

스트레스에 의한 식물세포 손상에서 Biphasic Reactive Oxygen Species(ROS)와 Ethylene 생합성의 Synergism 효과

지나리 · 박기영

Stress-induced biphasic ethylene and ROS biosynthesis are synergistically interacted in cell damage

Na Ri Ji · Ky Young Park

Received: 14 March 2011 / Accepted: 19 March 2011

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Although reactive oxygen species (ROS) are inevitable by-products of many redox reactions in eukaryotic cells, they play a crucial role as signaling molecules in many cellular processes for development and defense response to abiotic stresses. The biphasic ROS production which was peaked twice in a first transient phase and a second massive phase was occurred after treatment of abiotic stress such as oxidative stress, high salinity. This biphasic generation of ROS was followed by the biphasic production of stress hormone, ethylene. The mechanism of interactions between ROS and ethylene biosynthesis is studied in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants under the abiotic stresses. The stress-induced ethylene production was significantly inhibited in *RbohD-AS* and *RbohF-AS*, in which antisense expression of NADPH oxidase genes was performed. The accumulation of ROS, which was determined by DAB and DCFH-DA staining, was significantly decreased after abiotic stresses in transgenic plants. The suppression of signaling with ethylene and ROS induced more tolerance in response to abiotic stress. The transgenic plants were more tolerant in MS medium supplemented with salinity stress in contrast with wild-type. Stress-induced cell damage determined by DNA fragmentation was decreased at phase II in those transgenic plants. Therefore, the first burst of ROS is more responsible for making a role as a signaling molecule during

stress-induced response. These results suggested that ethylene and ROS act in a positive feedback cycle that results in mutual enhancement of ethylene and ROS production during stress-induced cell death.

서론

식물과 동물은 발달 과정 중 노화과정이나 스트레스에 노출되게 되는데 병원균, 가뭄, 과도한 고온과 저온, 고광도, 고염분 등의 다양한 비생물학적/생물학적 스트레스가 있으며 식물은 대부분 변화가 많은 환경 조건에서 살게 되는데, 특히 식물의 성장과 발달에 지장을 초래하는 환경조건에 처하게 되므로 (Boyer 1982; Thomashow 2001; Bohnert et al. 1995) 스트레스에 대해 식물은 유전자 발현 변화 또는 세포의 대사작용 변화를 일으키게 된다 (Knight and Knight 2001). 이러한 비생물학적 스트레스가 가해지면 일시적으로 활성산소군의 생성이 크게 증가하여 식물 성장에 불리하게 작용하기 때문에 식물의 생산성과 작물의 질이 떨어지는 등 식물에 해를 입히게 된다 (Inzé and Montague 1995). 활성 산소군 (Reactive oxygen species, ROS) 은 superoxide radical (O_2^-), hydroxyl radical ($OH\cdot$), 그리고 hydrogen peroxide (H_2O_2) 등으로 식물체내에서 과잉 생산되면 생체 내에서 세포막과 단백질을 분해하고 DNA 합성을 저해할 뿐 아니라 다른 세포구성 성분에 산화적 스트레스를 일으키며 (Fridovich 1986; Bartosz 1997; Foyer and Noctor 2000), 그 중 H_2O_2 는 낮은 농도에서도 엽록체에서의 광합성률을 저하시키며 치명적 피해를 식물에 일으킨다 (Alscher et al. 1997). 스트레스에 의한 활성산소군의 축적은 동시에 세포 사멸을 초래하기 때문에 식물체

N. R. Ji · K. Y. Park (✉)
순천대학교 생명산업과학대학 생물학과
(Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon,
Chonnam 540-742, Korea)
e-mail: plpm@suncheon.ac.kr

에서는 활성산소균을 생성하는 시스템과 이를 제거하는 시스템사이의 적절한 균형인 redox homeostasis를 유지하기 위하여 적절한 antioxidant system이 이루어진다 (Rennenber and Polle 1994). 그러므로 정상적인 상태에서 활성산소균은 superoxide dismutase (SOD), peroxidase, catalases (CAT) 등의 효소적인 방법과 그 외에 서로 다른 세포 기관에서 작용하는 비효소적인 방법에 의해 효과적으로 제거되지만 (Noctor and Foyer 1998), 스트레스가 지속적으로 주어지게 되면 그러한 해독 작용 체계가 포화되어 세포 손상은 물론 작물 생산량 저하를 일으키게 되는 것이다 (Ishitani et al. 1997). H_2O_2 를 포함한 활성산소균은 hypersensitive cell death 등을 비롯한 여러 종류의 신호 전달과정을 유도하고, ethylene 등이 관계되는 신호 전달과정을 활성화시킨다 (Overmyer et al. 2000; Rao et al. 2000). 이렇게 다양한 스트레스에 대한 반응에서 ethylene은 세포 사멸을 포함한 방어반응을 일으키는 신호 전달과정에 중요한 역할을 하며 활성산소균 축적 유도와 관련되어 있음을 알 수 있다 (Overmyer et al. 2000).

