J Plant Biotechnol (2014) 41:194-200
DOI:http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2014.41.4.194 ISSN 1598-6365

Research Article

현사시나무 monodehydroascorbate reductase (MDHAR) 유전자의 분리 및 발현특성

윤서경 · 박응준 · 배은경 · 최영임 · 김준혁 · 이효신

Isolation and characterization of a monodehydroascorbate reductase gene in poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*)

Seo-Kyung Yoon · Eung-Jun Park · Eun-Kyung Bae · Young-Im Choi · Joon-Hyeok Kim · Hyoshin Lee

Received: 19 September 2014 / Revised: 28 September 2014 / Accepted: 20 October 2014
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Monodehydroascorbate reductase (MDHAR) is an important enzyme that plays a role in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) by maintaining reduced pool of ascorbate through recycling the oxidized form of ascorbate. In this study, we isolated a *PagMDHAR1* gene from *Populus alba* × *P. glandulosa*, and investigated its expression characteristics. The *PagMDHAR1* cDNA encodes a putative 434 amino acids containing FAD- and NAD(P)H-binding domains. Southern blot analysis indicated that a single nuclear gene encodes this enzyme. Northern hybridization analysis revealed that *PagMDHAR1* is highly expressed in both suspension cells and flower tissues, while its expression levels were enhanced by drought, salt, cold, wounding and ABA. Therefore, *PagMDHAR1* might be expressed in response to abiotic stress through the ABA-mediated signaling pathway in this poplar species, suggesting that the *PagMDHAR1* plays an important role in the defense mechanisms against oxidative stress.

Keywords ABA, *PagMDHAR1*, *Populus alba* × *P. glandulosa*, ROS, stress

S.-K. Yoon · E.-J. Park · Y.-I. Choi · J.-H. Kim
국립산림과학원 산림생명공학과
(Division of Forest Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Korea)

E.-K. Bae · H. S. Lee (✉)
국립산림과학원 임목육종과
(Division of Forest Tree Improvement, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Korea)
e-mail: hslee@forest.go.kr

서 론

식물의 성장과 생산성은 생물적 스트레스뿐만 아니라 건조, 고염, 고온, 저온 및 중금속 등과 같은 비생물적 스트레스에 의해 큰 영향을 받는다(Atkinson and Urwin 2012). 또한 건조, 고염 및 저온을 포함하는 대부분의 환경 스트레스는 초과산화이온(superoxide, O_2^-), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 하이드록시 라디칼(hydroxyl radical, OH^-), 단일항산소(singlet oxygen, O^-)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성에 기인한다(Gechev et al. 2006). 활성산소종의 강력한 산화력은 세포막의 파괴, 단백질 분해, DNA 합성 억제, 광합성반응 억제, 엽록체 파괴 등의 원인이 되며 심할 경우는 식물체가 고사하게 된다. 이러한 산화 스트레스를 방어하기 위하여 식물체 내에서는 ascorbate, glutathione, carotenoid, tocopherol 등의 저분자 항산화물질과 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), glutathione reductase (GR), ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR) 등의 항산화효소가 활성산소 제거에 관여한다(Apel and Hirt 2004).

식물의 중요한 항산화 물질 중 하나인 ascorbate는 과산화수소를 물로 환원시킴으로써 무독성화 하는 역할을 한다. 이러한 항산화 과정은 APX가 촉매 하는 반응으로 일어나는데, 이로 인해 ascorbate는 monodehydroascorbate (MDHA)로 환원된다. MDHA는 MDHAR의 작용을 받아 ascorbate로 환원되거나 비효소적 과정을 통해 dehydroascorbate (DHA)로 산화된다. 여기서 MDHA가 ascorbate로 환원되는 것은 활성산소종을 무독성화 하는데 필수적인 과정이며, MDHAR은 이러한 환원형 ascorbate의 함량을 유지하는 데 매우 중요한 역할을 하는 효소이다(Shigeoka et al. 2002; Sultana et al. 2012). 실제로 MDHAR이 과발현된 담배에서 환원형

ascorbate의 양이 증가하였고 이로 인해 건조, 염, 오존 스트레스에 대한 저항성이 증가하는 것이 보고된 바 있다(Eltayeb et al. 2007).

