

## 배추에서 신규 염 저항성 관련 유전자 분리 및 검정

유재경 · 박영두\*

경희대학교 생명과학대학 원예생명공학과

### Isolation and Identification of a New Gene Related to Salt Tolerance in Chinese Cabbage

Jae-Gyeong Yu and Young-Doo Park\*

Department of Horticultural Biotechnology, Kyunghee University, Yongin 446-701, Korea

**Abstract.** This study was conducted to find a salt tolerance gene in *Brassica rapa*. In order to meet this objective, we analyzed data from a KBGP-24K oligo chip [BrEMD (*Brassica rapa* EST and microarray database)] of the *B. rapa* ssp. *pekinensis* 'Chiifu' under salt stress (250 mM NaCl). From the *B. rapa* KBGP-24K microarray chip analysis, 202 salt-responsive unigenes were primarily selected under salt stress. Of these, a gene with unknown function but known full-length sequence was chosen to closely investigate the gene function. The selected gene was named *BrSSR* (*B. rapa* salt stress resistance). *BrSSR* contains a 285 bp open reading frame encoding a putative 94-amino acid protein, and a DUF581 domain. The pSL94 vector was designed to over-express *BrSSR*, and was used to transform tobacco plants for salt tolerance analysis.  $T_1$  transgenic tobacco plants that over-expressed *BrSSR* were selected by PCR and DNA blot analyses. Quantitative real-time RT PCR revealed that the expression of *BrSSR* in transgenic tobacco plants increased by approximately 3.8-fold. Similar results were obtained by RNA blot analysis. Phenotypic characteristics analysis showed that transgenic tobacco plants with over-expressed *BrSSR* were more salt-tolerant than the wild type control under 250 mM NaCl for 5 days. Based on these results, we hypothesized that the over-expression of *BrSSR* may be closely related to the enhancement of salt tolerance.

**Additional key words:** microarray, gene over-expression, transgenic tobacco

### 서 언

전세계적으로 약 9억ha에 달하는 면적이 염(salt)에 의해 영향을 받고 있는 것으로 보고되어 있으며, 특히 농업에 있어 관개(irrigation)가 필수적인 국가들에게 염 집적은 작물의 수확량을 결정하는 매우 중요한 요인이다(Flowers, 2004; Flowers and Yeo, 1995; Munns, 2002; Tester and Davenport, 2003; Zhang et al., 2010; Zhu, 2001). 작물의 생장을 억제하는 요인은 다양하게 있을 수 있으나 가장 유력한 요인은 바로 체내  $\text{Na}^+$ 의 증가이다. 이에 식물들은 염 스트레스 환경에 적응하기 위해  $\text{Na}^+$ 의 흡수 조절,  $\text{Na}^+$ 을 물관 내에 보관했다가 다시 회수, 뿌리에서 외부로 분출, 액포 내로의 구획

화 등의 다양한 기작을 마련하고 있다(Flowers and Yeo, 1995; Tester and Davenport, 2003; Zhang et al., 2010). 최근 세계적인 기후 변화로 인해 경작지에서의 토양 염 집적은 앞으로 20년 안에 현재 경작지 면적을 30% 정도 감소시킬 것이며, 2050년까지 50% 이상의 감소를 야기할 것으로 예상되고 있다(Wang et al., 2003). 그러므로 염 저항성 관련 유전자의 동정 및 기작 연구를 통한 작물의 염 저항성 향상은 미래의 식량 공급 안정성 측면에서 식물 생명공학 연구에서의 최우선 과제로 다루어진다. 염 집적을 비롯한 다양한 비생물적 스트레스에 대한 저항성 연구들이 분자 수준에서 특정 유전자를 조절함으로써 진행되어 오고 있는데, 1941년 Lyon에 의해 처음으로 염 저항성 형질의 유전에 관한 연구

\*Corresponding author: ydpark@khu.ac.kr

※ Received 7 June 2013; Revised 3 July 2013; Accepted 17 July 2013. 본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ008076과 PJ008118)의 지원에 의해 이루어진 것임.

© 2013 Korean Society for Horticultural Science

가 시작된 이래(Lyon, 1941) 지금까지 다양한 작물에서 다양한 저항성 유전자들이 발견되고 있으며 그 발현 네트워크에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 그 예로 보리의 late embryogenesis abundant(LEA) protein 유전자인 *HVA1*이 도입된 벼의 염 저항성 향상 연구(Xu et al., 1996), 벼의 *OscDPK7*(rice calcium-dependent protein kinase) 유전자의 과발현이 염 및 건조 스트레스 조건에서 벼의 생장 개선에 기여했다는 보고(Saijo et al., 2000), 애기장대에서 세포막의  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  역수송체 유전자(salt overly sensitive 1, *SOS1*)의 과발현이 염 저항성을 향상시켰다는 보고(Shi et al., 2003), 벼의 DREB1(dehydration-responsive element-binding protein 1) 형태의 유전자(DREB1A, DREB1B)가 작물의 저온 저항성 개선에 매우 효과적이라는 보고(Ito et al., 2006) 등이 있다.

순계배추에서 염 저항성 관련 유전자를 과발현시켜 염 저항성이 우수한 배추 품종을 육성한다는 최종 목표를 달성하기 위해, 본 연구는 염 스트레스를 처리한 순계배추(*B. rapa* ssp. *pekinensis* 'Chiifu')를 대상으로 microarray 분석을 통하여 염 저항성 유전자로 추정되는 유전자를 선별 및 동정하였다. 분리된 유전자를 과발현(over-expression)시킨 형질전환 담배를 생산 및 분석하여 염 스트레스 처리 시 해당 유전자의 염 저항성을 확인하였으며, 이 유전자를 *BrSSR* (*B. rapa* salt stress resistance)로 명명하였다.

