

*SOD2*와 *NDPK2* 유전자 집적에 의한 페튜니아의 아황산가스 저항성 증진

이수영* · 천경성 · 김소영 · 권오현 · 이혜진 · 김원희 · 유봉식

국립원예특작과학원

Enhanced Resistance to Sulfur Dioxide Gas in Transgenic Petunia by Stacking both *SOD2* and *NDPK2* Genes

Su Young Lee*, Kyeong-Seong Cheon, So Young Kim, O Hyeon Kwon, Hye Jin Lee, Won Hee Kim, and Bong Sik Yoo

National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

*Corresponding author: lsy8542224@korea.kr

Abstract

The aim of this study was to develop a transgenic petunia with enhanced resistance to sulfur dioxide (SO₂) gas by stacking two genes, *SOD2* and *NDPK2*, which are both known to confer resistance to abiotic stresses. The first-generation hybrids (TF₁) were obtained through reciprocal crosses between an *SOD2*-transgenic line SOD2-2-1-1-35(T₄)[S(T₄)] and an *NDPK2*-transgenic line NDPK2-7-1(T₂)[N7-1(T₂)]. Approximately 32.1-73.0% of the first-generation hybrids (TF₁) carried both *SOD2* and *NDPK2* genes. These hybrids showed 2.6 and 5.1 times less damage than hybrids carrying only *SOD2* or *NDPK2* genes, respectively, when they were treated with SO₂ gas at 30 ppm. This confirmed that the heterozygous hybrids were more resistant to SO₂ than the hybrids carrying either one of the resistance genes. Second-generation hybrids (TF₂) were obtained by selfing the TF₁ individuals. We confirmed the expression of the stacked genes in the TF₂ hybrids by phenotypic observation of their response to SO₂ gas at 30 ppm as well as using RT-qPCR and photosynthetic efficiency.

Additional key words: first-generation hybrid, photosynthetic efficiency, RT-qPCR, second-generation hybrid

서 언

페튜니아는 절화류 중심으로 꽃 소비가 이루어지는 우리나라의 경우 2013년 현재 총 화훼 판매액 (7,656.5억원)의 20.7%를 점유하는 초화류 및 종자·종묘 시장의 6% 정도 점유한다(Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2014). 반면, 1년초 및 정원용 화훼류 중심으로 꽃 소비가 이루어지

는 미국의 경우 2010년 현재 총 화훼소비량(3,981,711,000\$)의 34.1%를 차지하는 초화 및 화단용 화훼시장의 10%를 차지할 정도로 소비 비중이 적지 않은 화종이다(United States Department of Agriculture, 2011).

페튜니아는 팬지와 더불어 봄부터 늦여름까지 대기오염에 직접 노출되는 도로 및 가로변의 화단용으로 주로 이용되어 대기오염을 포함한 환경스트레스로 인한 잎의 퇴색 등으로 관상가치가 저하되므로 대기오염 스트레스에 대한 저항성 증진 품종 개발이 요구되고 있다. 그런데, 교잡육종 기술에 의해 대기오염 스트레스에 대한 저항성 증진 식물을 개발하는 것이 쉽지 않아 벼 등 주곡작물에서 육종의 주요 수단으로 된 형질전환 기술을 이용하여 대기환경오염 저항성 식물체를 개발하고자 하는 연구가 시도되고 있고(Lee et al., 2015; Nakamura et al., 2009; Nian et al., 2014; Su et al., 2015), 최근에는 단독 유전자 도입이 아닌 두 종류 이상의 유전자 집적 방법에 의해 대기환경 오염 스트레스 저항성을 더욱 배가시키고자 하는 노력들도 이루어지고 있다(Kim et al., 2015; Tseng et al., 2008). 보편적으로 이용되고 있는 유전자 집적 방법에는 2개 이상의 외래 유전자를 한번에 도입하거나 1개 도입된 형질전환체에 또 다른 종류의 유전자를 연이어 도입하거나 1개의 외래 유전자를 도입한 형질전환체간 교잡에 의해 유전자를 도입되도록 하는 방법 등이 있다(Francois et al., 2002). 본 연구팀에서는 이전의 연구결과에서 내환경성 페튜니아 형질전환체를 개발하고자 대장균 유래 superoxide dismutase 2(SOD2) 및 애기장대 유래 Nucleoside-diphosphate kinases 2(NDPK2, 이전 연구에서는 SN으로 표기 됨) 유전자를 페튜니아 순계 계통 Wongyo A2-36에 각각 도입하여 내염성 형질전환체를 개발한 바 있으며(Lee et al., 2009a), 이후 그들을 세대진전 시킨 후대들간의 교잡을 통해 획득한 교잡세대들이 산화적 스트레스에 대한 저항성이 증진된 것을 확인한 바 있다(Lee et al., 2011).