또한 ethylene은 기체 형태의 식물 호르몬으로서 과일의 성숙, 잎과 꽃의 노화, 종자의 발아, 탈리, 기관의 형태적인 반응 (삼중반응) 등 다양한 생리적 과정에 관여하고 있다 (Woodson et al. 1992). 고등식물의 모든 조직은 ethylene을 생성할 수 있지만, 보통 그 생성량은 매우 낮은 수준으로 유지된다 (Abeles et al. 1992). 그러나 ethylene 생성은 식물의 발생과 분화 단계상의 여러 요인 및 다양한 환경 요인에 의해 조절된다고 알려져 왔다. 식물이 상처를 받거나 병원균의 공격을 받았을 때, 그리고 산소의 부족, 가뭄, 냉해 등 다양한 스트레스에 의해서도 ethylene 합성이 유도된다. 또한 ethylene은 과일 성숙 호르몬 또는 스트레스 호르몬이라고 알려져 있으며 (Yang and Hoffman 1984; Theolosis 1992) 병원균 감염과 다양한 비생물학적 스트레스에서 signaling response로서 중요하다 (Chung et al. 2008; Díaz et al. 2002). Ethylene 생합성을 통제하고 ethylene pathway의 활성을 조절하는 것은 식물의 발달 과정과 스트레스 반응의 중재로서 매우 중요하다고 알려져 왔다 (Achard et al. 2006; Cao et al. 2006; Zhijin Zhang et al. 2009). 그러므로 스트레스 환경에서 생성이 가속화되는 ROS에 의한 세포의 산화적 손상을 피하기 위해 식물은 주로 다른 파괴적인 라디칼로 전환되지 않으면서 ROS를 제거할 수 있는 화합물인 항산화제와 그러한 반응을 촉매하거나 ROS를 직접 처리하는데 관여하는 효소인 항산화 효소를 이용한 방어 기작을 통해 ROS의 유익한 기능의 작동이 계속되게 하면서, 손상을 막아 활성산소를 조절해왔다 (Jin-Song Zhang et al. 2007). 이러한 과정을 통하여 세포 내 농도가 제어된 ROS는 신호물질로도 작용하여 성장과 발달, 생물학적/비생물학적 스트레스에 대한 방어반응 및 programmed cell death (PCD) 등 여러 가지 반응을 일으

킨다 (Luis AJ et al. 2009). 또한 식물에서 ROS는 기공폐쇄, 뿌리생장, 굴지성과 같은 여러 가지 반응에 있어서 중요하다 (Desikan et al. 2005). 이러한 과정에서 ethylene이 ROS를 생성하여 방어반응을 유도하는 신호전달물질인가 아니면 단지 이 과정에서 유도된 스트레스 ethylene이 식물의 노화를 일으켜 식물을 죽게 만드는 원인인가에 대해 아직도 명확하게 결론이 도출되지 못하였다.

ROS는 식물세포에서 integral membrane protein인 NADPH oxidase의 작용에 의해 생성되며 (Miklós P et al. 2009), 본 논문에서는 ROS 생성에 관여하는 유전자인 *RbohD*와 *RbohF*의 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체 (*RbohD-AS*, *RbohF-AS*)를 이용하여 스트레스 저항성에 관하여 연구하였다. 식물체가 산화적 스트레스나 염분 스트레스 등 비생물학적 스트레스를 받게 되면 30분 이내에 ROS가 축적되고 이후 ethylene 합성효소인 *NtACS4*의 유전자 발현에 의해 ACC가 새롭게 생성되어 ethylene이 1시간에 최대로 생성되는 초기 반응을 확인하였다 (Wi SJ et al. 2010). 이때 생성된 ethylene에 의해 다시 ROS가 3시간 정도에 생성되며 그 결과 후기에서 다량의 ethylene이 생성되었는데 이때 생성된 ethylene의 양에 따라 식물이 저항성을 나타내거나 혹은 죽게 되는 것으로 보인다. 본 연구에서는 ROS 생성에 관여하는 유전자인 *RbohD*와 *RbohF*의 유전자 발현이 억제된 *RbohD-AS*, *RbohF-AS* 형질전환 식물체에 고염분과 산화적 스트레스 등을 처리했을 때 ROS 생성과 축적, ethylene 생성에 따른 저항성을 확인하였다. 또한 후기의 다량 생성된 ethylene의 최고치에 따른 세포 사멸을 통해 *RbohD-AS*, *RbohF-AS* 형질전환 식물체에서의 cell death 감소를 확인하였다.

따라서 스트레스 과정에서 가장 공통적으로 작용하는 두 가지 물질인 ethylene과 ROS 관계 속에 ROS가 ethylene의 upstream에 존재할 것이라는 점에 초점을 맞추어 상호 synergism을 일으켜 저항성을 유도하며 ROS 생성에 관여하는 유전자인 *RbohD*와 *RbohF*의 유전자 발현이 억제된 *RbohD-AS*, *RbohF-AS* 형질전환 식물체에서 스트레스 저항성에 관하여 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양조건

본 연구에서는 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv Wisconsin 38) 식물체를 사용하여 ROS생성에 관여하는 유전자의 발현이 억제된 식물체를 제조하기 위하여 *RbohD*, *RbohF*를 antisense 방향으로 도입하여 제조한 형질전환 돌연변이 식물체를 사용하였다 (Fig. 1). 확보한 *RbohD*, *RbohF*의 antisense 형질전환 식물체들의 라인들 중에서 활성산소

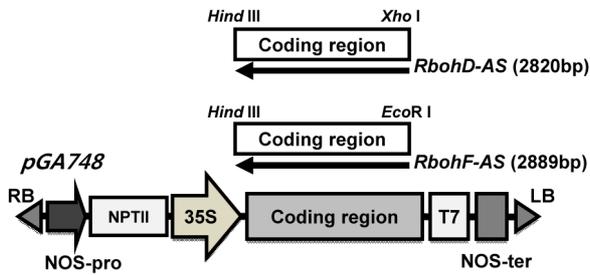


Fig. 1 Diagram of the 35S::RbohD antisense and 35S::RbohF antisense chimeric genes. *RbohD* cDNA and *RbohF* cDNA were separately inserted into each the *Hind*III, *Xho*I or *Eco*RI sites of pGA748 in the reverse direction. The constructs were confirmed by sequence analysis and used for the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation with tobacco leaf. 35S, CaMV 35S; LB, left border; NPT II, neomycin phosphotransferase II; NOS-P, nopaline synthase gene promoter; NOS-T, 3' terminator region of the nopaline synthase gene; RB, right border; T7, transcript 7 terminator.