## 재료 및 방법

### RT-PCR을 이용한 유전자 동정

발아 후 3주간 생장한 순계배추(*B. rapa* ssp. *pekinensis* 'Chiifu')에 염 스트레스(250mM NaCl)를 48시간 동안 처리한 후, 생육단계별로 각각의 total RNA를 추출하고 KBGP-24K oligo chip을 제작하여 각 유전자들의 발현 변화를 분석하였다. 그리고 chip 분석 결과는 BrEMD(*B. rapa* EST and microarray database, [www.brassica-rapa.org/BrEMD](http://www.brassica-rapa.org/BrEMD))에 등록하였다(Lee et al., 2008). 본 연구의 대상 유전자는 BrEMD 정보를 활용하여, 염 스트레스 처리 시 발현이 강하게 증가하였으나 그 기능이 알려지지 않은 유전자들 중에서 선별하였다. 선별된 염 저항성 관련 유전자를 동정하기 위해 먼저 KBGP-24K oligo chip에서의 염기서열(BRAS0001S00000772), 애기장대(*A. thaliana*)에서 상동성을 가지는 cDNA 염기서열(AT2G44670)

과 NCBI에 등록된 각각의 *B. rapa* subsp. *pekinensis* cDNA clone들의 염기서열(AC189399, AC189261)을 바탕으로 동정용 primer set(BrSSR-F: 5'-ATG GCT TCG TAT TAC TCT GCG T-3', BrSSR-R: 5'-CTA CGC GAC CAC GAG TGT T-3')을 제작하였다. 제작된 primer set을 이용하여 reverse transcriptase(RT)-PCR 방법으로 285bp의 product를 증폭하였으며, 이 PCR product는 pGemT-easy vector(Promega, USA)에 클로닝 후 대장균 DH10β에 형질전환하였다. 형질전환된 대장균에서 plasmid DNA를 추출하고(EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps Kit, Bio Basic Inc., Canada) 이를 Macrogen Co.(Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다.

### *Agrobacterium*을 이용한 담배 형질전환

순계배추에서 동정한 염 저항성 관련 유전자가 과발현된 담배 형질전환체를 생산하기 위해, 우선 전체 285bp의 유전자를 pH2GW7(VIB-Ghent University, Belgium)에 클로닝하여 형질전환용 과발현 운반체인 pSL94를 제작하였다 (Fig. 1). 그런 뒤, *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법을 이용하여(Lee et al., 2004) 기내 배양된 담배(*Nicotiana tabacum* 'SR1')로의 유전자 전이를 수행하였다. 그리하여 생산된  $T_0$  담배 형질전환체들은 형질전환 유무를 PCR 방법으로 확인하고  $T_1$  세대로 세대진전 하였으며, 본 연구에서는  $T_1$  세대 담배 형질전환체를 이용하여 분석을 수행하였다.

### Genomic DNA 추출 및 PCR 분석

$T_1$  형질전환체로 추정되는 담배의 잎을 채취하여 Lee et al.(2004) 방법과 동일한 방법으로 genomic DNA를 추출하였다. 그런 뒤 HPT-F: 5'-TTT CCA CT GCG AGT AC-3'와 HPT-R: 5'-TGT CGA GAA GTT TCT GAT CGA-3' primer set을 이용하여 T-DNA 상의 hygromycin 저항성 유전자를 대상으로 형질전환 유무를 확인하였다. PCR 반응은 genomic DNA 1 $\mu$ L(100ng), 10pmol의 HPT-F와 HPT-R primer 각각 1 $\mu$  L, 2.5mM dNTPs 2 $\mu$ L, 5U의 *Taq* polymerase 0.5 $\mu$ L, 10 $\times$  buffer 2 $\mu$ L, 그리고 나머지는 멸균수를 첨가하여 최종 반응 액이 20 $\mu$ L가 되도록 하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간/1회 predenaturation한 후 95°C에서 30초간 denaturation,

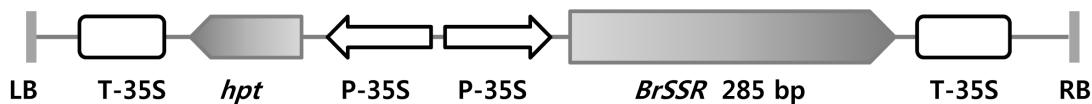


Fig. 1. Diagram of *BrSSR* over-expressing vector for tobacco transformation. LB, left border; T-35S, Cauliflower mosaic virus 35S terminator; *hpt*, hygromycin resistance gene; P-35S : Cauliflower mosaic virus 35S promoter; RB, right border.

60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 35회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 10분간/1회 final extension 하였다. 증폭된 PCR 산물은 1× TBE buffer를 사용하여 1% agarose gel 상에서 100V, 30분간 전기영동하여 ethidium bromide(EtBr)로 염색한 후, UV illuminator를 이용하여 반응산물을 확인하였다.

