

현사시나무에서 *SENESCENCE 1* 유전자의 분리와 발현특성 구명

김준혁, 이효신*, 최영임, 배은경, 윤서경, 노설아

국립산림과학원

Isolation and Characterization of a Putative *SENESCENCE 1* Gene from Poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*)

Joon-Hyeok Kim, Hyoshin Lee*, Young-Im Choi, Eun-Kyung Bae, Seo-Kyung Yoon and Seol Ah Noh

Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Korea

Abstract - Plant senescence is one of the survival strategies to use limited nutrients efficiently during growth, development and adaptation. In this study, we isolated a gene (*PagSENI*) homologous to *SENESCENCE 1* from *Populus alba* × *P. glandulosa*. The *PagSENI* gene encodes a putative protein consisting of 243 amino acids containing a rhodanese domain. Southern blot analysis suggested that two copies of the *PagSENI* gene are present in the poplar genome. We characterized its transcriptional expression under various conditions mimicking senescence and environmental stresses. The *PagSENI* was expressed most strongly in mature leaves but most weakly in roots. The gene was significantly up-regulated by treatments with mannitol, NaCl, ABA and JA, but not by cold, SA and GA₃. These results indicate that *PagSENI* is involved in senescence response induced by environmental stresses.

Key words - Environmental stress, Hormone, *PagSENI*, Gene expression

서 언

온대기후대에서 자라는 나무는 해마다 성장과 휴면을 거듭 하면서 나이테를 만들고 재적이 증가한다. 그러나 나무가 적절 한 시기에 휴면에 들어가지 못하면 냉해를 입거나 심하면 고사 하게 된다. 휴면에 들어가기 위해서는 단풍이나 낙엽과 같은 노쇠 과정이 필연적으로 수반된다. 노쇠는 성장, 발달 및 적응에 영향을 미쳐 식물이 살기 어려운 환경에서 살아남도록 한다는 점에서 노화와는 다르다(Thomas, 2013). 식물의 일반적인 생활사에서 노쇠의 예로는 탈리가 있다. 식물은 잎의 탈리가 이루어지기 전에 단백질, 핵산 및 지질 등의 대사물질을 분해하여 흡수하는 자가소화작용을 통해 제한적인 자원을 효율적으로 이용하는 장점을 가지고 있다(Himelblau and Amasino, 2001; H rtensteiner and Feller, 2002). 또한 식물은 세포예정사(programmed cell death)라는 특별한 형태의 노쇠 과정을 통해 스트레스에 의한 피해를 최소화한다(Fuqiang *et al.*, 2013;

Gepstein and Glick, 2013). 따라서 노쇠는 나무의 성장과 발달을 이해하고 조절하는데 있어 매우 중요한 과정이다.

최근 생명공학 연구기술의 발전에 힘입어 식물의 노쇠를 조절하는 유전자에 대한 관심이 높아졌다. 식물 생명공학 연구에 있어 대표적인 모델식물인 애기장대(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)에서 *SENESCENCE 1* (*AtSENI*) 유전자가 분리되었다(Oh *et al.*, 1996). *AtSENI* 유전자는 자연적으로 노쇠가 진행 중인 잎에서 높게 발현하고, 삼투 스트레스와 관련된 식물호르몬인 ABA (abscisic acid)와 잎의 탈리를 일으키는 ethylene의 전구체인 ethephon 처리에 의해 발현이 증가하였다. *AtSENI* 유전자는 곰팡이 그리고 세균과 같은 병원균에 대한 방어기작의 일환으로 유도되는 것으로 밝혀졌다(Schenk *et al.*, 2005). 뿐만 아니라 *AtSENI* 유전자와 높은 상동성을 가진 담배(*Nicotiana tabacum* L.)의 dark inducible gene (*NtDIM*) 유전자는 ABA와 IAA (indole-3-acidic acid) 처리에 의해서 발현이 증가하였고(Yang *et al.*, 2003), 무(*Raphanus sativus* L.)의 *RsDINI* 유전자는 ethylene과 고온 스트레스 처리에 의해 발현이 증가하였다(Azumi and Watanabe, 1991). 이러한 결과는 *SENI* 유전자가

*교신저자(E-mail) : hslee@forest.go.kr

식물의 생활사 주기에서 일어나는 노쇠에만 관련된 것이 아니라 환경 스트레스에 의해 유발되는 노쇠 반응에도 관련이 있다는 것을 의미한다.

