

ORIGINAL ARTICLE

형질전환 담배의 내건성 개선

박용목*

청주대학교 생명과학과

Improvement of Drought Tolerance in Transgenic Tobacco Plant

Yong Mok Park*

Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 28503, Korea

Abstract

Leaf water and osmotic potential, chlorophyll content, photosynthetic rate, and electrolyte leakage were measured to evaluate tolerance to water stress in wild-type (WT) and transgenic tobacco plants (TR) expressing copper/zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) and ascorbate peroxidase (APX) in chloroplasts. Leaf water potential of both WT and TR plants decreased similarly under water stress condition. However, leaf osmotic potential of TR plants more negatively decreased in the process of dehydration, compared with WT plants, suggesting osmotic adjustment. Stomatal conductance (Gs) in WT plants markedly decreased from the Day 4 after withholding water, while that in TR plants retained relatively high values. Relatively low chlorophyll content and photosynthetic rate under water stress were shown in WT plants since 4th day after treatment. In particular, damage indicated by electrolyte leakage during water stress was higher in WT plants than in TR plants. On the other hand, SOD and APX activity was remarkably higher in TR plants. These results indicate that transgenic tobacco plants expressing copper/zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) and ascorbate peroxidase (APX) in chloroplasts improve tolerance to water stress.

Key words : Dehydration tolerance, Electrolyte leakage, Leaf water potential, Photosynthetic rate, Stomatal conductance

1. 서론

지구온난화 등으로 인한 기후변화는 강수량 패턴을 변화시켜 세계적으로 다양한 환경문제를 야기하고 있다. 특히, 건조지와 반건조지를 중심으로 진행되는 사막화 문제는 이들 지역의 농업생산력 저하로 인한 식량난뿐만 아니라 황사와 같은 환경문제를 야기하여 인류의 생존을 위협하고 있다. 따라서 세계 각국은 사막화 방지를 위한 여러 가지 노력을 행하고 있다(Alscher et al., 1997; Kim et al., 2011).

환경변화는 식물에 있어서 환경스트레스로 작용한다.

환경스트레스는 생리적, 생화학적, 세포 및 분자수준에서 식물에 영향을 미친다(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005). 고온이나 저온, 환경오염 그리고 건조와 같은 환경스트레스는 식물에 있어서 산화적 스트레스로 작용하며, 식물이 환경스트레스를 받으면 강한 산화력의 superoxide radical (O_2^-), H_2O_2 등과 같은 반응성이 큰 독성을 가진 활성산소종을 체내에 생성한다(Moran et al., 1994). 이들 활성산소종은 세포막 파괴, 단백질 분해, 엽록소 파괴로 인한 광합성 저해, DNA 합성 저해와 같은 치명적인 상해를 식물에 준다(Halliwell and Gutteridge, 2000). 그러나 식물체는 오랜 진화과정

Received 18 November, 2015; Revised 10 December, 2015;

Accepted 27 December, 2015

*Corresponding author: Yong Mok Park, Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 28503, Korea
Phone: +82-43-229-8531
E-mail: ecopark@cju.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에서 산화적 스트레스로부터 자신을 방어하기 위한 항산화 시스템을 발달시켜 생체를 방어하고 있다. 이들 항산화 시스템에는 ascorbic acid, tocopherol, glutathione 등과 같은 저분자의 항산화 물질과 superoxide dismutase (SOD), peroxidase(POD) 등과 같은 항산화 효소 등이 알려지고 있다(Allen et al., 1997; Asada, 1992, 1999).