식물의 MDHAR 단백질은 3개의 FAD/NAD(P)H 결합 영역이 보존되어 있으며 보존된 영역을 통하여 MDHAR의 효소활성에 FAD와 NADH가 관여함을 알 수 있다(Yoon et al. 2004). 또한 MDHAR은 엽록체 뿐만 아니라 세포질, 미토콘드리아, 퍼록시좀에서 발현되며 MDHAR의 발현이 다양한 스트레스에 반응한다고 알려져 있다(Leterrier et al. 2005). 염 스트레스에 의한 MDHAR의 발현 증가는 토마토(Mittova et al. 2004), 벼(Vaidyanathan et al. 2003)와 밀(Sairam et al. 2002)에서 보고된 바 있으며, 애기장대의 *AtMDHAR1*은 건조, 염과 저온 스트레스, 그리고 *AtMDHAR2*는 건조와 광 스트레스에 의해 발현이 증가하였다(Mittler et al. 2004). 그러나 최근까지 식물의 항산화 효소에 대한 연구는 주로 APX 및 GR 등에 초점이 맞추어져 있었으며, 산화스트레스에 대한 MDHAR 작용과의 관련성을 보고한 결과는 거의 없는 실정이다(Yoon et al. 2004). 더욱이 가장 풍부한 생물자원이며 광범위하게 이용되고 있는 나무에서, 스트레스 반응에 관여하는 유전자의 기능 분석은 매우 중요하며 여기에는 항산화 효소인 MDHAR이 포함된다. 따라서 본 연구에서는 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)로부터 MDHAR 유전자를 분리하여 유전자의 서열과 구조를 분석하였으며, 다양한 스트레스 처리에 따른 발현특성을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

식물재료로 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)를 사용하였다. 배양세포는 현사시나무의 잎에서 유도하였다(Choi et al. 2001). 정지기에 도달한 0.4 g의 현사시 배양세포를 100 mL의 현탁배양배지(MS배지 + 1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L NAA + 0.01 mg/L BA)에 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. Northern blot 분석을 위해 계대 후 배양 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 26 및 30일째의 세포를 취하여 무게를 측정하고 액체질소에 얼린 다음 -70°C에 보관하였다. 조직특이성 분석을 위하여 잎, 줄기 및 뿌리는 1년생 삽목묘로부터, 꽃은 25년생 나무로부터 채취하였다.

유전자 서열 분석

계대 후 배양 8일째의 현사시나무 배양세포에서 분리한 mRNA를 사용하여 제작한 cDNA library 유래의 EST (expressed sequence tag) 클론 분석(Lee et al. 2005)을 통하여 식물에서 보고된 MDHAR 유전자와 상동성을 나타내는 cDNA 클론을 선발하였다. 선발된 cDNA 클론의 전체 서열을 결정한 다음 Vector NTI advance 10.0 (Invitrogen, USA)을 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.html30)을 사용하여 NJ method로 작성하였다. 아미노산 서열 분석은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 AtMDHAR1 (NP_190856), AtMDHAR2 (NP_568125), AtMDHAR3 (NP_566361), AtMDHAR4 (NP_189420), AtMDHAR5 (NP_564818), 벼(*Oryza sativa*)의 OsMDHAR1 (BAD46251.1), OsMDHAR2 (XP_483751.1), OsMDHAR3 (XP_467388.1), OsMDHAR4 (XP_467387.1), OsMDHAR5 (XP_480126.1), 포플러(*Populus trichocarpa*)의 PtMDHAR1 (XP_002326252), PtMDHAR2 (XP_002298535), PtMDHAR3 (XP_002299509), 옥수수(*Zea mays*)의 ZmMDHAR1 (AY103967), ZmMDHAR2 (AY107597), ZmMDHAR3 (AY106646)로 실시하였다.

Southern blot 분석

현사시나무의 잎에서 MegaExtractor plant genome kit (Toyobo, Japan)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 10 μg의 genomic DNA를 제한효소 *Bam*HI, *Eco*RI 및 *Hin*dⅢ로 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-^{32}P로 표식된 현사시나무의 MDHAR 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 현상하였다.

스트레스 처리 및 northern blot 분석

계대 후 배양 4일째의 배양세포에 mannitol (250 mM), NaCl (150 mM) 및 ABA (25 μM)를 각각 처리한 다음 2시간과 10시간 후에 세포를 회수하였다. 저온처리는 배양세포가 들어있는 삼각 플라스크를 얼음에 꽂아 배지의 온도가 약 2°C가 되게 조절한 후 2시간과 10시간 동안 진탕배양하였다. 대조구는 스트레스 처리에 사용된 동일한 배양세포를 아무런 처리 없이 2시간과 10시간 후에 각각 회수하였다. 세균 관련 반응을 조사하기 위하여 배양세포에 laminarin을 처리하였고, 상처 처리는 잎 조각(직경 9

mm)을 잘라 MS 배지에 올려 처리하였다. 모든 실험은 3반복으로 수행하였고, 회수한 시료는 즉시 액체질소에 얼린 다음 -70°C에 보관하였다.