노쇠는 식물의 성장과 발달을 포함한 생활사의 한 부분일 뿐 아니라 환경적응의 과정이라는 점에서 매우 중요하지만 아직까지 분자수준에서의 조절기작에 관여하는 알려진 것이 매우 적다. 또한 지금까지의 연구는 주로 애기장대와 담배 그리고 무와 같은 초본식물을 대상으로 하였다. 숲의 대부분을 차지하는 나무는 수명이 매우 길 뿐 아니라 성장과 휴면을 해마다 반복하는 특징이 있어 노쇠의 과정을 이해하는 것이 매우 중요하다(Rohde and Bhalarao, 2007). 그러나 나무의 경우 노쇠 과정에서 나타나는 생리적 변화(Keskitalo *et al.*, 2005)와 색소체의 변화(Lee *et al.*, 2003)에 대한 연구는 보고되었지만 유전자 수준에서의 연구는 거의 보고된 바 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 나무의 노쇠 과정을 유전자 수준에서 이해하기 위한 첫 단계로 현사시나무에서 *PagSENI* 유전자를 분리한 다음 다양한 조건에서의 발현특성을 분석하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 스트레스 처리

본 연구의 식물재료로 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)를 사용하였다. 배양세포는 1.0 mg/L의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.1 mg/L의 1-naphthaleneacetic acid (NAA), 0.01 mg/L의 6-benzylaminopurine (6-BAP) 그리고 3% sucrose 가 첨가된 100 ml의 액체 MS 배지(Duchefa, Netherlands)를 사용하여 22 ± 1°C의 약한 광조건(20 μmol m⁻²s⁻¹)에서 120 rpm으로 현탁배양 하였다(Lee *et al.*, 2005). 조직별 유전자 발현을 확인하기 위하여 잎, 줄기 및 뿌리는 1년생 삼목묘로부터, 꽃은 25년생 나무로부터 채취하였다. 잎의 경우 엽병을 제외하고 지름 3 cm 이하의 어린잎과 지름 10 cm 이상으로 완전히 전개된 성숙 잎을 각각 채취하였다. 스트레스 처리는 계대 후 배양 4일째의 현탁배양 세포에 mannitol (250 mM), NaCl (150 mM) 및 저온(2°C)을 각각 처리하였고, 식물호르몬은 ABA (20 μM), JA (jasmonic acid, 10 μM), SA (salicylic acid, 20 μM) 및 GA₃ (gibberellic acid, 20 μM)를 처리하였다. 모든 시료는 즉시 액체 질소에 넣어 얼린 다음 -70°C에 보관하였다.

PagSENI 유전자의 분리와 서열 분석

유전체 정보가 완전히 밝혀진 *Populus trichocarpa* Torr. & A.

Gray ex Hook.의 DNA 염기서열을 바탕으로 Phytozome v9.1 프로그램(<http://www.phytozome.net/>)을 이용하여 *SENI* 유전자를 증폭하기 위한 정방향(5'-CCACCTTTGGCCCTCTTTGTGATTC-3') 및 역방향(5'-GGTAATGGACGTAATTCOCGTAAAC-3') primer를 설계하였다. 현사시나무의 잎에서 total RNA를 분리(Quiagen plant RNA extraction kit, Germany)한 다음, 1 μg의 RNA로부터 cDNA를 합성하였다(PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser, Takara, Japan). 합성된 cDNA로부터 *SENI* 유전자의 증폭을 위해 각각 1 μl의 정방향 및 역방향 primer, 1 μl의 cDNA, 그리고 DNA Polymerase (SolGent™ Pfu-X, SolGent, Korea)를 사용하였다. PCR 증폭반응은 95°C에서 5분간 1회 반응시킨 후, 95°C 30초, 60°C 30초 그리고 72°C 1분간의 반응과정을 30회 반복하고, 72°C에서 5분간 1회 반응하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 크기를 확인한 후 DNA 염기서열을 결정하였다. 상동성 분석에는 ClustalW 프로그램(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)을 사용하였고, phylogenetic tree는 MEGA6.0 프로그램(<http://www.megasoftware.net/>)으로 작성하였다.

Southern blot 분석

현사시나무의 잎에서 genomic DNA를 분리하였다(DNeasy plant mini kit, Qiagen, Germany). 10 μg의 DNA를 제한효소 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 각각 절단한 다음 1% agarose gel에서 전기영동하였다. Capillary transfer 방법을 사용하여 nylon membrane (Hybond-XL, Amercham-Pharmacia Biotech, UK)에 전이시켰다(Southern, 1975). Membrane을 10 ml의 hybridization buffer (1× PerfectHYB plus, Sigma, USA)에 넣고 68°C에서 1시간 동안 전처리하였다. 전장의 *PagSENI* 유전자를 α-³²P로 표식(Multiprime labeling kit, Amercham, USA)한 다음 hybridization buffer에 넣고 68°C에서 12시간 동안 반응시켰다. Membrane을 0.2 × SSC - 0.1% SDS 용액으로 65°C에서 15분간 3회 세정한 다음 X-ray 필름에 노출시켰다.