SOD2는 스트레스에 의해 식물체내에 발생하는 과산화물음이온과 O_2^- 의 불균등화 반응을 촉매하는 효소인 superoxide dismutase 유전자 중 Mn과 결합하여 작용하는 효소 유전자로 애기장대(Gao et al., 2003), 벼(Zhao et al., 2006) 등에 도입된 식물체가 내염성을 나타내었다고 보고된 바 있다. NDPK2는 진핵생물에서 세포증식, 세포발달 및 세포분화 등에 관여하는 단백질인 NDPK의 하나로 애기장대에서 항산화 관련 유전자들의 조절 기능을 하는 것으로 보고되었으며, 감자에 도입된 식물체가 산화스트레스에 대한 내성이 증진되었다고 보고된 바 있다(Tang et al., 2004).

이에, 본 연구는 SOD2 및 NDPK2 유전자가 페튜니아 순계 계통에 각각 도입된 형질전환체간 교잡에 의해 SOD2 및 NDPK2 유전자를 집적시켰을 때 산화스트레스 저항성이 증진된 페튜니아 형질전환 계통 및 그 후대가 아황산가스 저항성도 증진되는지를 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구팀의 이전 연구(Lee et al. 2011)에서 사용된 NDPK2-7-1(T₂)[이하 N7-1(T₂)로 표기]계통과, SOD2-2-1-1-35(T₃)계통의 후대 SOD2-2-1-1-35(T₄)[이하 S(T₄)로 표기]계통을 NDPK2와 SOD2 유전자 집적 계통을 획득하기 위한 교배모본으로 사용하였다.

항산화 유전자 SOD2 및 NDPK2 집적 형질전환 페튜니아 계통 후대획득

N7-1(T₂)와 S(T₄)의 교잡 제1세대는 2009년에 S(T₄)와 N7-1(T₂)간 상호교배에 의하여, 교잡 2세대는 2010년에 교잡 제1세대의를 자가수분시킨 후 획득하였다. 종자는 교배 및 자가수분 후 45-50일경 충실도를 기준으로 채종하였다. 채종한 종자는 한 달여 기간의 저온처리 후 파종하였으며, 32공 프러그 트레이 가식 및 화분(직경 15cm)정식 후 국립원예특작과학원 LMO 식물체 격리온실에서 재배하였다.

PCR 분석

SOD2 및 *NDPK2* 유전자가 집적된 교잡 후대를 선발하기 위해 PCR 분석을 이용하였다. PCR 분석을 위한 교잡 후대의 genomic DNA는 파종 후 87일된 식물체의 어린 잎으로부터 DNeasy plant mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 추출하였다. 추출한 DNA는 NanoVue(GE, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 정량한 후 template DNA로 사용하였다. PCR 반응액 조성은 총 25 μ L 반응액에 한 후 25–50 ng·L⁻¹의 total genomic DNA, 0.2mM의 dNTPs, 50ng의 *SOD2* 또는 *NDPK2* 유전자 특이 primers, 1 \times Taq DNA polymerase buffer와 1unit의 Taq DNA polymerase(Takara, Shiga, Japan)을 첨가하였다. *SOD2* 유전자 특이 primers 염기서열은 (forward; 5'-TAC TGG AGA TGA ATA TGA GC-3', reverse; 5'-CAG CAG GCG GCA AAT GAT TA-3')이고, *NDPK2* 유전자 특이 primers 염기서열은 (forward; 5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3', reverse; 5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA-3')이다. PCR 증폭은 icycler(Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 94°C에서 5분간 주형 DNA를 pre-denaturing시킨 후, 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 55회 반복시켰다.