생성이 가장 억제된 라인들을 선별하여 본 연구의 실험 재료로 사용하였다. 광량은 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 30$ 으로서 16 시간 광조건과 8시간 암조건이며, $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 으로 설정되어 있는 배양실에서 재배하였다. T0 식물체에서 얻은 T1 종자 및 T2 종자 혹은 T3 종자는 살균 소독한 후 kanamycin ($100 \mu\text{g/ml}$)이 첨가되어 있는 $0.5 \times \text{MS}$ agar 배지에 치상하여 25°C 로 유지되는 growth chamber에서 3~4주일 동안 키운 후 흠에 옮기거나 배양병에 옮겨 실험재료로 사용하였다.

ROS 정량 분석

야생형 식물체의 잎 조직을 수확하여 스트레스 ($20 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ 와 200 mM NaCl)를 처리한 후 각 시간에 맞춰 액체 질소를 이용하여 즉시 마쇄한 후 10 mM Tris (hydroxymethyl)aminomethane (Tris) buffer (pH 7.2)를 첨가하여 원심분리 ($2,000 \text{ xg}$, 5 min , 4°C) 하였다. 상등액을 옮긴 후 추출물 2.4 ml 과 $24 \mu\text{l}$ $0.1 \text{ mM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate}$ (H_2DCFDA) (SigmaChemicals, StLouis, Mo, USA)을 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 dark 상태로 10분간 incubation 하였으며 Spectrofluorophotometer를 이용하여 excitation 485 nm /emission 525 nm 파장에서 형광을 측정한 후 각각 sample의 protein양을 정량하여 각각의 sample의 값을 계산하였다.

H_2O_2 의 축적 확인

야생형 식물체와 형질전환 식물체의 잎의 뒷면을 벗겨서 $20 \text{ mM Phosphate buffer}$ 에 안정화 시켰다. $20 \text{ mM Phosphate buffer}$ 100 ml 에 100 mM 의 DCFH-DA ($2',7'$ -dichlorofluorescein diacetate)의 stock을 준비하여 final 농도 $10 \mu\text{M}$ 로 첨가한 후 벗긴 조직을 잘 넣어서 10분간 염색 하였으며, 염색된 조직을 DCFH-DA가 첨가되지 않은 신선한 buffer를 이용하여 깨끗하게 washing을 해주었다. 먼저 confocal로 basal

level을 관찰한 후 $20 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ 와 200 mM NaCl 이 주어진 buffer에 넣어 적정시간 동안 처리한 후 washing하여 관찰 하였다.

야생형 식물체와 형질전환 식물체의 잎 전체를 수확하여 스트레스 ($20 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ 와 200 mM NaCl)를 처리하여 DAB 용액에 5~8시간 동안 담근 상태로 25°C 에 방치하였다. DAB이 염색된 잎 조직은 에탄올 (96%)에 10분 동안 끓인 후 cooling 시켜서 에탄올이 들어있는 상태로 실온에서 보관하면서 탈색된 잎 조직을 디지털카메라로 촬영하였다.

Ethylene 측정

야생형 식물체와 형질전환 담배 식물체의 잎 조직을 수확하여 스트레스 ($20 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ 와 200 mM NaCl)를 처리한 후 6 ml 용기에 넣어 공기가 새지 않게 밀봉하여 1시간 동안 ethylene을 포집한 후 1 ml 용 주사기로 용기 내 기체를 채취하였다. Gas chromatography를 이용하여 ethylene 양을 측정하였으며, 시료의 생중량과 용기의 부피를 이용하여 ethylene 생성량을 계산하였다.

NaCl 처리 된 배지에서 WT과 형질전환 식물체의 발아 비교 관찰

200 mM NaCl 이 처리 된 $0.5 \times \text{MS}$ agar medium에서 야생형 식물체와 형질전환 식물체를 동시에 치상하여 25°C 로 유지되는 growth chamber에서 20일 동안 발아 후 디지털카메라로 촬영하였으며 root growth를 측정하였다.

Genomic DNA 분리 후 DNA fragmentation 분석을 통한 cell death 확인

야생형 식물체와 형질전환 담배 식물체의 잎 조직을 수확하여 스트레스 ($20 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ 와 200 mM NaCl)를 처리하여 ethylene 후기 peak에서 잎 조직을 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 DNA 추출용액 [0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl , 20 mM EDTA , $2\% \text{ CTAB}$, $0.2\% \beta$ -mercaptoethanol]을 혼합하여 65°C 에 10분간 방치하였다. 4°C , $12,000 \text{ rpm}$ 에서 15분 동안 원심분리하여 얻은 상등액에 chloroform을 첨가하여 혼합하고 반복된 원심분리로 얻은 상등액을 이용하여 ethanol precipitation을 수행하였다. 상기과정에서 얻은 DNA pellet을 $50 \mu\text{l TE}$ buffer에 녹여 $1 \mu\text{l RNase}$ (10 mg/ml)를 첨가하여 30분간 실온에서 반응시켜 RNA를 제거하였다. 최종적으로 얻은 genomic DNA를 정량 분석하였다. Genomic DNA를 정량 분석한 후 $15 \mu\text{g}$ 을 $1.6\% \text{ agarose gel}$ 에 5시간 동안 전기영동 (45 V/gel cm) 한 후 EtBr 염색을 하여 UV상에서 DNA fragmentation의 변화를 확인하였다.

