

Research Report

배추 염 저항성 관련 유전자의 네트워크 모델 구축

이기호[†], 유재경[†], 박지현, 박영두^{*}

경희대학교 생명과학대학 원예생명공학과

Construction of a Network Model to Reveal Genes Related to Salt Tolerance in Chinese Cabbage

Gi-Ho Lee[†], Jae-Gyeong Yu[†], Ji-Hyun Park, and Young-Doo Park^{*}

Department of Horticultural Biotechnology, Kyunghee University, Yongin 446-701, Korea

Abstract: Abiotic stress conditions such as cold, drought, and salinity trigger physiological and morphological changes and yield loss in plants. Hence, plants adapt to adverse environments by developing tolerance through complex regulation of genes related to various metabolic processes. This study was conducted to construct a coexpression network for multidirectional analysis of salt-stress response genes in *Brassica rapa* (Chinese cabbage). To construct the coexpression network, we collected KBGP-24K microarray data from the *B. rapa* EST and microarray database (BrEMD) and performed time-based expression analyses of *B. rapa* plants. The constructed coexpression network model showed 1,853 nodes, 5,740 edges, and 142 connected components (correlation coefficient > 0.85). On the basis of the significantly expressed genes in the network, we concluded that the development of salt tolerance is closely related to the activation of Na⁺ transport by reactive oxygen species signaling and the accumulation of proline in Chinese cabbage.

Additional key words: abiotic stress, microarray, jasmonic acid, reactive oxygen species

서 언

저온, 건조, 염 집적과 같은 비생물적 스트레스는 작물의 생육 및 발달, 생리적 변화 등과 같은 대사과정에 속해 있는 유전자들의 발현 수준을 변화시킴에 따라 작물의 형태적, 생육적 변화와 수확량 감소를 초래한다(Krasensky and Jonak, 2012; Wang et al., 2003). 특히 염 스트레스는 직접적으로 식물 세포에서 분자생물학적 불균형을 유발하여 고삼투압 스트레스, 항상성 파괴 및 이온 독성을 동반하여 식물의 생장 및 발달, 수확량 저하를 유발하고, 간접적으로는 염 스트레스에 의한 수분 부족 현상으로 광합성 효율의 저하와 이

에 따른 세포 독성을 가진 활성 산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 초래한다(Sobhanian et al., 2011). 이를 해결하기 위해 최근 애기장대(Chan et al., 2012; Liu et al., 2013), 벼(Pandit et al., 2011; Ray et al., 2011), 아욱(Yang et al., 2011), 및 면화(Rodriguez-Urbe et al., 2011)에서 염 스트레스에 관한 microarray 연구 및 EST 분석으로 염 저항성 기작 및 관련 유전자를 분석하기 위한 대규모 유전체 연구들이 진행되고 있다. 이 연구 결과들은 염 스트레스가 ROS의 형성 및 제거 기작을 포함하여, 저항성 기작과 관련된 다양한 신호의 전달 및 세포벽 약화, 단백질 생합성 및 에너지 대사 과정 변화뿐만 아니라 아미노산 및 식물 호르몬의 변화에도

*Corresponding author: ydpark@khu.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

※ Received 27 February 2014; Revised 12 April 2014; Accepted 29 April 2014. 본 연구는 국립농업과학원 농업생명자원부 [(구)농업생명공학연구원]이 공개한 BrEMD(*Brassica rapa* EST and Microarray Database)를 이용하여 분석한 결과임. 또한 본 연구는 2011년도 경희대학교 연구교수 지원사업에 의한 결과임(KHU-20110210).

© 2014 Korean Society for Horticultural Science

복합적으로 연관되어 있음을 보고하였다. 이에 따라 이러한 복합적 발현 기작간의 상호 관계 확인과 저항성과 관련된 미지의 기작 및 유용 유전자를 발견하기 위하여 유전자 발현 네트워크를 구축하고 이를 분석하는 연구가 진행되고 있다(Bassel et al., 2011; Lee et al., 2010).

배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)는 유채(*B. napus*)와 양배추(*B. oleracea*)과 같은 배추 속으로 대한민국뿐만이 아니라 중국, 일본과 같이 아시아 국가에서 중요한 원예 작물 중 하나이다(Yu et al., 2010). 따라서 본 연구는 농촌진흥청(구)농업생명공학연구원 배추제염팀과 본 연구팀과의 공동 연구 결과가 공개되어 있는 BrEMD(*Brassica rapa* EST and Microarray Database)에서 배추에서의 염 스트레스에 대한 microarray 정보를 획득하고, 이것을 통계적 분석 및 관련 유전자들의 가시화를 통해 배추에서의 염 스트레스 저항성 관련 유전자들의 발현 네트워크 모델을 구축하였다.

재료 및 방법

Microarray 정보 수집 및 네트워크 모델 구축

배추에서의 염 스트레스에 의한 발현 유전자 정보는 농촌진흥청(구)농업생명공학연구원 배추제염팀의 연구 결과를 공개해 놓은 배추 유전자 정보 홈페이지(*Brassica rapa* EST and Microarray Database, <http://www.brassica-rapa.org/BrEMD>; 현재 농업생명공학정보센터, <http://nabic.rda.go.kr/>)에서 획득하였다. 해당 정보는 생육환경이 일정한 식물생장상(온도 25°C, 광주기 16시간 명처리/8시간 암처리, 광도 290 μ E·m⁻²·s⁻¹, 습도 40-70%)에서 3주간 생육된 근교계통 배추인 ‘Chiifu’를 대상으로 0.5, 3, 12, 24, 48시간 간격의 염(250mM NaCl) 처리 후 각 시간대별로 total RNA를 분리하고, 발현하는 배추 유전자를 NimbleGen System을 이용한 KBGP-24K microarray chip 분석 결과로서 2반복으로 진행되었다(Lee et al., 2008).

