

현사시나무에서 Dormancy-associated protein 1 (*DRM1*) 유전자의 분리와 발현 특성 구명

윤서경 · 배은경 · 최현모 · 최영임 · 이효신

Isolation and Expression of Dormancy-associated protein 1 (*DRM1*) in Poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*)

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

Received: 1 February 2017 / Revised: 17 March 2017 / Accepted: 17 March 2017

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Dormancy-associated protein (DRM) is involved in the dormancy physiology of plants and is conserved in almost all plant species. Recent studies found that DRM genes are involved in the abiotic stress response, and characterization studies of these genes have been conducted in several plants. However, few studies have focused on DRM genes in woody plants. Therefore, in this study, cDNA coding for DRM (*PagDRM1*) was isolated from poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*), and its structure and expression characteristics were investigated. *PagDRM1* encodes a putative protein composed of 123 amino acids, and the protein contains two conserved domains (Domain I and Domain II). *PagDRM1* is present as one or two copies in the poplar genome. Its expression level was highest in the stem, followed by mature leaves, roots, and flowers. During the growth of cultured cells in suspension, *PagDRM1* was highly expressed from the late-exponential phase to the stationary phase. In addition, *PagDRM1* expression increased in response to drought, salt stress, and treatment with plant hormones (e.g., abscisic acid and gibberellic acid). Therefore, we suggested that *PagDRM1* not only plays an important role in the induction of dormancy, but also contributes to stress

tolerance in plants.

Keywords Abiotic stress, Dormancy, Gene expression, *PagDRM1*, *Populus alba* × *P. glandulosa*

서론

식물은 발달과정 동안 여러 종류의 환경 스트레스로부터 지속적인 피해를 받는다. 환경 스트레스는 생물적 스트레스와 비생물적 스트레스로 구분되며, 건조 및 고염 등의 비생물적 스트레스는 산림의 생산성을 제한하는 가장 큰 요인으로 주목받고 있다(Atkinson and Urwin 2012; Gollmack et al. 2011; Kirilenko et al. 2007). 식물은 환경 스트레스에 대한 방어기작 중의 하나로 일정기간 발달과 성장이 일시적으로 정지하는 휴면(dormancy)을 선택한다. 이와 관련하여 비생물적 스트레스와 휴면 조절에 관해 여러 식물에서 보고된 바 있다(Lang et al. 1987; Rae et al. 2014). 최근 유전체학 기술의 발전에 힘입어 식물의 휴면 조절에 관여함과 동시에 다양한 비생물적 스트레스에 반응하는 유전자에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Govind et al. 2009; Hwang et al. 2005; Lee et al. 2013; Ueno et al. 2013).

*Dormancy-associated protein (DRM)*은 휴면 시에 발현이 유도되는 대표적인 유전자로, 완두콩에서 처음 보고되었다(Stafstrom et al. 1998). *DRM* 유전자는 주로 휴면상태에 있는 액아에서 발현되며(Kebrom et al. 2006; Tatematsu et al. 2005), 많은 식물에서 눈의 휴면, 잎의 성숙, 종자의 발아 그리고 생장에 관여하는 것으로 보고되었다(Soeda et al. 2005; Stafstrom 2000; Tatematsu et al. 2005; Wood et al. 2013). *DRM* 유전자가 식물의 스트레스 반응을 조절하는 것으로 알려지면서 다양

S.-K. Yoon · E.-K. Bae · H. Choi · Y.-I. Choi · H. Lee (✉)
국립산림과학원 산림유전자원부
(Department of Forest Genetic Resources, National Institute of Forest Science, 39 Onjeong-ro, Suwon 16631, Republic of Korea)
e-mail: hyoshinlee@korea.kr

S.-K. Yoon
서울대학교 산림과학부
(Department of Forest Sciences, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Seoul 08826, Republic of Korea)

한 식물에서 이 유전자의 발현 분석이 활발히 이루어지고 있다. 즉, *DRM* 유전자는 애기장대(Rae et al. 2014), 배추(Lee et al. 2013) 그리고 땅콩(Govind et al. 2009) 등의 식물에서 건조, 염, 상처 및 동결 등의 비생물적 스트레스에 반응하여 발현되는 것으로 보고되었다. 이러한 결과는 *DRM* 유전자가 식물의 생활주기에서 일어나는 휴면 뿐 아니라 비생물적 스트레스 반응에도 관련이 있다는 것을 의미한다. 따라서 이 유전자의 발현을 조절함으로써 나무를 포함한 식물의 성장과 발달을 좋게 하면서 환경 스트레스에 대한 내성의 획득이 가능할 것으로 기대되고 있다 (Rae et al. 2013; Soeda et al. 2005).

