

# 현사시나무 *Gibberellic Acid-Stimulated Arabidopsis (GASA)* 유전자의 발현 특성 및 건조 스트레스 내성 구명

최현모 · 배은경 · 최영임 · 윤서경 · 이효신

## Characterization of *Gibberellic Acid-Stimulated Arabidopsis (GASA)* gene to drought stress response in Poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*)

Hyunmo Choi · Eun-Kyung Bae · Young-Im Choi · Seo-Kyung Yoon · Hyoshin Lee

Received: 21 February 2017 / Revised: 20 March 2017 / Accepted: 21 March 2017

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** *Gibberellic Acid-Stimulated Arabidopsis (GASA)* genes are involved in plant hormone signaling, cell division and elongation, as well as in responses to stress conditions in plants. In this study, we isolated a *GASA* gene from hybrid poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*) and analyzed its physiological phenotype and molecular functions in poplar. *PagGASA* cDNA encodes a putative protein composed of 95 amino acids containing an N-terminal signal peptide and a conservative cysteine-rich C-terminal domain. Southern blot analysis revealed that one or two copies of the *PagGASA* are present in the poplar genome. The *PagGASA* transcripts were highly detected in flowers and roots. Moreover, the expression of *PagGASA* was induced by growth hormone (gibberellic acid) and stress hormones (abscisic acid, jasmonic acid, and salicylic acid). By using transgenic analysis, we showed that the upregulation of *PagGASA* in poplar provides high tolerance to drought stress. Therefore, our results suggest that *PagGASA* plays an important role in drought stress tolerance via stress-related plant hormone signaling in poplar.

**Keywords** Drought stress, Gene expression, *PagGASA*, transgenic poplar

### 서론

식물의 성장과 생산성은 생물적 스트레스 뿐만 아니라 건조, 고염, 고온, 저온 및 중금속 등과 같은 비생물적 스트레스에 의해 큰 영향을 받는다(Atkinson and Urwin 2012). 더욱이 지구온난화와 물 소비량의 급증 등에 따른 사막화 현상이 가속화 되면서 건조와 고염 스트레스가 농업생산성을 감소시키는 가장 큰 요인으로 주목받고 있다(Golldack et al. 2011). 따라서 식물의 생산성을 높이기 위해서는 다양한 환경 스트레스에 내성이 강한 새로운 식물의 개발이 필수적이다. 이에 따라 최근 유전체학 기술의 발전을 바탕으로 식물의 환경 스트레스 내성을 조절하는 유전자에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Ballen-Taborda et al. 2013; Hirayama et al. 2010; Luo 2010; Nakashima et al. 2014).

*GASA*는 병원균 방어, 항산화 활성, 열, 염 또는 산화 스트레스 반응과 같은 생물적 또는 비생물적 스트레스 반응에 관여하는 유전자로(Alonso-Ramirez et al. 2009; Li et al. 2011), 토마토에서 처음 알려진 *GA stimulated transcript 1 (GAST1)*의 상동유전자가 애기장대에서 보고되어 *Gibberellic acid stimulated Arabidopsis (GASA)*로 명명되었다(Herzog et al. 1995). *GASA* 유전자군은 애기장대에서 15개(Alonso-Ramirez et al. 2009) 그리고 포플러에서 17개(JGI v2.2 <http://www.jgi.doe.gov>)로 이루어진 것으로 보고되었다.

*GASA*는 85 ~ 119개의 아미노산으로 구성된 작은 단백질인데, 예외적으로 239개의 아미노산을 가지는 1개의 *GASA*가 애기장대, 포도 그리고 포플러에서 보고되었다. *GASA*는 아미노 말단에 시그널 펩티드와 카르복시 말단에 12개의 시스테인 잔기를 가지고 있다(Herzog et al. 1995). 또한 *GASA*는 세포분열과 세포신장, 기관형성, 줄기신장, 측근형성 그리고 개화조절 등의 발달과정에도 관여하는 것으로

H. Choi · E.-K. Bae · Y.-I. Choi · S.-K. Yoon · H. Lee (✉)  
국립산림과학원 산림생명공학과  
(Forest Biotechnology Division, National Institute of Forest Science, Suwon 16631, Korea)  
e-mail: hyoshinlee@korea.kr

알려져 있다(Kotilainen et al. 1999; Ben-Nissan et al. 2004). 실제로 애기장대의 *AtGASA4*는 화아분열과 종자의 발달을 조절한다고 보고된 바 있다(Aubert et al. 1998; Roxrud et al. 2007). 이외에도 *AtGASA1* 과발현 애기장대는 저온 스트레스에 반응하여 *DELLA* 유전자를 축적하고 뿌리 발달이 억제되었으며(Li et al. 2011), *AtGASA4* 과발현 애기장대는 염(150 mM NaCl), 산화(500  $\mu$ M paraquat) 및 고온(50°C) 스트레스에 대한 내성이 개선되었다. 반면 *AtGASA4*가 발현 억제된 애기장대는 대조구와 비교하여 스트레스 내성에 차이가 없는 것으로 나타났다(Alonso-Ramirez et al. 2009).