환경스트레스 가운데서도 수분스트레스는 식물의 생장과 발생에 가장 크게 영향을 미쳐 어떤 지역의 농업생산력을 결정하는 가장 중요한 요인이다(Flexas et al. 2002). 수분스트레스에 적응한 많은 식물들은 수분스트레스 하에서 다양한 물질이나 유리 당을 세포내에 축적하여 삼투조절을 행하거나 활성산소를 효율적으로 제거하는 항산화효소를 발달시키고 있다(Arbona and Gómez-Cadenas, 2008; Mittler and Zilinskas, 1994). 수분스트레스에 대한 이들 두 가지 기작은 독립적으로 작용하지만 두 기작이 동시에 작용하면 수분스트레스에 의한 산화적 스트레스를 완화시키고 수분스트레스에 대하여 내성을 증가시킬 수 있을 것이다. 그러므로 기후변화에 대처하고 지속가능한 농업생산력 확보를 위하여 수분스트레스에도 잘 견디는 내성식물 종이나 작물의 품종개발이 절실히 요구되고 있다. 그 결과, 현재 여러 나라에서 여러 가지 다양한 형질전환 식물체가 만들어져 세포수준에서, 개체수준에서 환경스트레스에 대한 내성에 관한 시험이 진행되고 있다(Kim et al., 2011; Kwon et al., 2005).

본 연구에서는 활성산소 생성에서 가장 먼저 작용하며 독성이 강한 superoxide와 peroxide를 무독화하는 항산화효소인 CuZnSOD와 APX 유전자를 도입한 담배의 수분스트레스에 대한 내건성을 평가하고 항산화 도입 형질전환 식물의 유용성에 대하여 고찰하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 식물재료

재료로 사용된 식물은 항산화효소인 Copper zink superoxide dismutase(CuZnSOD)와 Ascorbate peroxidase(APX) 유전자를 엽록체에 도입한 형질전환 담배와 야생형의 담배(*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*)를 재료로 이용하였다. 종자를 25℃, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광조건에서 발아시킨 후, 잎이 3-4장 되었을 때 화분에 이식

하여 식물생장실(광량 350 μmol , 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 70%)에서 생육시켰다. 수분스트레스 처리가 시작되기 전까지 7회에 걸쳐 하이포넥스 영양액(500배 희석액)과 충분한 물을 공급하였으며, 이식 후 약 2개월 정도 되어 잎이 9-10장 되었을 때 수분스트레스 처리를 실시하였다.

2.2. 실험방법

잎의 수분포텐셜은 Microvolt meter(C-52, Wescor, USA)를 이용하여 측정하였으며, 삼투포텐셜은 액체질소를 이용하여 잎의 세포를 파괴한 후, 수분포텐셜과 같은 방법으로 측정하였다. 잎의 기공전도도는 steady-state porometer (Li-1600, Licor, USA)를 이용하여 측정하였다. 광합성은 휴대용 광합성장치(Li-6400, Licor, USA)를 이용하여 측정하였으며, 측정시의 광의 강도는 $1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 이산화탄소 농도 $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ 로 하여 식물을 키운 식물생장실에서 측정을 실시하였다.

수분스트레스로 인한 잎의 용질의 유출은 Ghoulam et al.(2002)의 방법을 일부 변경하여 측정하였다. 측정을 위하여 3개체의 건강한 식물체에서 잎을 각각 3장씩 잘라 표면에 부착된 용질을 Blume and Ebercon(1981)의 방법에 따라 제거한 후 잎을 광량 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 기온 $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 약 60%의 조건 하에서 수분스트레스를 가하면서 시간 경과에 따른 막손상의 정도를 측정하였다. 처리가 끝난 잎은 직경 25 mm 크기로 잘라 10 ml의 증류수가 든 유리병에 넣어 뚜껑을 닫은 후 상온에서 30분간 150 rpm의 속도로 rotary shaker에서 배양하여 잎으로부터 유출된 용질의 총량을 conductivity meter(Checkmate II, Corning, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정된 잎을 다시 121°C 에서 20분 간 멸균한 후에 유출된 용질의 양을 측정하여 유출 전, 후의 용질의 양을 백분율로 나타내었다. 잎의 엽록소 함량은 80% acetone으로 추출한 후 UV-spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정하였다(Porra et al., 1989).