결과 및 고찰

비생물학적 스트레스 처리 후 ROS 정량 분석

스트레스 처리 후 생성되는 ROS를 정량적으로 분석하기 위해 야생형 식물체에서 비생물학적 스트레스로 산화적 스트레스와 염분 스트레스를 (20 mM H₂O₂, 200 mM NaCl) 각각 처리 후 ROS 생성을 확인한 결과 대조구에 비해 평균히 높은 수준의 ROS가 생성되는 것을 확인하였다. 또한, 스트레스 처리 후 30분이 지났을 때 일시적으로 1차 peak를 형성하였다가 거의 basal level까지 감소하고 다시 증가하여 3시간 후에 상당히 오랫동안 지속되는 다량의 2차 peak를 형성한 후 다시 거의 basal level로 낮아지는 두 번의 ROS 생성 peak가 biphasic 양상이 나타났다 (Fig. 2). 따라서 스트레스 반응에서 ROS 생성의 biphasic한 양상을 확인하였으며 이러한 두 번의 ROS peak가 스트레스 signal로 작용할 것인지 혹은 앞의 peak만 스트레스 signal로 작용하고 있는 것인지에 대한 추가 연구가 필요 할 것으로 사료된다.

ROS 생성이 억제된 형질전환 식물체에서 비생물학적 스트레스 처리에 대한 ethylene 생성 확인

스트레스 처리 시 생성되는 ROS를 확인한 후 ROS 생성 유전자인 *RbohD*와 *RbohF* 유전자 발현이 억제된 *RbohD-AS*, *RbohF-AS* 형질전환 식물체에서 활성산소 생성이 적은 라인을 각각 선별 (*RbohD-AS* #10, *RbohF-AS* #8) 하였다. 이

를 이용하여 스트레스 (20 mM H₂O₂, 200 mM NaCl)를 처리한 후 시간에 따른 ethylene 생성량을 측정하였다 (Fig. 3). 전체적으로 보았을 때 *RbohD-AS*, *RbohF-AS* 형질전환 식물체에서는 야생형 식물체에 비해 전반적으로 ethylene의 양이 적게 측정되었으며 이는 *RbohD-AS*와 *RbohF-AS* 식물체에서 스트레스에 의해 생성되는 ROS의 생성이 억제되었으며 그 결과로 스트레스에 대한 ethylene 생성이 더 적은 것으로 보여졌다. 또한 biphasic ROS 생성은 스트레스 처리 후 30분과 3시간에 나타났지만 ethylene의 biphasic peak는 스트레스 처리 후 1시간과 30시간에 최대치를 이루었다. 따라서 ethylene의 생성은 ROS 생성의 downstream에 위치하고 있는 것으로 여겨진다. 또한 이 결과에서 보면 ROS 생성이 낮으면 ethylene 생성이 낮아짐으로써 ethylene과 ROS는 서로 synergism을 갖고 합성이 되고 있는 것으로 여겨졌으며, 한편으로 서로의 생합성을 촉진하고 이 과정에서 biphasic 양상을 나타내게 된다고 여겨진다.

비생물학적 스트레스에서 ROS 축적과 형질전환 식물체에서 억제 효과 관찰

ROS 생성 억제에 관여하는 유전자의 발현이 억제된 *RbohD-AS*, *RbohF-AS* 형질전환 식물체를 이용하여 ROS 축적을 조사한 결과 H₂O₂와 NaCl의 모든 처리구에서 ROS 축적

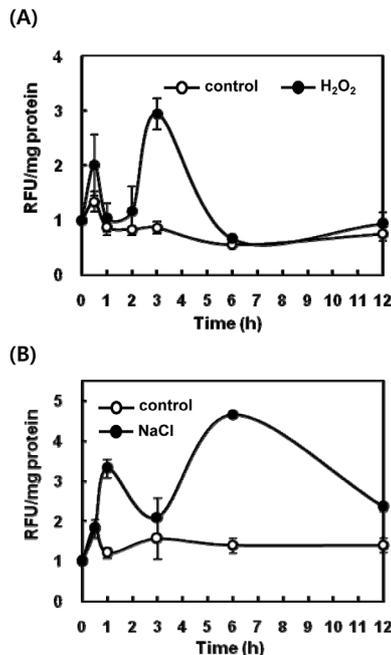


Fig. 2 ROS production in leaves of wild type plant after treatment with H₂O₂ 20 mM (A) and NaCl 200 mM (B) stresses

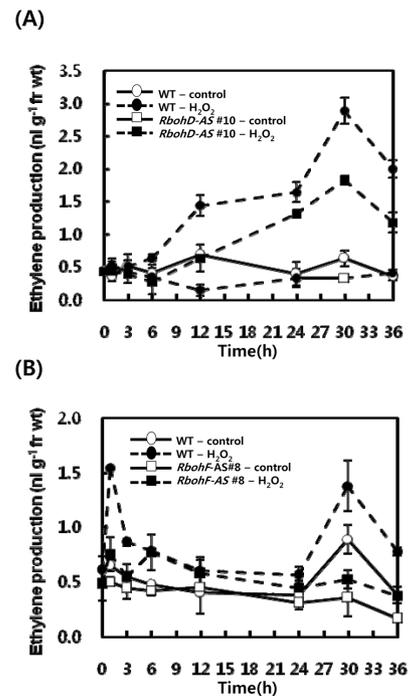


Fig. 3 Ethylene production in wild type and transgenic (*RbohD-AS*, *RbohF-AS*) tobacco plants leaves after treatment with oxidative stress for indicated time. At time 0, leaf discs were treated with 20 mM H₂O₂. Expression is reported as means ± SDs

