

Ethyl methane sulfonate (EMS)에 의해 변이된 애기장대 종자 집단으로부터 염 내성 돌연변이체 선발 및 특성 분석

정문수 · 정정성 · 김철수*

전남대학교 식물생명공학부 및 농업식물 스트레스 센터

Received February 13, 2007 / Accepted April 25, 2007

Isolation and characterization of ethyl methane sulfonate (EMS) *Arabidopsis* mutants capable of germination under saline conditions. Moon Soo Chung, Jung Seong Chung and Cheol Soo Kim*. *Department of Plant Biotechnology and Agricultural Plant Stress Research Center, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea* – We conducted a seed germination screening under saline conditions to identify *salt tolerance (sto)* mutants with ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenesis seed pool. During the screening, we identified three mutant lines that seemed to confer elevated salt tolerance in high concentrations of NaCl. At 175 mM NaCl, germination rate of *sto42-14* mutant (one of the EMS *salt tolerance* mutants) was 7-fold higher than that of wild-type plants. Interestingly, *sto42-14* mutant exhibited insensitivity to high glucose concentration and growth inhibition to gibberellin. Our results suggest that *sto42-14* is involved in salt stress tolerance as well as in glucose and gibberellin response in *Arabidopsis*.

Key words – Gibberellin, glucose insensitivity, salt stress, seed germination

서 론

토양에서의 염분 축적은 식물체의 성장을 저해하며, 고염 지역에서의 식물체 반응에 대한 기전을 이해하는 것은 농업적인 생산성 문제를 해결하는데 있어 중요하다. 고염 스트레스는 높은 삼투압에 의하여 토양으로부터 물의 흡수를 방해하는 삼투 스트레스와 고농도 염 이온의 축적에 의한 이온 스트레스를 포함한다. 삼투 스트레스와 이온 스트레스에 의한 고염 스트레스는 영양물의 불균형, 활성산소에 의한 스트레스 및 광합성의 장애 등과 같은 식물 성장에 중요한 영향을 미치며, 심할 경우에는 식물체가 사멸할 수도 있다[20]. 따라서 식물체가 고염 스트레스를 받게 되면 세포막 및 식물체의 수분 상태, 효소의 활성도, 단백질의 합성 및 유전자의 발현 변화를 유도하여 스트레스에 대해 적절히 대응할 수 있는 작용 기전을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[2,3,18,19]. 대표적으로 고염 스트레스에 의한 식물체의 반응 기전은 잎에 다량의 abscisic acid (ABA)를 축적하여 ABA 의존적 신호 전달 과정과 ABA 독립적 신호 전달 과정을 개시하여 스트레스 반응에 관련된 유전자를 발현시키고 다른 여러 유전자들을 조절한다[6,16].

고염 스트레스에 대한 세포 내 영향은 여러 작물들[4], 호염균[1] 및 조직 배양된 세포[8,13,17] 등 다양한 생물체에서 지속적으로 연구되어져 왔지만, 식물체에 대한 고염 내성 작용 기전은 여전히 잘 알려지지 않고 있다. 고염 내성에 대한

작용 기전은 많은 유전자 산물들에 의하여 결정되어지며, 이러한 사실들은 유전적인 분석이 중요함을 시사하고 있다. 현재 가장 잘 알려진 고염 스트레스에 대한 유전자의 기능 분석으로는 세포내의 염을 외부로 내보내는 작용 기전인 SOS (salt overly sensitivity) 신호 전달 경로가 존재 한다[12,15,21]. 또한 최근 보고에 의하면, 염해 스트레스는 glucose 및 병원균 저항성에 대해서도 연관이 있다고 보고되어져 있다[7].