*GASA* 유전자의 특성 연구는 작물과 초본식물에서는 많이 이루어졌으나, 환경 스트레스에 빈번하게 노출되는 임목에서의 보고는 거의 없는 실정이다. 더욱이 가장 풍부한 생물자원이면서 생물소재로서 이용도가 높은 임목에서 스트레스 반응에 관여하는 유전자의 기능 분석은 매우 중요하다. 따라서, 본 연구에서는 식물의 성장 뿐만 아니라 스트레스 반응에 관여하는 *GASA* 유전자를 현사시나무(*Populus alba*  $\times$  *P. glandulosa*)에서 분리하여 서열과 구조를 분석하였으며, 유전자의 발현특성 및 스트레스 내성을 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 유전자 분리 및 염기서열 분석

현사시나무(*Populus alba*  $\times$  *P. glandulosa*)의 배양세포에서 분리한 mRNA를 기반으로 제작된 cDNA library 유래의 EST (expressed sequence tag) 클론 분석(Lee et al. 2005)을 통하여 *GASA* 유전자와 상동성을 나타내는 cDNA 클론을 선별하였다. 선별된 cDNA 클론의 전체 서열을 결정한 다음 Vector NTI advance 10.0 (Invitrogen, USA)을 이용하여 예상 아미노산 서열을 조사하였다. Uniprot program (<http://www.uniprot.org/align/>)의 ClustalW algorithm을 이용하여 단백질 상동성 분석을 하였다. 유전자의 계통수 (phylogenetic tree)는 MEGA4.1 (<http://www.megasoftware.net/index.html30>)을 사용하여 NJ method로 작성하였다. 아미노산 서열 분석은 PtGASA5 (XP\_006383339), AtGASA1 (NP\_565116.1), AtGASA2 (NP\_192699.1), AtGASA3 (NP\_192698.1), AtGASA4 (NP\_197027.1), AtGASA5 (NP\_566186.1), ZmGAST1 (NP\_001149114.1)를 이용하여 실시하였다.

### Southern blot 분석

현사시나무의 잎에서 MegaExtractor plant genome kit (Toyobo, 일본)를 사용하여 게놈 DNA를 분리한 다음, 제한효소 *EcoRI*, *BamHI*, *XbaI* 및 *HindIII*으로 절단하였다. 아가로스 겔에 전기영동한 다음 capillary transfer 방법으로 겔 상의 DNA를 Hybond-XL 나일론 막(Amersham-Pharmacia Biotech, 영국)에

전이시켰다. 나일론 막에 PerfectHYB plus hybridization buffer (Sigma, 미국)을 넣고 68°C에서 30분동안 전처리 하였다. 방사성 동위원소  $\alpha$ -<sup>32</sup>P로 표지된 *PagGASA* cDNA probe를 첨가한 다음 68°C에서 12시간 동안 혼성화 반응 하였다. 반응이 끝난 나일론 막을 X-ray 필름에 노출시킨 후 현상하였다.

### 식물 호르몬 처리

배양 4일째에 ABA (abscisic acid, 20  $\mu$ M), JA (jasmonic acid, 10  $\mu$ M), SA (salicylic acid, 20  $\mu$ M) 및 GA<sub>3</sub> (gibberellic acid, 20  $\mu$ M)을 각각 배양 배지에 첨가하고 30분 및 5시간 후에 세포를 회수하였다. 식물 호르몬을 무처리한 현탁배양세포를 대조구로 설정하여 30분과 5시간 후에 각각 회수하였다. 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.

### 조직특이성 및 유전자 발현 분석

조직특이성 분석을 위하여 잎, 줄기, 뿌리 및 엽병은 1년생 삽목묘로부터, 꽃은 25년생 나무로부터 채취하였다. Total RNA는 TRI Reagent (Molecular Research Center, 미국)를 사용하여 사용자 매뉴얼에 따라 분리하였고 cDNA를 합성하였다(PrimeScriptRT Reagent Kit with gDNA Eraser, Takara, 일본). Real-time quantitative PCR (real-time qPCR) 분석에 사용할 primer를 설계하기 위하여 Primer3 프로그램(<http://fokker.wi.mit.edu>)을 사용하였다. PCR 증폭산물의 정량을 위한 내부표준으로는 *Actin* 유전자를 사용하였다(Kim et al. 2011). PCR 증폭반응을 위해 1  $\mu$ l의 cDNA, 10  $\mu$ l의 PCR Master Mix (2  $\times$  SYBRGreen, BioRad, 미국), 1  $\mu$ l의 정방향 및 역방향 primer(10  $\mu$ M) 그리고 7  $\mu$ l의 nuclease-free water를 혼합하였다. 증폭반응은 실시간 모니터링이 가능한 PCR 증폭기(CFX96 Touch™ Real-Time PCR, BioRad, 미국)를 사용하여 95°C에서 3분간 1회, 95°C 15초의 변성, 60°C 15초의 결합 그리고 72°C 20초의 증합 과정을 40회 그리고 72°C에서 10분간 1회 실시하였다. 분석은 3반복으로 수행하였고, 각 시료에서의 유전자 발현량을 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>법에 따라 상대정량 하였다 (Pfaffl, 2001).