Real-time qPCR 분석

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). *PagSENI* 유전자의 PCR 증폭을 위하여 정방향(5'-TTATTGTCGGTTGCCAGCTTGG-3') 및 역방향(5'-ACCTATCTCTTTTCTTTAAA-3') primer를 사용하였다. Actin

유전자의 PCR 증폭을 위하여 정방향(5'-GCCATCTCTCATCGG AATGGAA-3') 및 역방향(5'-AGGGCAGTGATTTCCCTTGCTC A') primer를 사용하였다.

1 µg의 total RNA로부터 cDNA를 합성하였다(PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser, Takara, Japan). PCR 증폭반응을 위해 1 µl의 cDNA, 10 µl의 PCR Master Mix (2 × SYBRGreen, BioRad, USA), 1 µl의 정방향 및 역방향 primer (10 µM) 그리고 7 µl의 nuclease-free water를 혼합하였다. 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 상대정량 하였다(Pfaffl, 2001).

결과 및 고찰

PagSENI 유전자의 분리와 유연관계 분석

현사시나무는 1800년도에 후반에 도입되어 토착화되어 있는 은백양(*Populus alba* L.)을 모수로, 우리나라 자생종인 수원사시나무(*Populus grandulosa* Uyeki)를 화분수로 하여 만들어진 교잡종 포플러이다. 현사시나무 배양세포 유래의 cDNA library에서 선발한 EST (expressed sequence tag) 분석 결과(Lee *et al.*, 2005)에서 *SENI* 유전자의 cDNA 단편을 확보하였다. 이 단편의 DNA 염기서열을 유전체 정보가 완전히 밝혀진 *P. trichocarpa*의 DNA 서열과 비교한 결과 *PtSENI* 유전자와 98%의 매우 높은 상동성을 나타내었다. 따라서 *PtSENI* 유전자의 5'과 3'의 비번역 부위(untranslated region)에 결합하는 PCR primer를 제작한 다음 현사시나무의 잎에서 분리한 total RNA로부터 *SENI* (*PagSENI*) 유전자를 RT-PCR 증폭방법으로 분리하였다. 분리한 cDNA 클론의 DNA 염기서열을 분석한 결과 732 bp (base pair)의 ORF (open reading frame)를 가지는 것으로 나타났(Fig. 1A). 또한, 암호화되는 예상 단백질은 243개의 아미노산으로 구성되며 예상 분자량은 27.2 kDa, 등전점은 10.29로 나타났다. 단백질의 보존영역을 분석한 결과 PagSENI 단백질은 sulfurtransferase의 Rhodanese domain을 한 개 가지고 있었다(Fig. 1A). Sulfurtransferase는 thiosulfate와 cyanide의 화학적 반응을 촉매하여 sulfite와 thiocyanate를 생성하는 것으로 알려져 있다(Cipollone, 2008).

지금까지 알려진 SEN1 단백질과의 상동성을 비교한 결과

PagSENI 단백질은 아미노산 수준에서 *P. trichocarpa*의 *PtSENI* 과 97%의 가장 높은 서열 상동성을 나타내었으며, 피마자(*Ricinus communis* L.)의 SEN1과는 67%의 상동성을 보였다. 한편, 노쇠와 관련한 기능이 보고된 애기장대의 *AtSENI*, 담배의 *NtDIN* 그리고 무의 *RsDIN1* 단백질과는 각각 52%, 57% 그리고 49%의 상동성을 나타내었다. 식물에서 보고된 SEN1 단백질의 유연관계 분석 결과 단자엽과 쌍자엽으로 구분되었고, 쌍자엽은 다시 초본과 목본으로 구분되었다. 본 연구에서 분리한 PagSENI은 쌍자엽의 목본그룹에서 *P. trichocarpa*의 *PtSENI*과 가장 높은 유연관계를 나타내었다(Fig. 1B).