나무는 수백 년에 걸친 긴 수명과 고착생활로 인하여 예측할 수 없이 변화하는 다양한 환경 스트레스에 반복적으로 노출되기 때문에 스트레스 반응을 조절하는 유전자의 기능을 분석하고 이용하는 기술의 개발이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)에서 *DRM1* 유전자(*PagDRM1*)를 분리하여 유전자의 구조 및 발현특성을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양

식물재료로 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)를 사용하였으며, 배양세포는 현사시나무의 잎에서 유도하였다 (Choi et al. 2001). 정지기에 도달한 0.4 g의 배양세포를 100 mL의 현탁배양배지에 3~4주 간격으로 계대배양 하였다 (Lee et al. 2005). 세포는 22±1°C의 약한 광조건 (20 μmol m⁻² s⁻¹)에서 120 rpm으로 현탁배양 하였다. 유전자 발현 분석을 위해 계대 후 배양 4, 8, 12, 16, 18, 20, 24 및 26일째의 세포를 취하였다(Lee et al. 2007). 조직특이성 분석을 위하여 잎, 줄기 및 뿌리는 1년생 삼목묘로부터, 꽃은 25년생 나무로부터 채취하였다. 모든 시료는 즉시 액체질소에 얼린 다음 -80°C에 보관하였다.

유전자 분리 및 아미노산 서열 분석

배양세포에서 분리한 mRNA를 사용하여 제작한 cDNA library 유래의 EST (expressed sequence tag) 클론 분석(Lee et al. 2005)을 통하여 식물에서 보고된 *DRM* 유전자와 상동성을 나타내는 cDNA 클론을 선발하였다. 선발된 cDNA 클론의 전체 염기서열을 결정된 다음 CLC Main Workbench 7.5 (Qiagen, Germany)를 이용하여 예상 아미노산 서열을 조사하였다. 단백질의 상동성 분석은 Uniprot program (<http://www.uniprot.org/align/>)의 ClustalW algorithm을 사용하였고, phylogenetic tree는 MEGA4.1 (<http://www.megasoftware.net/index.html#30>)을

사용하여 Neighbor-Joining 방법으로 작성하였다.

Southern blot 분석

DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 현사시나무의 잎에서 genomic DNA를 분리하였다. 10 μg의 genomic DNA를 제한효소 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III 및 *Xba*I으로 각각 완전히 절단하였다. 1% agarose gel에 전기영동한 다음 capillary transfer 방법으로 gel 상의 DNA를 Hybond-XL nylon membrane (Amersham-Pharmacia Biotech, UK)에 전이시켰다. Membrane을 0.1 mg/mL의 변성된 연어 정소 DNA가 첨가된 1× PerfectHYB plus hybridization buffer (Sigma, USA)에 넣고 68°C에서 30분간 전처리 하였다. α-³²P로 표식된 전장의 *PagDRM1* cDNA probe를 첨가한 다음 68°C에서 12시간 동안 hybridization 하였다. 반응이 끝난 membrane을 0.2× SSC - 0.1% SDS 용액으로 15분간 3회 세정한 다음 X-ray 필름에 노출시킨 후 현상 하였다.

비생물적 스트레스 및 호르몬 처리

배양세포에 건조 (mannitol, 250 mM)와 염 (NaCl, 150 mM) 스트레스를 각각 처리한 다음 2시간과 10시간 후에 세포를 회수하였다. 저온처리를 위해 배양세포가 들어있는 삼각 플라스크를 얼음에 꽂아 배지의 온도가 약 2°C가 되게 얼음을 넣어 조절한 후 2시간과 10시간 동안 진탕배양 하였다. 식물 호르몬 반응을 조사하기 위하여 salicylic acid (SA, 20 μM), abscisic acid (ABA, 25 μM), jasmonic acid (JA, 10 μM) 및 gibberellic acid (GA₃, 20 μM)를 각각 배양 배지에 첨가하고 0.5 및 10시간 후에 세포를 회수하였다. 대조구는 동일한 배양세포를 아무런 처리 없이 시간 별로 각각 회수하였다. 모든 실험은 3반복으로 수행하였고, 회수한 시료는 즉시 액체질소에 얼린 다음 -80°C에 보관하였다.

