다양한 비생물적 스트레스에 의해 유도되는 *RsMYB1* 프로모터의 특성분석

김다혜^{1,2} · 양주희² · 이주희² · 이종렬^{2*} · 임선형^{1*}

¹국립한경대학교 원예생명공학과, ²농촌진흥청 국립농업과학원

Characterization of the *RsMYB1* Promoter Induced by Various Abiotic Stresses

Da-Hye Kim^{1,2}, Ju-Hee Yang², JuHee Rhee², Jong-Yeol Lee^{2*}, and Sun-Hyung Lim^{1*}

¹Division of Horticultural Biotechnology, School of Biotechnology, Hankyong National University, Anseong, 17579, Republic of Korea

²National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Jeonju 54874, Republic of Korea

Abstract Plants grown under stress conditions generate excessive reactive oxygen species resulting in cell death. Therefore, plants activate the protection mechanism via antioxidant accumulation. Anthocyanins are flavonoid-derived secondary metabolites with high antioxidant properties. In this study, we analyzed and characterized the promoter region of *RsMYB1*, a positive regulator of anthocyanin biosynthesis. The *RsMYB1* promoter was designed with four different fragment lengths (*MP1*, -1034; *MP2*, -830; *MP3*, -633; and *MP4*, -430 bp), and then each *RsMYB1* promoter region was fused into a *GUS* gene for *Arabidopsis* transformation. The expression patterns of the *RsMYB1* promoter constructs were analyzed at different developmental stages and under various abiotic stresses. The *GUS* expression pattern steadily increased with plant growth, and coincided with enzyme activity and a histochemical *GUS* assay. In response to drought, salt, sucrose, and low temperature, the *GUS* transcript level was highly expressed in *MP4* in parallel with *GUS* enzyme activity. These assays indicated that the proximal region (-430 to -1 bp) of *RsMYB1* was the core sequence that was induced by salt and low temperature. The expression level of *RsMYB1* in the leaves of radish was highly activated and was consistent with the anthocyanin content under salt and low temperature conditions. These results suggest that induction of the *RsMYB1* gene can activate the biosynthesis of anthocyanins, which are expected to help plants adapt to stress conditions due to their antioxidant activity.

Keywords abiotic stress, anthocyanin, promoter, radish, *RsMYB1*

Received on September 6, 2021. Revised on September 30, 2021. Accepted on September 30, 2021.

* Corresponding Author: Sun-Hyung Lim (E-mail: limsh2@hknu.ac.kr, Tel: +82-31-670-5105, Fax: +82-31-670-5109)

* Co-corresponding Author: Jong-Yeol Lee (E-mail: jy0820@korea.kr, Tel: +82-63-238-4616, Fax: +82-63-238-4602)

서 언

식물은 성장과 발달 동안 가뭄, 염분 그리고 저온과 같은 스트레스 환경에 노출되며, 이러한 상황에 적응하기 위해 다양한 스트레스 내성 메커니즘을 진화시켜 왔다. 스트레스 상황 속에서 엽록체, 미토콘드리아, 퍼옥시좀과 같은 다양한 세포내 소기관에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다(Baxter et al. 2014, Sandalio & Romero-Puertas 2015, Dietz et al. 2016, Huang et al. 2016). 식물체내에 생성된 활성산소종은 DNA를 손상시키며 세포사멸을 유도할 뿐만 아니라 정상적인 식물 성장을 방해한다(Huang et al. 2016). 모든 활성산소종의 기본이 되는 산소는 안정적이나, 식물대사에 영향을 주는 다양한 과정에 의하여 여러 식물 소기관에서 활성산소종으로 전환될 수 있다(Mittler 2017).

식물체내에서 생성된 활성산소종은 크게 효소적 및 비효소적 시스템에 의하여 제거된다. 효소적 시스템에는 대표적으로 초과산화물 불균등화 효소(superoxide dismutase, SOD), 아스코르브 산 과산화효소(ascorbate peroxidase, APX), 글루타티온 과산화효소(glutathione peroxidase, GPX)가 있다(Apel & Hirt 2004). 비효소적 시스템의 경우 플라보노이드, 글루타티온, 아스코르브 산과 같은 항산화 물질이 활성산소종의 일종인 수산화 라디칼(hydroxyl radicals)과 일종항 산소를 제거하는 것으로 보고되었다(Gechev et al. 2006). 특히, 플라보노이드 계열 물질 중 하나인 안토시아닌은 UV로부터 식물을 보호하고 활성산소를 제거하는 등 다양한 방어 기작을 가진다(Pourcel et al. 2007, Mouradov & Spangenberg 2014, Xu et al. 2017). 안토시아닌 생합성은 다양한 전사인자에 의하여 조절되며, 이러한 전사인자들은 지베렐린, 앱시스산, 자스몬산, 에틸렌을 포함하는 식물 호르몬과