Southern blot 분석

PagSENI 유전자가 현사시나무에 몇 copy가 존재하는지 알아보기 위해 Southern blot 분석을 실시하였다. 현사시나무의 잎에서 분리한 genomic DNA를 제한효소 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 완전히 절단한 다음 전장의 *PagSENI* cDNA에서 합성한 probe로 hybridization을 실시하였다. 그 결과, *Bam*HI으로 절단한 genomic DNA에서는 2개의 band가 나타난 반면에 *Eco*RI으로 절단한 genomic DNA에서는 4개의 band가 나타났다(Fig. 2). *PagSENI*의 cDNA 염기서열에는 제한효소 *Bam*HI의 절단부위가 존재하지 않는다. 하지만 *Eco*RI 절단부위는 297~302번째와 386~391번째 염기의 위치에 두 개의 절단부위가 존재한다. 따라서 Southern blot 분석에서 나타난 hybridized band의 수와 제한효소 절단부위를 고려하면 현사시나무의 염색체에는 *PagSENI* 유전자가 2 copy 정도 존재하는 것으로 생각된다. 한편 Oh *et al.* (1996)의 보고에 의하면 애기장대에는 *SENI* 유전자가 1 copy가 존재하는 것으로 나타났다. 현사시나무에서 SEN1 유전자가 애기장대 보다 많은 것은 애기장대의 유전체 크기가 약 125 Mb이고, 유전자의 수가 약 25,000개(AGI, 2000)인 것에 비해, 포플러는 종 분화과정에서 일어난 염색체의 부분 또는 전체적 duplication에 의해 유전체의 크기가 약 500 Mb에 이르고 유전자는 약 45,000개(Tuskan *et al.*, 2006)가 존재하는 것을 반영한 결과로 생각된다. 이러한 사례는 Lee *et al.* (2013)이 현사시나무와 *P. trichocarpa*의 HD-ZIP III_1 유전자가 애기장대에 비해서 상대적으로 많다고 보고한 것과 동일한 결과이다.