Total RNA 분리 및 Real-time qPCR 분석

RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. 10 μg의 total RNA를 1.2% formaldehyde agarose gel에 전기영동하였다. Real-time qPCR 분석에 사용한 primer는 Primer3 프로그램(<http://fokker.wi.mit.edu>)으로 설계하였다. PCR 증폭산물의 정량을 위한 내부표준으로는 actin 유전자를 사용하였다(Kim et al. 2011). *PagDRM1* 유전자의 PCR 증폭에는 정방향(5'-ATCATGCCAGGAAGTCCA GGGA-3') 및 역방향(5'-TTCGTCTCTCCACTGTACATCCAG-3') primer를 사용하였다. Actin 유전자의 PCR 증폭을 위하여 정방향(5'-GCCATCTCTCATCGGAATGGAA-3') 및 역방향(5'-AGGG CAGTGATTCCTTGCTCA') primer를 사용하였다. 1 μg의 total RNA로부터 cDNA를 합성하였다(RNA to cDNA EcoDry premix,

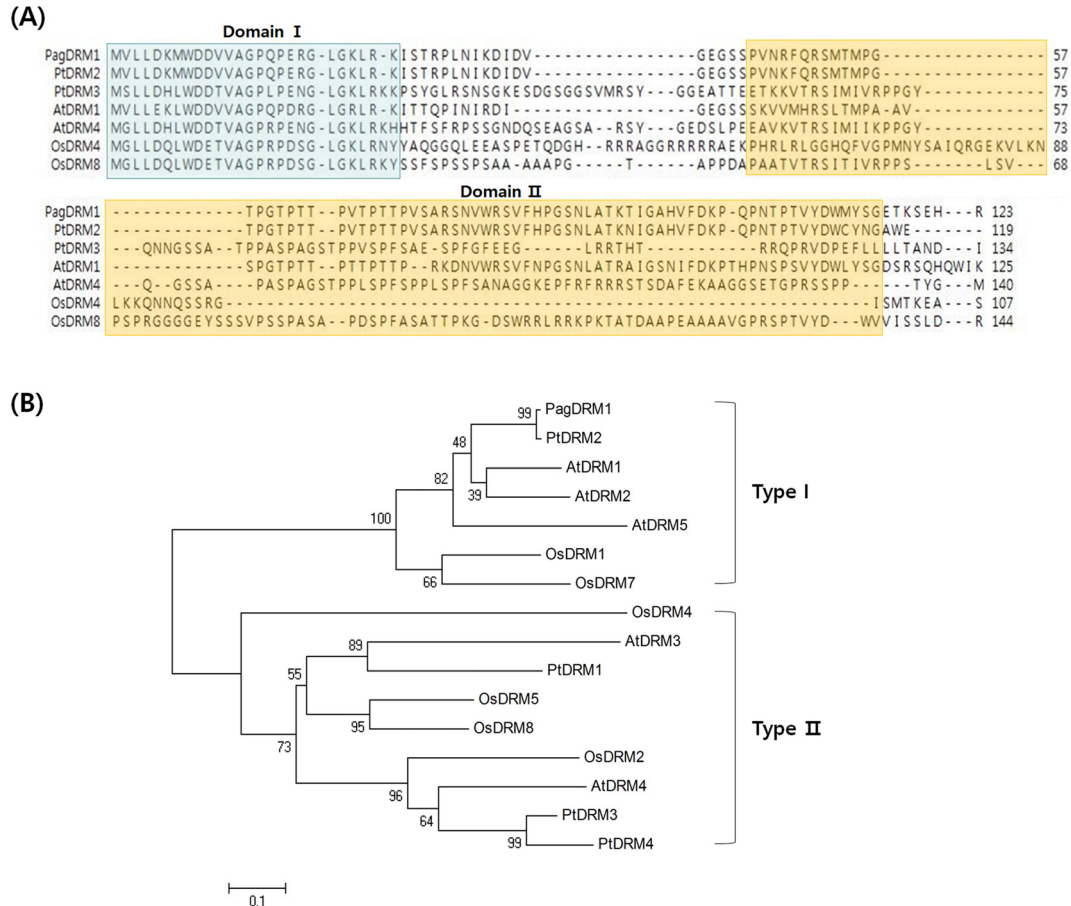


Fig. 1 Amino acid sequence comparisons of PagDRM1 and other DRM homologues. (A) Multiple alignments of the deduced amino acid sequences of PagDRM1 and DRM homologues. Amino acid domains (Domain I and Domain II) are boxed. (B) Phylogenetic tree based on the PagDRM1 amino acid sequence and DRM sequences from *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), and *Populus trichocarpa* (Pt). The DRM family proteins used in this analysis include AtDRM1 (NP_001154378), AtDRM2 (NP_850220), AtDRM3 (NP_175809), AtDRM4 (NP_849820) and AtDRM5 (NP_199243) from *Arabidopsis thaliana*, OsDRM1 (ABA95234), OsDRM2 (ABA95871), OsDRM4 (NP_001061955), OsDRM5 (NP_001063265), OsDRM7 (AAL78369) and OsDRM8 (EEC83671) from *Oryza sativa*, and PtDRM1 (XP_002304241), PtDRM2 (XP_002305123), PtDRM3 (XP_002319507) and PtDRM4 (XP_002330171) from *Populus trichocarpa*.