SOD 활성은 zanthine-zanthine oxydase계를 이용하여 superoxide radicals(O_2^-)을 발생시켜 cychrome c를 환원시키는 속도를 측정하는 McCord and Fridovich (1969)의 방법에 따라 550 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 결정하였다. 효소액과 반응액(10 mM xanthine,

10 mM cytochrome c, 0.1 mM EDTA, pH 7.8의 50 mM 인산완충액)에 대한 zanthine oxydase 활성이 50% 억제되는 것을 SOD 1 unit로 정의하였다. APX 활성은 ascorbate를 산화시키는 APX 활성을 0.5 mM ASA, 0.1 mM H₂O₂, 0.1 mM EDTA, 50 mM의 인산 완충액 (pH 7)과 추출 효소액을 포함한 반응액을 이용하여 Nakano and Asada(1981)방법에 따라 280 nm에서 1분 간 흡광도 감소를 측정하여 결정하였다.

3. 결과

3.1. 잎의 수분관계

수분스트레스 처리에 따라 형질전환 식물체와 야생형 식물체 모두에서 충분히 물을 공급한 식물체에 비하여 처리 3일째부터 잎의 수분포텐셜 저하가 나타났다(Fig.

1). 그러나 삼투포텐셜 변화에서는 두 식물형 간에 차이를 나타내었다. 즉, 형질전환 식물체에서는 잎의 수분포텐셜 저하시에 삼투포텐셜 값도 거의 같은 정도로 저하하여 압력포텐셜 값을 높게 유지하는 반면, 야생형에서는 처리 4일째부터 현저히 낮은 압력포텐셜을 나타내었다.

압력포텐셜로 표현되는 팽압은 초본식물의 형태를 유지시킬 뿐만 아니라 기공을 여는 중요한 작용을 한다. 건조에 적응한 많은 식물은 수분스트레스에 의해 잎의 수분포텐셜이 감소할 때 세포에 많은 당이나 이온을 축적하여 삼투포텐셜을 낮춤으로써 팽압을 유지하는 적응 형태를 나타낸다(Arbona and Gómez-Cadenas, 2008). 형질전환 식물체의 경우 비록 처리 5일 이후에 압력포텐셜이 감소하기는 하였지만 그 이전까지는 야생형에 비하여 충분한 물을 공급한 식물체와 비슷하게 1 bar 이 넘는 팽

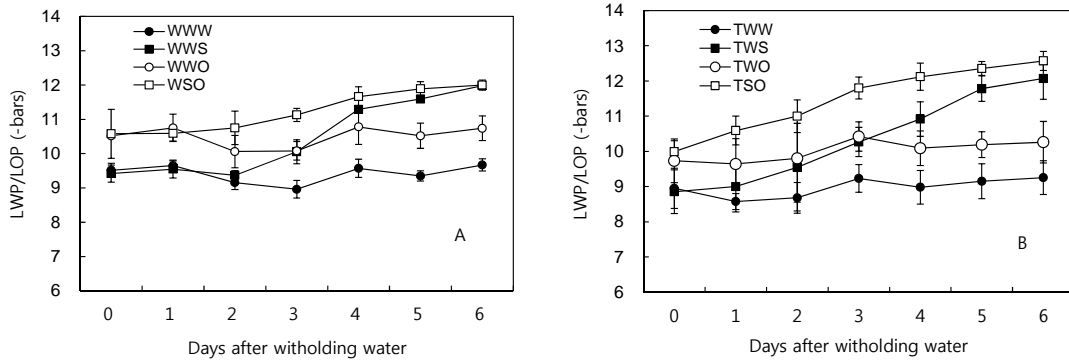


Fig. 1. Changes of leaf water potential (●/■) and osmotic potential (○/□) in well-watered (circle) and water-stressed (quadrangle) plants. A, wild type; B, transgenic plants. Values represent means with SE (n=6).