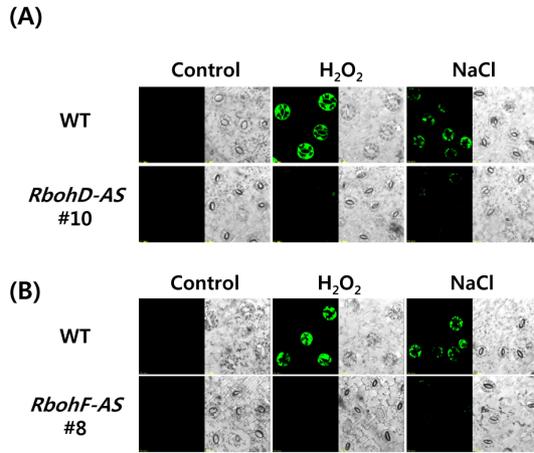


Fig. 4 Accumulation of intracellular ROS after treatment with H₂O₂ and NaCl in whole plants of wild-type and transgenic (*RbohD-AS*, *RbohF-AS*) tobacco plants determined using confocal images from leaf discs, which were obtained after incubation with 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) for 10 min. Plants were pretreated for 0.5 h with MES buffer containing 20 mM H₂O₂ and 200 mM NaCl

이 현저하게 억제됨을 확인하였는데 (Fig. 4) 이는 ROS 생성에 관여하는 *RbohD*와 *RbohF*의 유전자가 이들 형질 전환 식물체에서 효과적으로 억제되었음을 확인해 주었다. 또한 이들 형질전환 식물체에서 스트레스에 의한 ROS 축적이 크게 억제된 결과를 통해 *RbohD*와 *RbohF*가 스트레스에 의해 유도되는 ROS 생성에 주요하게 작용하고 있다는 것을 확인하였다.

또한, ROS 생성 억제에 관여하는 유전자의 발현이 억제된 *RbohD-AS*, *RbohF-AS* 형질전환 식물체 전체를 약 6 주 동안 배양병에서 생장시킨 후 산화적 스트레스와 고염분 스트레스를 30분간 처리하여 H₂O₂의 축적을 DAB 염색을 통하여 관찰하였다 (Fig. 5). 그 결과 야생형 식물체에 비해 형질전환 식물체 모두 ROS 축적이 현저하게 억제되었는데, 산화적 스트레스에 대한 저항효과가 야생형 식물체에 비해 이들 형질전환 식물체에서 높게 유지되고 있는 것은 ROS의 생성이 저해되었기 때문인 것으로 사료된다. 또한 스트레스에 의한 ROS 생성에 *RbohD*와 *RbohF*가 관여하고 있기 때문에 이들 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체에서 ROS 생성이 현저하게 감소한 것으로 나타났으며 이들 형질전환 식물체에서는 ethylene 생성도 크게 저하되었으므로 ROS 생성 저하에 낮은 수준의 ethylene 생성도 영향을 미치는 것으로 판단된다.

ROS 생성이 저하된 형질전환 식물체에서의 스트레스 저항성 증대

고염분 스트레스는 식물의 생장과 작물의 생산성을 감소시키는 중요한 요인으로 여겨지고 있으며 특히 건조한

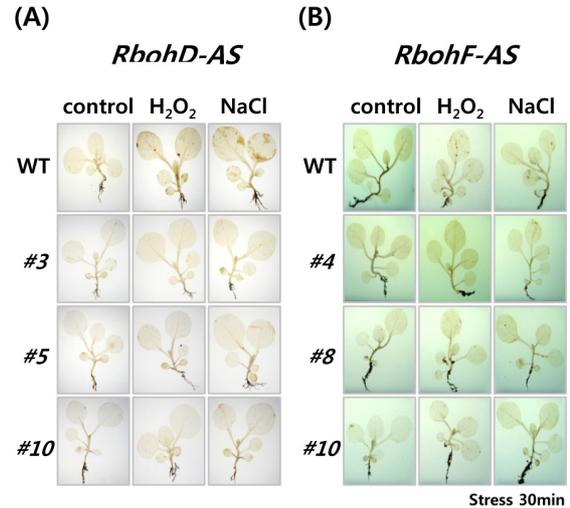
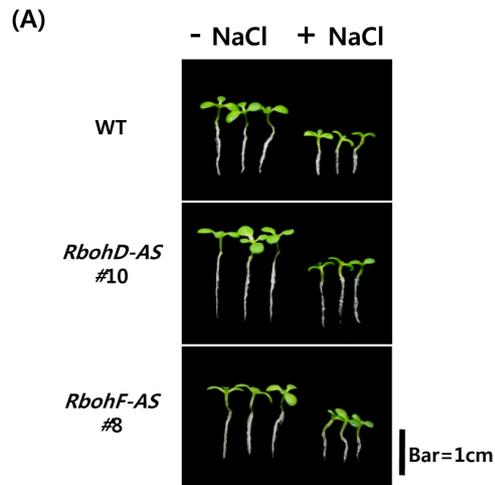