고염 스트레스에 대한 종자 발아율 측정 연구는 종자의 수분 흡수 저해와 이온 독성에 의한 발아율 영향[11] 등에 대한 유용한 정보를 제공해 줄 수 있으며, 또한 그와 관련된 유전자들의 상호 작용 관계를 제공할 것이다. 본 연구는 고농도 NaCl에서 발아 능력이 있는 ethyl methane sulfonate (EMS)에 의해 변이된 *Arabidopsis* 돌연변이체를 선발하였고, 그 돌연변이체에 대한 특성 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 생육 조건

염해 내성 돌연변이체를 선발하기 위하여, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*, ecotype Col-O) 종자에 ethyl methane sulfonate (EMS)로 처리된 M2 세대 종자(50,000 종자)를 Lehle Seeds (Round Rock, TX) 회사로부터 구입하였다. 종자는 70% 에탄올로 1분, 2% sodium hypochlorite 용액으로 10분간 살균한 다음 멸균수로 5회 충분히 세정한 후, 4°C에서 암상태로 2일간 저온 처리하여 MS 기본 배지[10]에 파종하였다. 식물 생장 조절실내의 환경조건은 16/8시간 명기/암기로 조절된 광주기 하에서 온도는 22°C, 습도는 70%로 유

*Corresponding author

Tel : +82-62-530-2182, Fax : +82-62-530-2047

E-mail : cskim626@chonnam.ac.kr

지되도록 조절하였다.

염 농도별 종자 발아율 감수성 조사

다양한 염 농도에 대한 대조군 (wild-type, WT)의 종자 발아율 감수성을 조사하기 위하여, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 그리고 250 mM NaCl이 첨가된 MS 기본 배지에 종자를 파종한 5일 후, 발아율을 조사하였다. 이 실험은 3회 반복 실험을 하였다.

염해 내성 돌연변이체 선발

염 농도에 대한 WT 종자 발아율 감수성 조사 결과를 토대로 우리는 EMS 돌연변이 종자들을 150 mM NaCl이 함유된 MS 기본 배지에 파종한 2주 후, 염해 내성 돌연변이체를 선발하였다. 이러한 선발과정을 통하여 3개의 돌연변이체를 선발하였으며 (*salt tolerance; sto42-14, sto42-18, sto48-4*로 명명), 선발된 3개의 돌연변이체들은 M3 세대에서 150 mM NaCl 농도에 대해 single locus로 분리됨을 알 수 있었고 M4 세대를 거쳐 안정된 homozygous 돌연변이체들을 확보하였다. 또한 이들 3개의 돌연변이체들은 wild-type과 교잡 후 얻어진 종자를 가지고 (F1 및 F2), 150 mM NaCl이 함유된 MS 배지에 파종하여 발아 실험한 결과, 열성 돌연변이체임을 확인할 수 있었다.

스트레스에 대한 종자 발아율 조사와 표현형 관찰

고염 스트레스에 대한 종자 발아율을 측정하기 위하여 175 mM NaCl이 함유된 MS 기본 배지에 종자 파종한 5일 후, 발아율을 조사하였다. 또한 4% glucose (Glc)가 함유된 MS 기본 배지에 종자 파종한 15일 후, 표현형을 관찰하였으며, gibberellin (GA) 호르몬에 대한 표현형을 조사하기 위하여, 20 µM GA가 함유된 MS 기본 배지에 종자 파종한 10일 후, 유식물체의 하배축과 뿌리의 길이를 측정하였다.

Total RNA 추출과 Northern blot 분석

Total RNA는 MS 기본 배지에 종자를 파종하여 2주 동안 자란 식물체를 150 mM NaCl이 함유된 MS 액체 배지에 옮긴 후, 0, 3, 및 6시간 동안 처리한 식물체로부터 aurintricarboxylic acid (ATA) 방법에 의하여 추출하였다[9]. Northern 분석을 위해 total RNA (20 µg)는 1.2% formaldehyde-agarose gel에서 전기 영동한 후, nylon membrane (Roche, Indianapolis, IN)으로 옮겨졌다. Hybridization과 membrane wash 과정은 Sambrook 등[14]의 방법으로 수행하였다.

애기장대로부터 RD29A 유전자를 분리하기 위하여, Forward I primer (5'-GATAACGTTGGAGGAAGAGTCGGC-3')와 Reverse I primer (5'-CAGCTCAGCTCCTGATTCCTACTACC-3')를 가지고 Reverse transcription PCR (RT-PCR)을 통하여

증폭된 DNA를 pGEM T-easy 벡터에 클로닝하였다.