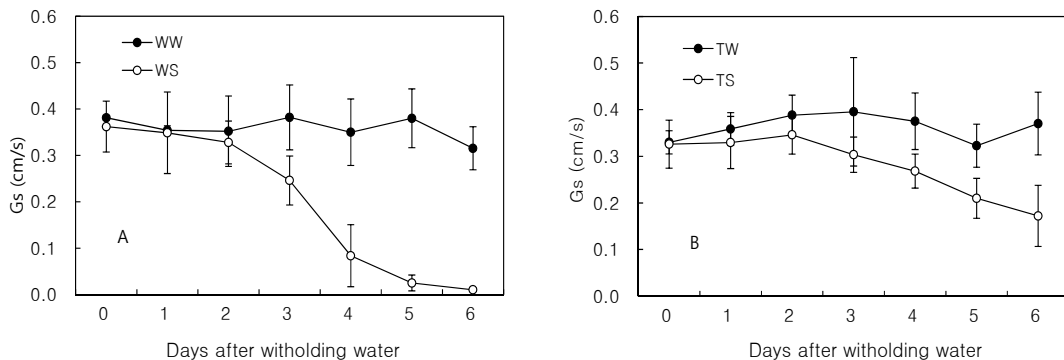


Fig. 2. Changes of stomatal conductance in well-watered (●) and water-stressed (○) tobacco plants. A, wild-type plants; B, transgenic plants. Values represent means with SE (n=6).

압을 유지하고 있었다. 그 결과, 형질전환 식물체는 수분 스트레스 처리 후에도 상당히 높은 기공전도도를 보이고 있다(Fig. 2). 야생형에서는 처리 3일째부터 기공전도도의 감소가 나타나 처리 4일 후에는 초기치의 70%가 넘게 감소하였다. 그러나 형질전환 식물체에서는 거의 80%에 이르는 높은 값을 나타내었다.

식물은 낮동안 기공을 열고 이산화탄소를 받아들여 광합성을 하며, 이 과정에서 광합성으로 고정시키는 이산화탄소의 수습배에서 수백배에 이르는 물을 기공을 통하여 증산에 의하여 잃는다. 따라서 수분공급이 원활하지 않는 수분스트레스 하에서는 수분손실을 줄이기 위하여 식물들은 일시적으로 기공을 닫아 기공전도도가 저하한다(Larcher, 1995). 일반적으로 토양수분이 충분한 경우, 대부분의 식물들에서 수분스트레스가 발생하는 한 낮에 일시적으로 기공전도도 저하가 관찰된다. 그러나 토양수분의 감소에 의한 심한 수분스트레스의 경우, 기공전도도의 저하가 지속되고 이로 인하여 광합성이 감소하고, 성장 저하를 초래하며, 심한 수분스트레스가 장기간 지속되면 식물은 시들거나 사망에까지도 이르게 된다(Larcher, 1995).

3.2. 광합성률과 엽록소 함량

Fig. 3은 수분스트레스 처리에 따른 광합성의 변화를 나타낸다. 수분스트레스가 진행되면서 야생형과 형질전환 식물체 모두에서 처리 4일 이후에 광합성률이 저하하였다.

그러나 광합성 저하의 정도는 야생형에서 훨씬 크게 나타나 형질전환 식물체에서는 수분스트레스 처리 4일 후 약 40%, 6일 후에는 약 60%가 감소한 반면, 야생형에서는 각각 약 60%, 90% 감소하였다. 광합성 저하는 다양한 원인에 의하여 나타나지만 수분스트레스에 의한 기공전도도의 저하가 가장 민감하게 반영된다. 또한, 전체 광합성에 영향을 미치는 잎의 엽록소 함량 변화를 보면, 수분스트레스 처리 4일째부터 야생형에서 엽록소 함량이 감소하였다(Fig. 4).