Fig. 5 Accumulation of intracellular H₂O₂ in response to abiotic stresses in whole plants of wild-type and transgenic (*RbohD-AS* and *RbohF-AS*) plants, determined using 3,3-diaminobenzidine (DAB) staining for 8 h. Four-week-old whole plants were treated with MES buffer containing 20 mM H₂O₂ and 200 mM NaCl for 30 min



(B)

Line No.	Root growth (cm)	
	-NaCl	+NaCl
Wild-type	0.8 ± 0.2	0.4 ± 0.2
<i>RbohD-AS</i> #10	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.2
<i>RbohF-AS</i> #8	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.2

20days/old/plants

Fig. 6 Comparison of plant growth phenotype and root growth in transgenic lines, compared to wild-type tobacco plants under NaCl stress. After wild type and transgenic plants (*RbohD-AS*, *RbohF-AS*) were incubated on MS agar medium containing 200 mM NaCl during 20days, plants were photographed (A) and measured the length of roots (B)

지역에서 고염분화는 지속적으로 증가하고 있는 추세이다 (Scebba et al. 1999; Tejpal GILL et al. 2010). 식물에 스트레스가 주어지면 ROS의 발생이 증가하게 되어 식물생장도 저하되는 스트레스 반응을 나타내므로 ROS가 저하된 형질전환 식물체를 통해 ROS와 스트레스에 대한 저항성과의 관계를 알아보고자 ROS 생성 억제에 관여하는 유전자의 발현이 억제된 *RbohD-AS*, *RbohF-AS* 형질전환 식물체를 이용하여 200 mM NaCl이 포함된 MS agar 배지에서 종자의 발아 및 유식물의 생장을 조사하였다. 고염분 MS 배지에서 발아한 유식물의 생장은 발아 후 20일째 된 유식물의 표현형 변화와 뿌리 성장 정도를 측정하여 조사하였고 그 결과 야생형 식물체에 비해 형질전환 식물체인 *RbohD-AS*에서 두드러지게 높은 생장률을 나타내었으나, *RbohF-AS* 형질전환 식물체에서 야생형에 비해 생장이 약간 증가하였을 뿐, *RbohD-AS* 보다는 월등하게 낮은 생장을 나타내었다 (Fig. 6A). 또한, *RbohD-AS* 식물체에서 뿌리성장 역시 고농도의 NaCl이 처리된 배지에서 야생형에 비해 2배 높은 생장이 관찰되었다 (Fig. 6B). 이것으로 보아 고염분 스트레스에 의해서 생성되는 ROS의 생성이 감소하면 식물체의 스트레스 저항성이 높아지는 것으로 여겨진다. 또한 이 과정에서 ROS와의 상호관계로서 ROS 억제로 인한 ethylene 생성량 감소도 스트레스 저항성을 높게 유도하는 것으로 여겨진다. *RbohD-AS*와 *RbohF-AS*에서 상대적인 스트레스 저항성을 비교하여 보면, *RbohF-AS*보다 *RbohD-AS*에서 더 월등하게 높은 스트레스 저항성을 나타낸 것으로 보아 유식물에 처리된 스트레스에 대한 반응 과정에서 *RbohF* 유전자보다는 *RbohD*의 유전자가 더 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 현재 스트레스 반응 과정에서 ROS 생성에 *RbohF*와 *RbohD* 중 어떤 유전자가 더 주요하게 작용하는지에 대해서는 아직 확립된 이론은 없으나 스트레스를 받은 식물의 유전자 발현 정도는 *RbohF* 유전자가 *RbohD* 유전자 보다 월등하게 낮은 편이다. 따라서 스트레스 반응 과정에서 *RbohF* 유전자보다는 *RbohD* 유전자가 더 주요하게 작용할 것으로 여겨진다.

형질전환 식물체에서의 Programmed cell death 지연 현상

스트레스 반응에서 발생하는 ROS와 ethylene 생성은 모두 biphasic 양상을 나타내며 결국 세포손상이 초래되는 후기 peak에서 다량의 ethylene이 생성되어 그 양에 따라 식물이 저항성을 나타내거나 혹은 죽게 된다고 보고되었다 (Wi et al. 2010). 앞서 ROS 생성 유전자인 *RbohD*와 *RbohF*의 유전자 발현이 억제된 식물체에서 스트레스 처리에 대한 ethylene 생성량이 크게 저하되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 과정을 세포손상의 관점에서 확인하기 위해 스트레스 처리 후 genomic DNA를 분리하여 DNA frag-

mentation을 조사하였다. 20 mM H₂O₂ 처리 후 ethylene 생성은 각각 1시간과 30시간에 peak를 보이는 biphasic 양상을 나타내었는데 이 시기의 야생형 식물체의 잎 조직을 harvest하여 genomic DNA를 분리한 후 DNA fragmentation을 확인하였다 (Fig. 7A). 그 정도를 확인한 결과 phase II 시기인 30시간째에는 야생형 식물체에 비해 이들 형질전환 식물체에 DNA fragmentation의 효과가 월등하게 감소되는 것을 확인할 수 있었고 특히, *RbohD-AS* 형질전환 식물체에서 그 효과가 더 좋은 것을 알 수 있었다. 또한 200 mM NaCl을 처리한 경우에 다량의 ethylene이 생성되는 시기인 48시간 후 야생형 식물체에서 DNA의 fragmentation은 대조구에 비해 NaCl 처리구에서 크게 증가되었고 형질전환 식물체에서는 대조구에 비해 DNA fragmentation이 다소 낮은 수준으로 일어났다. 특히 DNA fragmentation 현상은 스트레스를 주지 않은 상태의 대조구에서도 다소 나타난 것으로 보였으나 형질전환 식물체에서는 이러한 DNA fragmentation 현상이 거의 보이지 않았다 (Fig. 7B).