### 형질전환 벡터 제작과 현사시나무 형질전환

*PagGASA* 유전자의 과발현 벡터 제작을 위해 정방향 primer (5'-GAGTCTAGAGGATCCAGCACCATG-3')와 역방향 primer (5'-GGTAGCTAGAGCTCAAGGTCAAGGG-3')를 이용하여 PCR 증폭하였다. PCR 증폭에는 Ex-Taq DNA polymerase (Takara, Otsu, Shiga, 일본)를 사용하였으며 95°C에서 3분간 1회, 95°C 30초의 변성, 60°C 30초의 결합 그리고 72°C 1분의 증합 과정을 40회 그리고 72°C에서 10분간 1회 실시하였다. PCR 산물을 1.0% 아가로스 겔에서 분리하였다. 분리한 PCR 산물은 UltraClean 15 DNA purification kit(MoBio, 대한민국)를

이용하여 사용자 매뉴얼에 따라 정제하고, pGEM-T easy 벡터(Promega, 미국)에 클로닝 하였다. *GASA*의 삽입이 검증된 plasmid DNA를 제한효소 *Bam*HI과 *Sac*I으로 완전히 절단한 후 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동하고 분리하였다. 분리한 단편을 UltraClean 15 DNA purification kit(MoBio, 대한민국)를 사용하여 정제한 다음 pBI121 벡터의 *Bam*HI/*Sac*I 위치 에 삽입하여 과발현 벡터인 pBI121-*PagGASA*를 제작하였다.

*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 이용하여 현사시나무를 형질전환하였다. Kanamycin (50 µg/ml)에 의해 선발된 식물체의 형질전환 여부는 genomic DNA PCR 분석을 통하여 확인하였다. 형질전환체의 검증을 위해서는 정방향 primer (5'-TGCTTCACAAACCAAGGCAAGTAAT-3')와 역방향 primer (5'-CTTGTGGCCATAAGTACCAGGAGG-3')를 사용하였다. 형질전환된 식물체에서 도입 유전자의 발현을 확인하기 위하여 real-time qPCR을 실시하였다. 유전자의 발현 분석에는 *PagGASA* 유전자의 특이적 서열인 정방향 primer (5'-TAGC CTCAGTCGCAATTCTCCC-3')와 역방향 primer (5'-AGGCA TGTCGCACAGCATTT-3')를 사용하였다.

#### 형질전환체의 건조 스트레스 내성 분석

건조 스트레스 내성을 조사하기 위하여 현사시나무를 24±1°C, 50% 상대 습도 및 16시간 광/8시간 암의 광주기에서 8주간 생장시켰다. 건조 처리 1일 전에 토양 수분함량이 48%가 될 때까지 물을 준 다음, 11일간 물을 주지 않고 식물의 상태를 관찰하였다. 토양 수분함량은 moisture probe meter (ICT international Pty Ltd)를 사용하여 3반복으로 측정하였다. 엽록소 형광반응은 Pocket PEA chlorophyll fluorometer (Hansatech, 독일)를 사용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### GASA 유전자의 분리 및 구조 분석

식물에서 보고된 *GASA* 유전자와 상동성을 보이는 현사시나무 배양세포 유래의 cDNA 클론을 선발하였다(Lee et al. 2005). 선발된 클론의 전장 cDNA를 분리하여 염기서열을 결정하고 아미노산 서열을 분석한 결과, *P. trichocarpa*의 *PtGASA5* (XP\_006383339)와 단백질 수준에서 98%의 상동성을 나타내어 이를 *PagGASA* (*Populus alba* × *P. glandulosa* *Gibberellic acid stimulated Arabidopsis*)라 명명하고 그 특성을 구명하고자 하였다.

DNA 염기서열 분석 결과, *PagGASA*의 길이는 769 base pair (bp)로, 45번째 뉴클레오티드(nt)에서 개시코돈이 시작하여 329번째 nt에서 종결되는 285 bp 길이의 open reading frame을 가지는 것으로 나타났다. *PagGASA*에 의해 암호화

되는 예상 단백질은 95개의 아미노산으로 구성되며, 예상 분자량은 10.6 kDa이었다. *PagGASA* 단백질은 *P. trichocarpa*에서 보고된 *PtGASA5*와 98%의 가장 높은 아미노산 서열 상동성을 나타내었다. 또한 애기장대의 *AtGASA5*와는 65% 그리고 *AtGASA4*와는 50%의 상동성을 나타내었다.

대부분의 식물에서 보고된 *GASA* 패밀리의 단백질은 아미노 말단에 약 21 ~ 27개의 아미노산 서열로 구성된 시그널 펩티드와 카르복시 말단에 12개의 시스테인 잔기가 보존되어 있다. 특히, 아미노 말단에 시그널 펩티드가 존재 함으로써 세포 밖으로 분비되는 특징이 있으며, 이로 인해 *GASA* 단백질이 세포 외 환경에서 작용할 것으로 추정하였다 (Roxrud et al. 2007). 아미노산 서열 분석 결과 *PagGASA* 단백질은 아미노 말단에 시그널 펩티드(1 ~ 28번째 아미노산)와 카르복시 말단에 12개의 시스테인 잔기(37, 41, 45, 54, 58, 61, 62, 65, 67, 79, 81, 94번째 아미노산)가 존재 하였다(Fig. 1A). 따라서, 본 연구에서 분리한 *PagGASA*가 Roxrud et al. (2007)이 설명한 *GASA* 단백질의 전형적인 구조를 가짐을 확인하였다. 또한 단백질 계통분석 결과에서도 *PagGASA*는 *P. trichocarpa*의 *PtGASA5*와 애기장대의 *AtGASA5*와 가장 높은 유연관계를 나타내었다(Fig. 1B).