Total RNA는 TRI Reagent (Molecular Research Center, USA)를 사용하여 사용자 매뉴얼에 따라 분리하였다. 10 μg의 total RNA를 1.2% formaldehyde agarose gel에 전기영동 하였다. Probe의 합성, hybridization 및 membrane washing 등은 Southern blot 분석과 동일한 방법으로 실시하였다.

결과 및 고찰

MDHAR 유전자의 분리 및 구조 분석

식물에서 보고된 MDHAR 유전자와 상동성을 보이는 현사시나무 배양세포 유래의 cDNA 클론을 선발하였다. 이를 *PagMDHAR1* (*Populus alba* × *P. glandulosa* monodehydroascorbate reductase1)이라 명명하고 그 특성을 구명하고자 하였다. DNA 염기서열 분석 결과 *PagMDHAR1*의 길이

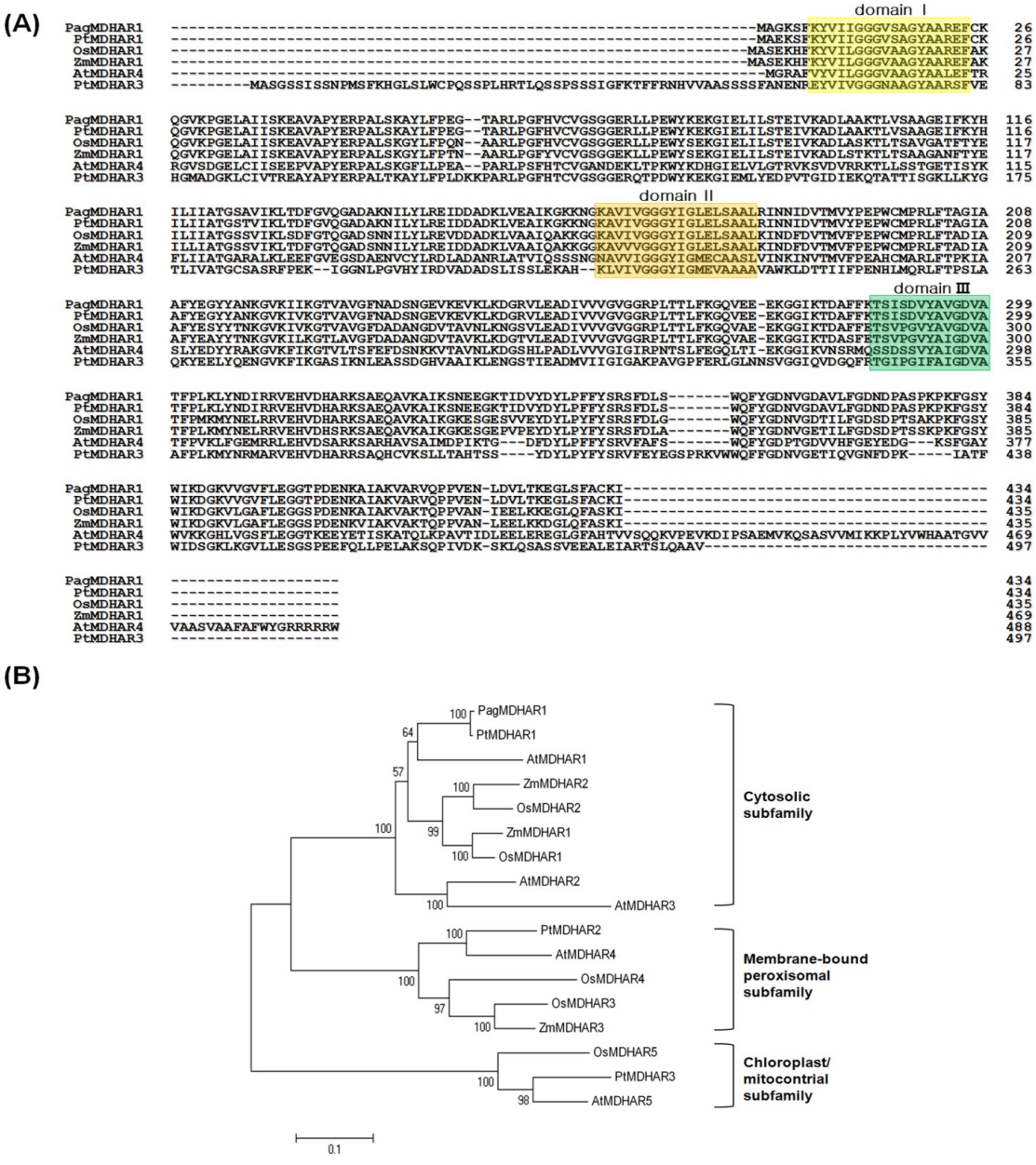

Fig. 1 Sequence comparison of PagMDHAR1 with other MDHAR homologues. (A) Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of PagMDHAR1 with MDHAR homologues from *Arabidopsis thaliana* (AtMDHAR4), *Oryza sativa* (OsMDHAR1), *Populus trichocarpa* (PtMDHAR1, PtMDHAR3) and *Zea mays* (ZmMDHAR1). Amino acid domains (Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ) involved in the binding of FAD and NAD(P)H are boxed. (B) Phylogenetic tree of amino acid sequence of PagMDHAR1 with cytosolic, membrane-bound peroxisomal and chloroplast/mitochondrial subfamily