염 스트레스에 의한 배추 내 발현 유전자의 상호 관계 분석은 143회의 *Brassica* 300K microarray data를 기반으로 각 유전자 간 발현 연관성을 분석 및 제공하는 PlantArrayNet (GreenGene BioTech Inc.; <http://bioinfo.mju.ac.kr/arraynet/>)을 이용하였다. 염 스트레스 조건에 따른 KBGP-24K microarray chip 분석 결과에서 처리 대조군(0시간)을 기준으로 2배 이상 발현이 변화하는 유전자 중 PlantArrayNet 분석에서 Pearson correlations value 절댓값 > 0.85(cutoff p-value < 0.05)로 나타나는 유전자군을 선발하였다. 분석된 염 스트레스 관련 유전자 발현 네트워크 모델은 Cytoscape program(version

2.8.3, Cytoscape Consortium; Smoot et al., 2011)을 이용하여 구축하였으며, 네트워크의 구조는 spring embedded layout을 이용하여 가시적으로 형상화하였다(Barnes and Hut, 1986).

염 처리간 배추 내부 유전자 발현 변화 분석

구축한 네트워크를 이용하여 염 스트레스 처리 시간 변화에 따른 유전자 발현을 분석하였다. 발현 네트워크상 유전자군의 대사과정 변화는 다양한 작물의 유전체 정보 및 관련 대사 과정을 종합적으로 제시하는 데이터베이스인 KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>)를 이용하여 획득하였으며, 발현 유전자 기능 분류 분석을 통한 배추의 염 저항성 기능 유추는 DAVID(The database for annotation, visualization and integrated discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)를 사용하여 수행하였다(Huang et al., 2009; Kanehisa et al., 2012). 이후 gene ontology 분석은 Cytoscape plug-in program ClueGO를 이용하여 시각적으로 분석 및 표현하였다(Bindea et al., 2009).

결과 및 고찰

염 스트레스 처리 시 발현 네트워크 모델 구축

PlantArrayNet가 제공하는 *Brassica* 300K microarray data와 본 연구팀 및 (구)농업생명공학연구원 배추제염팀과의 공동연구 결과인 KBGP-24K microarray chip 분석 데이터를 이용하여 배추에서 염 스트레스 반응 유전자들의 발현 네트워크 모델을 구축하였다. 염 스트레스에 따른 배추 내 유전자 발현 연관 관계를 correlations value > 0.85로 선발한 결과 총 23,937개의 probe 중에서 1,853개의 probe가 염 스트레스 조건에서 유의적으로 발현하는 것으로 분석되었다. 분석된 유전자 발현 네트워크 기능을 유추하기 위하여 DAVID bioinformatics resources를 이용하여 functional annotation clustering을 실시하였다. 분석된 193개의 기능적 클러스터 중 enrichment score가 높은 순서로 5개의 클러스터를 선발하였다(Table 1). 그 결과 기능적 클러스터 중 가장 높은 enrichment score를 가진 [cluster 1]의 경우 수분 스트레스 조건 하에 반응하는 유전자군이 선발되었으며, [response to abiotic stimulus], [response to osmotic stress], [response to salt stress]에 관련된 유전자가 다수 집적되어 있었다. 이는 염 스트레스에 의해 발생하는 이온 불균형으로 식물 내부의 삼투압 변화가 발생하고 이러한 수분 스트레스에 의해 식물

Table 1. Functional annotation clustering of genes related salt stress in Chinese cabbage.

Cluster number	Cluster enrichment Score	GO code ^z	Functional category	Count	P-value	Benjamini value
Cluster 1	19.86	GO:0009628	response to abiotic stimulus	167	2.19E-30	2.97E-27
		GO:0006970	response to osmotic stress	68	1.34E-16	1.51E-13
		GO:0009651	response to salt stress	62	9.26E-15	1.25E-11
Cluster 2	7.67	GO:0010033	response to organic substance	119	8.29E-11	1.41E-08
		GO:0009719	response to endogenous stimulus	99	3.77E-09	3.65E-07
		GO:0009737	response to abscisic acid stimulus	42	1.72E-08	1.30E-06
		GO:0009725	response to hormone stimulus	80	3.75E-05	0.001375
Cluster 3	7.40	GO:0010035	response to inorganic substance	67	9.19E-10	9.60E-08
		GO:0046686	response to cadmium ion	44	1.10E-07	7.09E-06
		GO:0010038	response to metal ion	47	6.26E-07	3.40E-05
Cluster 4	6.41	GO:0006979	response to oxidative stress	45	6.74E-10	7.63E-08
		GO:0042542	response to hydrogen peroxide	23	3.84E-07	2.37E-05
		GO:0009644	response to high light intensity	14	4.36E-07	2.57E-05
		GO:0000302	response to reactive oxygen species	23	8.57E-06	3.75E-04
		GO:0009642	response to light intensity	16	8.80E-06	3.73E-04
Cluster 5	5.59	GO:0030312	external encapsulating structure	67	5.15E-08	4.53E-06
		GO:0005618	cell wall	66	6.67E-08	4.41E-06
		GO:0009505	plant-type cell wall	26	0.005179	0.117165

^zGene ontology code number.

내부 대사과정에 영향을 받는 것으로 판단된다(Bray, 1997). 즉, 선발한 probe 집단은 염 스트레스 조건에서 유의적으로 발현되는 것으로 분석되어, 염 스트레스 처리에 따른 발현 네트워크 모델 구축에 적합한 것으로 분석되었다. 이와 같이 분석된 data를 spring embedded layout을 이용하여 가시화하였다(Fig. 1). 구축된 유전자 발현 네트워크는 각각의 유전자를 나타내는 node와 각 유전자간의 유의적 발현 상호관계를 edge로 표현하였으며, 네트워크 모델을 구축 후 multi-edge node pair와 self-loop node를 분석 후 제거하여 총 1,853개 node, 5,740개 edge, 및 142개 connected component로 구축되었다. 특히 이들 하위 connected component 중 유의적인 유전자 상호관계 네트워크가 가장 크게 차지하고 있는 그룹이 1,398개 node(75.44%)와 5,375개 edge(93.64%)를 포함하고 있어 네트워크 모델이 높은 연관 관계로 구축된 것으로 분석되었다.

염 스트레스 네트워크 모델을 이용한 처리시간별 반응 기작 분석

구축한 네트워크를 바탕으로 배추에서 염 스트레스(250mM NaCl) 발생 시 시간경과에 따른 내부 유전자군들의 유의적 발현 패턴을 분석한 결과 총 1,853개의 유전자 중에서 0.5시간에는 275개(14.84%), 3시간 경과 시 383개(20.67%), 12시간 경과 시 534개(28.82%), 24시간 경과 시 456개(24.61%), 48시간 경과 시에는 205개(11.06%) 유전자가 유의적인 상호 관계를 가지는 것으로 분석되었다(Fig. 1).

