinozaki K. 2009. Functional genomics using RIKEN *Arabidopsis thaliana* full-length cDNAs. *J Plant Res* 122: 355-366.
37. Shalmani A, Muhammad I, Sharif R, Zhao C, Ullah U, Zhang D, Jing X-Q, Amin B, Jia P, Tahir MM, Xu Z, Chen K-M, An N. 2019. Zinc finger-homeodomain genes: Evolution, functional differentiation, and expression profiling under flowering-related treatments and abiotic stresses in plants. *Evol Bioinform* 15: 1-16.38. Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK. 2002. The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 controls long-distance Na^+ transporter in plants. *Plant Cell* 14: 465-477.
39. Song C, Je J, Hong JK, Lim CO. 2014. Ectopic expression of an *Arabidopsis* dehydration-responsive element-binding factor *DREB2C* improves salt stress tolerance in crucifers. *Plant Cell Rep* 33: 1239-1254.
40. Song J, Xing Y, Munir S, Yu C, Song L, Li H, Wang T, Ye Z. 2016. An ATL78-like RING-H2 finger protein confers abiotic stress tolerance through interacting with RAV2 and CSN5B in tomato. *Front Plant Sci* 7: 1305.
41. Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, Maruyama K, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis. *Plant J* 49: 46-63.
42. Vallejo AJ, Yanovsky MJ, Botto JF. 2010. Germination variation in *Arabidopsis thaliana* accessions under moderate osmotic and salt stresses. *Ann Bot* 106: 833-842.
43. Wang H, Yin X, Li X, Wnag L, Zheng Y, Xu X, Zhang Y, Wang X. 2014. Genome-wide identification, evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) zinc finger-homeodomain gene family. *Int J Mol Sci* 15: 5730-5748.
44. Wang X, Wang H, Wang J, Sun R, Wu J, Liu S et al. 2011. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat Genet* 43: 1035-1039.
45. Windhovel A, Hein I, Dabrowa R, Stockhaus J. 2001. Characterization of a novel class of plant homeodomain proteins that bind to the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Flaveria trinervia*. *Plant Mol Biol* 45: 201-214.
46. Xiong L, Zhu JK. 2002. Salt tolerance, pp. 1-24. In: Somerville C, Meyerowitz E. (Eds.) *Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biology, Rockville, USA.
47. Xiong L, Lee BH, Ishitani M, Lee H, Zhang C, Zhu JK. 2001. *FIERY1* encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 15: 1971-1984.
48. Yang Q, Chena Z-Z, Zhou X-F, Yin H-B, Li X, Xin X-F, Hong XH, Zhu J-K, Gong Z. 2009. Overexpression of *SOS* (*Salt Overly Sensitive*) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Mol Plant* 2: 22-31.
49. Yao K, Lockhart KM, Kalanack JJ. 2005. Cloning of dehydrin coding sequences from *Brassica juncea* and *Brassica napus* and their low temperature-inducible expression in germinating seeds. *Plant Physiol Biochem* 43: 83-89.
50. Yun D-J. 2005. Molecular mechanism of plant adaption to high salinity. *Korean J Plant Biotechnol* 32: 1-14.
51. Zhu J-K, Liu J, Xiong L. 1998. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: Evidence for a critical role of Potassium nutrition. *Plant Cell* 10: 1181-1191.
52. Zhu J-K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6: 66-71.