PagSENI 유전자의 조직 특이적 발현

SENI 유전자가 애기장대와 무 그리고 담배 등에서 확인된 후 노쇠와 관련된 많은 연구가 이루어졌지만(Azumi and Watanabe,

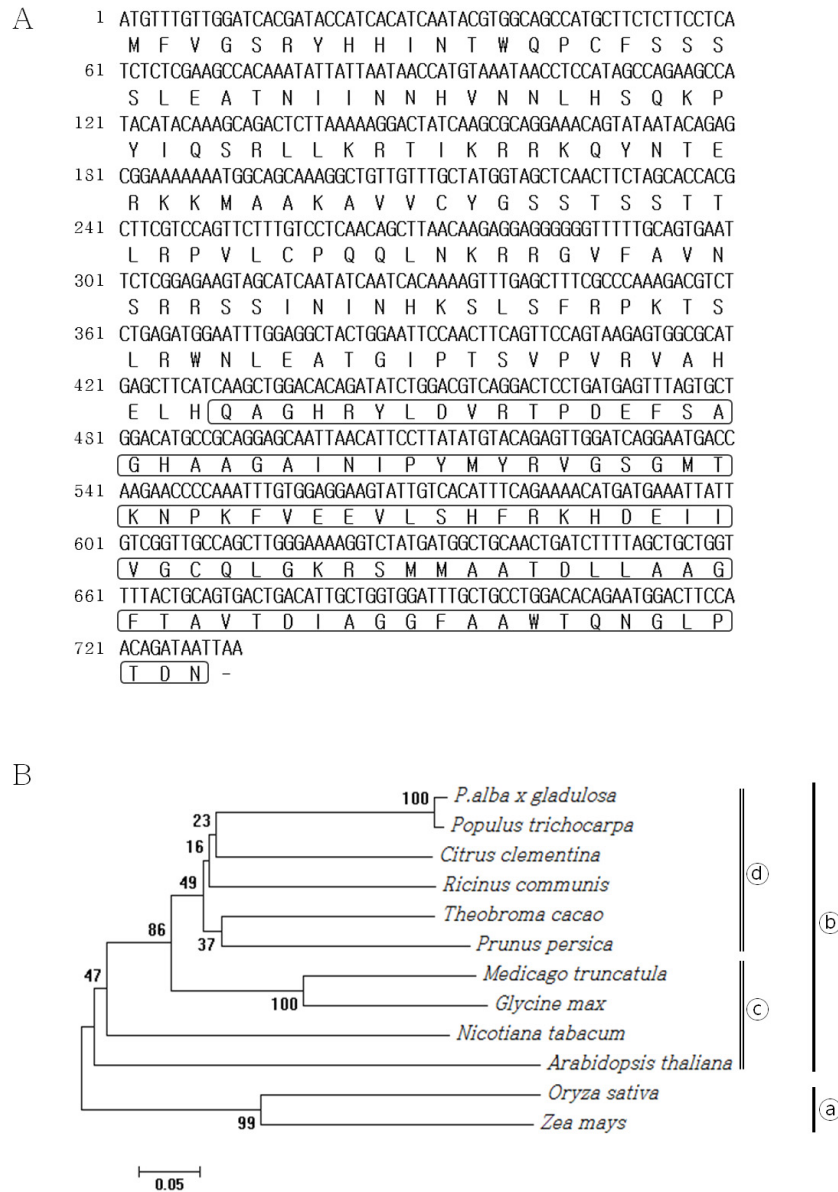


Fig. 1. (A) Nucleotide and amino acid sequences of the *PagSENI*. The box indicates a rhodanese domain. (B) Phylogenetic tree of various *SENI* homologs. ① monocot, ② dicot, ③ herbaceous and ④ woody plant except *Ricinus communis*. The accession numbers of the proteins are *Populus trichocarpa* (XP_006383026.1); *Ricinus communis* (XP_002530729.1); *Citrus clementina* (XP_006425337.1); *Theobroma cacao* (CM001879.1); *Prunus persica* (EMJ03837.1); *Medicago truncatula* (XP_003612270.1); *Glycine max* (NP_001235646.1); *Nicotiana tabacum* (AAZ23261.1); *Oryza sativa* (BAD61695.1); *Zea mays* (ACG42699.1); *Arabidopsis thaliana* (AAM61743.1).

1991; Oh *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2003), 아직까지 *SENI* 유전자의 식물 조직에 따른 발현양상은 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 현사시나무의 뿌리, 줄기, 어린잎과 성숙잎 그리고 꽃에서 *PagSENI* 유전자의 조직 특이적인 발현 여부를 조사하였다. 각각의 조직으로부터 total RNA를 분리하여 real-time

qPCR로 분석한 결과 *PagSENI* 유전자는 잎에서 가장 높게 발현되는 것으로 나타났으며, 상대적으로 성숙잎에서 더 높게 나타났다(Fig. 3). 즉, 뿌리에서 발현되는 *PagSENI* 유전자의 발현 수준을 기준으로 하여 비교한 결과 어린잎과 성숙잎에서의 발현이 각각 50배와 62배로 가장 높았다. 또한 줄기에서는 뿌리와

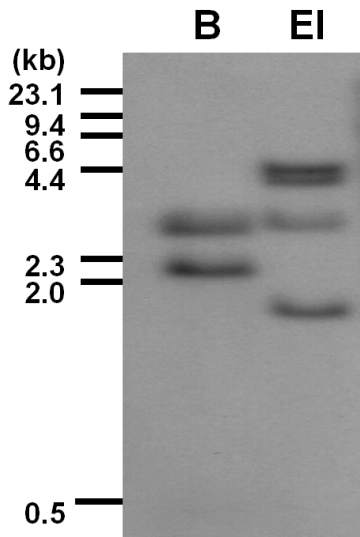


Fig. 2. Southern blot analysis of *PagSENI* gene in *Populus alba* × *P. glandulosa*. Genomic DNA digested with *Bam*HI (B) or *Eco*RI (EI) was fractionated by electrophoresis in 1.0% agarose gel. The gel was blotted onto nylon membrane, and hybridized with α-³²P labeled full-length *PagSENI* cDNA.

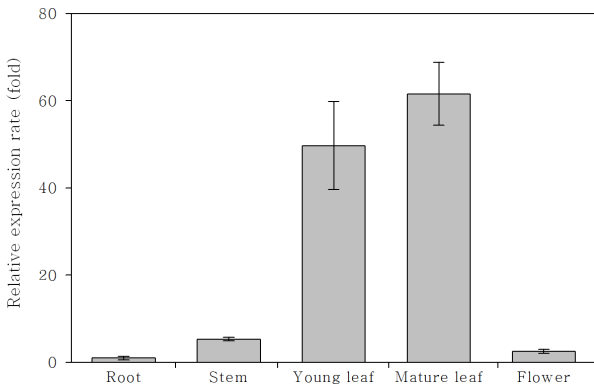


Fig. 3. Tissue specific expression of *PagSENI*. Error bars show the standard deviation of expression level.