염 처리 30분(0.5h) 후 반응하는 유전자군은 [response to heat], [response to wounding], 및 [toxin metabolic process]으로 분류되어 염 스트레스 반응 유전자와 다른 비생물적 스트레스의 신호 전달 관련 유전자가 유사하게 발현되었다(Fig. 2A). 선발된 유전자군을 이용하여 KEGG pathway 분석을 실시한 결과, 'Phosphatidylinositol signaling system'와 'alpha-Linolenic acid metabolism pathway'에 관련이 있었다.

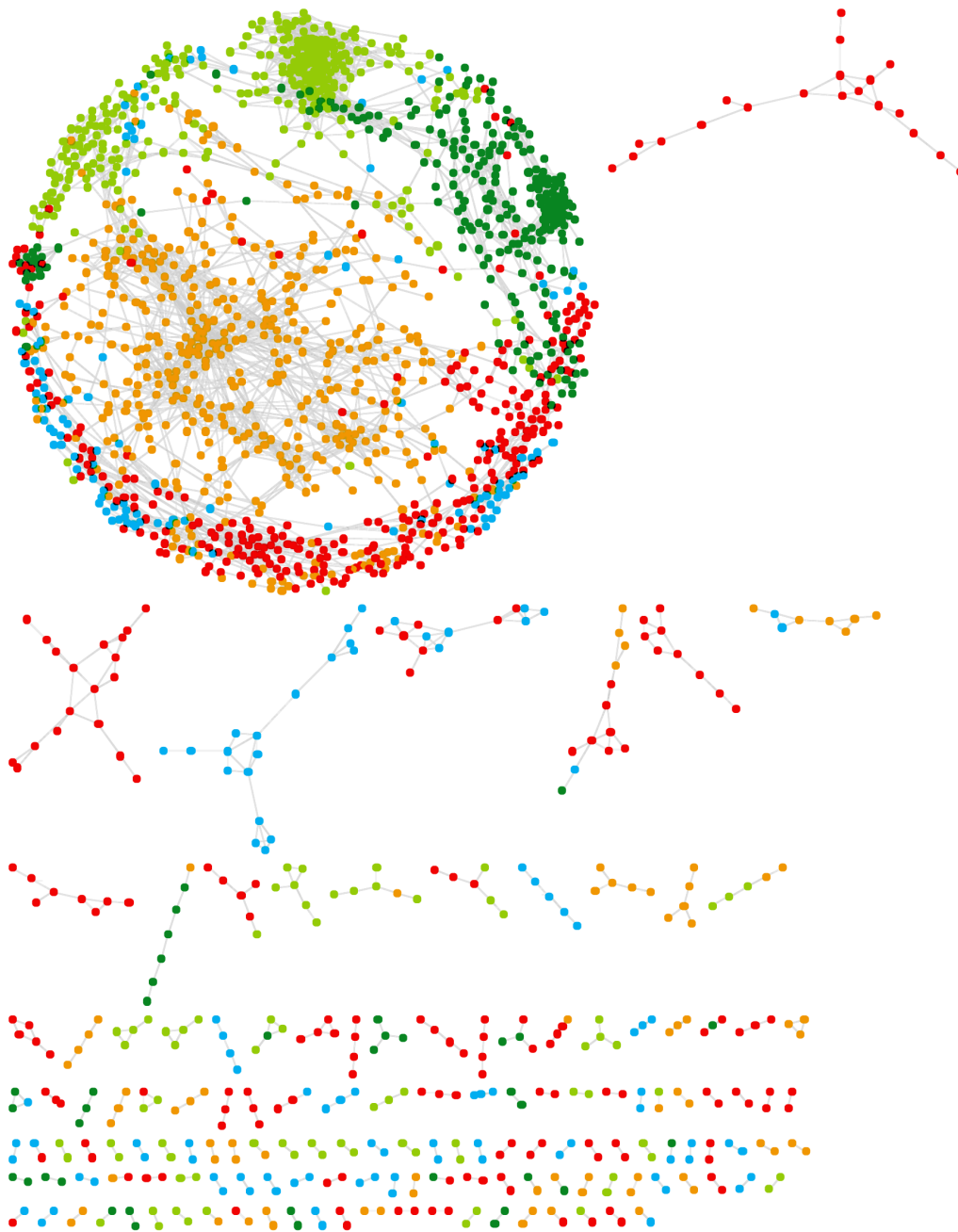


Fig. 1. Properties and topologies of gene coexpression networks related salt stress in Chinese cabbage. The analyzed experiment data in the coexpression network indicates that the average correlation coefficient is above 0.85. The network is displayed Cytoscape spring embedded layout. Nodes represent genes and edges represent significant expressional interactions between the genes. Colored dots indicated the significant expressed genes during 0.5 h (275 nodes; green, ●), 3 h (383 nodes; yellow-green, ●), 12 h (534 nodes; orange-yellow, ●), 24 h (456 nodes; red, ●), and 48 h (205 nodes; turquoise blue, ●) after 250 mM NaCl treatment.

이전까지의 연구에서는 염이 식물체 내로 유입되면 ROS 등에 의한 산화적 스트레스가 발생하게 되고 세포 내부의 endosome의 ROS 형성을 유도하여 독성을 가지게 되어 피해를 주는 것으로 알려졌지만, 최근 연구에 따르면 식물체

내에서 phosphatidylinositol signaling system 및 NADPH oxidase에 의해 형성된 ROS는 식물체에서 염 저항성 기작을 활성화하는 데 필수적인 요소로 보고되고 있으며(Kaye et al., 2011; Leshem et al., 2007), 배추를 대상으로 한 분