광, 당(sugar), 온도, 가뭄, 염, 탄소/질소비(C/N ratio) 등과 같은 환경적인 자극에 의해 유도되어 안토시아닌 생합성 경로를 조절한다(Xu et al. 2015). 에틸렌 반응 인자(ethylene response factor, ERF)는 식물 성장 및 안토시아닌 생합성을 포함한 다양한 스트레스 반응에서 중요한 역할을 한다(Mizoi et al. 2012). *MdERF38*은 안토시아닌 생합성의 양성조절자인 *MdMYB1*의 프로모터 영역에 결합하여 유전자의 발현을 유도하며, 가뭄 스트레스에 반응하여 안토시아닌 생합성을 촉진한다고 보고되었다(An et al. 2020). 또한 토마토와 양배추의 유식물체에 염분을 처리하여 안토시아닌의 생성이 유도되어 스트레스 조건에서 식물체를 보호하는 기작이 보고되었다(Eryilmaz 2006). 당은 광합성, 영양분 가용, 잎 노화 조절을 포함한 다양한 식물 발달 과정을 조절하고 식물의 성장을 자극하며, 안토시아닌 생합성 유전자의 발현을 유도하여 색소 생성을 야기시킨다(Bleecker & Patterson 1997, Corbesier et al. 1998, Smeekens 2000, Weiss 2000, Rolland et al. 2002, Rook & Bevan 2003). 애기장대에서 양적형질유전자좌(quantitative trait loci, QTL) 분석을 통해 R2R3 MYB을 암호화하는 *MYB75/PAP1* 전사인자가 설탕에 의해 유도되어 안토시아닌 축적을 증진시키는 후보 유전자임이 확인되었다(Teng et al. 2005). 저온처리시 배추에서 안토시아닌 생합성 조절인자인 *BrMYB2*, *BrTT8*과 구조유전자인 *BrANS*의 발현이 상향조절되어 안토시아닌이 축적됨이 보고되었다(Ahmed et al. 2015). 여러 작물에서 안토시아닌은 다양한 비생물적 스트레스 조건에서 식물체를 보호하는 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 안토시아닌 생성에 핵심 유전자로 밝혀진 *RsMYB1*의 프로모터 영역을 분리하여 세부적인 부분별로 가뭄, 염, 당, 그리고 저온 스트레스에 대한 반응을 분석하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 생장 조건

적색무인 신젠타 ‘Bordeaux’ 품종과 농업유전자원센터로부터 분양받은 흰색무 ‘IT160344’를 이용하여 *RsMYB1* 프로모터 영역을 분리하였다. *RsMYB1* 프로모터 형질전환은 애기장대 Columbia-0 (Col-0)에 수행하였고, 스트레스 처리를 위한 무 종자는 아시아종묘의 ‘단홍무’를 구입하여 사용하였다. 모든 식물 재료는 22°C의 장일조건(16시간 빛조건과 8시간의 암조건)에서 생육하였다.

RsMYB1 프로모터의 식물 발달 단계별 분석을 위해 Col-0와 애기장대 형질전환체들을 1/2 MS배지에 파종하여 4°C에서 암조

건으로 이틀간 배양한 후 22°C 생육상으로 옮긴 뒤 7일, 14일, 그리고 21일째 되는 식물체를 채취하여 초저온 냉장고에 보관하였다.

비생물적 스트레스 처리

비생물적 스트레스 처리를 위하여 애기장대 종자를 설탕이 포함되지 않은 1/2 MS배지에 파종하여 4°C에서 이틀간 암조건으로 배양한 뒤 22°C 생육상으로 옮겨 7일간 생육하였다. 그 다음 설탕이 포함되지 않은 1/2 MS배지에 각각 300 mM mannitol, 150 mM NaCl, 그리고 90 mM 설탕이 포함된 배지로 옮긴 뒤, 22°C에서 12시간 동안 생육시켰으며, 저온처리를 위하여 1/2 MS배지에서 생육한 식물체를 4°C에서 12시간 동안 배양하였다.

RsMYB1 프로모터 클로닝 및 애기장대 형질전환

RsMYB1 프로모터 영역은 적색무 ‘Bordeaux’로부터 genomic DNA를 추출하고, *RsMYB1*-GW-1 (5'-TCATCAGAGTTAAGTTTCCCTCTCTTGATACT-3')과 *RsMYB1*-GW-2 (5'-GGTGCCATTTCCCTTCTCCATACTTATCAATGCA-3') 프라이머와 Genome Walker Kit (Takara, Otsu, Japan)를 사용하여 분리하였다. 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하였고, 이를 바탕으로 프라이머를 제작하여 실험을 수행하였다. Genomic DNA를 주형으로 하여 MP1-F (5'-AAACAAACAATAATGGAGGCTACTTC-3')와 *RsMYB1*-promoter-R (5'-GGACCAACGATAAAATATTAGAAGTA-3') 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) 운반체에 클로닝한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석 후, 크기에 따라 *MP1*, *MP2*, *MP3*, 그리고 *MP4* 영역으로 나누기 위하여 *MP2*-F (5'-CTTTTATTTCCTTCGCTTTCATTC-3'), *MP3*-F (5'-CTCAACAACATGACACACTA AAATACG-3'), *MP4*-F (5'-TAGCTGTTGAAGTGTCCCTCTCTT-3'), 그리고 *RsMYB1*-promoter-R 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 뒤, pENTR/D-TOPO 운반체에 도입하였다. 그 다음 발현 운반체인 pBGWFS7 (VIB-Ghent University, Ghent, Belgium)에 클로닝하였다. 최종 운반체는 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)에 freeze-thaw 방법을 사용하여 형질전환하였다. *RsMYB1* 프로모터별 아그로박테리움을 사용하여 애기장대에 floral dipping 방법(Clough & Bent 1998)으로 형질전환을 수행한 후, 22°C에서 장일조건으로 생육시켰다. 종자를 파종한 뒤 7일째에 0.3% 바스타를 처리하여 형질전환체를 선발하였

다. 분석을 위하여 T₃ 세대까지 자가수정하여 실험재료로 이용하였다.