### DNA Blot 분석

DNA blot 분석을 통해  $T_1$  형질전환체들에 도입된 T-DNA 개수를 확인하였다. Genomic DNA 30 $\mu$ g에 제한효소 *Bam*H I을 첨가하여 37°C에서 15시간 동안 절단시킨 후 0.5× TAE buffer를 이용한 1% agarose gel 상에서 50V, 6시간 동안 전기영동하였다. 이 gel을 depurination(0.25M HCl), denaturation (5M NaCl, 0.5M NaOH), neutralization(5M NaCl, 1M Tris-HCl) 단계를 차례로 반응시킨 후, 20× SSC에 18시간 동안 처리하여 절단된 DNA를 Hybond-N<sup>+</sup> nylon membrane (Amersham Biosciences, UK)으로 옮겼다. Hygromycin 저항성 유전자 내 960bp의 단편을 probe로 사용하여 nylon membrane을 혼성화 mixture(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M, 10% BSA, 20% SDS, EDTA 0.5M, <sup>32</sup>P-dCTP)에 침지 후 65°C에서 18시간 동안 혼성화 반응시키고, 2× SSC, 0.1% SDS와 0.1× SSC, 0.1% SDS를 사용하여 각각 65°C에서 10분 간 세척하였다. 그 후, -80°C에서 48시간 동안 nylon membrane 을 X-ray 필름에 노출시키고 현상액과 고정액을 이용하여 X-ray 필름을 현상하였다.

### Total RNA 추출 및 도입유전자 발현 분석

Total RNA추출은 RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit(QIAGEN, Germany)를 이용하였다. 염(250mM NaCl) 처리 후 100mg의 잎을 채취하여 7 $\mu$ L의  $\beta$ -mercaptoethanol이 첨가된 세포용해용 RLT buffer 700 $\mu$ L를 넣고 상온에서 5분간 반응시킨 후 1차 column을 이용하여 수용층 용액을 분리하였다. 분리된 용액을 2차 column에 넣고 원심분리 한 후, membrane에 결합된 RNA를 세척하는 RW1 buffer 700 $\mu$ L와 RPE buffer 500 $\mu$ L를 차례로 넣어 column을 세척한 후 RNase가 첨가되지 않은 중류수로 total RNA를 추출하였다.

실제로 형질전환이 확인된 개체들에서 도입유전자가 과발현 되는지를 확인하기 위해 quantitative real-time RT PCR과 RNA blot 분석을 수행하였다. Quantitative real-time RT PCR은 Yu et al.(2012)에 제시된 방법과 동일하게 수행하였으며, 사용한 primer set은 SSRreal-F: 5'-ATG GCT TCG TAT TAC TCT GCG-3'과 SSRreal-R: 5'-CAC GAG TGT TCC TGT CCG TA-3'이었다. RNA blot 분석은 10 $\mu$ g의