Clontech, USA). PCR 증폭반응을 위해 PCR Master Mix (2× SYBRGreen, BioRad, USA)의 매뉴얼에 따라 반응시켰다. 증폭반응은 실시간 모니터링이 가능한 PCR 증폭기(CFX96 Touch™ Real-Time PCR, BioRad, USA)를 사용하여 95°C에서 3분간 1회, 95°C 15초, 60°C 15초 그리고 72°C 20초의 과정을 40회 그리고 72°C에서 10분간 1회 실시하였다. 분석은 3반복으로 수행하였고, 각 시료에서의 유전자 발현량을 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 법에 따라 상대정량하였다(Pfaffl 2001).

결과 및 고찰

DRM1 유전자의 분리 및 구조 분석

현사시나무 배양세포 유래의 cDNA library에서 선발한 EST 분석 결과에서 *DRM1* 유전자의 cDNA 클론을 선발하였다

(Lee et al. 2005). 이를 *PagDRM1* 이라 명명하고 그 특성을 구명하였다. DNA 염기서열 분석 결과 *PagDRM1*의 길이는 674 base pair (bp)로, 16번째 nucleotide (nt)에서 개시코돈이 시작하여 384번째 nt에서 종결되는 369 bp 길이의 open reading frame를 가지는 것으로 나타났다. *PagDRM1*은 123개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하며, *P. trichocarpa*에서 보고된 PtDRM2와 97%의 높은 아미노산 서열 상동성을 보였다(Fig. 1A). 또한 벼의 OsDRM8과는 69% 그리고 애기장대의 AtDRM4와는 62%의 상동성을 보였다. 한편 *Populus euphratica*의 XM_011029490.1 및 XM_011029491.1과 각각 99%와 97%의 서열 상동성을 나타내었다(결과 미제시).

DRM 단백질에는 2개의 보존영역(domain I과 domain II)이 존재하거나 혹은 1개의 보존영역(domain I)이 존재하는 것으로 알려져 있다(Kim et al. 2007; Steiner et al. 2003). 아미노산 서열 분석 결과 *PagDRM1*에는 1번 아미노산부터 26번

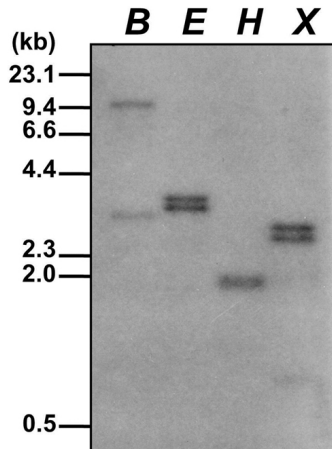


Fig. 2 Genomic Southern blot analysis of the *PagDRM1* in *Populus alba* × *P. glandulosa*. Genomic DNA digested with *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Hind* III (H) or *Xba*I (X) was fractionated by electrophoresis on a 1.0% agarose gel. The gel was blotted onto a nylon membrane and was then hybridized with P^{32} -labeled full-length *PagDRM1* cDNA.

아미노산까지 domain I이 존재하고, 45번 아미노산부터 115번 아미노산까지 domain II가 존재하는 것으로 나타났다. DRM은 domain 구조와 아미노산 서열 특성에 따라 Type I과 Type II로 구분한다(Wood et al. 2013). 단백질의 유연관계 분석 결과 본 연구에서 분리한 *PagDRM1*은 Type I에 속하며, *P. trichocarpa*의 *PtDRM2*와 가장 높은 유연관계를 나타내었다(Fig. 1B). 하지만 각 그룹(Type I과 Type II)의 생리적 기능에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다(Wood et al. 2013). 한편 Liu 등(2011)은 Type I 단백질인 *Populus trichocarpa*의 *PtDRM2*의 61번, 63번 그리고 70번째 위치한 트레오닌(T^{61} , T^{63} , T^{70})이 단백질의 인산화 작용에 관여한다고 보고하였다. 같은 Type I에 속하는 *PagDRM1*과 다래나무의 *Ade_DRM1* (Wood et al. 2013)에도 이 서열이 잘 보존되어 있는 것으로 확인되었다.

Southern blot 분석

현사시나무의 잎에서 분리한 genomic DNA를 제한효소 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III 및 *Xba*I으로 완전히 절단한 다음 방사능 표지한 전장의 *PagDRM1* cDNA를 탐침으로 사용하여 Southern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 *Eco*RI 또는 *Xba*I으로 절단한 현사시나무의 genomic DNA에서는 1개의 hybridized band가 확인되었다(Fig. 2). *Bam*HI 또는 *Hind*III로 절단한 genomic DNA에서는 각각 2개의 hybridized band가 확인되었으며, *PagDRM1* 유전자 내에는 제한효소 *Hind*III 절단부위가 한 개 존재 하였다. 이상의 결과를 고려하여 *PagDRM1*은 현사시나무의 게놈에 1~2 copy가 존재하는 것으로 판단되었다.