GUS 조직화학적 염색

프로모터의 발현부위를 확인하기 위하여 GUS 조직화학적 염색을 수행하였다. 애기장대 식물체를 GUS 염색용액(0.2 M NaPO₄ (pH 7.0), 2.5 mM K₃[Fe(CN)₆]·3H₂O (Ferri), 2.5 mM K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O (Ferro), 10 mM Na₂EDTA (pH 8.0), 100 mg X-gluc, 25% MeOH, and 0.01% Triton-X)에 침지시킨 후, 5분간 진공처리한 뒤 37°C에서 24시간 동안 염색하였다. 70% 에탄올을 처리하여 엽록소를 제거한 후 염색부위를 현미경으로 관찰하였다.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

유전자 발현을 분석하기 위해 Plant Total RNA Mini kit (Favorgen, Taiwan)를 이용하여 애기장대 식물체에서 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 2 µg으로 정량한 뒤, cDNA synthesis master mix kit (GenDEPOT, USA)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. qRT-PCR은 AccuPower 2 × Greenstar qPCR Master Mix (Bioneer, Korea)와 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)을 이용하여 수행하였다. *GUS* 유전자 발현분석은 *GUS*-qRT-F (5'-TCGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGC-3'), *GUS*-qRT-R (5'-CCATACCTGTTACACACGA-3') 프라이머와 애기장대 elongation 1 alpha (*AtEF1 α*)-F (5'-GCCACACCTCTCACATTG-3'), *AtEF1 α*-R (5'-TACCAGCGTCAACATTCT-3') 프라이머를 이용하여 정규화하였다. 마찬가지로 *RsMYB1*의 발현은 *RsMYB1*-qRT-F (5'-GTGCATGGACTGCTGAAGAA-3'), *RsMYB1*-qRT-R (5'-CAGTCCGACCGGGTAATCTA-3') 프라이머와 무 식물체의 RNA polymerase-II (*RsRPII*)-F (5'-ATCACGCTAAATGGTCTCCT-3'), *RsRPII*-R (5'-GCTGCTCTCAATCAAGTCAATC-3') 프라이머를 사용하여 정규화하였다. 각 시료당 독립적인 3번의 생물학적 반복을 수행하였다.

GUS 활성 분석

100 mg의 시료에 추출 용액(50 mM NaH₂PO₄ (pH 7.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.1% Triton X-100, 0.1% sarcosyl, 10 mM β-mercaptoethanol)을 처리하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 bovine serum albumin (BSA)를 이용하여 20 µg으로 정량하였다. 정량된 단백질에 1 mM의 4-Methylumbelliferyl-

β-D-glucuronide hydrate (MUG)를 넣어 37°C에서 한 시간 동안 처리하였다. 한 시간 뒤 반응을 멈추기 위하여 0.2 M의 Na₂CO₃을 넣어준 다음 365 nm와 455 nm에서 값을 측정하였다. 정량분석을 위해 4-methyl umbelliferone (4-MU)를 이용하여 표준곡선을 작성하였고, GUS 활성을 분석하였다.

총 안토시아닌 함량 분석

총 안토시아닌 함량은 Lim et al. (2021)에 기술된 방법에 따라 수행되었다. 간략하게, 액체질소를 이용하여 시료를 분쇄한 뒤 100 mg으로 정량하였다. 정량된 시료에 1% HCl이 포함된 메탄올 600 µL을 넣어준 뒤 4°C에서 교반기를 이용하여 여섯 시간 동안 잘 섞어주었다. 200 µL의 멸균수와 200 µL의 chloroform을 첨가한 뒤 원심분리하여 상층액을 분광광도계를 이용하여 530 nm (A₅₃₀)와 657 nm (A₆₅₇)에서 측정하였다. 총 안토시아닌 함량은 다음의 공식에 따라 계산하였다.

$$\text{총 안토시아닌 함량} = A_{530} - (0.33 \times A_{657}).$$

통계분석

실험 결과는 세 번의 독립적인 생물학적 및 기술적 반복의 평균값으로 표시되었다. 통계 프로그램은 SPSS를 사용하였으며, 통계적 유의성은 one-way ANOVA로 분석하였으며, Duncan의 다중 범위 테스트에 의해 사후분석 하였다.

결과 및 고찰

RsMYB1 프로모터의 염기서열 분석

기존 연구에 따르면 R2R3 MYB를 암호화하는 무 식물체 유래의 *RsMYB1*은 안토시아닌 생합성 경로 유전자들의 프로모터에 결합하여 유전자들의 발현을 활성화시켜 안토시아닌 축적을 유도하는 전사인자로 보고되었다(Lim et al. 2016). *RsMYB1*은 단독으로도 식물체 내에서 안토시아닌의 생성을 유도하며, bHLH 전사인자인 *RsTT8*과 상호작용을 통하여 안토시아닌의 생성을 강하게 증진시킨다(Lim et al. 2017).