는 1,535 base pair (bp)로, 23번째 nucleotide (nt)에서 개시 코돈이 시작하여 1,327번째 nt에서 종결되는 1,305 bp 길이의 ORF를 가지는 것으로 나타났다(Fig. 1A).

PagMDHAR1 (KC617869.1)은 435개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화 하며 *P. trichocarpa*에서 보고된 PtMDHAR1과 99%의 가장 높은 아미노산 서열 상동성을 보였다. 또한 벼의 OsMDHAR1과 옥수수의 ZmMDHAR1과는 86%의 상동성을 보였다.

아미노산 서열 분석 결과 PagMDHAR1은 3개의 FAD/NAD(P)H 결합 영역(domain I, Ⅱ, Ⅲ)이 보존되어 있으며 7번 아미노산부터 24번 아미노산까지 domain I, 165번 아미노산부터 182번 아미노산까지 domainⅡ, 287번 아미노산부터 299번 아미노산까지 domain Ⅲ가 존재하였다(Fig. 1A). 따라서 본 연구에서 분리한 *PagMDHAR1*은 Yoon et al. (2004)이 설명한 MDHAR 유전자의 전형적인 특징 즉 domainⅠ, Ⅱ, Ⅲ을 가지는 것으로 나타났다.

또한 MDHAR은 보존된 영역의 아미노산 서열 구성을 바탕으로 3개의 그룹으로 나뉜다. 각 그룹은 세포질 하위집단(cytosolic subfamily)과 카르복시말단이 확장된 구조를 갖는 막-결합 퍼록시좀 하위집단(membrane-bound peroxisomal subfamily), 그리고 아미노말단이 확장된 구조를 갖는 엽록체/미토콘드리아 하위집단(chloroplast/mitochondrial subfamily)이다(Lunde et al. 2006). 단백질 계통 분석 결과 PagMDHAR1은 3개의 그룹 중에서도 cytosolic subfamily에 속하였다. 또한 *P. trichocarpa*의 PtMDHAR1과 가장 높은 유연관계를 나타내었다(Fig. 1B). *PagMDHAR1*이 속하는 cytosolic MDHAR은 수분부족 스트레스에 의해 발현이 증가하며 활성산소종으로 부터 유도되는 산화 스트레스 방어기작과 밀접한 관련이 있음이 보고되어 있다(Lunde et al. 2006).

Southern blot 분석

현사시나무의 잎에서 분리한 genomic DNA를 제한효소 *Bam*HI, *Eco*RI 및 *Hin*dⅢ로 완전히 절단한 다음, 방사능 표지한 전장의 *PagMDHAR1* cDNA를 탐침으로 사용하여 Southern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 *Eco*RI으로 절단한 현사시의 genomic DNA에서는 1개의 hybridized band가 확인되었고, *Bam*HI 또는 *Hin*dⅢ로 절단한 genomic DNA에서는 각각 2개의 hybridized band가 확인되었다(Fig. 2).

또한 *PagMDHAR1*과 99%의 가장 높은 서열 상동성을 보였던 *PtMDHAR1* 유전자에서도 확인되었듯이, *PagMDHAR1* 유전자의 intron내에 제한효소 *Bam*HI과 *Hin*dⅢ 절단부위가 각각 한 개씩 존재할 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 *PagMDHAR1*은 현사시 게놈에 1~2 copy가 존재하는 것으로 추정된다. 또한 이전 연구에서 *PagMDHAR1*과 같이 cytosolic subfamily에 속하는 *BcMDHAR* 유전자가 배추