비교하여 5배 이상 높았으며, 꽃에서는 2.5배 이상 높게 나타났다. 다른 조직보다 잎에서 발현량이 높게 나타난 것은 줄기와 뿌리, 꽃 보다는 잎에서 발달에 따른 노쇠 과정이 뚜렷하게 나타나기 때문이라 생각된다. 애기장대의 경우에도 발아 14일 후부터 잎에서 *SENI* 유전자의 전사가 활발히 일어나 노쇠 과정이 진행된다고 보고되었다(Oh *et al.*, 1996). *SENI* 유전자의 조직별 발현이 뿌리에서 가장 낮게 그리고 잎에서 가장 높게 나타나는 이유는 뿌리는 식물의 지상부 보다 늦게 휴면에 들어가고 빨리 휴면을 타파하기 때문에 상대적으로 노쇠와 관련된 영향을 적게 받기 때문으로 추정된다.

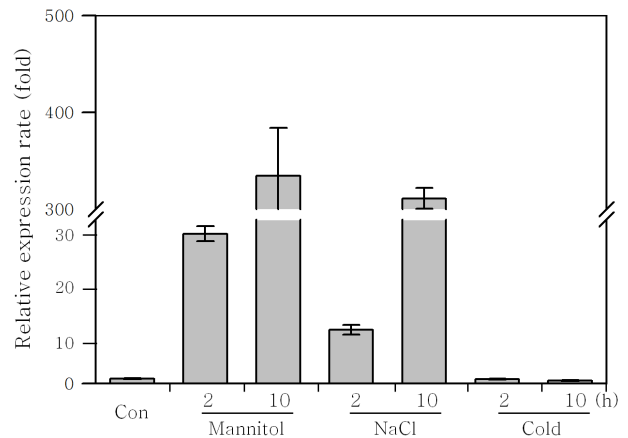


Fig. 4. *PagSENI* expression in response to treatment with mannitol (250 mM), NaCl (150 mM) and cold (2°C) for 2 and 10 h. *PagSENI* expression level represented as relative values when compared to that of untreated control (Con).

환경 스트레스 및 식물호르몬 처리에 따른 *PagSENI* 유전자의 발현

식물은 불량한 환경에 처하면 성장이 저해되고, 궁극적으로는 고사하게 된다. 이렇게 살아가기 힘든 환경에서 식물은 스스로 성장을 멈추고, 노쇠와 같은 과정을 거쳐 환경에 적응을 시작한다(Gepstein and Gillick, 2013). 높은 농도로 처리하면 식물 세포에 건조 스트레스 효과를 유발하는 mannitol (250 mM)과 염(150 mM NaCl) 그리고 저온(2°C)과 같은 환경 스트레스에 대한 *PagSENI* 유전자의 반응을 알아보기 위해 real-time qPCR 분석을 실시하였다. 그 결과 *PagSENI* 유전자는 mannitol과 염 처리 2시간 후부터 발현이 증가하기 시작하여, 처리 10시간 후에는 최대 300배 이상 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 *PagSENI* 유전자의 발현은 저온 처리에는 반응하지 않았다 (Fig. 4). Mannitol, 염 그리고 저온은 식물세포에 삼투 스트레스를 유발한다는 공통점을 가지고 있다(Xiong and Zhu, 2002; Agarwal and Jha, 2010). 본 연구에서는 *PagSENI* 유전자가 mannitol과 염 스트레스에는 반응하지만 저온 처리에는 반응하지 않는 것으로 나타났다. 식물은 가뭄과 염 스트레스에 반응하여 ABA를 경유한 경로와 ABA를 경유하지 않는 경로의 2가지의 신호전달경로를 통해 스트레스 반응 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). 그러나 저온 스트레스의 경우에는 ABA를 경유하지 않는 신호전달경로를 경유하여 신호를 전달한다. 따라서 *PagSENI* 유전자의 발현이 mannitol과 염 스트레스에는 반응하지만 저온 처리에는 반응하지 않는 것은 이 유전자의 발현이 ABA를 경유