### Southern blot 분석

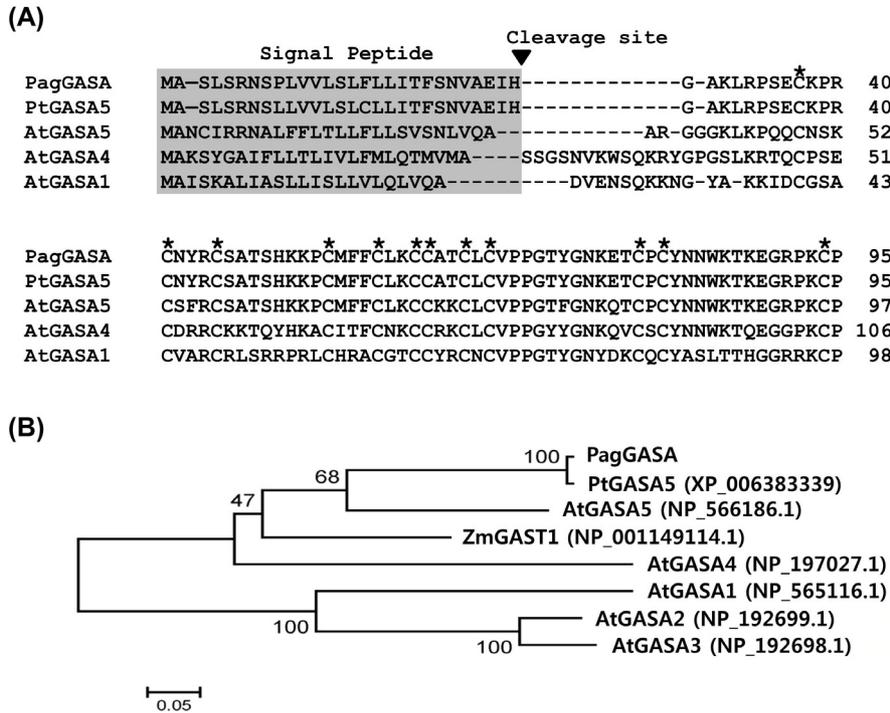
현사시나무의 잎에서 분리한 genomic DNA를 제한효소 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III 및 *Xba*I으로 완전히 절단한 다음, 방사능 표지한 전장의 *PagGASA* cDNA를 탐침으로 사용하여 Southern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 *Bam*HI, *Eco*RI과 *Xba*I으로 절단한 현사시나무의 genomic DNA에서는 각각 2개의 hybridized band가 확인되었고, *Hind*III로 절단한 genomic DNA에서는 1개의 hybridized band가 확인되었다(Fig. 2).

애기장대에서 *GASA* 유전자는 카르복시 말단의 서열 유사성에 의해 *AtGASA1*과 *AtGASA4*가 교차혼성화반응(cross-hybridization)이 일어난 결과가 보고된 바 있다(Herzog et al. 1995). 교차혼성화반응은 DNA 염기서열 상동성이 높은 DNA가 존재할 경우 흔히 일어나는 반응이다. 또한 *PagGASA*의 cDNA에는 제한효소 *Hind*III 절단부위는 135~140 nt의 위치에 한 개가 존재하고, *Xba*I의 절단부위는 각각 393 ~ 398 nt와 525 ~ 530 nt의 위치에 두 개가 존재하였다. 이를 바탕으로 *PagGASA*는 현사시나무의 유전체에 1 ~ 2 copy가 존재하는 것으로 추정된다.

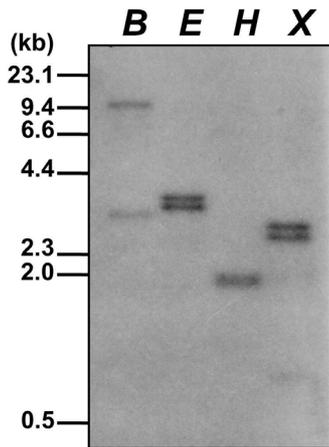
### *PagGASA* 유전자의 조직특이적 발현

*PagGASA* 유전자의 조직특이적 발현을 확인하기 위하여 현사시나무의 잎, 줄기, 뿌리, 꽃 및 엽병으로부터 total RNA를 분리하여 real-time qPCR 분석을 실시하였다. 그 결과, *PagGASA*의 발현은 뿌리와 꽃에서 가장 높게 나타났다(Fig. 3).

다른 식물에서 *GASA* 유전자의 조직 발현 양상을 살펴보면 기능에 따라 다양한 조직에서 특이적으로 발현되는 것

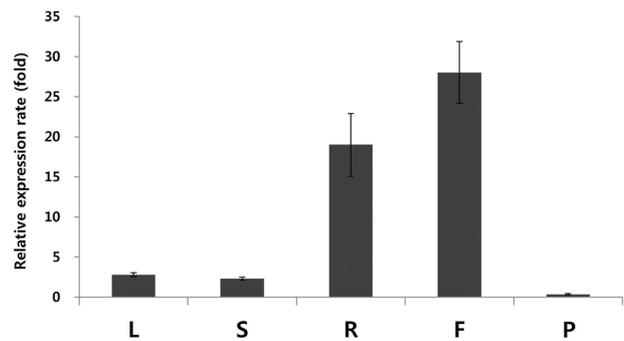


**Fig. 1** Sequence comparisons of *PagGASA* with other *GASA* homologues. (A) Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *PagGASA* with *GASA* homologues from *Arabidopsis thaliana* (*AtGASA1*, *AtGASA4*, *AtGASA5*) and *Populus trichocarpa* (*PtGASA5*). Signal peptides, involved in proper localization, are boxed. Asterisks indicate 12 conserved cysteine residues. (B) Phylogenetic tree of amino acid sequence of *PagGASA* with *GASA* from *Populus trichocarpa* (Pt), *Zea mays* (Zm) and *Arabidopsis thaliana* (At)