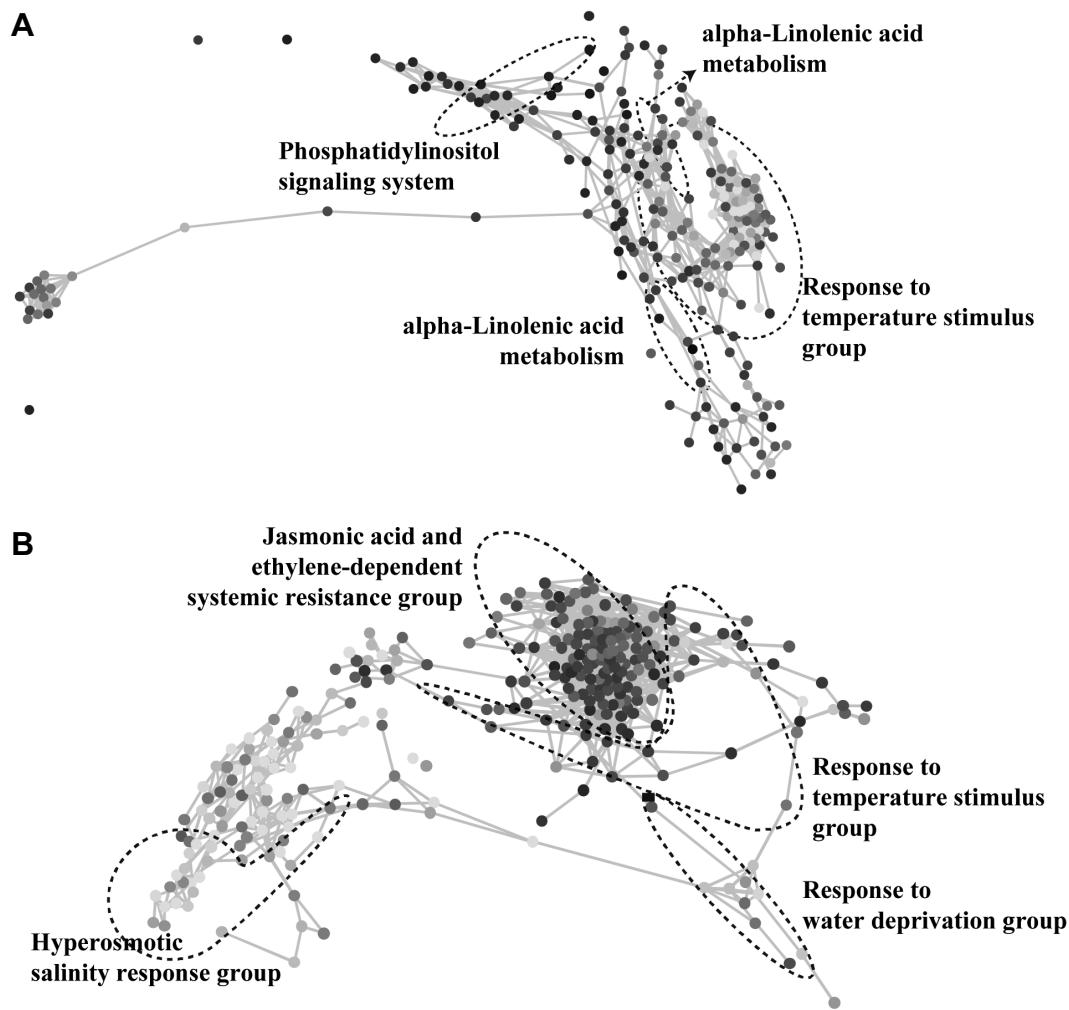


Fig. 2. Properties and topologies of gene coexpression networks related salt stress in Chinese cabbage. Coexpression networks show gene interactions with correlation coefficient above 0.85. The color scale bar indicates the maximum and minimum brightness values that represent expression ratios in log 2. Bright gray color indicates higher transcript levels than observed in the controls, whereas black means lower transcript levels. Networks are displayed by Cytoscape spring embedded layout.

연구에서도 ROS가 염 저항성 기작 활성화에 주요 인자로 작용하는 것으로 판단된다. Linolenic acid의 경우 Noreen and Ashraf(2010) 연구에서 염 스트레스 조건에서 해바라기 종자의 linolenic acid 함량이 유의적으로 감소하였다고 보고하였으며, 배추를 대상으로 한 본 연구에서도 30분간의 염 처리가 linolenic acid 대사과정에 부정적인 역할을 한 것으로 판단된다.

염 처리 3시간(3h) 후 반응하는 유전자군은 주로 [response to jasmonic acid stimulus], [response to water deprivation], [cellular response to extracellular stimulus], [response to toxin] 및 [tryptophan metabolic process]에 관련된 유전자들이었다 (Fig. 2B). 특히 [response to water deprivation] 유전자 그룹

에는 수분 스트레스에 관련된 유전자들과 abscisic acid 관련 유전자들이 다수 발현되는 것으로 분석되었다. 이는 염 스트레스에 의한 수분 공급의 부족으로 판단된다. 특히 Jie et al.(2010)의 연구에서 건조를 포함한 염 스트레스가 인(P)과 질소(N)의 흡수를 막아서 식물체의 수분함량(RWC, relative water content)의 감소를 유발하고, 이런 현상은 광합성과 증산을 억제하게 한다고 보고하였다. 따라서 [cellular response to extracellular stimulus] 그룹에서 인(P)과 질소(N)의 부족 현상에 대한 반응이 일어나는 것으로 판단된다. [response to jasmonic acid stimulus]의 경우 자스모닉산(jasmonic acid, JA) 신호에 의한 반응으로 분석되었다. 일반적으로 JA 신호는 식물의 생물적뿐만 아니라 비생물적 스트레스 방어 기작