심한 수분스트레스는 엽록소를 파괴하고 광합성효소를 불활성화시켜 광합성을 저하시키는 것이 알려지고 있다. 따라서 형질전환 식물체에서 수분스트레스 처리 4일 이후 보여진 광합성률의 저하는 기공전도도에 기인하는 것인 반면, 야생형에서의 광합성률 감소는 기공전도도

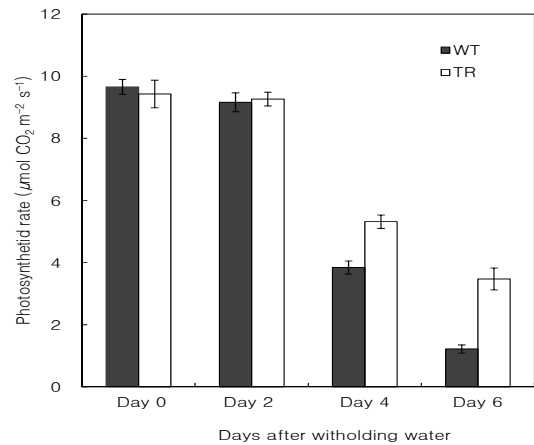


Fig. 3. Changes of photosynthetic rate in wild-type (closed column) and transgenic (open column) tobacco plants. Vertical bars represent means with SE (n=6).

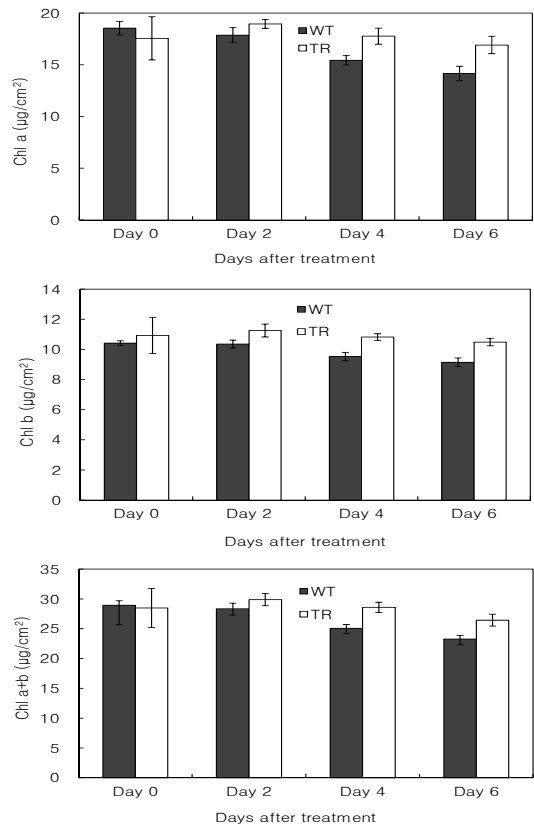


Fig. 4. Changes of Chlorophyll content in wild-type (closed column) and transgenic (open column) tobacco plants. Vertical bars represent means with SE (n=6).

감소와 함께 엽록소 붕괴에 기인하는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 막손상을 나타내는 이온유출을 나타내는 relative electrolyte leakage에서 더욱 분명하게 나타났다(Fig. 5). 세포의 막손상에 의한 이온의 유출은 각종 스트레스에 대한 영향을 단적으로 알 수 있는 중요한 지표가 된다. 이 결과로 볼 때 형질전환 식물체는 야생형 식물체에 비하여 수분스트레스에 대한 내성이 강한 것으로 판단된다.

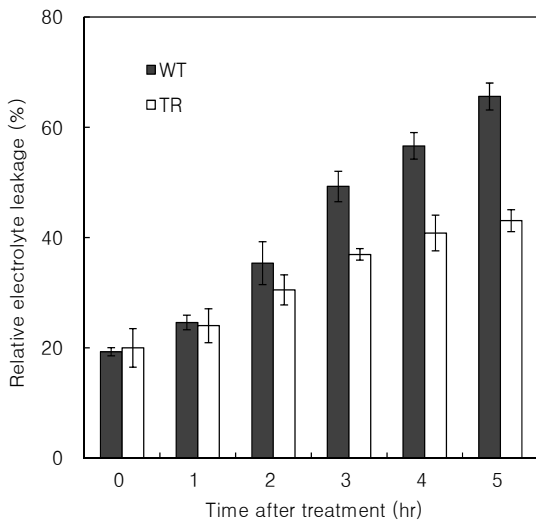


Fig. 5. Changes of relative electrolyte leakage in wild-type (closed column) and transgenic (open column) tobacco plants. Vertical bars represent means with SE (n=9).