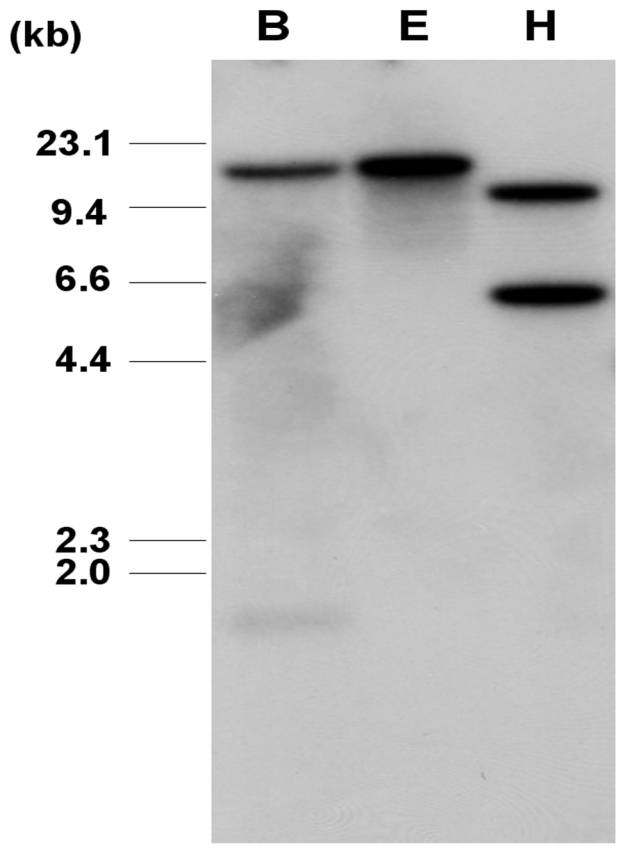

Fig. 2 Genomic Southern blot analysis of the *PagMDHAR1* in *Populus alba* × *P. glandulosa*. Genomic DNAs digested with *Bam*HI (B), *Eco*RI (E) or *Hin*dⅢ (H) were fractionated by electrophoresis on 1.0% agarose gel. The gel was blotted onto nylon membrane, and hybridized with P^{32}-labeled full-length *PagMDHAR1* cDNA

의 게놈에 1 copy로 존재한다는 결과가 보고된 바 있다(Yoon et al. 2004).

PagMDHAR1 유전자의 조직특이적 발현

PagMDHAR1 유전자의 조직특이적 발현을 확인하기 위하여 현사시나무의 잎, 줄기, 뿌리 및 꽃과 계대 후 배양 14일째의 세포로부터 total RNA를 분리하여 northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과, *PagMDHAR1*의 발현은 꽃과 배양세포에서 높게 나타났다(Fig. 3A).

이는 다른 식물에서 보고된 MDHAR의 조직 특이적 발현과는 다른 결과로, *PagMDHAR1*과 같이 cytosolic subfamily에 속하는 배추의 *BcMDHAR*은 잎에서 많이 발현 되었고(Yoon et al. 2004), 체리나무의 *MgMDHAR*은 뿌리와 줄기에서 높게 발현 되었다(Hani et al. 2011). 또한 peroxisomal subfamily에 속하는 완두콩의 *MDHAR1*은 열매에서 높은 발현을 나타내었다(Leterrier et al. 2005). 또한, 배양세포의 경우는 배양과정에 수반되는 진탕에 의해 과산화수소의 생산이 촉진될 수 있기 때문에(Legendre et al. 1993), 항산

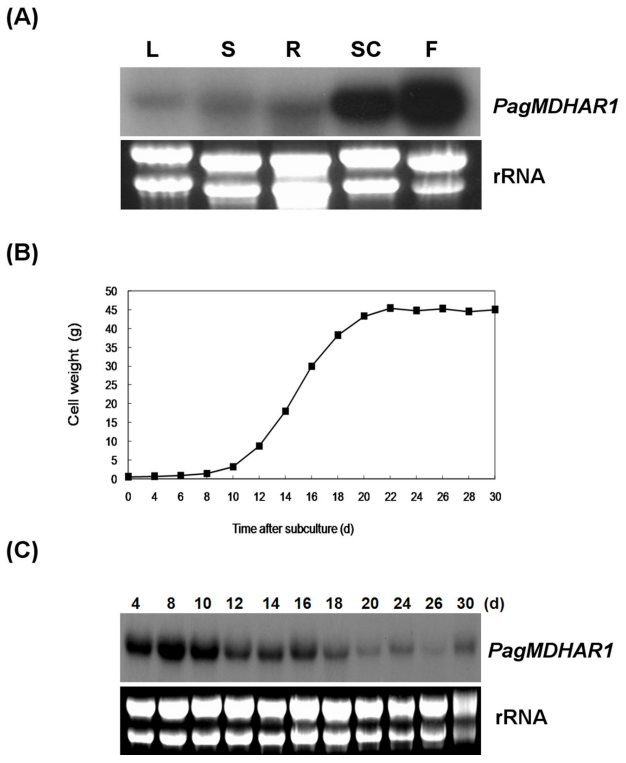

Fig. 3 *PagMDHAR1* expression in various tissues of poplar cells during normal growth in suspension culture. (A) Northern analysis of total RNA extracted from mature leaves (L), stems (S), roots (R), suspension cells (SC) and flowers (F) of poplar. (B) Growth kinetics of suspension cells. (C) Northern analysis of total RNA extracted from the cells at the indicated times. Full-length *PagMDHAR1* cDNA was used as the probe and ethidium-bromide stained ribosomal RNA (rRNA) served as a loading control

화 효소인 *PagMDHAR1*이 배양세포에서 높게 발현되는 것은 배양과정에서 발생하는 산화스트레스에 의해 유도된 것으로 예상된다.