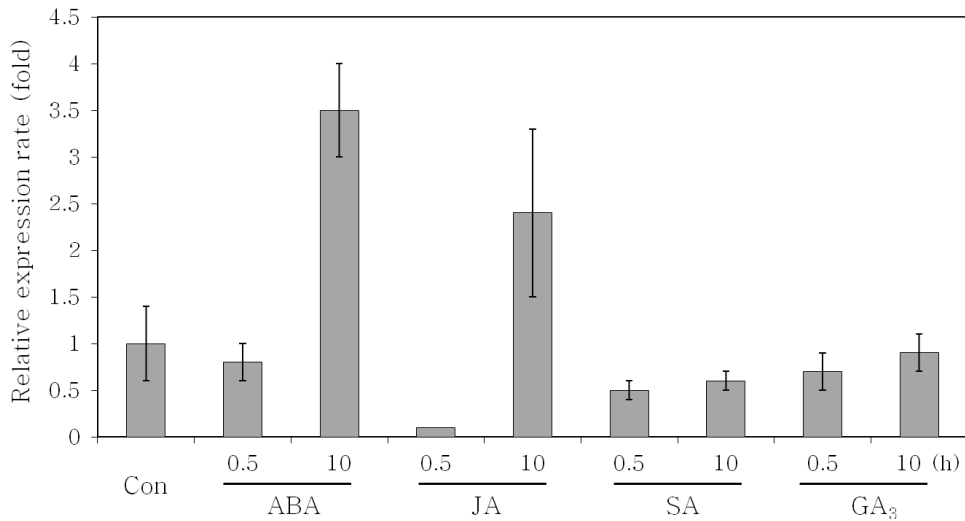


Fig. 5. *PagSENI* expression in response to treatment with plant growth regulators including ABA (20 μ M), JA (10 μ M), SA (20 μ M) and GA₃ (20 μ M) for 0.5 and 10 h. *PagSENI* expression level represented as relative values when compared to that of untreated control (Con).

한 신호전달경로와 관계가 있음을 나타내는 것으로 추정된다.

식물호르몬은 식물의 성장과 발달과정을 조절하는 가장 중요한 인자 중의 하나이다. 즉, 종자의 발아에서부터 성숙한 식물이 다시 종자를 만들고 죽기까지의 거의 모든 성장 및 발달과정에 식물호르몬이 관여한다. 따라서 현사시나무의 배양세포에 생리적 농도로 ABA, SA, JA 그리고 GA₃를 각각 처리한 다음 *PagSENI* 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 *PagSENI* 유전자는 ABA와 JA 처리 10시간 후에 발현이 3.5배와 2.4배 이상 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5). ABA는 식물의 성장과 발달과정 전반에 영향을 미치며, 환경 스트레스 반응과 노쇠과정에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; van der Graaff *et al.*, 2006; Jukanti *et al.*, 2008). 한편 JA는 식물의 삼투 스트레스 반응과 노쇠 등에 관여하는 것으로 알려져 있다(Ueda and Kato, 1980; Kramell *et al.*, 1995).

이상의 결과를 종합하면 현사시나무에서 분리한 *PagSENI* 유전자는 식물의 자연적 노쇠과정에 관여할 뿐 아니라 가뭄이나 염 스트레스와 같은 환경변화에 의해 유발되는 노쇠과정에도 관여하는 것으로 판단된다. 나무의 생산성은 성장과 관련된 고유한 유전적 형질과 식재환경에 의해 복합적으로 조절된다. 지구온난화에 따른 기후변화로 나무를 포함한 식물이 받는 환경 스트레스 피해가 심각해지는 것을 고려하면 *PagSENI* 유전자의 발현조절을 통한 식물의 생산성 향상이 가능할 것으로 기대된다. 따라서 *PagSENI* 유전자의 기능을 구명하기 위해 현재

형질전환 포플러를 만들고 있으며, 향후 실험실 및 포지에서 조사를 병행할 예정이다.

적 요

본 연구에서는 식물의 노쇠와 관련된 *SENESCENCE 1 (SENI)* 유전자를 현사시나무에서 분리하고, 여러 가지 조건에서 발현 특성을 분석하였다. 현사시나무의 *SENI* 유전자(*PagSENI*)는 243개의 아미노산으로 이루어져 있고, 한 개의 rhodanese domain 을 가지고 있다. Southern blot 분석 결과 *PagSENI* 유전자는 현사시나무에서 2 copy 정도가 존재하는 것으로 나타났다. 조직 특이적 발현양상을 분석한 결과 *PagSENI* 유전자는 성숙잎에서 가장 높게 발현하고, 뿌리에서 가장 낮게 발현하는 것으로 나타났다. 또한 mannitol과 염 스트레스 처리에 의해 300배 이상 발현이 증가한 반면에 저온 스트레스에는 반응하지 않았다. 식물 호르몬 처리에서는 ABA와 JA 처리 10시간 후에 발현이 3.5 배와 2.4배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 *PagSENI* 유전자는 건조와 염 스트레스에 반응하며, 식물의 자연적 노쇠 과정 뿐 아니라 스트레스와 같은 환경변화에 의해 유발되는 노쇠과정에도 관여하는 것으로 판단된다.