결과 및 고찰

NaCl 농도별 wild-type (WT) 종자의 발아율 조사

염해 내성 돌연변이체를 선발하기 위하여 wild-type (WT) 종자 발아에 대한 적정 염 농도를 조사하였다. 50 mM에서 250 mM 까지의 다양한 NaCl 농도 별에서 WT 종자에 대한 발아율을 조사한 결과, NaCl이 함유되지 않는 MS 기본 배지에서는 종자의 발아율이 90% 이상, 50 ~ 100 mM NaCl에서는 55% 이하, 그리고 125 ~ 200 mM NaCl에서는 15% 이하의 발아율을 나타내었고, 225 mM 이상의 NaCl 농도에서는 WT 종자가 전혀 발아하지 못함을 관찰할 수 있었다(Figure 1). 이러한 결과에서, 125 mM NaCl 농도는 종자 발아하는데 있어서 아주 커다란 영향을 미치는 농도임을 알 수 있었다.

salt tolerance (sto) 돌연변이체들의 선발

염해 내성 돌연변이체를 선발하기 위하여 EMS 애기장대 (ecotype Col-0) M2 종자를 구입하여 150 mM NaCl이 함유된 MS 배지에 파종한 2주 후 조사한 결과, 잠정적인 염해 내성 돌연변이체 3개의 salt tolerance (sto) lines을 (*sto42-14, sto42-18* 및 *sto48-4*) 선발하였다. 선발된 sto 돌연변이체들의 고염에 대한 내성을 재차 검증하기 위해 75 mM 및 125 mM NaCl이 함유된 MS 배지에 종자를 파종하여 식물 배양실에서 18일 동안 키운 후, 대조군 (WT)와 sto 돌연변이체들의 식물체 성장 표현형을 비교 관찰하였다. 그 결과, *sto42-14, sto42-18* 및 *sto48-4* 돌연변이체들은 75 mM 및 125 mM NaCl 농도에서 WT에 비해 식물체의 생장이 보다 잘 자라는 염 내성 표현형이 나타남을 확인하였다(Figure 2). 또한, 75 mM NaCl 농도의 염해 스트레스 하에서 *sto42-14*는 *sto42-18*

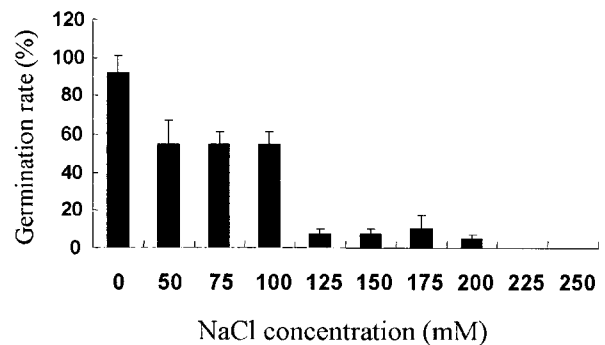


Fig. 1. Germination of the wild-type seed in response to salt stress. Germination of the wild-type (WT) was measured in the medium supplemented with indicated NaCl, and the germination scored at 5 days. Germination was defined as complete protrusion of the radicle. Data represent means standard deviation of three independent experiments (50 seeds per point).