RNA를 formaldehyde와 MOPS 용액을 이용하여 전기영동한 후, 1M ammonium acetate로 18시간 처리하여 Hybond-N<sup>+</sup> nylon membrane(Amersham Biosciences, UK)으로 RNA를 옮기고 혼성화 단계부터는 DNA blot 방법과 동일하게 수행하였다.

### 염 스트레스 처리 후 표현형 분석

$T_1$  형질전환 담배를 대상으로 염 스트레스 발생 시 저항성 여부를 확인하기 위해 염 스트레스(250mM NaCl)를 처리하였다. 염 스트레스는 본엽이 6-8매가 된 비형질전환 대조군과 형질전환체들을 병해나 충해가 발생하지 않는 광도 250 $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 광주기 16시간 명처리/8시간 암처리, 습도 30-50%로 생육조건이 일정한 생장상에서 동시에 처리를 시작하여 표현형적으로 명확한 차이(염색 변화 및 식물체 도복 현상)를 보인 5일 동안 진행하였다.

## 결과 및 고찰

### 신규 염 저항성 관련 유전자 동정

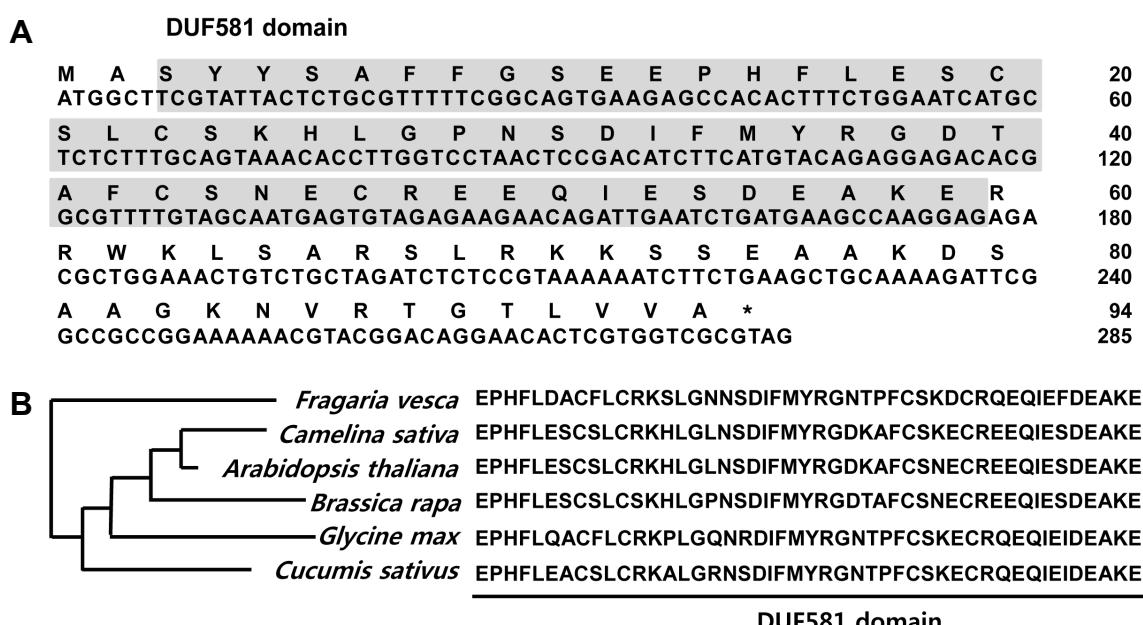
BrEMD(*Brassica rapa* EST and microarray database, www.brassica-rapa.org/BrEMD) 내 염 스트레스가 처리된 순계배추('Chiifu')를 대상으로 한 microarray 데이터를 분석하여 대조군 대비 5배 이상 발현이 증가한 202개의 unigene 들을 1차 선발하였다. 이들 중 기능이 명확히 알려지지 않았으며 완전장을 갖추고 있는 유전자들에서 하나의 유전자를 최종 선발하여 "BrSSR"로 명명하였다. 최종 선발된 BrSSR 의 KBGP-24K chip seqID는 "BRAS0001S00000772"이고, 5' end EST clone 이름은 "KBFL-131B09"이며, TAIR ID는 "AT2G44670"이다. BrEMD에 공개된 731bp의 cDNA 염기서열에서 285bp의 오픈리딩 프레임과 94개의 아미노산을 확인할 수 있었으며(Fig. 2A), 이 정보를 바탕으로 RT-PCR 방법을 이용하여 순계배추('CT001', 시원씨드, 경기도 평택)의 잎에서 BrSSR을 동정하였다. 이 BrSSR의 염기서열을 이용한 BlastX 분석 결과, 애기장대(*A. thaliana*)를 비롯하여 양구슬냉이(*Camelina sativa*), 산딸기(*Fragaria vesca*), 오이(*Cucumis sativus*), 콩(*Glycine max*) 등과 75% 이상의 높은 아미노산 상동성을 가지는 것으로 확인되었으나, 각각의 작물에서 해당 유전자의 기능에 대해서는 아직 보고되어 있지 않았다(Fig. 2B). 한편, 약 530Mbp의 배추 게놈에서 공개된 2,026개 BAC clone을 이용하여 BrSSR의 위치를 확인한 결과, VCS3M\_DH와 JWF3P genetic map에서는 아직 정확한 위치가 공개되어 있지는 않았지만 3번 염색체의 KBrB056I08 BAC clone(Genbank No. AC189399)에 속해