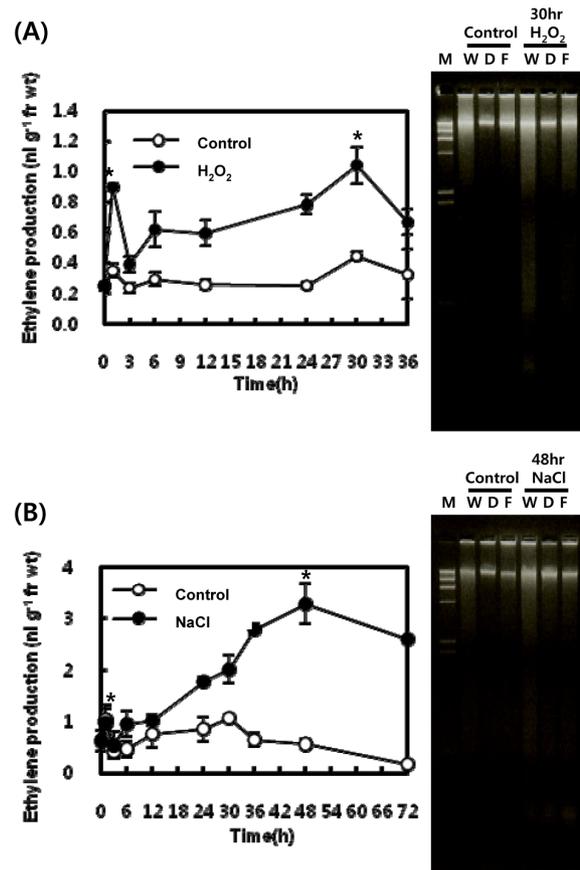


Fig. 7 Ethylene production in wild type tobacco plants leaves after treatment with stress for indicated time. At time 0, leaf discs were treated with 20 mM H₂O₂ or 200 mM NaCl and then analyzed DNA fragment in leaf disc of transgenic (*RbohD-AS*, *RbohF-AS*) tobacco plants after 30 hours of H₂O₂ (A), and 72 hours of NaCl (B) W, Wild type plant; D, *RbohD-AS* #10; F, *RbohF-AS* #8

산화적 스트레스와 고염분 스트레스 모두 *RbohF-AS* 식물체보다는 *RbohD-AS*의 식물체에서 DNA fragmentation이 크게 저하된 것으로 보아 역시 스트레스에 의한 세포 손상 과정에서 일어나는 DNA의 fragmentation에도 역시 *RbohF* 유전자보다는 *RbohD*의 유전자가 더 주요하게 작용하고 있는 것으로 여겨진다. 식물이 높은 강도의 스트레스를 받았을 경우 세포죽음이 초래되는 경우나 혹은 HR (Hypersensitive response)에 의한 저항성 반응이 일어나는 기작을 보면 다음과 같다. 스트레스를 받은 후 *RbohD*와 *RbohF* 등에 의해 유도된 NADPH oxidase의 높은 활성에 의해 발생된 superoxide anion과 hydrogen peroxide를 비롯하여 nitric oxide 등은 calcium influx 과정을 거쳐 세포내에서 스트레스 신호전달 과정이 일어나는데 이 수준이 threshold level 이상이 되어 일어난 현상이다 (Miguel AT et al. 2005).

Biphasic한 ROS와 ethylene의 생성에서 초기 과정인 phase I에서는 세포손상이 두드러지게 나타나지 않으며, DNA fragmentation도 관찰되지 않았지만 후기 peak시기인 phase II에서 야생형 식물체로부터 분리한 genomic DNA의 fragmentation이 증가한 것으로 보아 이 시기에 주로 PCD를 유발하는 것으로 사료된다. 그렇다면 phase I에서의 ROS의 생성과 ethylene 생성은 오히려 신호물질로 작용하여 phase II의 ROS와 ethylene 생성을 유발하는 것으로 생각할 수도 있을 것이다. 특히 phase I에서 ROS 생성과 ethylene 생성이 저하된 경우는 phase II에서의 생성도 낮은 수준을 유지하도록 신호전달을 받는다고 생각할 수 있다. 그러므로 ethylene 생성이 감소하도록 유도된 ROS 생성에 관여하는 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체에서 PCD 유발 또한 감소하는 것으로 사료된다.

적 요

비생물학적 스트레스로 H_2O_2 를 이용하여 산화적 스트레스와 고염분 스트레스를 처리한 후 ROS의 생성을 확인한 결과 스트레스 처리 후 30분에 일시적으로 1차 peak를 형성하였다가 거의 basal level까지 감소하고 다시 증가하여 3시간에 매우 다량의 2차 peak를 형성한 후 거의 basal level로 다시 낮아지는 biphasic 양상을 나타내게 된다. 따라서 ROS의 생성은 초기 30분 내에 일시적으로 발생한 Phase I의 ROS와 Phase II의 좀 더 장기적으로 다량의 고농도로 발생된 ROS의 생리적 역할이 다를 것으로 여겨진다. 본 논문에서는 스트레스 처리 시 생성되는 ROS를 확인한 후 ROS 생성 유전자인 *RbohD*와 *RbohF* 유전자 발현이 억제된 *RbohD-AS*, *RbohF-AS* 형질전환 식물체를 이용하여 실험을 수행하였다. 스트레스에 의해 생성되는 ROS의 생성을 억제시킴으로써 스트레스에 대한 ethylene 생성이 더 적은 것으로 나타났다. 또한, 이들 형질전환