본 연구에서는 무 식물체 유래의 안토시아닌 생합성의 핵심 유전자인 *RsMYB1*의 프로모터 영역을 분석하기 위하여 'Bordeaux' 품종의 프로모터 영역을 genome walking을 통해 분석하였다. 염기서열 분석 후 프로모터 영역을 분리할 수 있는 프라이머를 제작하여 무 식물체 뿌리에서 안토시아닌이 축적되는 'Bordeaux' 품종과 안토시아닌이 축적되지 않는 'IT160344' 유전자원에서부터 각각 *RsMYB1* 프로모터를 분리하였다. 각각의 품종에서

분리한 프로모터의 서열 길이는 1,034 bp이며 ‘Bordeaux’와 IT160344’ 사이에서 특이적인 염기서열의 차이는 없었다. 분리된 프로모터 영역을 분석해 본 결과 가뭄, 염, 당, 그리고 저온을 포함한 비생물적 스트레스 조건에서 유도되는 다양한 *cis*-element가 포함되어 있음을 확인하였다(Table 1).

RsMYB1 프로모터 영역을 네 구역으로 나누어 식물 발현 운반체를 제작하였다(Fig. 1). 프로모터의 길이가 긴 순서대로 *RsMYB1 promoter 1* (MP1), MP2, MP3, 그리고 MP4로 명명하

였다(Fig. 1). 비생물적 스트레스 조건에서 *RsMYB1* 프로모터들의 부위별 발현양상을 비교분석하기 위하여, 애기장대에 형질전환하여 T₃ 식물체를 확보하였다.

식물 발달 단계별 *RsMYB1* 프로모터의 발현 양상 분석

식물 성장 시기별 *RsMYB1* 프로모터의 발현 양상을 확인하기 위해 1/2 MS 배지에 파종한 뒤 7일, 14일, 그리고 21일째 되는 애기장대 식물체를 이용하여 실험을 수행하였다. 식물 발달 단계

Table 1. Stress-related *cis*-elements in *RsMYB1* promoter region.

<i>Cis</i> -element	Function	Conserved sequence	Position from ATG	Number
G-box	Dehydration, high salinity, cold response	CACGTG	-122	1
MYBCORE	Dehydration, high salinity, cold response	CNCGTT(A/G)	-785	1
MYC	Dehydration, cold response	CAA(T/C/A)TG, CAT(T/G)TG	-133, -422, -679, -751	4
MYCCONSENSUSAT	Cold response	CANNTG	-122, -133, -679, -751	4
MYB	Dehydration response	(A/T)AACCA	-29, -88, -718, -857	4
ACGTA TERD1	Dehydration response	ACGT	-52, -123, -148, -276, -313, -743	6
CRT/DRE	Dehydration response	(A/G)(C/T)CGAC	-376	1
MYBR	Dehydration response	TGGTTAG	-28	1
W-box	Salinity response	TTGAC	-515	1
ACGT-box	Sugar response	TACGTA	-51	1
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	Sugar response	CCTTTT	-72, -244	2

Fig. 1. Schematic representation of *RsMYB1* promoter::GUS vector construction Predicted *cis*-elements related to abiotic stress represent various patterns. The size of the constructs are shown in the left. BAR: bialaphos resistance gene; LB: left border; RB: right border; T35S: cauliflower mosaic virus CaMV 35S terminator.

별로 식물체의 성장이 진행됨에 따라 *GUS* 유전자의 발현이 증가되었다(Fig. 2A). 이러한 양상은 *CaMV 35S* (35S)로 형질전환된 개체에서도 동일하게 관찰되었다. 또한, 프로모터 부위별 발현 양상을 살펴본 결과, MP4 운반체가 다른 프로모터 운반체보다 높은 *GUS* 발현을 나타내었다(Fig. 2A). 발달 시기별 단백질

활성분석을 수행한 결과, 생육 초기에는 *RsMYB1* 프로모터별 운반체간의 유의한 차이가 관찰되지 않으나, 생육이 진행됨에 따라 앞서의 *GUS* 유전자 발현 양상과 유사하게 MP4 운반체에서 높은 단백질 활성을 나타냈다(Fig. 2B). 조직화학적 *GUS* 염색 결과, 어린시기부터 잎의 배수조직, 하배축, 그리고 뿌리에서

Fig. 2. Analysis of *GUS* expression pattern driven by *RsMYB1* promoters deletion constructs in transgenic *Arabidopsis* plants at the various developmental stages. (A) The transcript level *GUS* genes at the differential growth stage. (B) *GUS* activities directed by the *RsMYB1* promoter deletion constructs. Results represent mean values $\pm$ SD from three independent biological replicates. Different letters were calculated through a one-way ANOVA analysis by Duncan's multiple ranges and meant significantly different values ($p < 0.001$). (C) Histochemical *GUS* staining of independent proRsMYB1::GUS transgenic *Arabidopsis* plants. WT: wild type; 35S: cauliflower mosaic virus promoter- β -glucuronidase.

GUS 염색이 확인되었고, 생장함에 따라 잎과 줄기가 만나는 접합부와 꼬투리에서도 GUS 염색이 확인되었다(Fig. 2C). 특히 성숙시기시 GUS 발현과 활성이 높은 MP3의 경우 뿌리와 잎의 접합부에서 비슷한 수준으로 GUS가 염색됨이 확인되었으나, MP4의 경우 뿌리보다는 지상부에서 GUS 염색 정도가 강한 것을 확인하였다. 따라서 MP3 영역이 뿌리에서 발현하는데 중요하리라 생각된다.