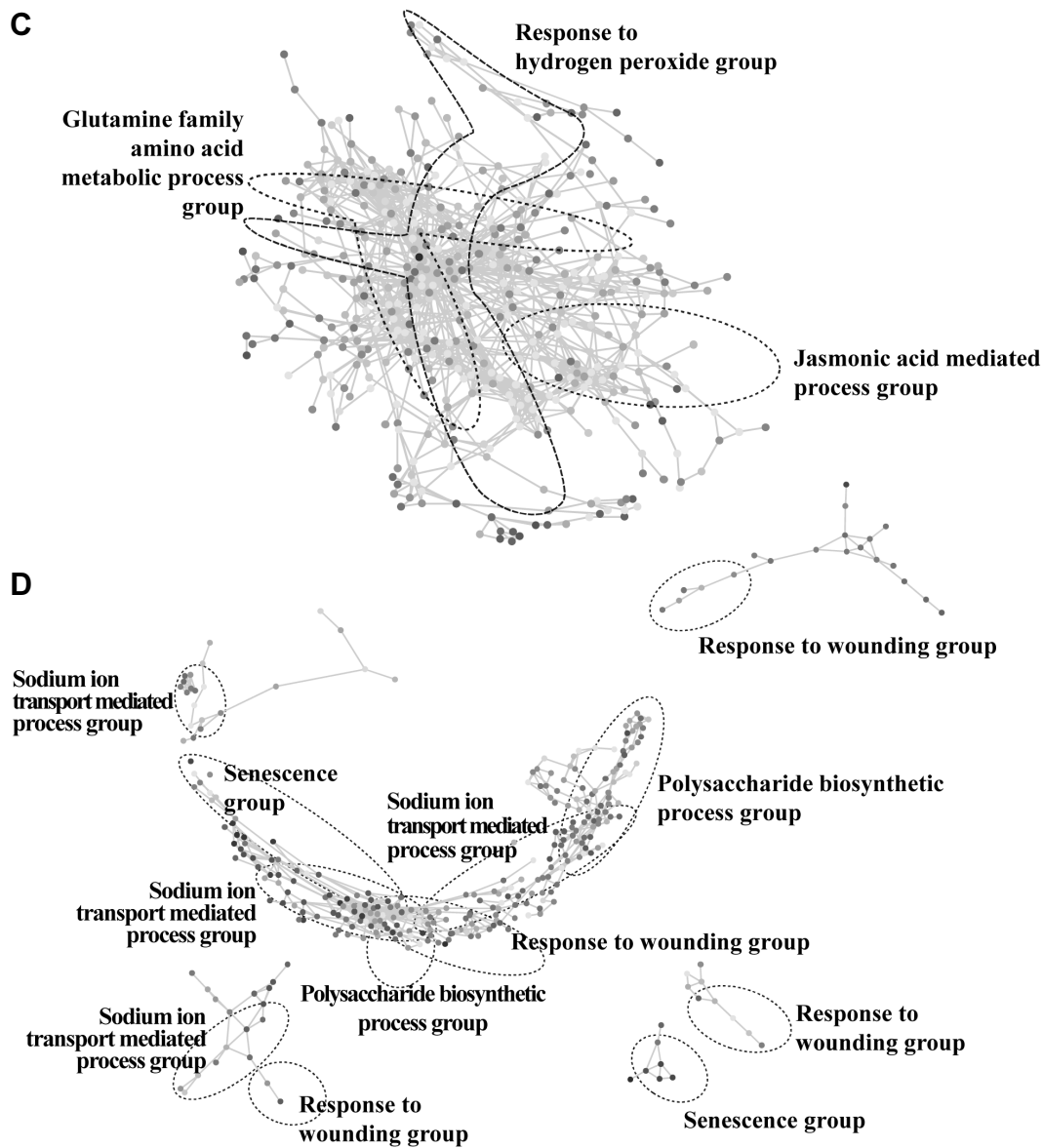


Fig. 2. Continued.

의 필수적인 신호 전달 인자로 알려져 있다. Ismail et al. (2012)의 연구에 의하면, Na^+ 가 세포 내부로 유입이 되면 합성된 JA에 의해 염 스트레스 저항성과 관련된 Na^+/H^+ EXCHANGER(*NHX1*) 유전자가 작동하게 되고, JA 피드백 작용으로 jasmonate ZIM/tify-domain(*JAZ/TIFY*) proteins이 작동하여 JA를 억제하는 대사과정이 형성된다고 보고하였다. 즉, 염 스트레스 저항성과 관련 있는 *NHX1* 유전자는 장기적인 염 스트레스 저항성 신호 전달 효과가 있는 ROS를 형성할 뿐만 아니라, 액포 내부로 Na^+ 을 수송하여 세포질 내 삼투압 균형을 유지시키는 것으로 판단된다. 이에 따

라 염 처리 3시간째 일어나는 [response to jasmonic acid stimulus]는 전체 시간에 따른 처리 반응에서 JA 신호에 의한 염 저항성 획득 기작의 초기 반응에 해당하는 것으로 판단된다.

염 처리 12시간(12h) 후 반응하는 유전자군은 [response to temperature stimulus]과 [response to hydrogen peroxide]이 주요 그룹으로 분석되었다(Fig. 2C). 이는 앞의 염 처리 후 30분 및 3시간 반응과 동일하게 염 스트레스 반응 기작이 작동하는 것으로 분석되었다. 즉, [regulation of response to stimulus] 유전자군을 바탕으로 [response to water deprivation]