져 있음을 확인하였다(National Agricultural Biotechnology Information Center, nabic.rda.go.kr).

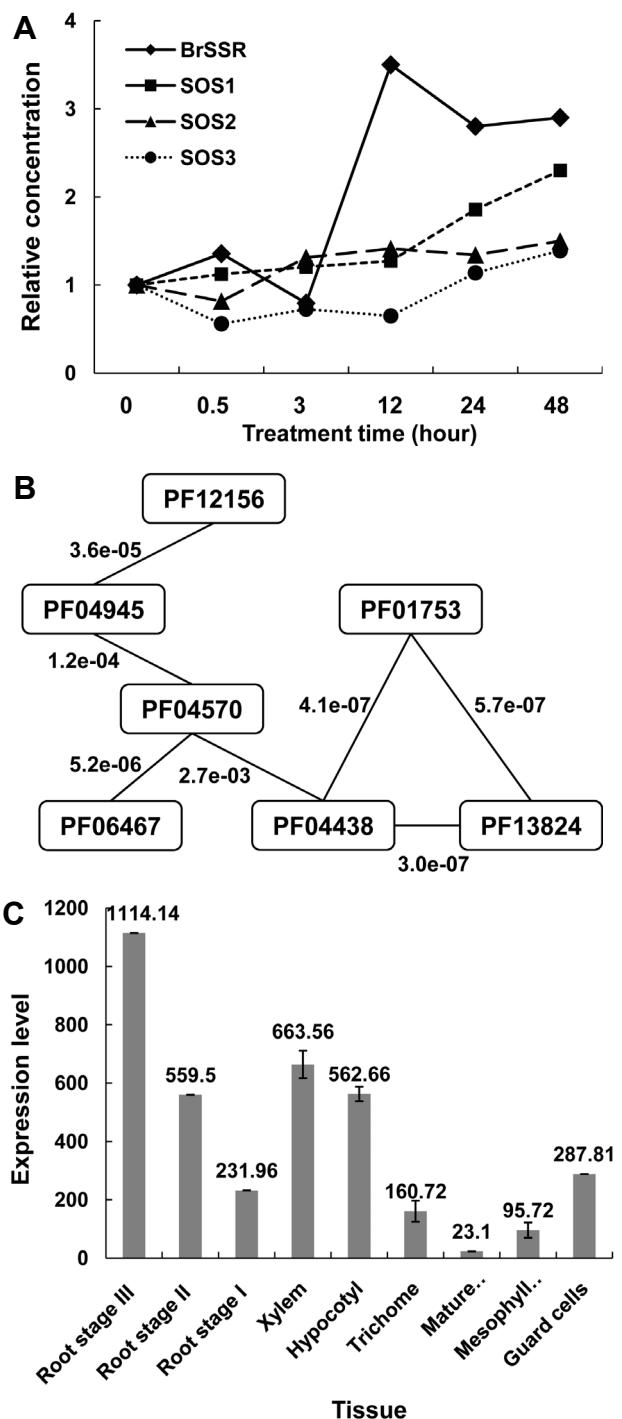
### In Silico 분석

*BrSSR*의 기능을 유추하기 위해 먼저 BrEMD 데이터를 기반으로 *BrSSR*과 염 저항성 관련 유전자로 알려진 salt overly sensitive 1(*SOS1*), 2(*SOS2*), 3(*SOS3*) 유전자들(Flowers, 2004; Wang et al., 2003; Yang et al., 2009)의 발현 변화를 비교하였다. 염처리 48시간까지의 시간대별 발현 변화를 분석한 결과, *BrSSR*은 스트레스 발생 초기에 염 저항성 유전자인 *SOS* 유전자군보다 더 민감하게 반응함으로써 염 스트레스와 밀접한 관련이 있는 유전자일 것으로 추정하였다(Fig. 3A). 하지만 *BrSSR* 내에 존재하는 보존 도메인 분석에서 *BrSSR*은 *SOS* 유전자군의 도메인과는 다른 종류의 도메인을 가지고 있었다. *BrSSR* 내에는 총 94개의 아미노산 중 3-59번까지의 아미노산 서열에서 “Domain of unknown function(DUF) 581” 도메인이 존재함을 확인하였다([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). DUF로 명명된 도메인들은 3,000개 이상이 존재하고 있으며, 이 중 “dicer endonuclease(DUF283)”와 같이 기능이 알려진 것들은 전체의 20% 정도에 지나지 않는다(Bateman et al., 2010; Dlakić, 2006; Marchler-Bauer et al., 2011). *BrSSR*이 가지고 있는 DUF581(PF04570) 도메인을 Pfam database ([pfam.sanger.ac.uk](http://pfam.sanger.ac.uk))에서 분석한 결과 그 기능을 명확히 확인할 수는 없었지만, 양이온 수송 ATPase(ATPase-cat\_bd) (PF12156), 구리이온 수송 ATPase(YHS)(PF04945), zinc

finger-FCS(-HIT, -Mss51, -MYND)(PF06467, PF04438, PF13824, PF01753) 도메인들과 관련이 있는 것으로 나타났다. 양이온 수송 ATPase 도메인에 포함되는 구리이온 수송 ATPase(YHS) 도메인은 엽록체의 스트로마 기질로 구리이온을 이동시키는데 긴밀히 관여하는 것으로 보고되어 있으나 염 자극 시 반응 여부는 아직 보고되지 않았다(Catty et al., 2011; Shikanai et al., 2003). 또한 전사조절인자인 zinc finger-HIT는 다양한 생물적·비생물적 스트레스 자극에 반응하여 세포막 형성의 중요 구성요소인 지질의 대사작용에 관여하는 phospholipid, phosphatedate 등의 생성에 관여하는 것으로 보고되었다(Testerink and Munnik, 2005; Wang et al., 2007). DUF581을 포함한 이들 7개의 도메인들은 금속(중금속) 감지, 결합, 수송 및 저항성과 관련된 도메인 집단으로 추정되는 “TRASH superfamily clan(CL0175)”에 속하는 것으로 확인되어, DUF581 도메인을 가진 *BrSSR*도 체내 metal coordination 그룹에 속하는 유전자일 것으로 추측된다(Ettema et al., 2003)(Fig. 3B). 금속이온과 염의 상관관계에 대해, 보리(*Hordeum vulgare*)와 쇠비름(*Portulaca oleracea*)의 경우 금속의 존재가 체내 염 축적을 감소시켰다는 연구 보고가 있다(Zurayk et al., 2001). 또한 염분이 풍부한 조건에서 재배가 가능한 염생식물(halophyte) 대상 연구에서는 금속 축적으로 인해 염 스트레스에 의한 활성산소의 활성이 효율적으로 감소하여 염 저항성과 금속 저항성이 서로 긴밀히 연결된 기작으로 작동하고 있음을 보고하였다(Shalata and Tal, 1998).



**Fig. 2.** Identification and phylogenetic tree of *B. rapa* salt stress resistance gene (*BrSSR*). (A) The deduced amino acid sequence of *BrSSR* gene. (B) Comparison of DUF domains of *B. rapa* and orthologs from five other organisms using CLC free workbench 3.2.3 program.



**Fig. 3.** Characterization of *B. rapa* salt stress resistance gene (*BrSSR*). (A) Time course expression levels of *BrSSR* and three salt-respond genes after treatment with 250 mM NaCl. *BrSSR* expression was similar to but higher than salt overly sensitive 1 (SOS1), 2 (SOS2), and 3 (SOS3). The expression level of 0 h treatment was used as a normalization control. (B) The relationships between members of TRASH clan. Members are deemed to be closely related if their E-value is less than  $10^{-3}$ . PF04570, DUF581; PF12156, ATPase-cat bd; PF04945, YHS; PF10013, DUF2256; PF03884, DUF329; PF01753, zf-MYND; PF04438, zf-HIT; PF13824, zf-Mss51; PF06467, zf-FCS. (C) Tissue specific expression of *BrSSR* deduced from *A. thaliana* database. The maximum expression level (expression potential) was shown in the “Root” data source.