식물체가 성장하는 동안 *GUS* 유전자의 발현이 높아짐에 따라 GUS 단백질 활성이 증가되었다(Figs. 2A, 2B). 특히, MP3와 MP4 운반체는 성숙시기에 높은 단백질 활성을 나타내었다(Fig. 2B). 이러한 결과를 통하여 *RsMYB1*은 잎의 배수조직과 하배축, 뿌리, 잎의 접합부위, 그리고 꼬투리에서 발현하는 유전자이며, 유묘기부터 성숙시기까지 발현되어 기능을 하는 것으로 생각된다. 또한 프로모터 영역별 활성을 살펴보면 MP3와 MP4에서 활성수준이 MP1과 MP2보다 높게 나타남에 따라, MP1과 MP2 영역에 유전자의 발현을 억제하는 부위가 존재하리라 예상된다.

가뭄 조건에서의 *RsMYB1* 프로모터별 발현 양상 분석

식물의 성장과 발달 동안 다양한 비생물적 스트레스는 활성산

소종의 생성을 유도한다. 활성산소에 의해 세포가 손상되면, 식물은 안토시아닌과 같은 항산화 물질을 생성하여 스트레스 조건하에서 스스로를 보호한다(Kovnich et al. 2015). 다양한 스트레스 조건 중에서 물부족 현상은 미래농업과 인류생존에 직면한 주요 위험요소 중의 하나이다. 따라서 적은 양의 물로도 작물의 생존 능력을 향상시키기 위한 노력이 필수적으로 요구된다. 물이 부족한 상황에서 생육된 식물에서는 안토시아닌이 축적되며 기공닫힘이 유도되어 수분손실을 억제되는 것으로 보고되었다(Cirillo et al. 2021).

가뭄조건에서 *RsMYB1*의 프로모터별 발현 변화를 확인하기 위해 애기장대 종자를 1/2 MS배지에서 발아시켜 7일 뒤 300 mM mannitol이 포함된 배지로 옮겨 준 후 12시간 동안 생육하였다. 그 결과 모든 운반체에서 *GUS* 유전자 발현이 무처리구에 비해 증가하였다(Fig. 3A). 이에 반해, 35S 프로모터의 *GUS* 발현은 mannitol 처리시 감소되었다. 모든 형질전환체들의 *GUS* 단백질 활성 역시 무처리구에 비해 mannitol 처리조건에서 증가하였다(Fig. 3B). GUS 염색을 이용한 *RsMYB1* 프로모터의 조직별 발현 양상은 무처리구에 비해 mannitol 처리시 GUS 염색 부위와 강도가 진해짐을 확인하였다(Fig. 3C). 이러한 결과

Fig. 3. Analysis of expression patterns in transgenic *Arabidopsis* plants with *RsMYB1* promoter deleted construct under 300 mM mannitol treatment. (A) The transcript level *GUS* genes under mannitol treatment. (B) *GUS* activities directed by the *RsMYB1* promoter deletion constructs. Results represent mean values $\pm$ SD from three independent biological replicates. Different letters were calculated through a one-way ANOVA analysis by Duncan's multiple ranges and meant significantly different values ($p < 0.001$). (C) Histochemical *GUS* staining of independent pro*RsMYB1::GUS* transgenic *Arabidopsis* plants. WT: wild type; 35S: cauliflower mosaic virus promoter- β -glucuronidase.

를 통하여 가뭄조건시 *RsMYB1* 유전자의 발현이 증가되어 안토시아닌을 생성을 유도하고 물이 부족한 환경에서도 식물이 적응할 수 있도록 도울 것으로 여겨진다.

염조건에서의 *RsMYB1* 프로모터별 발현 양상 분석

토양의 염도는 항상성 교란 등과 같은 방식으로 식물의 성장과 발달을 제한하는 주요 문제로 간주되며, 다양한 작물의 수확량 감소를 초래한다(Golldack et al. 2014, Kisa et al. 2016). 토양내 높은 염도는 초기에 수분 스트레스를 유발하며 장기간 노출시 이온 스트레스와 같은 다른 비생물적 스트레스를 유도한다(Cramer & Nowak 1992).

염 스트레스 조건시 프로모터별 발현 양상을 비교하기 위하여, 애기장대 형질전환체에 150 mM NaCl을 처리한 결과 *GUS* 유전자의 발현수준이 전반적으로 증가하였다(Fig. 4A). *GUS* 단백질의 활성은 *MP1*을 제외한 모든 형질전환체에서 유의하게 증가하였다(Fig. 4B). 특히 *MP3*와 *MP4*에서 잎의 배수조직뿐만 아니라 잎맥에서도 *GUS* 염색이 확인되었으며, 이러한 결과는 *RsMYB1*의 발현이 염분 스트레스 조건에서 유도됨을 나타낸다(Fig. 4C). 이전 연구에 의하면, 금어초 유래 안토시아닌 생합성의

활성조절자인 *Del*을 과발현시킨 담배 형질전환체에 염 스트레스를 처리한 결과, 식물체에서 안토시아닌 생성이 증가하였으며, 라디칼 소거능력이 향상되어 염분에 내성이 생겼다고 보고되었다(Naing et al. 2017). 무 식물체 유래의 안토시아닌 생합성 활성조절자인 *RsMYB1* 유전자는 식물체가 염스트레스에 노출되었을 때 안토시아닌의 생성을 유도하여 식물체를 보호할 수 있으리라 생각된다.