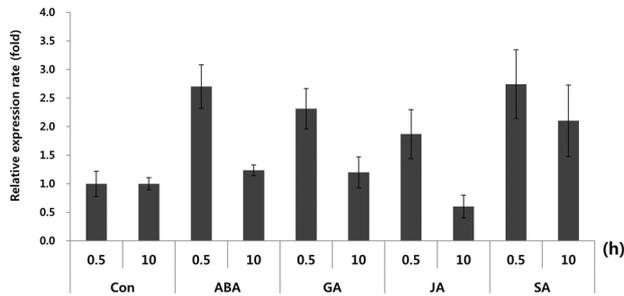
**Fig. 2** Genomic Southern blot analysis of the *PagGASA* in *Populus alba* × *P. glandulosa*. Genomic DNAs digested with *Bam*HI (B), *Eco*RI (E) or *Hind*III (H) were fractionated by electrophoresis on 1.0% agarose gel. The gel was blotted onto a nylon membrane, and hybridized with <sup>32</sup>P-labeled full-length *PagGASA* cDNA

을 확인할 수 있었다. 또한 현사시나무의 *GASA*처럼 애기장대의 *AtGASA4*도 뿌리에서 발현하는 것이 알려져 있으며 (Herzog et al. 1995), 토마토의 *RS1-1*과 옥수수의 *ZmGSL*은 측근의 초기 분화에 관여하는 것으로 보고되었다(Taylor et al. 1994; Zimmermann et al. 2010). 또한 꽃과 관련하여 애기장대



**Fig. 3** The tissue-specific expression level of *PagGASA*.. Real-Time qPCR analysis of total RNA extracted from mature leaves (L), stems (S), roots (R), flowers (F) and petioles (P) of *Populus alba* × *P. glandulosa*. Error bars show the standard deviation of expression levels

의 *AtGASA1*과 *AtGASA4*는 화아에서 발현되는 것이 보고되었고(Herzog et al. 1995), *AtGASA4*와 *AtGASA6*은 개화시기를 조절하는 역할을 하는 것이 알려져 있다(Qu et al. 2016). 이러한 연구사례를 통하여 조직특이적으로 뿌리와 꽃에서 발현하는 *PagGASA* 유전자의 기능이 세포의 신장과 분열 외에도 측근의 분화와 개화 조절에도 관여할 가능성을 유추할 수 있다.



**Fig. 4** The expression level of *PagGASA* under various phytohormone treatment conditions. *PagGASA* expression in response to treatment with plant growth regulators including ABA (25  $\mu$ M), GA (20  $\mu$ M), JA (10  $\mu$ M) and SA (20  $\mu$ M) for 0.5 and 10 h. The expression level of *PagGASA* represented as relative values when compared to those of untreated controls. Error bars show the standard deviation of expression levels

#### 식물 호르몬 처리에 따른 *PagGASA* 유전자의 발현

여러 식물에서 보고된 *GASA* 유전자들은 식물 호르몬에 의해 조절될 뿐 아니라 호르몬 신호전달과 생합성 과정에 직접 관여하는 것이 알려져 있다(Nahimk et al. 2012). 따라서 본 연구에서는 식물 호르몬이 현사시나무의 *GASA* 유전자 발현에도 영향을 주는지 확인하고자 하였다. ABA, GA, JA 그리고 SA를 각각 처리한 현사시나무의 배양세포로부터 RNA를 분리한 다음 real-time qPCR 분석을 실시하였다. 그 결과, 발현수준의 차이는 있지만 모든 처리구에서 0.5 시간 후에 *PagGASA*의 발현이 2배 이상 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 식물 호르몬 처리 후 10시간이 지났을 때 ABA와 GA에 의한 발현량은 대조구 수준으로 회복되었지만 SA의 경우에는 처리 후 10시간이 지났을 때에도 발현량의 감소 폭은 크지 않았으며, JA의 경우는 대조구에서의 발현량보다 절반으로 감소하는 특징을 보였다.

요약하면 현사시나무의 *GASA* 유전자는 스트레스 내성에 관여하는 것으로 알려진 ABA, JA 그리고 SA에 의해 발현이 조절되고, 길항 작용을 하는 것으로 알려진 GA와 ABA, 두 호르몬 모두에 의해 발현이 증가하는 특징을 보였다. 이러한 현상은 다른 식물에서 보고된 *GASA* 유전자들의 발현 양상과 구별되는 특성으로서 토마토 *GAST1*을 비롯한 많은 수의 *GASA* 상동유전자들은 GA에 의해 발현이 증가하고 ABA에 의해 감소하는 것이 알려져 있다(Shi et al. 1992; Cheng et al. 2004; Ko et al. 2007; Zhang et al. 2008). GA에 의해서 증가하지 않는 사례로서 애기장대의 *AtGASA5*, *AtGASA9*, *AtGASA11* 과 감자의 *SN-2* 등은 GA에 의해 감소하는 것이 보고되어 있고(Zhang et al. 2008; Zhang et al. 2009), 애기장대 *AtGASA9*는 ABA와 GA 두 호르몬에 의해 모두 발현이 감소하는 것이 알려져 있다(Zhang et al. 2008).