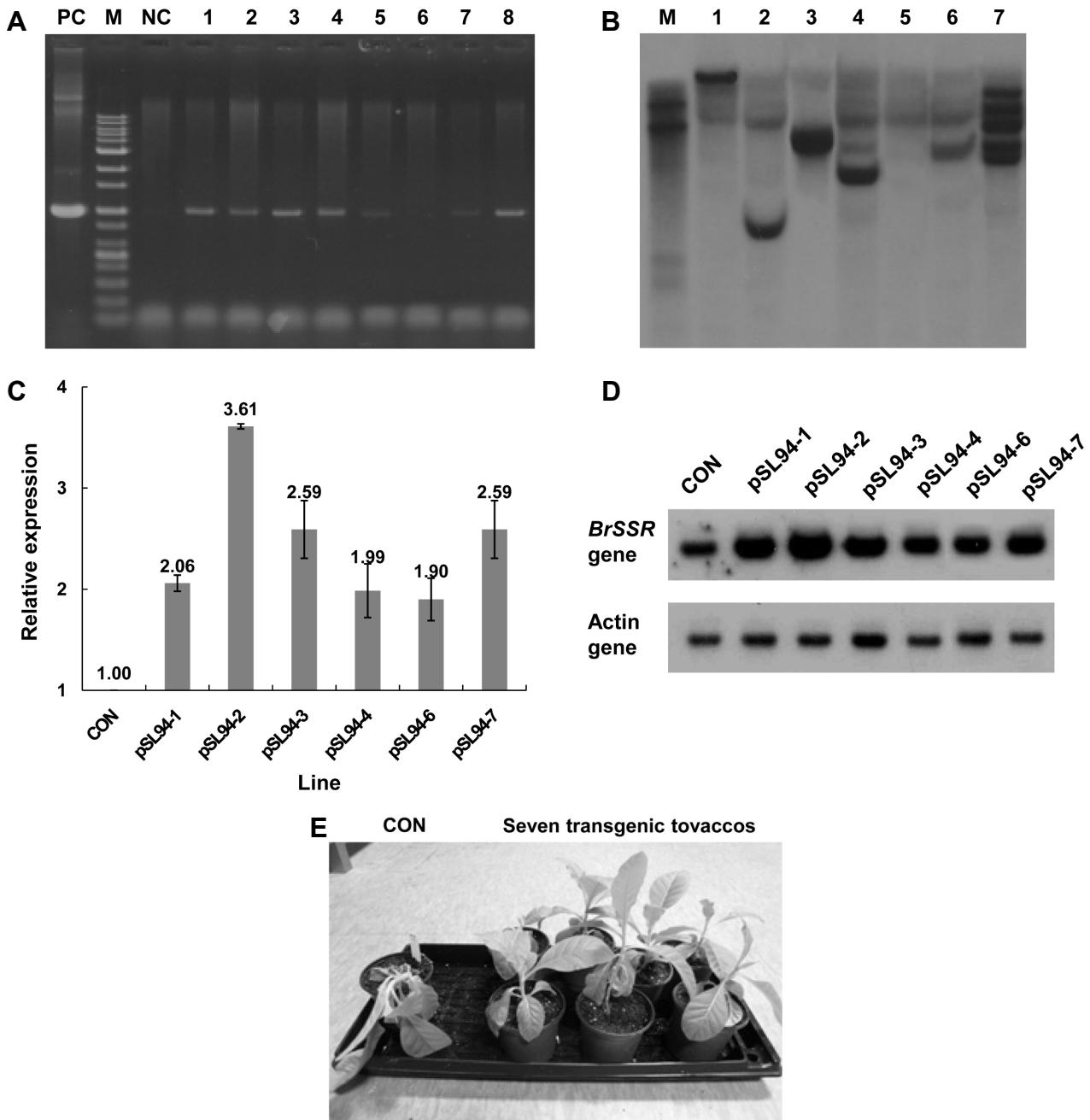
그리고 “*Arabidopsis* eFP Browser([www.bar.utoronto.ca/](http://www.bar.utoronto.ca/))” (Winter et al., 2007)를 이용한 분석에서 *BrSSR*은 호르몬 관련 비교에서 zeatin, indole-acetic acid(IAA), ABA, methyl jasmonate, gibberellic acid 3(GA<sub>3</sub>), brassinosteroids이 처리된 어린 애기장대 모든 조직에서 처리농도 및 시간에 관계 없이 일정한 발현 수준을 보였으나, 특이하게 조직별 발현 비교에서 금속이온 및 나트륨이온(Na<sup>+</sup>)의 흡수가 이루어지는 뿐만 아니라 이들이 이동하는 물관 부위에서 발현이 현저히 높음을 확인할 수 있었다(Tester and Davenport, 2003; Zhang et al., 2010; Zhu, 2001)(Fig. 3C). 그러므로 *BrSSR*은 식물 호르몬의 작용과는 관계없이 DUF581 도메인의 작용에 의해 염 스트레스 조건 하에서 작물에게 염 저항성을 부여하는데 관여할 것으로 추정하였다(Saijo et al., 2000; Shalata and Tal, 1998; Shi et al., 2000; Zurayk et al., 2001). 또한 애기장대 유전자들의 발현 네트워크 분석 데이터(GENEMANIA, [www.genemania.org](http://www.genemania.org))를 기반으로 *BrSSR*과 밀접히 관련된 유전자들을 분석한 결과, 총 20개의 유전자들이 유의적인 관계를 가지고 있는 것이 분석되었으며, 이들 중 기능이 밝혀져 있는 유전자는 체내 RNase 단백질의 활성을 억제하는 regulator of ribonuclease-like protein 3(AT5G56260)와 세포증식 및 생장 관련 시그널을 조절하는 tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1(AT1G72300)으로 확인되었다. 그러나 이들과 염 저항성과의 관련 연구는 아직 보고되지 않았다.

#### In Planta 분석

현재까지 기능이 보고되지 않은 *BrSSR* 유전자의 염 저항성 여부를 알아보기 위해 *N. tabacum* ‘SR1’을 이용하여 *BrSSR* 과발현 운반체인 pSL94 vector로 형질전환하였다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법으로 담배에 도입한 결과, 총 8개의 추정 담배 형질전환체를 생산하였으나 이 중 1개체는 hygromycin 저항성 유전자(*hpt*)를 대상으로 한 PCR 분석에서 *hpt* 유전자의 존재가 확인되지 않아 이 개체를 제외하고 최종 7개체의 담배 형질전환체를 선별하였다(Fig. 4A). 또한 7개체의 PCR product의 염기서열을 분석하여 *hpt* 유전자임을 확인하였다(순서대로 pSL94-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7로 명명함). 그리고 DNA blot 분석으로 7개체의 T-DNA 도입 수를 확인한 결과, pSL94-3 개체는 1개의 T-DNA가, 나머지 개체들은 1개 이상의 T-DNA가 삽입되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 도입된 *BrSSR*의 발현 수준 분석은 DNA blot 분석으로 형질전환 유무가 명확하지 않은 pSL94-5번 개체를 제외하고 총 6개 담배 형질전환체들을 대상으로, 250mM NaCl을 3일간 처리한 후 RNA를 추출하여 quantitative real-

time RT PCR과 RNA blot 방법으로 수행하였다. 실험의 신뢰성을 부여하기 위해 내부 대조 유전자로서 actin 유전자의 발현 분석을 함께 수행하였다. Quantitative real-time RT PCR과 RNA blot 분석에서 개체별로 유사한 발현 패턴을 보였으며 6개의 형질전환체들 모두 대조군 대비 발현량