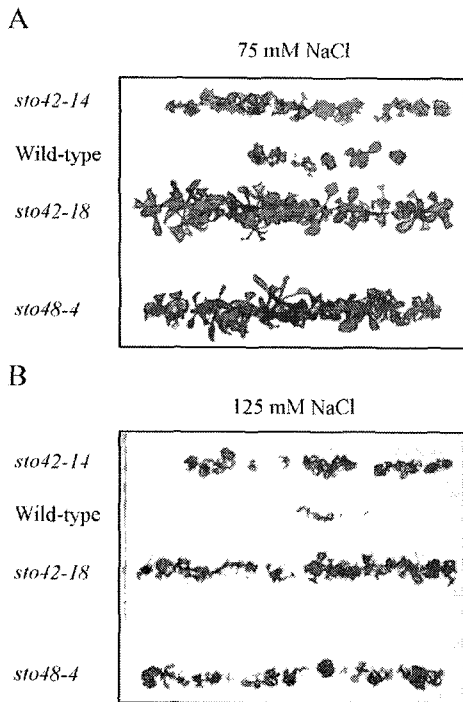


Fig. 2. Germination and growth of the wild-type and *sto* mutant lines in response to salt stress. (A) Wild-type (WT) and *sto* mutants (*sto42-14*, *sto42-18*, and *sto48-4*) were grown on MS agar medium supplemented with 75 mM NaCl for 18 days. (B) WT and *sto* mutants (*sto42-14*, *sto42-18* and *sto48-4*) were grown on MS agar medium supplemented with 125 mM NaCl for 18 days.

및 *sto48-4* 돌연변이체와의 잎 성장 차이가 보임으로써 (Figure 2A), 최소한 *STO42-14* 유전자는 *STO42-18* 또는 *STO48-4* 유전자와 다름을 알 수 있었다.

고염 스트레스에 대한 *sto42-14* 돌연변이체의 발아율 측정

sto42-14 돌연변이체에서의 고염 스트레스에 대한 내성 여부를 측정하기 위하여 175 mM NaCl의 MS 배지에서 종자 발아율을 측정하였다. 종자를 파종한 5일 후 발아율을 조사한 결과, WT 종자는 발아 및 떡잎 발달이 되지 못한 반면 *sto42-14* 돌연변이체는 떡잎이 발달됨을 알 수 있었다(Figure 3A). NaCl이 함유되지 않은 MS 배지에서는 대조구와 *sto42-14* 돌연변이체의 종자 발아율이 90% 이상으로 서로 비슷함을 나타내었고, 175 mM NaCl이 함유된 MS 배지에서는 대조구 (WT)는 종자 발아율이 10% 이하인데 반해, *sto42-14* 돌연변이체는 75%의 발아율을 관찰 할 수 있었다(Figure 3B). 이러한 결과를 통하여 *sto42-14* 돌연변이체는 고염 스트레스 하에서도 내성임을 재확인할 수 있었다.

Glucose 처리에 의한 *sto42-14* 돌연변이체의 성장 표현형 관찰

sto42-14 돌연변이체의 염 내성 특징 외에 다른 성장 표현

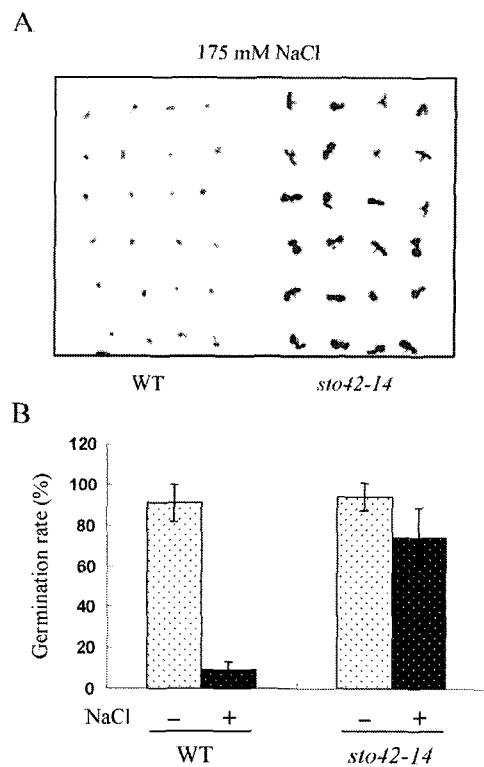


Fig. 3. NaCl tolerance of *sto42-14* mutant. (A) Wild-type (WT) and *sto42-14* lines were germinated on MS agar medium supplemented with 175 mM NaCl for 5 days. (B) WT and *sto42-14* lines were germinated on MS agar medium (-) or MS agar supplemented with 175 mM NaCl (+) for 5 days. Germination was defined as complete protrusion of the radicle, and the germination scored at indicated days. Data represent means standard deviation of three independent experiments (50 seeds per point).