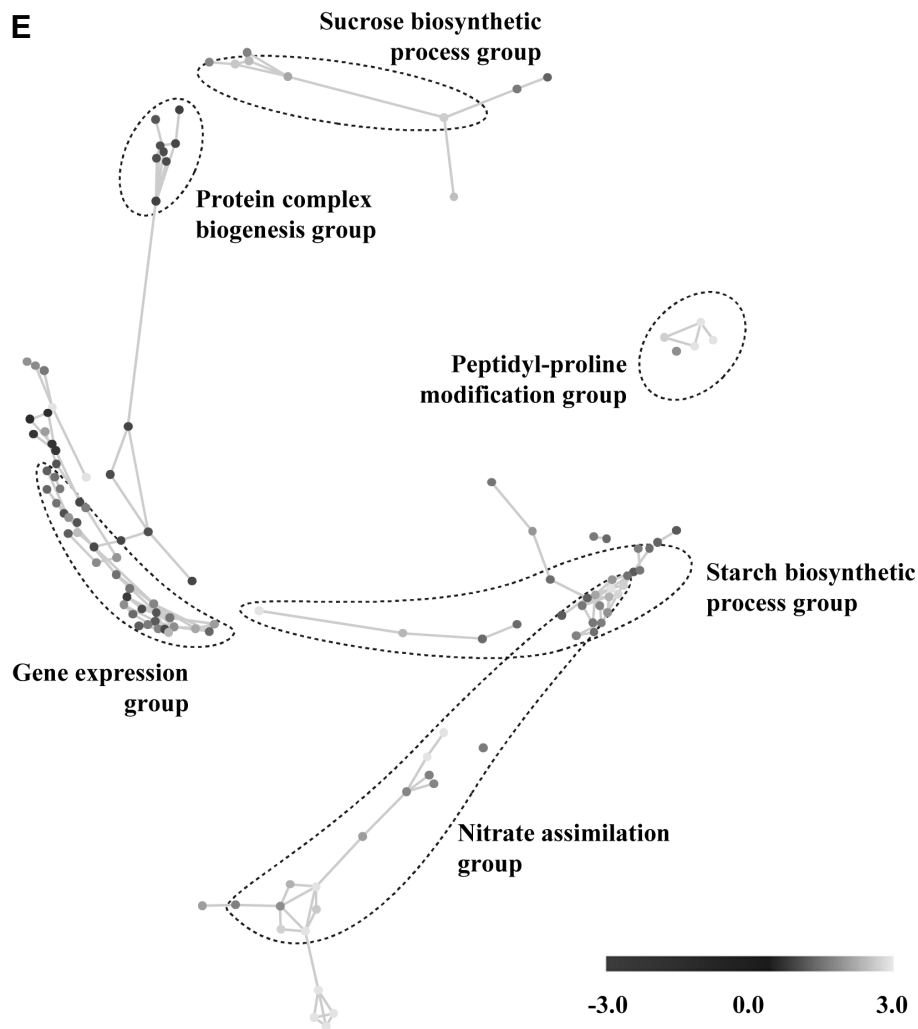


Fig. 2. Continued.

유전자 군이 작동하여 염 스트레스에 의한 수분 부족 현상을 보완 하는 기작이 작동하게 된 것으로 판단된다. 또한 [response to hydrogen peroxide] 그룹에서도 염 스트레스의 저항성 신호 전달자인 ROS에 의한 반응이 두드러지게 나타나고 있어 앞선 시간대의 염 스트레스 반응 기작과의 연관성을 보여 주었다. 또한 이 유전자군이 [short-chain fatty acid metabolic process]에 의해서 [glutamine family amino acid metabolic process]로 넘어가는 네트워크와 긴밀하게 연관되어, 배추에서 ‘hyperosmotic salinity response’과 ‘proline metabolic process’ 유전자군에 의해 최종적으로 [response to desiccation] 반응으로 연결되었다. 즉, ROS의 신호에 의해 발생하는 장기적인 염 저항성 획득은 [glutamine family amino acid metabolic process]와 관련 있는 것으로 판단된다.

다음으로 염 처리 24시간(24h) 후 반응하는 유전자군은 [sodium ion transport], [response to wounding], [polysaccharide biosynthetic process], [response to osmotic stress], 및 [senescence]의 5개의 그룹으로 분석되었다(Fig. 2D). 이전 시간대 반응에 이어서 24시간째 반응에서도 염 스트레스에 의해 발생하는 jasmonic acid signal 반응으로 ROS 인식 및 이에 따른 저항성 기작 반응이 주로 분석되었다. 또한 발생한 수분 스트레스에 의하여 [response to osmotic stress] 그룹에서 [response to abscisic acid stimulus]와 [response to gibberellin stimulus] 유전자군이 발현하였다. 이러한 발현의 상호 관계는 [response to wounding] 유전자군에 의한 식물체내 저항성 기작의 작동과 함께 [polysaccharide biosynthetic process] 유전자군이 발현하여 세포벽 형성을 촉진하는 것으로 분석되었다. 이

결과는 Singh and Prasad(2009)의 연구에서 보고한 바와 같이 염 스트레스가 세포벽에 존재하는 세포벽 가수분해 효소 (cell wall hydrolase)의 활성을 억제하여 세포벽을 딱딱하게 만들어 세포의 크기, 성장 속도 및 생체중은 감소하지만, 염에 대한 저항성을 획득하는 효과가 있음을 보고한 것과 관련이 있는 것으로 판단된다. 또한 처리 3시간 때부터 작동하기 시작한 JA 신호에 의해 염 스트레스 저항성과 관련된 Na^+/H^+ EXCHANGER(*NHX1*)가 처리 24시간 때 활성화되기 시작하였다. *NHX1*의 경우 주로 미토콘드리아나 세포벽에서 발견되어 이온 및 pH의 균형을 조절하는 역할을 하며, 염 스트레스 조건 시 세포의 항상성 유지를 위해 과발현되는 것으로 보고되었다(Rodríguez-Rosales et al., 2009). 특히 동일한 배추과인 갯(*Brassica juncea*)과 유채(*Brassica napus*)에서 *NHX1* 유전자의 과발현을 통한 염 저항성의 획득을 보고하였다(Rajagopal et al., 2007; Zhang et al., 2001). 배추를 이용한 본 연구 결과에서도 외부에서 유입된 Na^+ 을 *NHX1*이 외부로 배출시키는 역할을 하는 것으로 판단된다.

마지막으로 염 처리 48시간(48h) 후 반응하는 유전자군은 [peptidyl-proline modification], [sucrose biosynthetic process], [nitrate assimilation], [starch biosynthetic process], [pollen tube growth], 및 [protein secretion]으로 분석되었다. 식물체가 고농도의 염 스트레스를 받게 되면 세포 내 자당(sucrose) 농도가 증가하여 피드백(feed-back) 작용에 의해 탄소 동화 작용이 감소됨에 따라 생육이 억제되고(Gilbert et al., 1997; Krapp and Stitt, 1995; Krapp et al., 1991; Pattanagul and Thitisaksakul, 2008), nitrate transporters(*NRT*)의 활성 저해로 식물 생육에 필수적인 질산염(nitrate)의 흡수를 방해한다(Yao et al., 2008). 이와는 대조적으로 당으로부터 전환되는 전분(starch)의 축적은 직접적인 염 저항성 효과는 없지만 세포 내 자당의 농도를 낮추어 탄소 동화작용의 피드백 작용을 억제하는 효과를 부여하여 염 스트레스에 의한 생리적 피해를 억제하는 것으로 보고되어 있다(Balibrea et al., 2000; Pattanagul and Thitisaksakul, 2008). 또한 ‘peptidyl-proline modification’ 기능과 관련된 유전자들의 발현으로 세포 내부에 proline을 축적하여 염 스트레스를 극복하는 기작이 작동하는 것으로 분석되었다. Proline은 세포의 삼투압 조절, 세포막 안정성 부여 및 염 스트레스와 같은 외부 스트레스로부터 식물체를 보호하는 역할을 하기 때문에(Turan et al., 2009), proline의 축적이 갯(*B. juncea*)과 유채(*B. napus*)에서 염 저항성을 부여하는 주요 요소임이 보고되었다(Farhoudi and Sharifzadeh, 2006; Jain et al., 1991). 즉, proline 축적

기작의 활성화가 배추의 염 저항성 기작에 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다. 결과적으로 48시간 동안의 염 처리 과정 중 24시간 처리부터 나타난 세포벽 가수분해 효소의 활성 억제 및 세포벽 경화에 이어서, 자당 증가 및 proline의 감소에 따라 탄소 동화 작용 억제로 전체적인 생육이 억제되지만, 전분의 생합성 활성을 증가시켜 염 저항성을 획득하는 과정이 일어나는 것으로 분석되었다.