이 약 1.9-3.8배 가량 증가한 것으로 나타났다(Figs. 4C and 4D). 한편, BrEMD에 제시된 ‘Chiifu’ 배추를 이용한 KBGP-24K microarray 분석에서도 염처리 12시간째부터 발현이 크게 증가하여 최대 3.5배까지 발현량이 증가하는 특징을 보였다(Fig. 3A). 이 결과들은 *BrSSR*의 과발현이 담배 형질전환



**Fig. 4.** Molecular biological analyses of *BrSSR* over-expressed tobacco. (A) PCR analysis of eight transgenic tobacco plants with pSL94 vector. Seven transgenic plants were confirmed to be inserted T-DNA of pSL94 vector. PC, hygromycin resistance gene; M, 1 Kb size marker; NC, wild type control; lane 1-8, transgenic plants. (B) DNA blot analysis using [<sup>32</sup>P]-labeled 960 bp fragment of the hygromycin resistance gene. M,  $\lambda$ HindIII size marker, lane 1-7, pSL94-1 to pSL94-7 transgenic plants. (C) Expression levels of six transgenic plants except pSL94-5 compared with wild type using quantitative real-time RT PCR. (D) RNA blot analysis of six transgenic plants except pSL94-5 using [<sup>32</sup>P]-labeled 267 bp fragment (from start codon to 267 downstream) of *BrSSR*. CON, wild type control; pSL94, *BrSSR* over-expressed lines. (E) Phenotype characterization of *BrSSR* over-expressed  $T_1$  tobacco plants. For salt stress, seven transgenic plants (pSL94-1 to pSL94-7) and a non-transgenic tobacco (CON) were placed for 5 days under 250 mM NaCl condition. CON showed plant drooping, light green leaves, and growth inhibition, on the other hand, the transgenic plants exhibited normal growth and development.

체 및 ‘Chiifu’ 배추의 염 저항성을 향상시키는데 크게 관여하고 있음을 보여 주는 것이다.

DNA blot 분석으로 명확히 확인되지 않았으나 PCR 분석 결과를 기반으로 pSL94-5번 개체까지 포함하여 총 7개의 형질전환체들을 염 스트레스 환경 시 표현형상의 기능검정을 위해 250mM NaCl에서 5일 동안 처리하였다. *BrSSR* 유전자가 과발현된 7개의 pSL94 형질전환체들은 대조군 대비 염 스트레스 환경에서 표현형상의 저항성을 보였다(Fig. 4E). 대조군인 비형질전환 담배는 잎과 줄기의 탄력을 잃고 쓰러지고 엽색이 점차 연해지더니 노란색으로 변하기 시작하였으며 더 이상 생장하지 못하는 모습을 보인 반면, 형질전환된 7개체는 모두 염 처리 전과 동일한 모습을 유지하여 표현형상의 뚜렷한 차이를 보여 주었다.

결론적으로 순계배추(‘Chiifu’)의 염 자극 시 3배 이상의 발현량 증가 및 염 스트레스 관련 유전자들인 SOS 유전자군과의 발현 비교 분석(BrEMD의 KBGP-24K microarray 분석), DUF581 domain 분석, 애기장대에서의 호르몬 및 기관발달 관련 연구보고, 그리고 최종적으로 실제 담배 형질전환체의 염 스트레스 시 표현형 분석을 종합하여 볼 때, *BrSSR* 유전자는 염 스트레스 발생 시 발현량의 증가를 통해 식물의 염 저항성 향상과 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다. 아울러 본 연구 결과는 염 저항성 유전자인 *BrSSR*을 과발현시켜 실제 염 저항성이 우수한 배추 품종 육성의 가능성을 제시할 수 있으며, 더 나아가 배추 재배의 용이성 향상에도 기여할 수 있을 것이다.

## 초 록

본 연구는 배추에서 염 저항성 관련 유전자를 발굴하기 위해 수행되었다. 우선 염처리(250mM NaCl)된 순계배추 ‘Chiifu’를 이용한 KBGP-24K oligo chip 데이터[BrEMD (*B. rapa* EST and microarray database)]를 분석하였다. 그 결과, 염처리 시 크게 반응하는 202개의 unigene들을 1차 선발하였고, 이들 중 기능이 정확히 알려지지 않았으나 완전장을 갖추고 있는 1개의 유전자를 최종선발하여 *BrSSR* (*B. rapa* salt sensitive resistance)로 명명하였다. *BrSSR*은 94개의 아미노산으로 번역되는 총 285bp의 오픈리딩프레임을 가지고 있으며, DUF581 도메인을 지니고 있다. 염 저항성을 분석하기 위하여 *BrSSR*이 과발현된 pSL94 vector를 제작하여 담배에 형질전환시켰다. *BrSSR*이 과발현된 T<sub>1</sub> 세대 담배 형질전환체들은 PCR과 DNA blot 분석에 의해 선발하였다. Quantitative real-time RT PCR 분석 결과, 형질전환된 담배에서 *BrSSR*의 발현이 대조군 보다 약 3.8배까지

높게 발현되었다. 이는 RNA blot 분석 결과와도 일치했다. 또한 표현형 분석에서 5일간 250mM NaCl 염 처리 후 *BrSSR*이 과발현된 형질전환체들이 대조군보다 우수한 염 저항성을 보여 주었다. 위 결과들에 근거하여 염 스트레스 환경 하에서 *BrSSR* 유전자의 과발현은 식물의 염 저항성을 향상과 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다.