배양세포 생장주기에서 *PagMDHAR1* 유전자의 발현

현사시나무 배양세포의 생장주기에서 *PagMDHAR1* 유전자의 발현양상을 확인하기 위하여 계대 후 배양 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 26 및 30일째의 세포로부터 RNA를 분리한 다음 northern blot 분석을 실시하였다. 현사시나무의 배양세포는 식물 배양세포의 전형적인 생장패턴을 따라 S자형 생장곡선을 나타내었다(Fig. 3B). 생장률이 매우 느린 유도기가 배양 8일째까지 지속된 다음 배양 8~16일에 초기 지수생장기를 나타내었고 이후 22일 까지 느리게 생장하다가 정지기에 이르는 것으로 나타났다. 즉 늦은 지수생장기로 접어들면서 배지 내의 영양분이 결핍되며 정지기 에서는 마침내 영양분이 고갈되고 세포사가 일어나기 때문인 것으로 판단된다. *PagMDHAR1* 유전자는 유도기인 4일부터 초기 지수생장기에 접어드는 배양 10일까지 높은 발현수준을 유지하다가 12일부터 발현이 감소하였고 정지기인 배양 30일까지 지속적으로 낮은 발현을 나타내었다(Fig. 3C). Lee et al. (2007)에 따르면 현사시나무 배양세포의 세포주기 및 현미경 분석 결과 유도기의 세포에서 DNA 합성이 일어나고, 초기 지수생장기에 세포분열과 생장이 왕성하게 일어난다고 보고하였다. 또한, 이 기간 동안에 리보솜 단백질, 번역 조절인자(translation regulator) 및 단백질 합성 관련 유전자들의 발현이 크게 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 배양세포 생장초기에 왕성한 세포분열과 함께 DNA 합성 및 다양한 유전자의 발현이 활성화될 것으로 추정된다. 이러한 결과는 MDHAR과 같이 ascorbate의 생합성과 재생에 관여하는 효소가 세포분열이 왕성하게 일어나는 시기에 활성화 된다는 보고와 일치하는 것이다(De Pinto et al. 2000; Smirnoff et al. 2001). Ascorbate의 산화, 환원상태는 세포분열과 신장, 특히 세포주기가 진행됨으로써 발생하는 산화스트레스와 밀접한 관련이 있다(Horemans et al. 2003). 따라서 *PagMDHAR1* 유전자가 세포분열이 왕성하게 일어나는 유도기와 초기 지수생장기에 발현이 높게 나타난것으로 보이며, 이는 ascorbate의 항상성 유지에 관여할 것으로 판단된다.

스트레스 처리에 따른 *PagMDHAR1* 유전자의 발현

식물에서 MDHAR은 산화스트레스에 반응하는 항산화 효소로서 대부분의 MDHAR 유전자의 발현이 다양한 비생물적 스트레스에 의해 증가한다고 알려져 있다(Eltayeb et al. 2007; Kavitha et al. 2010; Lunde et al. 2006). 따라서 본 연구에서는 스트레스 및 ABA 처리가 *PagMDHAR1* 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 현사시나무의 배양세포에 mannitol (250 mM), NaCl (150 mM), 저온 (2°C) 및 ABA (25 μM)를 처리한 배양세포로부터 RNA를 분리한 다음 northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 발현수준의 차이는 있지만 모든 처리구에서 *PagMDHAR1*의 발현이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4A).

Mannitol과 NaCl 처리에서는 처리 10시간 후에 발현이 크게 증가하였고, 저온과 ABA 처리의 경우에는 2시간과 10시간 모두에서 발현이 증가하였다. 한편, ABA는 비생물적 스트레스 신호를 핵으로 전달하여 스트레스 반응 유전자의 발현을 유도하는 식물호르몬으로서, 수분 스트레스에 의해 유도되는 유전자의 상당수가 ABA-의존적 신호전달 경로를 통해 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다(Seki et al. 2003). 따라서 본 연구 결과를 바탕으로, *PagMDHAR1* 유전자가 건조, 염, 저온 스트레스에 노출 시 ABA를 경유한 신호전달경로를 따라 반응할 것으로 예상된다.