당 스트레스 조건에서의 *RsMYB1* 프로모터별 발현 양상 분석

당 반응 경로는 식물 성장 및 발달과 관련된 매우 복잡한 과정이며, 광 스트레스, 질소 그리고 식물 호르몬과 같은 다양한 반응 경로와 서로 연관되어 있다(Sun et al. 2013, Ljung et al. 2015). 당은 유전자의 발현을 활성화하거나 비활성화시키는 신호분자로 작용하며, 설탕처리시 안토시아닌이 강하게 상향 조절됨이 보고되었다(Gupta & Kaur 2005). 또한 애기장대에 설탕을 처리하여 플라보노이드 생합성 경로 유전자들의 발현을 확인한 결과, 설탕의 농도가 짙어짐에 따라 유전자들의 발현이 증가하고, 안토시아닌의 함량도 유의하게 높아지는 것을 확인하

Fig. 4. Analysis of expression patterns in transgenic *Arabidopsis* plants with *RsMYB1* promoter deleted construct under 150 mM NaCl treatment. (A) The transcript level *GUS* genes under salt stress treatment. (B) *GUS* activities directed by the *RsMYB1* promoter deletion constructs. Results represent mean values $\pm$ SD from three independent biological replicates. Different letters were calculated through a one-way ANOVA analysis by Duncan's multiple ranges and meant significantly different values ($p < 0.001$). (C) Histochemical *GUS* staining of independent pro*RsMYB1::GUS* transgenic *Arabidopsis* plants. WT: wild type; 35S: cauliflower mosaic virus promoter- β -glucuronidase.

였다(Solfanelli et al. 2006).

*RsMYB1*의 프로모터가 당에서 유도되는지 확인하기 위하여 90 mM의 설탕을 처리한 결과, 모든 형질전환체에서 *GUS* 유전자의 발현 수준이 증가되었다(Fig. 5A). *MP3*와 *MP4*의 *GUS* 단백질 활성은 무처리 조건과 비교하여 설탕을 처리한 실험구에서 유의하게 높아졌으며, *GUS*가 강하게 염색됨을 확인하였다(Figs. 5B, 5C). 당에 의해 유도되는 *cis*-element는 *RsMYB1* 프로모터 영역별로 많이 분포되어 당 스트레스 조건에서 발현에 영향하리라 판단된다(Table 1).

저온 스트레스 조건에서의 *RsMYB1* 프로모터별 발현 양상 분석

생육 적온보다 낮은 온도조건인 저온은 식물 성장에 영향을 미쳐 심각한 생산성의 손실을 초래한다. 식물마다 저온(0-15°C), 및 동결(<0°C) 조건의 온도에 대해 견디는 반응이 다르다. 일반적으로 온대 기후지역의 식물은 다양한 정도의 저온내성이 있는 것으로 간주되며, 열대 및 아열대 기원의 식물들은 저온과 동결 스트레스에 민감한 것으로 보고되고 있다(Xin & Browse 2001,

Sanghera et al. 2011). 무 식물체를 포함한 배추과 식물은 안토시아닌의 축적에 의해 추위 및 동결 스트레스에 대한 내성이 생긴다고 보고되었다(Ahmed et al. 2015).

저온처리시 프로모터별 발현양상을 비교하기 위해, 애기장대 형질전환체를 1/2 MS 배지에 발아시킨 뒤 7일째 되는 유식물체를 4°C에서 12시간 동안 처리하였다. 모든 형질전환체들의 *GUS* 유전자의 발현과 *GUS* 단백질 활성이 무처리구에 비해 높은 수준으로 증가하였다(Figs. 6A, 6B). 조직화학적 염색 실험에서도 무처리구와 비교하여 저온처리구에서 강한 *GUS* 염색을 확인하였다(Fig. 6C). 이러한 결과로부터 저온처리시 *RsMYB1*의 발현이 증가되어 안토시아닌 생성이 유도됨을 유추할 수 있다.

RsMYB1 프로모터 중 가장 길이가 긴 *MP1*은 본 실험에서 확인한 비생물적 스트레스에 의해 발현되는 정도가 다른 프로모터들에 비해 상대적으로 낮았다. 이는 *MP1* 영역에 유전자 발현을 억제하는 음성 *cis*-element가 포함되어 있을 것으로 예상된다. 또한, *MP3*와 *MP4*에는 유전자 발현에 필요한 많은 요소가 포함되어 있으며, 음성 *cis*-element를 포함하지 않아 발현수준이 가장 높은 것으로 생각된다.

Fig. 5. Analysis of expression patterns in transgenic *Arabidopsis* plants with *RsMYB1* promoter deleted construct under 90 mM sucrose treatment. (A) The transcript level *GUS* genes under sugar treatment. (B) *GUS* activities directed by the *RsMYB1* promoter deletion constructs. Results represent mean values±SD from three independent biological replicates. Different letters were calculated through a one-way ANOVA analysis by Duncan's multiple ranges and meant significantly different values ($p<0.001$). (C) Histochemical *GUS* staining of independent pro*RsMYB1*::*GUS* transgenic *Arabidopsis* plants. WT: wild type; 35S: cauliflower mosaic virus promoter- β -glucuronidase.