결론적으로 염 스트레스 발생 시 배추에서 일어나는 주요 기작을 시간 순서에 따라 정리하면, 먼저 염 처리 초기(0.5h)에는 염 스트레스에 의해 활성화된 ‘Phosphatidylinositol signaling system’으로 ROS 신호가 생성되고, 이후(3h) 세포 내부로 도입된 Na^+ 로 인하여 JA 활성화 및 세포의 수분량

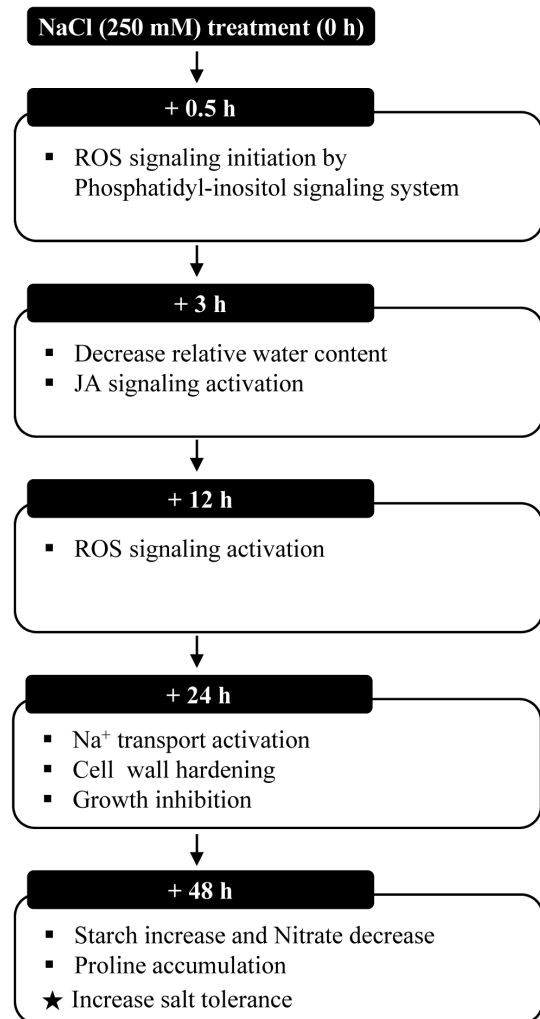


Fig. 3. A simplified hypothetical model depicting gene expression related salt stress during 0.5 h, 3 h, 12 h, 24 h, and 48 h after 250 mM NaCl treatment in Chinese cabbage.

(RWC)이 감소하게 된다. 다음으로(12h) 활성화된 JA는 ROS 신호를 생성하여 Na^+ transport의 활성화(24h)로 염 저항성을 획득한다. 염 스트레스가 더 지속되면(48h), 염 스트레스에 의해 세포는 세포벽을 더 두껍게 만들기 시작하고, 질산염이 감소하고 자당이 증가하여 탄소 동화작용이 억제됨에 따라 세포 크기가 작아지고 생육이 억제되지만, 전분 및 proline을 합성을 통하여 장기적인 염 저항성을 획득하는 것으로 판단된다(Fig. 3).

본 연구에서 구축한 염 스트레스 반응 유전자들의 발현 네트워크를 이용하여 배추 내에서 염 저항성 기작을 추정할 수 있었다. 이렇게 구축된 네트워크는 추후 염 스트레스 저항성 유전자와 같은 비생물적 스트레스 저항성 유전자를 찾아내는 데 유용하게 쓰일 수 있을 것이며, 이를 이용한 염 스트레스 저항성 유용 GM 작물 개발에 활용될 수 있을 것이다.

초 록

저온, 건조, 염과 같은 비생물적 스트레스는 식물의 생리적 형태적 변화와 수확량 감소를 초래한다. 이러한 이유로 식물체는 불리한 환경을 극복하기 위해 다양한 대사과정에 관련된 유전자들간의 복잡한 상호 관계를 조절함으로써 저항성을 획득한다. 본 연구는 배추에서 염 스트레스에 반응하는 유전자를 다각적으로 분석하기 위해 상호발현 네트워크를 구축하였다. 네트워크를 구축하기 위하여 배추를 염 스트레스 조건 하에서 시간 경과에 따라 KBGP-24K 마이크로어레이 분석을 실시한 [BrEMD (*Brassica rapa* EST and Microarray Database)] 실험 결과를 수집하여 분석하였다. 구축된 네트워크 모델은 1,853개 node, 5,740개 edge, 및 142개 connected component(상관계수 > 0.85)로 구성되었다. 구축된 네트워크 분석 결과, ROS 신호 전달을 통한 Na^+ 수송 활성화와 proline 축적이 배추의 염 저항성 획득과 밀접한 연관이 있는 것으로 판단하였다.

추가 주요어 : 비생물적 스트레스, 마이크로어레이, 자스몬산, 활성산소

인용문헌

Balibrea, M.E., J.D. Amico, M.C. Bolarín, and F. Pérez-Alfocea. 2000. Carbon partitioning and sucrose metabolism in tomato