**추가 주요어 :** 마이크로어레이, 유전자과발현, 형질전환 담배

## 인용문헌

- Bateman, A., P. Coggill, and R.D. Finn. 2010. DUFs: Families in search of function. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66:1148-1152.
- Catty, P., S. Boutigny, R. Miras, J. Joyard, N. Rolland, and D. Seigneurin-Berry. 2011. Biochemical characterization of *AtHMA6/PAA1*, a chloroplast envelope Cu(I)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 286:36188-36197.
- Dlakić, M. 2006. DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. *Bioinformatics* 22:2711-2714.
- Ettema, T.J., M.A. Huynen, W.M. de Vos, and J. van der Oost. 2003. TRASH: A novel metal-binding domain predicted to be involved in heavy-metal sensing, trafficking and resistance. *Trends Biochem. Sci.* 28:170-173.
- Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55:307-319.
- Flowers, T.J. and A.R. Yeo. 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next? *Aust. J. Plant Physiol.* 22:875-884.
- Ito, Y., K. Katsura, K. Maruyama, T. Taji, M. Kobayashi, M. Seki, K. Shinozaki, and K. Yamauchi-Shinozaki. 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.
- Lee, M.K., H.S. Kim, S.H. Kim, and Y.D. Park. 2004. Analysis of T-DNA integration patterns in transgenic tobacco plants. *J. Plant Biol.* 47:179-186.
- Lee, S.C., M.H. Lim, J.A. Kim, S.I. Lee, J.S. Kim, M. Jin, S.J. Kwon, J.H. Mun, Y.K. Kim, H.U. Kim, Y. Hur, and B.S. Park. 2008. Transcriptome analysis in *Brassica rapa* under the abiotic stresses using *Brassica* 24K oligo microarray. *Mol. Cells* 26:595-605.
- Lyon, C. 1941. Responses of two species of tomatoes and the F<sub>1</sub> generation to sodium sulphate in the nutrient medium. *Bot. Gaz.* 103:107-122.
- Marchler-Bauer, A., S. Lu, J.B. Anderson, F. Chitsaz, M.K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J.H. Fong, L.Y. Geer, R.C. Geer, N.R. Gonzales, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, J.D. Jackson, Z. Ke, C.J. Lanczycki, F. Lu, G.H. Marchler, M. Mullokandov, M.V. Omelchenko, C.L. Robertson, J.S. Song, N. Thanki, R.A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang, C. Zheng, and S.H. Bryant. 2011. CDD: A conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 39:225-229.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25:239-250.

- Saijo, Y., S. Hata, J. Kyozuka, K. Shimamoto, and K. Izui. 2000. Over-expression of a single  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* 23:319-327.
- Shalata, A. and M. Tal. 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol. Plant.* 104:169-174.
- Shi, H., B.H. Lee, S.J. Wu, and J.K. Zhu. 2003. Overexpression of a plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotech.* 21:81-85.
- Shikanai, T., P. Muller-Moule, Y. Munekage, K.K. Niyogi, and M. Pilon. 2003. PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* 15: 1333-1346.
- Tester, M. and R. Davenport. 2003.  $\text{Na}^+$  tolerance and  $\text{Na}^+$  transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91:503-527.
- Testerink, C. and T. Munnik. 2005. Phosphatidic acid: A multi-functional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci.* 10:368-375.
- Wang, J., Y. Li, M. Zhang, Z. Liu, C. Wu, H. Yuan, Y.Y. Li, X. Zhao, and H. Lu. 2007. A zinc finger HIT domain-containing protein, ZNHIT-1, interacts with orphan nuclear hormone receptor Rev-erb $\beta$  and removes Rev-erb $\beta$ -induced inhibition of apoCIII transcription. *FEBS J.* 274:5370-5381.
- Wang, W., B. Vinocur, and A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.
- Winter, D., B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G.V. Wilson, and N.J. Provart. 2007. An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* 2:e718.
- Xu, D., X. Duan, B. Wang, B. Hong, T.H.D. Ho, and R. Wu. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* 110:249-257.
- Xu, D.Q., J. Huang, S.Q. Guo, X. Yang, Y.M. Bao, H.J. Tang, and H.S. Zhang. 2008. Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Lett.* 582:1037-1043.
- Yang, Q., Z.Z. Chen, X.F. Zhou, H.B. Yin, X. Li, X.F. Xin, X.H. Hong, J.K. Zhu, and Z. Gong. 2009. Overexpression of SOS (salt overly sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 2:22-31.
- Yu, J.G., G.H. Lee, and Y.D. Park. 2012. Physiological role of endogenous S-adenosyl-L-methionine synthetase in Chinese cabbage. *Hort. Environ. Biotechnol.* 53:247-255.
- Zhang, J.L., T.J. Flowers, and S.M. Wang. 2010. Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. *Plant Soil* 326:45-60.
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:66-71.
- Zurayk, R.A., N.F. Khoury, S.N. Talhouk, and R.Z. Baalbaki. 2001. Salinity-heavy metal interactions in four salt-tolerant plant species. *J. Plant Nutr.* 24:1773-1786.