형 특성을 살펴보기 위하여 glucose (Glc)가 함유된 MS 배지에서 종자 발아율 및 떡잎 성장 표현형을 관찰하였다. 4% Glc가 함유된 MS 배지에 종자를 파종한 5일 후의 종자 발아율과 15일 후의 성장 표현형을 관찰한 결과(Figure 4), WT과 *sto42-14* 돌연변이체간의 5일째 종자 발아율에서는 차이를 나타내지 않았으나(Figure 4A), 15일째에서는 WT 떡잎 발달이 되지 못한 반면, 돌연변이체의 떡잎이 발달되는 것으로 보아 *sto42-14* 돌연변이체는 Glc 비감수성을 갖고 있음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 *STO42-14* 유전자가 Glc 하에서 떡잎 발달에 중요한 유전자임을 나타낸다.

Gibberellin 처리에 의한 *sto42-14* 돌연변이체의 하배축과 뿌리 길이 측정

식물 호르몬인 gibberellin (GA)는 고염, 가뭄, 냉해와 같은 환경 스트레스와 당 대사에 연관되어 있다고 보고되어져 왔다[5]. 고염 내성 및 당 비감수성을 갖는 *sto42-14* 돌연변이체가 GA 호르몬과의 연관성을 알아보기 위하여 GA가

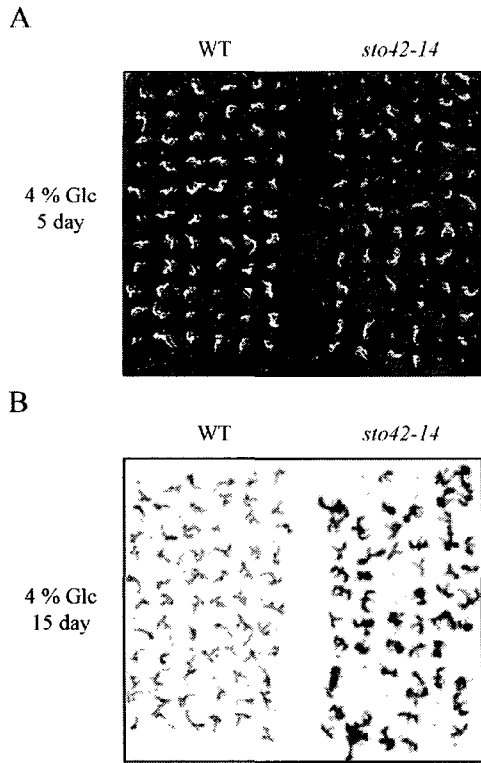


Fig. 4. Glucose (Glc) effect on cotyledon greening. (A) Wild-type (WT) and *sto42-14* lines were germinated on MS agar medium supplemented with 4 % Glc for 5 days. (B) WT and *sto42-14* lines were grown on MS agar medium supplemented with 4 % Glc for 15 days.

함유된 배지에서 *sto42-14* 돌연변이체의 하배축과 뿌리 성장 표현형을 측정 관찰하였다. 20 μ M GA가 함유된 MS 배지에 종자를 파종하여 식물 배양실에서 10일 동안 키워 대조군과 *sto42-14* 돌연변이체의 하배축과 뿌리의 길이를 관찰 및 측정 한 결과(Figure 5), 20 μ M GA가 함유된 배지에서 대조군의 하배축 길이는 4.5 mm, 뿌리 길이는 7 mm인데 반해, *sto42-14* 돌연변이체의 하배축 길이는 1.5 mm, 뿌리 길이는 1.2 mm임을 관찰할 수 있었다(Figure 5B 및 5C). GA가 함유된 배지에서 *sto42-14* 돌연변이체는 대조군에 비해 하배축과 뿌리 생장이 현저히 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *STO42-14* 유전자가 GA 호르몬에 반응하는 뿌리 및 하배축 길이 조절에 관여함을 알 수 있다.