환경스트레스는 식물에 산화적 스트레스를 유발하여 독성이 강하고 유해한 활성산소종을 발생시킴으로써 식물의 세포막을 손상시키고, 단백질을 분해시키는 등 여러 가지 생리적 장애를 야기한다(Moran et al., 1994). 환경스트레스에 대한 식물종에 따른 감수성의 차이는 이들 활성산소종을 얼마나 효율적으로 제거하느냐에 달려 있다. 실제 환경스트레스에 강한 식물종이나 작물의 품종은 활성산소종을 제거하는 항산화물질을 함유하고 있거나 항산화효소의 높은 활성을 가지고 있다. 이러한 사실은 항산화효소 유전자를 도입한 본 연구에서의 형질전환 담배로부터도 알 수 있다.

3.3. 항산화효소 활성

Fig. 6은 수분스트레스 하에서 야생형과 형질전환 식물체의 SOD와 APX 활성을 나타내고 있다. 형질전환 식물체는 야생형의 식물체에 비하여 수분스트레스가 진행되어감에 따라 SOD와 APX 활성이 점점 높아지는 것을 보여주고 있으며, 이것은 항산화효소 유전자를 도입한 형질전환 식물체에서 도입 유전자가 잘 발현되고 있다는 것을 시사하고 있다. 반면, 야생형의 식물체에서는 수분스트레스의 진행에 따라 APX의 활성이 약간 증가하였으나 형질전환 식물체의 약 35% 정도에 지나지 않았다. 뿐만 아니라 식물체의 SOD 활성은 거의 변화하지 않았다. 수분스트레스 하에서의 이러한 항산화효소 활성의 차이는 수분스트레스 진행과정에서 나타난 야생형과

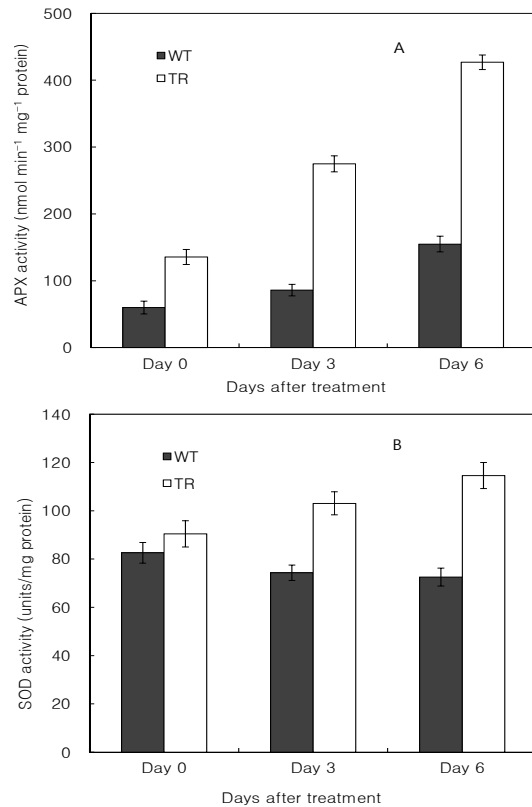


Fig. 6. Changes of APX (A) and SOD (B) activity in wild-type (closed column) and transgenic (open column) tobacco plants. Vertical bars represent means with SE (n=9).