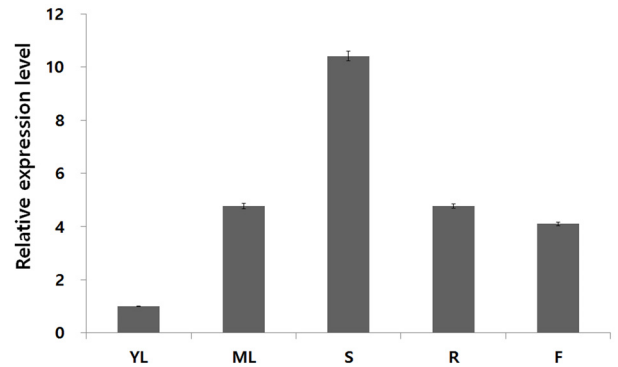


Fig. 3 Tissue-specific expression of *PagDRM1*. Total RNA was extracted from the young leaves (YL), mature leaves (ML), stems (S), roots (R), and flowers (F) of *Populus alba* × *P. glandulosa*. Error bars show the standard deviations of the expression levels.

PagDRM1 유전자의 조직특이적 발현

PagDRM1 유전자의 조직특이적 발현을 확인하기 위하여 현사시나무의 잎, 줄기, 뿌리 및 꽃으로부터 total RNA를 분리하여 real-time qPCR 분석을 실시하였다. 그 결과 *PagDRM1*의 발현은 줄기에서 가장 높게 나타났다(Fig. 3). 어린 잎에서의 *PagDRM1* 유전자의 발현량을 기준으로 비교한 결과 줄기에서 10배로 가장 높았고 성숙 잎, 뿌리 및 꽃에서는 각각 4배 이상의 높은 발현 수준을 나타내었다.

완두콩의 *PsDRM2*는 줄기, 잎 및 뿌리에서 높게 발현되었고(Stafstrom et al. 1998), 수수의 *sbDRM1* 유전자는 액아에서 높은 발현을 나타내었다(Kebrom et al. 2010). 또한, 배추의 *BrDRM1* 유전자는 뿌리, 성숙 잎 및 다양한 꽃기관 등에서 발현이 높은 것으로 보고된 바 있다(Lee et al. 2013). *DRM* 유전자는 주로 휴면상태에 있는 액아에서 발현된다고 알려져 있지만 그 외의 다른 조직에서 발현되는 결과가 여러 식물에서 보고되었다. 이러한 결과를 통하여 *DRM* 유전자가 조직 특이적으로 발현하지 않으며, 식물의 다양한 조직에서 기능할 것으로 판단되었다.

배양세포의 성장주기에서 *PagDRM1* 유전자의 발현

현사시나무 배양세포의 성장주기에서 *PagDRM1* 유전자의 발현양상을 확인하기 위하여 각 시기별 배양세포로부터 RNA를 분리한 다음 real-time qPCR 분석을 실시하였다. 현사시나무의 배양세포는 유도기에 이어 배양 8~16일에 지수생장기를 거친 후 정지기에 이르는 식물 배양세포의 전형적인 S자형 성장곡선을 나타내었다(Lee et al. 2007) (Fig. 4A).

PagDRM1 유전자는 늦은 지수생장기에 해당하는 16일부터 발현이 증가하여 정지기인 배양 20일째에 가장 높은 발현을 나타내었고, 26일까지 높은 발현 수준을 유지하였다(Fig. 4B). 현사시나무의 배양세포에서는 유도기에 DNA가

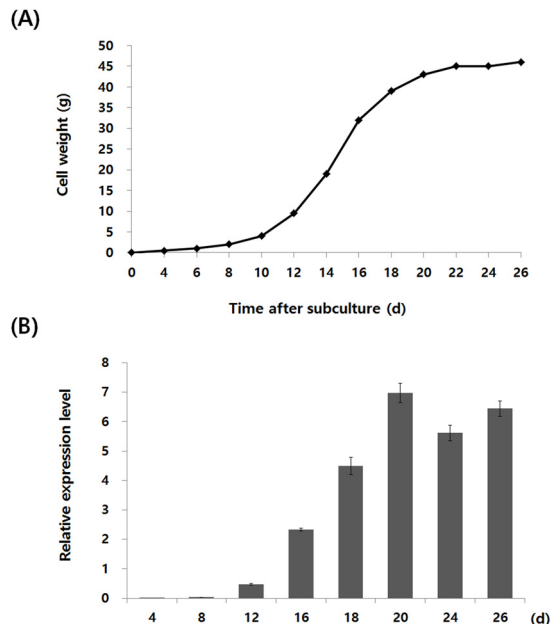


Fig. 4 Expression levels of *PagDRM1* in poplar cells during normal growth in suspension culture. (A) Growth kinetics of poplar cells in suspension culture. After sub-culturing, the fresh cellular mass was maintained for 26 days. (B) Expression levels of *PagDRM1* during normal growth in suspension culture. Total RNA was extracted from cells at the indicated times