GA와 ABA가 아닌 다른 호르몬에 의해 조절되는 사례에는 애기장대의 *AtGASA1*과 벼의 *OsGSR1*이 브라시노스테로

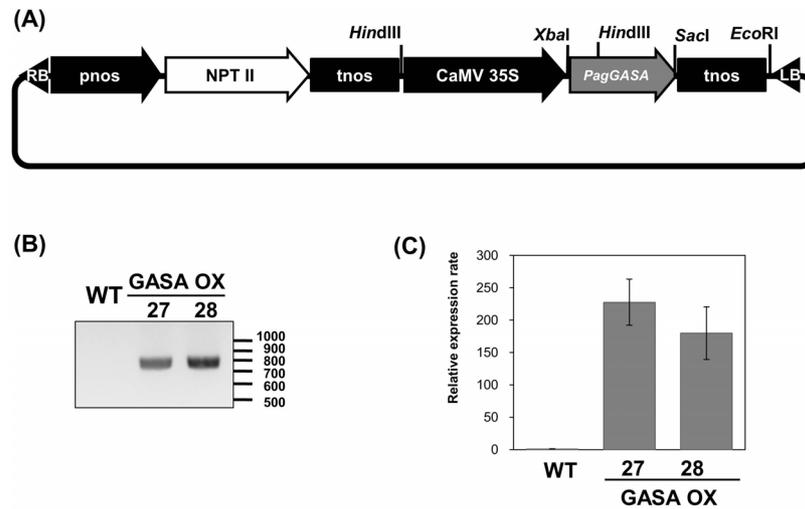
이드에 의해 감소한다는 보고가 있다(Wang et al. 2009; Bouquin et al. 2001). 또한 GA에 의해 증가된 *FsGASA4*는 SA 반응과 생합성에 관여하는 유전자들을 증가시킨다고 알려져 있는데(Alonso-Ramirez et al. 2009), *PagGASA* 유전자가 SA 처리 후 10시간 후에도 발현량이 계속 유지되고 있는 특징(Fig. 4)은 이러한 양성 피드백을 통한 것으로 유추할 수 있다. 이러한 사실들은 *GASA* 유전자가 서로 다른 호르몬 신호전달 간의 상호작용에 참여한다는 것을 보여주는 것으로서 *GASA* 유전자들이 식물 발달 및 환경 조건에 대한 반응에 관여하는 기작을 이해하는데 실마리를 제공하여 줄 것으로 기대한다.

#### *PagGASA* 형질전환 현사시나무의 건조 스트레스 내성

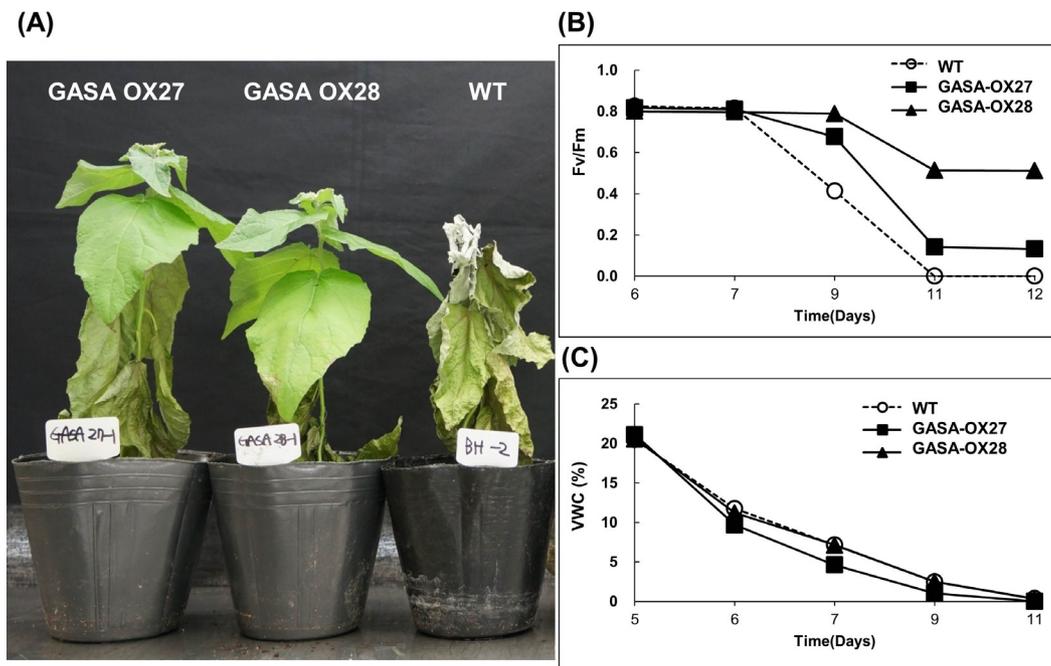
*PagGASA* 유전자가 ABA, JA, SA와 같은 스트레스 내성 관련 호르몬에 의해 발현이 증가하였기 때문에 스트레스 반응을 포함한 기능을 구명하기 위해서 *PagGASA* 유전자의 발현이 조절된 형질전환체를 제작하였다. pBI121 벡터를 기본골격으로 하여 CaMV 35S::*PagGASA* construct를 제작하였고(Fig. 5A), 이를 *Agrobacterium*에 도입한 후 현사시나무에 형질전환하였다. 형질전환 여부는 삽입된 T-DNA 부분을 증폭할 수 있는 primer를 이용하여 genomic DNA PCR 분석을 통하여 확인하였다(Fig. 5B). 또한 형질전환체에서의 *PagGASA*의 발현을 real-time qPCR 분석으로 확인한 결과 27번과 28번 계통의 형질전환체에서 대조구에 비하여 약 150배 이상의 *PagGASA* 발현량이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 5C).