NaCl 처리에 의한 RD29A 전사 발현 양상

염 처리 후, *sto42-14* 돌연변이체의 염 유도 유전자의 전사 양상을 알아보기 위하여 염 유도성 *RD29A* 유전자의 RNA 발현 양상을 확인하였다. MS 기본 배지에 종자를 파종하여 2주일 동안 키운 후 150 mM NaCl이 함유된 MS 액체 배지로 0시간, 3시간 및 6시간 동안 처리하여 각 식물체로부터 total RNA를 추출한 후, Northern을 비교 분석한 결과, *sto42-14* 돌연변이체의 *RD29A* 전사체는 대조군과 비교 했을

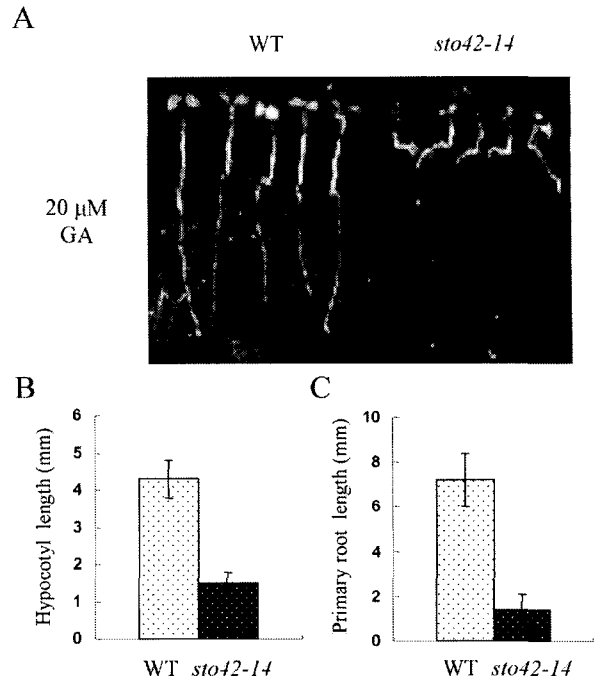


Fig. 5. Gibberellin (GA) effect on hypocotyl and primary root growth. (A) Wild-type (WT) and *sto42-14* lines were grown on MS agar medium containing 20 μ M GA for 10 days. (B, C) Hypocotyl and root length of WT and *sto42-14* seedlings was measured to quantify GA response. Data shown are hypocotyl length (B) and primary root elongation (C) measurements at 10 days. Values shown are means of data from three independent experiments (n=50 each); error bars indicate standard deviations.

때 NaCl 처리 후 3시간부터 대조군보다 강하게 발현함을 확인할 수 있었다(Figure 6). 이러한 결과는 염 스트레스 하에서, *RD29A* 전사체는 *STO42-14* 유전자에 의해 직접 또는 간접적으로 조절됨을 알 수 있다.

위의 실험 결과들을 바탕으로, *sto42-14* 유전자는 고염 및

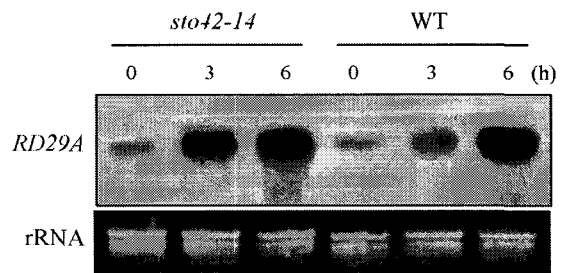


Fig. 6. Expression of *RD29A* gene in *sto42-14* mutants. RNA level of salt-regulated gene was determined by Northern hybridization using total RNA isolated from 2-week-old seedlings. For the salt treatment, the plant roots were submerged in 150 mM NaCl for 0-6 h with gentle shaking. Ethidium bromide-stained rRNAs were used as a loading control (bottom section).

Glc 내성에 관련된 유전자임을 알 수 있었으며, 또한 GA 호르몬에 대해 식물체의 뿌리 및 하배축 길이 조절에 관여함을 알 수 있었다. 앞으로의 최우선적인 연구로는 *sto42-14* 돌연변이체로부터 변이 유전자를 분리하기 위해 map-base cloning 방법을 수행해야 할 것이며, 특히 *sto42-14* 돌연변이체는 염, Glc 및 GA에 대한 복합 연관 관계의 기전을 규명할 수 있는 좋은 재료가 되리라 생각한다.