식물체에서 ethylene 생성과 H_2O_2 억제 효과를 확인하였으며 고염분 등의 스트레스에 대한 저항성은 ROS와 ethylene의 생성이 저하되어 나타난 것으로 판단된다. 산화적 스트레스와 고염분 스트레스에서 후기 ethylene이 다량으로 생성되는 시기, 즉 세포손상이 초래되는 후기에서 DNA fragmentation 분석을 통해서 ROS와 ethylene의 생성이 높은 식물체일수록 PCD가 높게 나타난 것으로 여겨지며, 이 과정에서 작용하는 유전자는 *RbohD*와 *RbohF*인 것으로 보이며, *RbohD*가 더 효과적으로 작용하는 것으로 생각된다. 따라서 스트레스에 반응하는 신호전달과정에서 초기에 ROS가 생성이 되고 후기에 ethylene이 다량으로 생성되어 결국 세포죽음에 이르게 하는 상호 synergism을 일으켜 반응을 나타내며, 이러한 반응 과정에서 *RbohD*와 *RbohF* 유전자 발현의 억제가 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 높이는 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국연구재단의 중견연구자지원사업 (R01-2007-000-11791-0)의 지원을 받아 수행하였다.

인용문헌

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit JrME (1992) Ethylene in plant biology, 2nd edn San Diego: Academic Press
- Achard P, Cheng H, DeGrauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harbed NP (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 31:91-94
- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Plant Physiol* 100:224-233
- Bartosz G (1997) Oxidative stress in plants *Acta. Plant Physiol* 19:47-64
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099-1111
- Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218:443-448
- Cao WH, Liu J, Zhou QY, Cao YR, Zheng SF, Du BX, Zhang JS, Chen SY (2006) Expression of tobacco ethylene receptor NTHK1 alters plant responses to salt stress. *Plant Cell Environ* 29:1210-1219
- Chu KM, Igari K, Uchida N, Tasaka M (2008) New perspectives on plant defense responses through modulation of Developmental Pathways. *Mol Cells* 26:107-112
- Desikan R, Hancock JT, Bright J, Harrison J, Weir I, Hooley R, Neill SJ (2005) A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 137:831-834
- Diaz J, ten Have A, van Kan JA (2002) The role of ethylene and

- wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* 129:1341-1351
- Foyer CH, Noctor G (2000) Trasley Review No. 112. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signalling. *New Phytol* 146:359-388
- Fridovich I (1986) Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol* 41:35
- Inzé D, Van Montague M (1995) Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotechnol* 6:153-158
- Ishitani M, Siong L, Stevenson B, Zhu J-K (1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell* 9:1935-1949
- Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Sci* 6:262-267
- Luis AJ, Mur, Amanda JL, Simona M, Cristescu, Frans JM, Harren, Michael A, Hall, Aileen RS (2009) Biphasic ethylene production during the hypersensitive response in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* 4:610-613
- Miguel AT, Jonathan DGJ, Jeffery LD (2005) Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 37:10
- Miklós P, Uta von R, Sebastian G, Anita D, Alexandra P, Philippe S, Günther B, Levente K, Balázs B, Jörg D (2009) Dual Roles of Reactive Oxygen Species and NADPH Oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria* Pathosystem. *Plant Physiol* 151: 1459-1475
- Noctor C, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 49:249-279
- Overmyer K, Tunimen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann HJR, Kangasjärvi J (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12:1849-1862
- Rao GV, Edwards R, Scheck J (2000) Case studies of tornadoes associated with tropical cyclones based on conventional and WSR-88D data. *Preprints*, 24th Conf. On Hurricanes and Tropical Meteorology, Ft. Lauderdale FL, Amer. Meteor. Soc
- Rennenber H, Polle A (1994) Protection from oxidative stress tolerance in transgenic plants. *Biochem Soc Trans* 22:936-940
- Scebba F, Sebastiani L, Vitagliano C (1999) Protective enzymes against activated oxygen species in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: Responses to cold acclimation. *Plant Physiol* 155:762-768
- Tejpal GILL, Sanjay KUMAR, Paramvir Singh AHUJA, Yelam SREENIVASULU (2010) Over-expression of Potentilla superoxide dismutase improves salt stress tolerance during germination and growth in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Genet & Transgenics* 1:1-10
- Theologis A (1992) One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70:181-184
- Thomashow MF (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiol* 125:89-93
- Wi SJ, Park KY (2010) Inhibition of Biphasic Ethylene Production Enhances Tolerance to Abiotic Stress by Reducing the Accumulation of Reactive Oxygen Species in *Nicotiana tabacum*. *Mol Cells* 30:37-49
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 35:155-189
- Zhang JS, Cao WH, Liu J, He XJ, Mu RL, Zhou HL, Chen SY (2007) Modulation of Ethylene Responses Affects Plant Salt-Stress Responses. *Plant Physiol* 143:707-719
- Zhijin Z, Haiwen Z, Ruidan Q, Xue-Chen W, Rongfeng H (2009) Transcriptional Regulation of the Ethylene Response Factor LeERF2 in the Expression of Ethylene Biosynthesis Genes Controls Ethylene Production in Tomato and Tobacco. *Plant Physiol* 150:365-377