형질전환된 현사시나무를 이용하여 *PagGASA*의 과발현이 건조 스트레스 내성에 영향을 주는지를 조사하였다. 단수 처리 후 11일 경과했을 때 *PagGASA* 과발현 현사시나무가 대조구에 비하여 건조 내성을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 6A). 잎의 고사 정도를 육안으로 확인한 결과 대조구는 전체적으로 고사하였고, 27번 계통은 하단부의 잎들이 고사하였으며, 28번 계통은 고사 정도가 경미하였다. 그리고 단수 처리 후 토양 함수율이 0%가 되는 11일까지(Fig. 6C) 잎의 고사 정도를 알아보기 위하여 엽록소 형광반응을 통하여 광합성 효율을 측정하였다(Fig. 6B). 함수율 5% 이내가 되는 단수 9일째에 대조구 잎의 광합성 효율이 50% 감소할 동안 *PagGASA* 과발현 현사시나무들은 광합성 효율이 90% 이상을 유지하였다. 토양 함수율이 0%가 되는 단수 11일째에 대조구는 광합성 효율 0%로 고사하였고, 27번 계통도 약 10% 수준으로 감소하였으나 28번 계통은 약 75% 정도의 광합성 효율을 유지하였다(Fig. 6B). 이러한 결과는 *PagGASA* 발현량의 증가가 건조 내성에 영향을 주는 것을 시사한다.

그러나 Fig. 5C의 결과를 토대로 27번 계통이 28번 계통보다 *PagGASA* 발현량이 더욱 높음에도 불구하고 광합성 효율 및 잎의 고사 표현형과 비례하지는 않는 것을 확인하였



**Fig. 5** Generation of *PagGASA* overexpression transgenic tree using *Agrobacterium*-mediated transformation. (A) Strategy for construction of expression vector pBI121, containing the *PagGASA* under the control of the CaMV 35S promoter. (B) Confirmation of *PagGASA* transgenic tree by genomic DNA PCR. (C) Relative *PagGASA* transcript levels in each transgenic line. The expression level of transgenic plants of lines #27, and #28 were reconfirmed using real-time qPCR



**Fig. 6** Physiological responses of the *PagGASA* transgenic plants after water outage. (A) Phenotypic responses of wild-type (WT) and *PagGASA* overexpression plants after 11 days under dehydration conditions. (B) Chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) of WT and transgenic plants. (C) The volumetric water content in the soil of WT and transgenic plant pots. Data represent the average of three replicates

다. 이것은 호르몬 신호전달 상호작용을 통한 감쇠 기작이 작동하거나, 형질전환을 통해 T-DNA가 삽입된 위치의 주변부 서열에 의한 간접적인 효과가 개입되었을 가능성을 예상할 수 있다. *PagGASA*를 통한 스트레스 내성 효과에 대한 총체적인 이해를 돕기 위하여 다양한 스트레스 내성의 조사와 식물 호르몬들과의 신호전달 상호작용 네트워크의 분석이 필요할 것으로 생각된다. 이는 향후 *GASA* 유전자의

도입과 발현 조절을 통한 스트레스 내성 임목 개발에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

## 결론

*GASA*는 GA에 의해 조절되는 식물 유전자로서, 여러 식물

에 보존되어 있고 다양한 조직에서 식물의 생장과 발달 및 스트레스 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 *GASA* 유전자를 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)에서 분리하여 이를 *PagGASA*라 명명하고, 유전자의 구조와 발현특성을 조사하였다. *PagGASA* 유전자는 95개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하며, 아미노 말단에 시그널 펩티드 영역과 카르복시 말단에 12개 시스테인 잔기가 보존되어 있다. *PagGASA*는 현사시나무의 염색체에 1~2 copy 존재하며, 꽃과 뿌리에서 높게 발현하였다. 또한 *PagGASA*는 GA 뿐 아니라 ABA와 JA, SA와 같은 스트레스 관련 식물 호르몬의 처리에 의해서 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 현사시나무에 형질전환하여 *PagGASA*를 과발현시킨 결과 건조 내성에 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 *PagGASA*는 스트레스 관련 식물 호르몬 신호전달과 연결되어 건조 스트레스 방어기작에서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