요 약

염 내성 돌연변이체를 선발하기 위하여, ethyl methane sulfonate (EMS)로 처리된 돌연변이 종자 집단을 사용하였다. 150 mM NaCl 고염 스트레스 하에서 종자 발아 내성을 보이는 세 종류의 EMS 돌연변이체를 선발하였다. 세 종류의 EMS 돌연변이체들 중, *salt tolerance 42-14 (sto42-14)* 돌연변이체는 175 mM NaCl 고농도에서 종자 발아율이 대조구 (WT)에 비해 7배 이상의 높은 발아율을 보였다. 또한 내염성 *sto42-14* 돌연변이체는 glucose (Glc)에 대해서도 비감수성을 갖고 있음을 관찰되었고, 흥미롭게도 *sto42-14* 돌연변이체에 20 μ M gibberellin (GA)을 처리한 결과, 대조구에 비해 하배축과 뿌리의 생장이 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로, 고염 내성 *sto42-14* 돌연변이체는 Glc 뿐만 아니라 GA 호르몬 반응에도 관련되어져 있음을 알 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 전남대학교 학술연구비 (2004-0086) 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Adams, P., J. C. Thomas, D. M. Vernon, H. J. Bohnert and R. G. Jensen. 1992. Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol.* **33**, 1215-1223.
- Blomberg, A. and L. Adler. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microbial Phys.* **33**, 145-212.
- Chapin, F. S. 1991. Integrated responses of plants to stress. *BioScience* **41**, 29-36.
- Cheeseman, J. M. 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* **87**, 547-550.
- Gazzarrini, S. and P. McCourt. 2003. Cross-talk in plant hormone signaling: what Arabidopsis mutants are telling us. *Ann. Bot.* **91**, 605-612.
- Grillo, S., A. Leone, Y. Xu, M. Tucci, R. Francione, P. M. Hasegawa, L. Monti and R. A. Bressan. 1995. Control of osmotin gene expression by ABA and osmotic stress in vegetative tissues of wild-type and ABA-deficient mutants of tomato. *Physiol. Plant* **93**, 498-504.
- Kim, M. J., G. H. Lim, E. S. Kim, C. B. Ko, K. Y. Yang, J. A. Jeong, M. C. Lee and C. S. Kim. 2007. Abiotic and biotic stress tolerance in Arabidopsis overexpressing the Multiprotein bridging factor 1a (MBF1a) transcriptional coactivator gene. *BBRC* **354**, 440-446.
- Kirti, P. B., S. Hadi, P. A. Kumar and V. L. Chopra. 1991. Production of sodium-Chloride-tolerant Brassica juncea plants by in vitro selection at the somatic embryo level. *Theor. Appl. Genet.* **83**, 233-237.
- Liu, J. P. and J. K. Zhu. 1997. Proline accumulation and salt-stress induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **114**, 591-596.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* **15**, 473-497.
- Quesada, V., M. R. Ponce and J. L. Micol. 2000. Genetic analysis of salt-tolerant mutants in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **154**, 421-436.
- Qui, Q. S., Y. Guo, M. A. Dietrich, K. S. Schumaker and J. K. Zhu. 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8436-8441.
- Rhodes, D., S. Handa and R. A. Bressan. 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiol.* **82**, 890-903.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning, pp 7.19-7.22, A Laboratory Manual, Ed 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press Inc., New York.
- Shi, H., B. H. Lee, S. J. Wu and J. K. Zhu. 2003. overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nature Biotechnol.* **21**, 81-85.
- Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* **115**, 327-334.
- Sumaryati, S., I. Negrutiu and M. Jacobs. 1992. Characterization and regeneration of salt- and water-stress mutants from protoplast culture of Nicotiana plumbaginifolia (Viviani). *Theor. Appl. Genet.* **83**, 613-619.
- Willing, R. P. and A. C. Leopold. 1983. Cellular expansion at low temperature as a cause of membrane lesions. *Plant Physiol.* **71**, 118-121.
- Yun, D. J. 2005. Molecular mechanism of plant adaption to high salinity. *Korean J. Plant Biotechnol.* **32**, 1-14.
- Zhu, J. K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**, 66-71.
- Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 247-273.