합성되고, 초기 지수생장기에 세포분열과 생장이 활발히 이루어진다. 이후 정지기에 이르러 배지 내의 양분이 고갈되어 생장이 정지된다(Lee et al. 2007). DRM 유전자의 발현은 식물의 휴면생리와 연관되어 있으며(Rae et al. 2013), *PagDRM1*이 정지기에서 높게 발현하는 것을 통해 이 유전자가 세포의 노화 및 세포사 과정에서 일어나는 과정에 관여할 것으로 판단되었다.

완두콩에서 세포성장 마커로 알려진 *PsRPL27* 유전자의 발현이 증가할 때 *PsDRM1* 유전자의 발현이 크게 감소하였으며(Stafstrom et al. 1998), 양다래에서 세포성장기인 G1기와 DNA 복제시기인 S기에 *AdDRM1* 유전자의 발현이 감소하는 것으로 나타났다(Wood et al. 2013). 따라서 본 연구에서 분리한 *PagDRM1*의 발현이 세포분열이 활발히 일어나는 시기에 나타나지 않으며, 세포생장이 정지되는 시기에 증가한 것으로 판단되었다. 이러한 사실은 식물에서 잎의 노화, 휴면 및 세포예정사(programmed cell death)와 관련된 유전자의 발현이 배양세포의 노화기 즉, 정지기에 발현된다는 보고와 일치하는 것이다(Correa et al. 2008; Hosseini and Mulligan 2001).

비생물적 스트레스 및 식물 호르몬 처리에 따른 *PagDRM1* 유전자의 발현

식물은 불량한 환경에서 스스로 성장을 멈추고, 노쇠 및 휴

면과 같은 과정을 거쳐 환경에 적응한다(Gepstein and Gillick 2013; Pnueli et al. 2002). 식물의 DRM 유전자는 휴면조절에 관여할 뿐 아니라 다양한 비생물적 스트레스에 의해서도 발현이 증가한다고 알려져 있다(Hwang et al. 2005; Lee et al. 2013; Stafstrom et al. 2000). 따라서 본 연구에서는 비생물적 스트레스 처리가 *PagDRM1* 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 건조(mannitol, 250 mM), 염(NaCl, 150 mM) 및 저온(2°C)을 처리한 배양세포로부터 RNA를 분리한 다음 real-time qPCR 분석을 실시하였다. 그 결과 건조처리에 의해서는 2시간 후에 발현이 증가하기 시작하여 처리 10시간 후에는 약 45배로 현저히 높은 발현을 나타내었으며, 염 처리구에서는 처리 2시간 후에 4배 이상의 발현 증가를 나타내었다. 반면, 저온처리에 의해서는 발현에 차이를 보이지 않았다(Fig. 5A). 이러한 결과는 현사시나무의 *PagDRM1* 유전자가 건조와 염 스트레스에 반응하여 발현이 증가함을 의미한다.

염과 건조 처리에 의한 DRM 유전자의 발현 증가는 애기장대(*AtDRM1.1*, *AtDRM2*)에서도 보고된 바 있다(Rae et al. 2014). 또한 배추의 *BrDRM1* (Lee et al. 2013)과 땅콩의 *AhDRM1* 유전자도 염과 건조에 의해 발현이 증가하는 것으로 나타났다(Govind et al. 2009).

건조와 염 스트레스에 반응하는 유전자의 상당수는 ABA를 포함한 다양한 식물호르몬 신호전달경로를 통해 조절되는 것으로 알려져 있다(Suzuki 2016). 따라서 본 연구에서는 현사시나무의 배양세포에 ABA, GA, JA 그리고 SA를 각각 처리한 다음 *PagDRM1* 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 ABA에 의해서는 처리 0.5시간 후에 발현이 2배 이상 증가하였고, GA 처리에서는 10시간 후에 발현이 3.1배로 증가하였다(Fig. 5B).