References

Agarwal, P.K and B. Jha. 2010. Transcription factors in plants

- and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biol. Plantarum* 54:201-212.
- AGI, Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815.
- Azumi, Y. and A. Watanabe. 1991. Evidence of a senescence-associated gene induced by darkness. *Plant Physiol.* 95:577-583.
- Buchanan-Wollaston, V., T. Page, E. Harrison, E. Breeze, P.O. Lim, H.G. Nam, J.F. Lin, S.H. Wu, J. Swidzinski, K. Ishizaki and C.J. Leaver. 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42:567-585.
- Cipollone, R., P. Ascenzi, P. Tomao, F. Imperi and P. Visca. 2008. Enzymatic detoxification of cyanide: clues from *Pseudomonas aeruginosa* Rhodanese. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15:199-211.
- Fuqiang, C., B. Mikael, S. Nina, T. Saijun and O. Kirk. 2013. Regulation of ABA dependent wound induced spreading cell death by MYB 108. *New Phytol.* 200:634-640.
- Gepstein, S. and B.R. Glick. 2013. Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. *Plant Mol. Biol.* 82:623-633.
- van der Graaff, E., R. Schwacke, A. Schneider, M. Desimone, U.I. Flügge and R. Kunze. 2006. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol.* 141:776-792.
- Himelblau, E. and R.M. Amasino. 2001. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *J. Plant Physiol.* 158:1317-1323.
- Hörtensteiner, S. and U. Feller. 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.* 53:927-937.
- Jukanti, A.K., N.M. Heidlebaugh, D.L. Parrott, I.A. Fischer, K. McInerney and A.M. Fischer. 2008. Comparative transcriptome profiling of near-isogenic barley (*Hordeum vulgare*) lines differing in the allelic state of a major grain protein content locus identifies genes with possible roles in leaf senescence and nitrogen reallocation. *New Phytol.* 177:333-349.
- Keskitalo, J., G. Bergquist, P. Gardstrom and S. Jansson. 2005. A cellular timetable of autumn senescence. *Plant Physiol.* 139:1635-1648.
- Kim, Y.H., M.D. Kim, Y.I. Choi, S.C. Park, D.J. Yun, E.W. Noh, H.S. Lee and S.S. Kwak. 2011. Transgenic poplar expressing *Arabidopsis NDPK2* enhances growth as well as oxidative stress tolerance. *Plant Biotechnol. J.* 9:334-347.
- Kramell, R., R. Atzorn, G. Schneider, O. Miersch, C. Brückner, J. Schmidt, G. Sembdner and B. Parthier. 1995. Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *J. Plant Growth Regul.* 14:29-36.
- Lee, D.W., J. O'Keefe, N. Michele, M. Holbrook and T.S. Feilk. 2003. Pigment dynamics and autumn leaf senescence in a New England deciduous forest, eastern USA. *Ecol. Res.* 18:677-694.
- Lee, H., J.S. Lee, E.W. Noh, E.K. Bae, Y.I. Choi and M.S. Han. 2005. Generation and analysis of expressed sequence tags from poplar (*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*) suspension cells. *Plant Sci.* 169:1118-1124.
- _____, E.J. Park, S.K. Yoon, M.N. Choi and S.H. Eo. 2013. Isolation and characterization of homeodomain-Leucine Zipper III Protein 1 gene in poplar. *Plant Breed. Biotech.* 1:236-244.
- Oh, S.A., S.Y. Lee, I.K. Chung, C.-H. Lee and H.G. Nam. 1996. A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* 30:739-754.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:2002-2007.
- Rohde, A. and R.P. Bhalerao. 2007. Plant dormancy in the perennial context. *Trends Plant Sci.* 12:217-223.
- Schenk, P.M., K. Kazan, A.G. Rusu, J.M. Manners and D.J. Maclean. 2005. The *SEN1* gene of *Arabidopsis* is regulated by signals that link plant defence responses and senescence. *Plant Physiol. Biochem.* 43:997-1005.
- Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:217-223.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Thomas, H. 2013. Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytol.* 197:696-711.
- Tuskan, G.A., S. Difazio, S. Jansson, J. Bohlmann, I. Grigoriev *et al.* 2006. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313:1596-1604.
- Ueda, J. and Kato, J. 1980. Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiol.* 66:246-249.
- Xiong, L. and J.-K. Zhu. 2002. Molecular and genetic aspects

of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.*
25:131-139.
Yang, S.H., T. Berberich, A. Miyazaki, H. Sano and T. Kusano.

2003. *Ntdin*, a tobacco senescence-associated gene, is involved
in molybdenum cofactor biosynthesis. *Plant Cell Physiol.*
44:1037-1044.

(Received 21 February 2014 ; Revised 14 April 2014 ; Accepted 23 June 2014)