항산화유전자를 도입한 형질전환 담배의 생리적 특성의 차이를 나타내는 것으로 두 품종의 수분스트레스에 대한 내성의 차이로 해석할 수 있다.

4. 결론

본 연구에서는 식물생명공학 기술을 이용하여 담배에 SOD와 APX의 두 가지 항산화효소 유전자를 도입한 형질전환 식물체와 비형질전환체인 야생형 식물체의 수분스트레스에 대한 내건성을 주된 생리적 지표로 이용하여 비교하였다. 그 결과 다음과 같은 결론에 도달하였다.

1) 수분스트레스가 진행되는 동안 형질전환식물체는 야생형 식물체에 비하여 삼투조절에 의해 수분포텐셜 보다 더 낮도록 삼투포텐셜을 낮춤으로써 팽압을 유지하여 상당기간 높은 기공전도도를 나타내었으며, 이것은 다시 높은 광합성률로 이어졌다.

2) 야생형의 식물체는 수분스트레스가 진행되는 동안 형질전환 식물체에 비하여 현저하게 광합성이 저하하였다. 이것은 야생형에서 형질전환 식물체에 비하여 더 일찍 팽압이 감소하여 기공전도도가 저하하였고, 엽록소 함량이 감소하였기 때문으로 판단된다.

3) 두 식물체 간의 내건성의 결정적 차이는 항산화효소 활성의 차이로 인하여 수분스트레스에 의해 발생된 활성산소 제거 능력에 차이가 나타났기 때문으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2013-2014년도 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구비)의 지원에 의하여 수행되었음

REFERENCES

- Allen, R. D., Webb, R. P., Schake, S. L., 1997, Use of transgenic plants to study antioxidants defences, *Free Rad. Biol. Med.*, 23, 473-479.
- Alscher, R. G., Donahue, J. L., Cramer, C. L., 1997, Reactive oxygen species and antioxidants: relation-ships in green cells, *Physiol. Pl.*, 100, 224-223.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., Tiburcio, A. F., 2010, Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance, *Planta*, 231, 1237-1249.
- Asada, K., 1992, Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants, *Physiol. Pl.*, 85, 235-241.
- Asada, K., 1999, The water - water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons, *Annual Rev. Pl. Mol. Biol.*, 50, 601-639.
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., De Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M., Inge, D., 1992, Mananese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants, *EMBO J.*, 10, 723-1732.
- Blum, A., Ebercon, A., 1981, Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat, *Crop Sci.*, 21, 43-47.
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J. M., Sampol, B., Medrano, H., 2002, Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations, *Func. Plant Biol.*, 29, 461-471.
- Ghoulam, C., Fousy, A., Fares, K., 2002, Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars, *Environ. Exp. Bot.*, 47, 39-50.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 2000, *Free radicals in biology and medicine*, 1st ed., Oxford University Press, London.
- Kim, Y. H., Kim, M. D., Choi, Y. M., Park, S. C., Yun, D. J., Noh, E. U., Lee, H. S., Kwak, S. S., 2011, Transgenic poplar expressing Arabidopsis NDPK2 enhances growth as well as oxidative stress tolerance, *Pl. Biotech. J.*, 9, 334-347.
- Kwon, S. Y., Lee, Y. P., Lim, S., Lee, H. S., Kwak, S. S., 2005, Transgenic plants with enhanced tolerance to environmental stress by metabolic engineering of antioxidative mechanism in chloroplasts, *Kor. J. Pl. Bioltech.*, 32, 151-159.
- Larcher, W., 1995, *Physiological plant ecology*, 2nd ed., Springer, Tokyo, 157-245.
- Mittler, R., Zilinskas, B. A., 1994, Regulation of pea

- cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought, *Pl. J.*, 5, 397-405.
- Moran, J. F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Freschilla, S., Klucas, R. V., Aparicio-Tejo, P., 1994, Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194, 346-352.
- Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E., 1989, Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta.*, 975, 384-394.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2005, Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters, *Trends Plant Sci.*, 10, 88-94.