- plants growing under salinity. *Physiologia Plantarum* 110:503-511.
- Barnes, J. and P. Hut. 1986. A hierarchical O (N log N) force-calculation algorithm. *Nature* 324:446-449.
- Bassel, G.W., H. Lan, E. Glaab, D.J. Gibbs, T. Gerjets, N. Krasnogor, A.J. Bonner, M.J. Holdsworth, and N.J. Provart. 2011. Genome-wide network model capturing seed germination reveals coordinated regulation of plant cellular phase transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:9709-9714.
- Bindea, G., B. Mlecnik, H. Hackl, P. Charoentong, M. Tosolini, A. Kirilovsky, W.H. Fridman, F. Pagès, Z. Trajanoski, and J. Galon. 2009. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25:1091-1093.
- Bray, E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2:48-54.
- Chan, Z., P.J. Bigelow, W. Loescher, and R. Grumet. 2012. Comparison of salt stress resistance genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* indicates that extent of transcriptomic change may not predict secondary phenotypic or fitness effects. *Plant Biotechnol. J.* 10:284-300.
- Farhoudi, R. and F. Sharifzadeh. 2006. The effects of NaCl priming on salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.) seedlings grown under saline conditions. *Indian J. Crop Sci.* 11: 74-78.
- Gilbert, G.A., C. Wilson, and M.A. Madore. 1997. Root-zone salinity alters raffinose family oligosaccharide metabolism and transport in *Coleus*. *Plant Physiol.* 115:1267-1276.
- Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4:44-57.
- Ismail, A., M. Riemann, and P. Nick. 2012. The jasmonate pathway mediates salt tolerance in grapevines. *J. Exp. Bot.* 63:2127-2139.
- Jain, S., H.S. Nainawatee, R.K. Jain, and J.B. Chowdhury. 1991. Proline status of genetically stable salt-tolerant *Brassica juncea* L. somaclones and their parent cv. Prakash. *Plant Cell Rep.* 9:684-687.
- Jie, Z., Y. Yuncong, J.G. Streeter, and D.C. Ferree. 2010. Influence of soil drought stress on photosynthesis, carbohydrates and the nitrogen and phosphorus absorb in different section of leaves and stem of Fuji/M.9EML, a young apple seedling. *Afr. J. Biotechnol.* 9:5320-5325.
- Kanehisa, M., S. Goto, Y. Sato, M. Furumichi, and M. Tanabe. 2012. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic. Acids Res.* 40:D109-114.
- Kaye, Y., Y. Golani, Y. Singer, Y. Leshem, G. Cohen, M. Ercetin, G. Gillaspay, and A. Levine. 2011. Inositol polyphosphate

- 5-phosphatase7 regulates the production of reactive oxygen species and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 157:229-241.
- Krapp, A. and M. Stitt. 1995. An evaluation of direct and indirect mechanisms for the 'sink-regulation' of photosynthesis in spinach: changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* 195:313-323.
- Krapp, A., W.P. Quick, and M. 1991. Stitt Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, other Calvin-cycle enzymes and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. *Planta* 186:58-69.
- Krasensky, J. and C. Jonak. 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* 63:1593-1608.
- Lee, I., B. Ambaru, P. Thakkar, E.M. Marcotte, and S.Y. Rhee. 2010. Rational association of genes with traits using a genome-scale gene network for *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 28:149-156.
- Lee, S.C., M.H. Lim, J.A. Kim, S.I. Lee, J.S. Kim, M. Jin, S.J. Kwon, J.H. Mun, Y.K. Kim, H.U. Kim, Y. Hur, and B.S. Park. 2008. Transcriptome analysis in *Brassica rapa* under the abiotic stresses using *Brassica* 24K oligo microarray. *Mol. Cells* 26:595-605.
- Leshem, Y., L. Seri, and A. Levine. 2007. Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J.* 51:185-197.
- Liu, Y., X. Ji, L. Zheng, X. Nie, and Y. Wang. 2013. Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* 14:9979-9998.
- Noreen, S. and M. Ashraf. 2010. Modulation of salt (NaCl)-induced effects on oil composition and fatty acid profile of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid. *J. Sci. Food Agric.* 90:2608-2616.
- Pandit, A., V. Rai, T.R. Sharma, P.C. Sharma, and N.K. Singh. 2011. Differentially expressed genes in sensitive and tolerant rice varieties in response to salt-stress. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 20:149-154.
- Pattanagul, W. and M. Thitisaksakul. 2008. Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Indian. J. Exp. Biol.* 46:736-742.
- Rajagopal, D., P. Agarwal, W. Tyagi, S.L. Singla-Pareek, M.K. Reddy, and S.K. Sopory. 2007. *Pennisetum glaucum* Na⁺/H⁺ antiporter confers high level of salinity tolerance in transgenic *Brassica juncea*. *Mol. Breed.* 19:137-151.
- Ray, S., P.K. Dansana, J. Giri, P. Deveshwar, R. Arora, P. Agarwal, J.P. Khurana, S. Kapoor, and A.K. Tyagi. 2011. Modulation of transcription factor and metabolic pathway genes in response to water-deficit stress in rice. *Funct. Integr. Genomics* 11:157-178.
- Rodríguez-Rosales, M.P., F.J. Gálvez, R. Huertas, M.N. Aranda, M. Baghour, O. Cagnac, and K. Venema. 2009. Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal Behav.* 4:265-276.
- Rodriguez-Uribe, L., S.M. Higbie, J.M. Stewart, T. Wilkins, W. Lindemann, C. Sengupta-Gopalan, and J. Zhang. 2011. Identification of salt responsive genes using comparative microarray analysis in Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Sci.* 180:461-469.
- Singh, A. and R. Prasad. 2009. Salt stress effects growth and cell wall bound enzymes in *Arachis hypogaea* L. seedlings. *Int. J. Integr. Biol.* 7:117-123.
- Smoot, M.E., K. Ono, J. Ruscheinski, P.L. Wang, and T. Ideker. 2011. Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* 27:431-432.
- Sobhanian, H., K. Aghaei, and S. Komatsu. 2011. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops? *J. Proteomics* 74:1323-1337.
- Turan M.A., A.H. Awad Elkarim, N. Taban, and S. Taban. 2009. Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations on maize plant. *Afr. J. Agric. Res.* 4:893-897.
- Wang, W., B. Vinocur, and A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.
- Yang, G., R. Zhou, T. Tang, X. Chen, J. Ouyang, L. He, W. Li, S. Chen, M. Guo, X. Li, C. Zhong, and S. Shi. 2011. Gene expression profiles in response to salt stress in *Hibiscus tiliaceus*. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 29:609-617.
- Yao, J., W.M. Shi, and W.F. Xu. 2008. Effects of salt stress on expression of nitrate transporter and assimilation-related genes in tomato roots. *Russ. J. Plant Physiol.* 55:232-240.
- Yu, J.G., G.H. Lee, J.S. Kim, E.J. Shim, and Y.D. Park. 2010. An insertional mutagenesis system for analyzing the Chinese cabbage genome using *Agrobacterium* T-DNA. *Mol. Cells* 29:267-275.
- Zhang, H.X., J.N. Hodson, J.P. Williams, and E. Blumwald. 2001. Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:12832-12836.