건조와 염, 저온 처리에 의한 MDHAR 유전자의 발현 증가는 애기장대(*AtMDHAR1)*에서도 보고된 바 있으며(Mittler

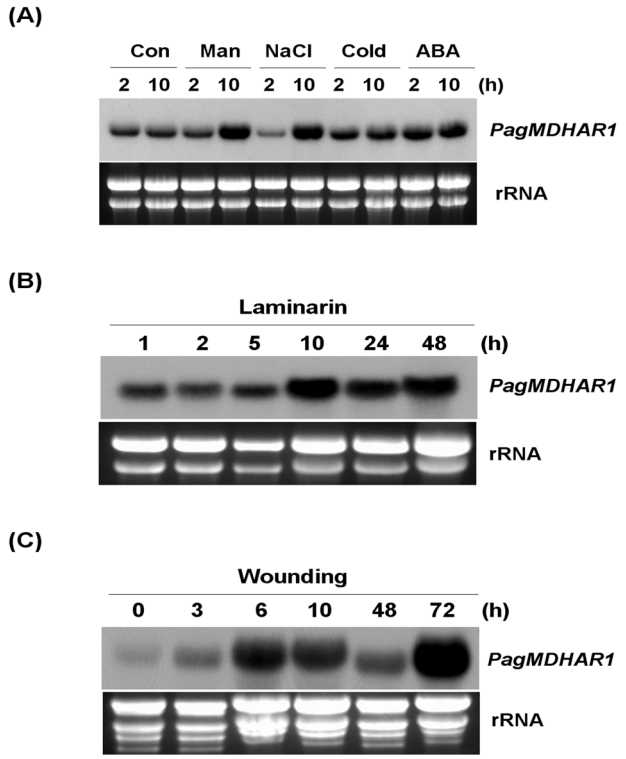

Fig. 4 *PagMDHAR1* expression under various treatment conditions. (A) *PagMDHAR1* expression in suspension cells in response to mannitol (Man, 250 mM), NaCl (150 mM), cold (2°C) and ABA (25 μM) for 2 and 10 h. Untreated control cells (Con) were incubated for the same time periods. (B) *PagMDHAR1* expression in suspension cells in response to treatment with laminarin. (C) *PagMDHAR1* expression in leaf tissues in response to wounding. Total RNA was extracted from the trimmed leaves at the indicated times

et al. 2004), 실제로 *AtMDHAR1*이 과발현된 담배에서 건조와 염 스트레스에 대한 저항성이 증가하였고, 활성산소종을 무독성화 시키는 환원형 ascorbate의 양이 2배 이상 증가하는 결과를 보였다(Eltayeb et al. 2007). 또한 맹그로브의 MDHAR 유전자인 *AeMDHAR*도 염 스트레스에 의해 발현이 증가하였으며, *AeMDHAR*가 과발현된 벼에서 염 스트레스에 대한 저항성을 보였다(Sultana et al. 2012). 이러한 연구사례를 고려하면 *PagMDHAR1* 유전자는 활성산소종으로부터 유도되는 산화 스트레스 방어기작과 밀접한 관련이 있으며 스트레스 내성에도 기여할 것으로 생각된다.

Bacterial-elicitor와 상처 처리에 따른 *PagMDHAR1* 유전자의 발현

비생물적 스트레스뿐만 아니라 생물적 스트레스에 대한 *PagMDHAR1*의 발현특성을 분석하기 위하여 현사시나무의 배양세포에 bacterial-elicitor인 laminarin을 처리 하여 세균 관련 반응을 조사하고자 하였다. Laminarin은 갈색 조류인 *Laminaria digitata*에서 정제한 선형의 β-1,3 glucan으로 식물의 스트레스 방어기작에 관여한다(Klarzynski et al. 2000). Laminarin을 처리한 배양세포로부터 RNA를 분리하여 northern blot 분석을 실시한 결과, 처리 10시간 후에 *PagMDHAR1*의 발현이 증가 하였고 48시간 까지 지속적으로 높은 발현수준을 유지하였다(Fig. 4B).

또한 상처 처리에 따른 *PagMDHAR1*의 발현을 알아보기 위하여 직경 9 mm의 잎 조각을 MS 배지에 올려 처리한 다음 northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과, 처리 6시간부터 발현이 유도되기 시작하여 처리 72시간 후에 최대를 나타내었다(Fig. 4C). 이와 같이 상처에 의해 MDHAR의 발현이 증가한 연구결과는 토마토에서도 보고된 바 있다(Ben Rejeb et al. 2004). Laminarin 및 상처 처리에 의한 *PagMDHAR1*의 발현증가는 *PagMDHAR1*이 세균 감염 및 상처에 대한 방어기작에서도 중요한 역할을 함을 의미한다.