Fig. 6. Analysis of expression patterns in transgenic *Arabidopsis* plants with *RsMYB1* promoter deleted construct under cold treatment. (A) The transcript level *GUS* genes under cold treatment. (B) *GUS* activities directed by the *RsMYB1* promoter deletion constructs. Results represent mean values $\pm$ SD from three independent biological replicates. Different letters were calculated through a one-way ANOVA analysis by Duncan's multiple ranges and meant significantly different values ($p<0.001$). (C) Histochemical *GUS* staining of independent pro*RsMYB1*::*GUS* transgenic *Arabidopsis* plants. WT: wild type; 35S: cauliflower mosaic virus promoter- β -glucuronidase.

Fig. 7. Expression analysis of *RsMYB1* gene and total anthocyanin content in radish under various abiotic stress treatments. (A) The transcript level of *RsMYB1* gene under different stress treatments. (B) Total anthocyanin content in the radish under drought, salt, sucrose, and cold treatment. Results represent mean values $\pm$ SD from three independent biological replicates. Different letters were calculated through a one-way ANOVA analysis by Duncan's multiple ranges and meant significantly different values ($p<0.001$).

비생물적 스트레스 조건에서 *RsMYB1* 유전자 발현 분석 및 총 안토시아닌 함량 분석

RsMYB1 프로모터 발현분석을 통해서 *RsMYB1* 유전자는 다양한 비생물적 스트레스에 유도되는 것을 확인하였다. 스트레스 처리하에서 *RsMYB1* 유전자의 발현을 확인하기 위하여, 본 연구

에서 분석한 네 가지의 스트레스 조건에서 무 식물체를 생육시켰다. *RsMYB1* 발현은 무처리 조건과 비교하여 모든 스트레스 처리 조건에서 증가하였으며, 특히 염과 저온 처리시 높은 수준으로 발현되었다(Fig. 7A). 또한, 스트레스 처리시 안토시아닌 함량은 무처리 조건에 비해 모두 증가되었으며, 유전자 발현양상과

유사하게 저온 스트레스에서 안토시아닌 함량이 의미있게 증가하였다(Fig. 7B). 이를 통해 다양한 스트레스 환경에서 *RsMYB1* 유전자의 발현이 활성화되고, 안토시아닌이 축적되어 식물이 다양한 스트레스에 내성을 지닐 것으로 생각된다.

생육기간 동안 저온에 노출되면 무 식물체의 잎과 뿌리 등에 안토시아닌이 축적된다. 본 연구 결과를 종합해 보면, 저온과 같은 스트레스 조건 하에서 안토시아닌 생성의 핵심 유전자인 *RsMYB1*의 발현이 높은 수준으로 증가함에 따라 안토시아닌의 생성을 유도하여 식물체를 보호하는 것으로 생각된다. 이러한 결과를 바탕으로 안토시아닌 생성을 활성화하는 전사인자인 *RsMYB1*이 다양한 스트레스에 의해서 발현이 유도되며 식물체가 성장과 발달과정에서 직면하는 스트레스 조건에서 적응력을 높이는데 관여하리라 생각된다. 프로모터 영역별 스트레스 처리에 대한 반응을 확인함에 따라 유전자 발현을 활성화하는 최소부위를 파악하고, 유전자 교정을 통해 이러한 부위를 변경함으로써 좀 더 환경에 잘 적응하는 작물 개발에 기여할 수 있으리라 생각된다.

적 요

스트레스 조건에서 자란 식물은 과도한 활성산소종을 생성하여 세포 사멸을 초래한다. 이러한 상황에서 식물은 항산화 물질의 축적을 통해 스스로를 보호하는 메커니즘을 활성화한다. 안토시아닌은 항산화 활성이 높은 플라보노이드 유래의 2차 대사 산물이다. 본 연구에서는 안토시아닌 생합성의 양성조절자인 *RsMYB1*의 프로모터 영역을 분석하고 특성화하였다. *RsMYB1* 프로모터를 염기서열 길이에 따라 4개의 단편(*MP1*, -1034; *MP2*, -830; *MP3*, -633; *MP4*, -430 bp)으로 나눈 뒤, 각 프로모터 영역을 *GUS* 유전자와 융합시켜 애기장대에 형질전환하였다. *RsMYB1* 프로모터의 발현양상은 다양한 발달 단계와 비생물적 스트레스 조건에서 분석되었다. *GUS*의 발현은 식물이 생장함에 따라 증가하였고, *GUS*의 단백질 활성 및 조직화학적 분석은 발현 양상과 일치하였다. 또한, 가뭄, 염, 당, 그리고 저온에 조건시 *MP4*에서의 높은 유전자 발현과 호소 활성이 확인되었다. 이러한 분석 결과는 *RsMYB1* 프로모터의 proximal 영역(-430에서 -1 bp)이 염과 저온에 의해 유도되는 반응 핵심 서열임을 나타낸다. 염과 저온을 처리한 무 식물체의 *RsMYB1* 발현 수준은 고도로 활성화 되었으며, 안토시아닌 함량 역시 증가되었다. 이러한 결과는 *RsMYB1* 유전자의 발현 유도는 스트레스 조건에서 식물이 적응하는데 도움을 주는 안토시아닌의 생성을 활성화할 것으로 예상된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원의 공동연구과제(PJ014554)와 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단(NRF-2020R1F1A1072559)의 지원을 받아 수행된 연구임.