건조와 염 스트레스에 반응하는 유전자의 경우 ABA 신호전달경로에 의해 조절되는 기작이 잘 알려져 있다(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). ABA에 의한 DRM 유전자의 발현 증가는 완두콩(Stafstrom et al. 2000)과 토마토(Vriezen et al. 2008)에서 보고되었다. 완두콩의 *PsDRM1*은 본 연구결과와 유사하게 ABA에 의해 발현이 증가하지만 GA에 대해서는 반응하지 않았다(Stafstrom et al. 2000). 그러나 애기장대의 *AtDRM1.2*와 *AtDRM1.4*는 GA에 의해 발현이 감소하는 것으로 나타났다(Rae et al. 2014). 따라서 GA 처리에 따른 *PagDRM1* 유전자의 반응은 다른 식물에서 보고된 DRM 유전자의 발현특성과는 차이가 있는 것이다. 반면, JA에 의해서는 처리 0.5시간에서 *PagDRM1*의 발현이 크게 감소하였는데, JA에 의한 DRM 유전자의 발현 감소는 애기장대에서도 보고된 바 있다(Rae et al. 2014).

이상의 결과와 연구사례들은 DRM 유전자가 다양한 비생물적 스트레스 및 식물 호르몬에 대하여 식물에 따라 다르게 반응함을 의미한다. 따라서 *PagDRM1* 유전자의 스트레스 반응을 포함하여 그 기능을 구명하기 위해서는 *PagDRM1*

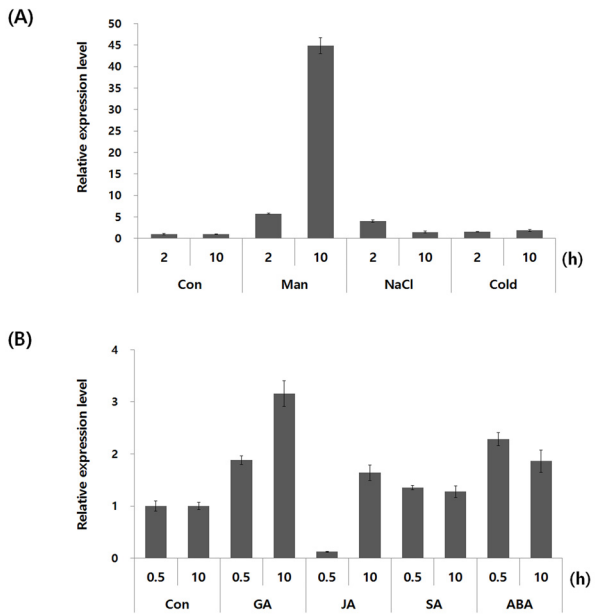


Fig. 5 Expression levels of *PagDRMI* under various treatment conditions. (A) *PagDRMI* expression in response to treatment with mannitol (250 mM, Man), NaCl (150 mM), and cold (2°C) for 2 and 10 h. Untreated control cells were incubated for the same time periods. (B) *PagDRMI* expression in response to treatment with plant growth regulators including ABA (25 μM), JA (10 μM), SA (20 μM), and GA (20 μM) for 0.5 and 10 h. *PagDRMI* expression levels are presented as relative values when compared to those of untreated controls. Error bars show the standard deviation of the expression levels.

유전자의 발현이 조절된 형질전환체를 이용한 기능 분석이 필요할 것으로 생각된다. 이는 향후 *PagDRMI* 유전자의 도입과 발현 조절을 통한 스트레스 내성 나무의 개발에 도움을 줄 것으로 기대된다.

적 요

Dormancy-associated protein (DRM)은 식물의 휴면생리에 관여하는 대표적인 단백질로 거의 모든 식물에 보존되어 있다. 최근 DRM 유전자가 비생물적 스트레스 반응에 관여하는 것으로 알려지면서 이 유전자의 특성구명 연구가 여러 식물에서 이루어지고 있다. 그러나 아직까지 나무에서는 DRM 유전자에 대한 연구가 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 DRM 유전자를 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)에서 분리하여 이를 *PagDRMI*이라 명명하고, 유전자의 구조와 발현특성을 조사하였다. *PagDRMI* 유전자는 123개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하며, 2개의 영역(Domain I과 Domain II)이 잘 보존되어 있다. *PagDRMI*은 현사시나무의 엽색체에 1~2 copy가 존재하며, 줄기에서 가장 높게 발현하였고 성숙 잎, 뿌리 및 꽃에서도 높은 발현 수준을 나타내었다. 현탁배양세포의 생장주기에서는 늦은

지수생장기부터 정지기까지 높게 발현하였다. 또한 *PagDRMI*은 건조와 염 스트레스에 반응하여 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 식물호르몬 처리에 의해서는 ABA와 GA 처리에 의한 발현 증가를 나타내었다. 따라서 *PagDRMI*은 식물의 휴면유도 과정에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 환경 스트레스 내성에도 기여하는 것으로 생각된다.