적 요

Monodehydroascorbate reductase (MDHAR)는 활성산소종 제거에 중요한 효소이다. 본 연구에서는 MDHAR 유전자를 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)에서 분리하여 이를 *PagMDHAR1*이라 명명하고 유전자의 구조와 발현특성을 조사 하였다. *PagMDHAR1* 유전자는 434개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하며 3개의 FAD/NAD(P)H 결합 영역이 보존되어 있다. *PagMDHAR1*은 현사시나무의 염색체에 1~2 copy가 존재하며, 배양세포와 꽃에서 높게 발현하였다. 현탁배양세포의 생장주기에서는 유도기와 초기 지수생장기에서 높게 발현하였다. 또한 *PagMDHAR1*은 건조와 염, 저온, 상처 및 ABA 처리에 의해서 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 *PagMDHAR1*은 ABA를 경유한 신호전달경로를 따라 다양한 스트레스에 반응하며, *PagMDHAR1*의 기능이 활성산소종에 의해 유도되는 산화 스트레스 방어기작에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 스트레스 내성에도 기여할 것으로 생각된다. 이는 향후 *PagMDHAR1* 형질전환 식물체 생산 등 생명공학적 기술을 이용한 유전자 기능에 대한 연구를 비롯하여 신기능성 임목의 개발에 활용 가능할 것으로 기대된다.

References

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol 55:373-399

Atkinson NJ, Urwin PE (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. J Exp Bot 63:3523-3543

Ben Rejeb I, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Ammar S, Bouzid S, Ayadi A (2004) Iron-superoxide dismutase and monodehydroascorbate reductase transcripts accumulate in response to internode rubbing in tomato. C R Biol 327:679-686

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

De Pinto MC, Tommasi F, De Gara L (2000) Enzymes of the ascorbate biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle in cultured cells of tobacco bright yellow 2. Plant Physiol Biochem 38:541-550

Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Shibahara T, Inanaga S, Tanaka K (2007) Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. Planta 225:1255-1264

Gechev TS, Breusegem FV, Stone JM, Denev I, Laloi C (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. BioEssays 28:1091-1101

Hani AE, Adebanjo AB, Yukichi F, Muneharu E (2011) Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). J Plant Physiol 168:619-627

Horemans N, Potters G, De Wilde L, Caubergs RJ (2003) Dehydroascorbate uptake activity correlates with cell growth and cell division of tobacco bright yellow-2 cell cultures. Plant Physiol 133:361-367

Kavitha K, George S, Venkataraman G, Parida A (2010) A salt-inducible chloroplastic monodehydroascorbate reductase from halophyte Avicennia marina confers salt stress tolerance on transgenic plants. Biochimie 92:1321-1329

Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B (2000) Linear β-1,3 glucans are elicitors of defense response in tobacco. Plant Physiol 124:1027-1037

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 Science 169:1118-1124

Lee H, 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 Plant 131:599-613.

Legendre L, Rueter S, Heinstein PF, Low PS (1993) Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. Plant Physiol 102:233-240

Leterrier M, Corpas FJ, Barosso JB, Sandalio LM, del Rio LA (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. Plant Physiol 138:2111-2123

Lunde C, Baumann U, Shirley NJ, Drew KP, Fincher GB (2006) Gene structure and expression pattern analysis of three monodehydroascorbate reductase (Mdhar) genes in *Physcomitrella patens*: Implications for the evolution of the MDHAR family in plants. Plant Mol Biol 60:259-275

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem FV (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci 9:490-498

Mittova V, Guy M, Tal M, Volokita M (2004) Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. J Exp Bot 55:1105-1113

Sairam RK, Rao KV, Srivastava GC (2002) Differential response of wheat genotypes to long-term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science 163:1037-1046

Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. Curr Opin Biotechnol 14:194-199

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyakawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. J Exp Bot 53:1305-1319

Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA (2001) Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52:437-467

Sultana S, Khew CY, Morshed MM, Namasivayam P, Napis S, Ho CL (2012) Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (AeMDHAR) confers salt tolerance on rice. J Plant Physiol 169:311-318

Vaidyanathan H, Sivakumar P, Chakrabarty R, Thomas G (2003) Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa L.*)-differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. Plant Science 165:1411-1418

Yoon HS, Lee HS, Lee IA, Kim KY, Jo JK (2004) Molecular cloning of the monodehydroascorbate reductase gene from Brassica campestris and analysis of its mRNA level in response to oxidative stress. Biochimica et Biophysica Acta 1658:181-186