REFERENCES

1. Ahmed NU, Park JI, Jung HJ, Hur Y, Nou IS. 2015. Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa*. *Funct Integr Genomics* 15: 383-394.
2. An JP, Zhang XW, Bi SQ, You CX, Wang XF, Hao YJ. 2020. The ERF transcription factor MdERF38 promotes drought stress-induced anthocyanin biosynthesis in apple. *Plant J* 101: 573-589.
3. Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
4. Baxter A, Mittler R, Suzuki N. 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* 65: 1229-1240.
5. Bleeker AB, Patterson SE. 1997. Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 1169-1179.
6. Cirillo V, D'Amelia V, Esposito M, Amitrano C, Carillo P, Carpato D, Maggio A. 2021. Anthocyanins are key regulators of drought stress tolerance in tobacco. *Biology* 10: 39.
7. Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743.
8. Corbesier L, Lejeune P, Bernier G. 1998. The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 206: 131-137.
9. Cramer GR, Nowak RS. 1992. Supplemental manganese improves the relative growth, net assimilation and photosynthetic rates of salt-stressed barley. *Physiol Plant* 84: 600-605.
10. Dietz KJ, Turkan I, Krieger-Liszka A. 2016. Redox- and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast. *Plant Physiol* 171: 1541-1550.
11. Eryilmaz F. 2006. The relationships between salt stress and

- anthocyanin content in higher plants. *Biotechnol Biotechnol Equip* 20: 47-52.
12. Gechev TS, Van Breusegem F, 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.
13. Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N. 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Front Plant Sci* 5: 151.
14. Gupta AK, Kaur N. 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J Biosci* 30: 761-776.
15. Huang H, Ullah F, Zhou DX, Yi M, Zhao Y. 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Front Plant Sci* 10: 800.
16. Huang S, Van Aken O, Schwarzlander M, Belt K, Millar AH. 2016. The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. *Plant Physiol* 171: 1551-1559.
17. Kısa D, Elmastaş M, Öztürk L, Kayır Ö. 2016. Responses of the phenolic compounds of *Zea mays* under heavy metal stress. *Appl Biol Chem* 59: 813-820.
18. Kovinich N, Kayanja G, Chanoca A, Otegui MS, Grotewold E. 2015. Abiotic stresses induce different localizations of anthocyanins in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 10: e1027850.
19. Lim SH, Kim DH, Jung JA, Lee JY. 2021. Alternative splicing of the basic helix-loop-helix transcription factor gene *CmbHLH2* affects anthocyanin biosynthesis in ray florets of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Front Plant Sci* 12: 669315.
20. Lim SH, Kim DH, Kim JK, Lee JY, Ha SH. 2017. A radish basic helix-loop-helix transcription factor, RsTT8 acts a positive regulator for anthocyanin biosynthesis. *Front Plant Sci* 8: 1917.
21. Lim SH, Song JH, Kim DH, Kim JK, Lee JY, Kim YM, Ha SH. 2016. Activation of anthocyanin biosynthesis by expression of the radish R2R3-MYB transcription factor gene *RsMYB1*. *Plant Cell Rep* 35: 641-653.
22. Ljung K, Nemhauser JL, Perata P. 2015. New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 25: 130-137.
23. Mittler R. 2017. ROS are good. *Trends Plant Sci* 22: 11-19.
24. Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2012. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta* 1819: 86-96.
25. Mouradov A, Spangenberg G. 2014. Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Front Plant Sci* 5: 620.
26. Naing AH, Park KI, Ai TN, Chung MY, Han JS, Kang YW, Lim KB, Kim CK. 2017. Overexpression of snapdragon *Delila* (*Del*) gene in tobacco enhances anthocyanin accumulation and abiotic stress tolerance. *BMC Plant Biol* 17: 1-14.
27. Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujonn I. 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci* 12: 29-36.
28. Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: S185-S205.
29. Rook F, Bevan MW. 2003. Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. *J Exp Bot* 54: 495-501.
30. Sandalio LM, Romero-Puertas MC. 2015. Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Ann Bot* 116: 475-485.
31. Sanghera GS, Wani SH, Hussain W, Singh NB. 2011. Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Current Genomics* 12: 30.
32. Smeekens S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 49-81.
33. Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P. 2006. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140: 637-646.
34. Sun W, Huang A, Sang Y, Fu Y, Yang Z. 2013. Carbon-nitrogen interaction modulates plant growth and expression of metabolic genes in rice. *J Plant Growth Regul* 32: 575-584.
35. Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeekens S. 2005. Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiol* 139: 1840-1852.
36. Weiss D. 2000. Regulation of flower pigmentation and growth: multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiol Plant* 110: 152-157.
37. Xin Z, Browse J. 2001. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ* 23: 893-902.
38. Xu W, Dubos C, Lepiniec L. 2015. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. *Trends Plant Sci* 20: 176-185.
39. Xu Z, Mahmood K, Rothstein SJ. 2017. ROS induces

anthocyanin production via late biosynthetic genes and anthocyanin deficiency confers the hypersensitivity to

ROS-generating stresses in Arabidopsis. Plant Cell Physiol 58: 1364-1377.