## References

- Alonso-Ramirez A, Rodriguez D, Reyes D, Jimenez JA, Nicolas G, Lopez-Climent M, Gomez-Cadenas A, Nicolas C (2009) Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol* 150:1335–1344
- Atkinson NJ, Urwin PE (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot* 63: 3523–3543
- Aubert D, Chevillard M, Dorne AM, Arlaud G, Herzog M (1998) Expression patterns of *GASA* genes in *Arabidopsis thaliana*: the *GASA4* gene is upregulated by gibberellins in meristematic regions. *Plant Mol Biol* 36:871–883
- Ballen-Taborda C, Plata G, Ayling S, Rodriguez-Zapata F, Lopez-Lavalle LAB, Duitama J, Tohme J (2013) Identification of cassava microRNAs under abiotic stress. *Int J Genomics* 2013:articleID 857986
- Ben-Nissan G, Weiss D (1996) The petunia homologue of tomato *gast1*: transcript accumulation coincides with gibberellin-induced corolla cell elongation. *Plant Mol Biol* 32:1067–1074
- Ben-Nissan G, Lee JY, Borohov A, Weiss D (2004) *GIP*, a *Petunia hybrida* GA-induced cysteine-rich protein: a possible role in shoot elongation and transition to flowering. *Plant J* 37:229–238
- Bouquin T, Meier C, Foster R, Nielsen ME, Mundy J (2001) Control of specific gene expression by gibberellins and brassinosteroid. *Plant Physiol* 127:450–458
- Cheng H, Qin L, Lee S, Fu X, Richards DE, Cao D, Luo D, Harberd NP, Peng J (2004) Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131:1055–1064
- de la Fuente JI, Amaya I, Castillejo C, Sanchez-Sevilla JF, Quesada MA, Botella MA, Valpuesta V (2006) The strawberry gene *FaGAST* affects plant growth through inhibition of cell elongation. *J Exp Bot* 57:2401–2411
- Furukawa T, Sakaguchi N, Shimada H (2006) Two *OsGASR* genes, rice *GAST* homologue genes that are abundant in proliferating tissues, show different expression patterns in developing panicles. *Genes Genet Syst* 81:171–180
- Golldack D, Luking I, Yang OS (2011) Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep* 30:1383–1391
- Herzog M, Dorne AM, Grellet F (1995) *GASA*, a gibberellin-regulated gene family from *Arabidopsis thaliana* related to the tomato *GAST1* gene. *Plant Mol Biol* 27:743–752
- Hirayama T, Shinozaki K (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* 61:1041–1052
- Kim YH, Kim MD, Choi YI, Park SC, Yun DJ, Noh EW, Lee HS, Kwak SS (2011) Transgenic poplar expressing *Arabidopsis NDPK2* enhances growth as well as oxidative stress tolerance. *Plant Biotechnol J* 9:334–347
- Ko CB, Woo YM, Lee DJ, Lee MC, Kim CS (2007) Enhanced tolerance to heat stress in transgenic plants expressing the *GASA4* gene. *Plant Physiol Biochem* 45:722–728
- Kotilainen M, Helariutta Y, Mehto M, Pollanen E, Albert VA, Elomaa P, Teeri TH, (1999) *GEG* participates in the regulation of cell and organ shape during corolla and carpel development in *Gerbera hybrida*. *Plant Cell* 11:1093–1104
- Lee HS, Lee JS, Noh EW, Bae EK, Choi YI, Han MS (2005) Generation and analysis of expressed sequence tags from poplar (*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*) suspension cells. *Plant Sci* 169:1118–1124
- Lee HS, Bae EK, Park SY, Sjödin A, Lee JS, Noh EW, Jansson S (2007) Growth-phase-dependent gene expression profiling of poplar (*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*) suspension cells. *Physiol Plantarum* 131:599–613
- Li KL, Bai X, Li Y, Cai H, Ji W, Tang LL, Wen YD, Zhu YM (2011) *GsGAS1* mediated root growth inhibition in response to chronic cold stress is marked by the accumulation of *DELLAs*. *J Plant Physiol* 168:2153–2160
- Luo LJ (2010) Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. *J Exp Bot* 61:3509–3517
- Nahirnak V, Almasia NI, Hopp HE, Vazquez-Rovere C (2012) Snakin/GASA proteins. *Plant Signal Behav* 7(8):1004–1008
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2014) The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in Plant Sci* 5(170):25–31
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45
- Qu J, Kang SG, Hah C, Jang J-C (2016) Molecular and cellular characterization of GA-Stimulated Transcripts *GASA4* and *GASA6* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 246:1–10
- Roxrud J, Lid SE, Fletcher JC, Schmidt ED, Opsahl-Sorteberg HG (2007) *GASA4*, one of the 14-member *Arabidopsis GASA* family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. *Plant Cell Physiol* 48:471–483
- Shi L, Gast RT, Gopalraj M, Olszewski NE (1992) Characterization of a shoot-specific, GA3- and ABA-regulated gene from tomato.

- Plant J 2:153-159
- Sun S, Wang H, Yu H, Zhong C, Zhang X, Peng J, Wang X (2013) *GASA14* regulates leaf expansion and abiotic stress resistance by modulating reactive oxygen species accumulation. J Exp Bot 64:1637-1647
- Taylor BH, Scheuring CF (1994) A molecular marker for lateral root initiation: the *RSI-1* gene of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is activated in early lateral root primordia. Mol Gen Genet 243:148-157
- Wang L, Wang Z, Xu Y, Joo SH, Kim SK, Xue Z, Xu Z, Wang Z, Chong K (2009) *OsGSR1* is involved in crosstalk between gibberellins and brassinosteroids in rice. Plant J 57:498-510
- Zhang S, Wang X (2008) Expression pattern of *GASA*, downstream genes of *DELTA*, in *Arabidopsis*. Chinese Sci Bull 53: 3839-3846
- Zhang S, Yang C, Peng J, Sun S, Wang X (2009) *GASA5*, a regulator of flowering time and stem growth in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol 69:745-759
- Zhong C, Xu H, Ye S, Wang S, Li L, Zhang S, Wang X (2015) *AtGASA6* serves as an integrator of gibberellin-, abscisic acid- and glucose-signaling during seed germination in *Arabidopsis*. Plant Physiol 169:2288-2303
- Zimmermann R, Sakai H, Hochholdinger F (2010) The gibberellic acid stimulated-like gene family in maize and its role in lateral root development. Plant Physiol 152:356-365