References

- Atkinson NJ, Urwin PE (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot* 63: 3523-3543
- Correa LGG, Riano-Pachon DM, Schrago CG, Santos RV, Mueller-Roeber B, Vincenz M (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS ONE* 3:e2944
- Choi YI, Noh EW, Han MS, Yi YS (2001) Estimation of cellular damages caused by paraquat and lead using a cell culture system. *Plant Biotechnol J* 3:83-88
- Gepstein S, Glick BR (2013) Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. *Plant Mol Biol* 82:623-633
- 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
- Govind G, Harshavardhan VT, Patricia JK, Dhanalakshmi R, Senthil Kumar M, Sreenivasulu N, Udayakumar M (2009) Identification and functional validation of a unique set of drought induced genes preferentially expressed in response to gradual water stress in peanut. *Mol Genet Genomics* 281: 591-605
- Hosseini R, Mulligan BJ (2001) Application of rice (*Oryza sativa* L.) suspension culture in studying senescence *in vitro* (I). Single strand preferring nuclease activity. *Electron J Biotechnol* 5: 1-13
- Hwang EW, Kim KA, Park SC, Jeong MJ, Byun MO, Kwon HB (2005) Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions. *J Biosci* 30:657-667
- Kebrom TH, Burson BL, Finlayson SA (2006) Phytochrome B represses *Teosinte Branched1* expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. *Plant Physiol* 140:1109-1117
- Kebrom TH, Brutnell TP, Finlayson SA (2010) Suppression of sorghum axillary bud outgrowth by shade, phyB and defoliation signaling pathways. *Plant Cell Environ* 33:48-58
- Kim HB, Lee H, Oh CJO, An CS (2007) Expression of *EuNOD-ARPI* encoding auxin-repressed protein homolog is upregulated by auxin and localized to the fixation zone in root nodules of *Elaeagnus umbellate*. *Mol Cells* 23:115-121
- 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

- Kirilenko AP, Sedjo RA (2007) Climate change impacts on forestry. *PNAS* 104: 19697-19702
- Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell RL (1987) Endo-, para- and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience* 22:371-377
- Lee HS, Lee JS, Noh EW, Bae EK, Choi YI, Han MS (2005) Generation and analysis of expressed sequence tags from poplar 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 suspension cells. *Physiol Plantarum* 131:599-613
- Lee J, Han CT, Hur Y (2013) Molecular characterization of the *Brassica rapa* auxin-repressed, superfamily genes, *BrARPI* and *BrDRM1*. *Mol Biol Rep* 40:197-209
- Liu CC, Liu CF, Wang HX, Shen ZY, Yang CP, Wei ZG (2011) Identification and analysis of phosphorylation status of proteins in dormant terminal buds of poplar. *BMC Plant Biol* 11:158-173
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002-2007
- Pnueli L, Hallak-Herr E, Rozenberg M, Cohen M, Goloubinoff P, Kaplan A, Mittler R (2002) Mechanisms of dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J* 31:319-330
- Rae GM, David D, Wood M (2013) The dormancy marker *DRM1/ARP* associated with dormancy but a broader role *In planta*. *Dev Biol J* (Article ID 632524)
- Rae GM, Uversky VN, David K, Wood M (2014) *DRM1* and *DRM2* expression regulation: potential role of splice variants in response to stress and environmental factors in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics* 289:317-332
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3:217-223
- Soeda Y, Konings MCJM, Vorst O, Houwelingen AMML, Stoopen GM, Maliapaard CA, Kodde J, Bino RJ, Groot SPC, Geest AHM (2005) Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiol* 137:354-368
- Stafstrom JP, Ripley BD, Devitt ML, Drake B (1998) Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. Cloning and expression of *PsDRM1* and *PsDRM2*. *Planta* 205:547-552
- Stafstrom JP (2000) Regulation of growth and dormancy in pea axillary buds. In: JDVAJ Crabbe (ed) *Dormancy in Plants*. CAB International, Wallingford 331-346
- Steiner C, Bauer J, Amrhein N, Bucher M (2003) Two novel genes are differentially expressed during early germination of the male gametophyte of *Nicotiana tabacum*. *Biochim Biophys Acta* 1625:123-133
- Suzuki N (2016) Hormone signaling pathways under stress combinations. *Plant Signal Behav* 11:e1247139
- Tatematsu K, Ward S, Leyser O, Kamiya Y, Nambara E (2005) Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138:757-766
- Ueno S, Klopp C, Leple C, Derory J, Noirot C, Leger V, Prince E, Kremer A, Plomion C, Provost GL (2013) Transcriptional profiling of bud dormancy induction and release in oak by next-generation sequencing. *BMC Genomics* 14:236
- Vriezen WH, Feron R, Maretto F, Keijman J, Mariani C (2008) Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytol* 177:60-76
- Wood M, Rae GM, Wu RM, Walton EF, Xue B, Hellens RP, Uversky VN (2013) *Actinidia DRM1*-an intrinsically disordered protein whose mRNA expression is inversely correlated with spring budbreak in kiwifruit. *PLoS ONE* 8:e57354