아황산가스 저항성 검정

SOD2 및 *NDPK2* 유전자가 집적된 교잡 후대의 아황산가스 저항성 정도를 측정하기 위한 아황산가스 처리는 Lee et al.(2009b)의 방법을 일부 변경하여 수행하였다. 분 정식 후 100일된 *SOD2* 및 *NDPK2* 유전자 집적 식물체를 지제부까지 비닐로 감싸 투명 아크릴판으로 제작한 120cm³ 밀폐 챔버 바닥에 둔 후 아황산가스를 처리하였다. 아황산가스는 충전압력이 35°C에서 135kg·cm⁻³으로 1,000ppm농도를 N₂로 밸런스 한 후 간이측정기(Gastec GV-100s, Kanagawa, Japan)를 사용하여 30ppm 4시간 처리하였다. 챔버 내 환경은 HOBO(Onset Computer, Massachusetts, USA)를 챔버 바닥에 놓고 조사하였으며, 평균 온도는 26.8 \pm 0.6°C 및 습도는 59.7 \pm 13.0%이었다. 처리 후 지제부까지 감쌌던 비닐을 제거하고 유리온실에서 관리하면서 피해 증상을 육안으로 관찰하였다. 교잡 제 1 세대 실험의 피해율은 2명의 연구원이 처리 식물체 잎 개개의 전체 면적 대비 피해 받은 부위 비율을 5% 간격으로 0%에서 100%로 구분하여 조사한 후 다음 식에 의해 계산하였다. Visible injury(VI, 피해율) = [(0% 피해 잎 수 \times 0.0) + (5% 피해 잎 수 \times 0.05) + (10% 피해 잎 수 \times 0.1) + + (100% 피해 잎 수 \times 1.0)]/전체 잎 수/2. 반면, 아황산가스 저항성이 증진된 교잡 제 1 세대의 아황산가스 저항성 증진 특성의 재현 확인 목적이었던 교잡 제 2 세대 실험의 피해율은 3명의 연구원이 각각 아황산가스 처리 식물체 전체에 대한 피해 정도를 비율로 조사한 후 평균치로 계산하였다. 또한, 광합성측정장치 Li-6400(LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA)를 이용하여 아황산가스 가시적 피해가 가장 적은 잎과 가장 큰 잎의 광합성 능력을 조사하였다. 형질전환 계통과 대조 비형질전환체간 아황산가스 피해율과 광합성능력에 대한 통계적 유의성은 SAS 9.2(sas Inst. Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 DUNCAN 다중검정하였다.

RT-qPCR 분석

RNeasy Mini Plant Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 잎으로부터 total RNA를 추출하고, total RNA 추출액에 혼합된 genomic DNA를 제거하기 위해 최종 반응액 10 μ L에 1 μ g의 total RNA, 1x RQ1 DNase Reaction Buffer와 1unit의 RQ1 RNase-Free DNase(Promega, WI, USA)을 혼합하여 37°C에서 1시간동안 처리하였다. 또한 gDNA의 제거를 확인하기 위해 1 μ L의 DNase를 처리한 total RNA, 1x Buffer, 0.2mM dNTP, 각 0.2 μ M *ACTIN* 프라이머(Table 1), 1.25unit Ex-taq(TaKaRa, Shiga, Japan)을 혼합하여 10 μ L의 반응액을 조성하고, 94°C에서 2분간 initial-denaturation을 수행 후, denaturation 94°C-30초, annealing 60°C-30초, extension 72°C-30초 과정을 40반복, final-extension 72°C-2분으로 standard PCR을 완료하였다. PCR반응이 완료된 PCR산물들은 1% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 증폭된 PCR산물이 없음을 확인하였다. gDNA를 제거한 total RNA와 PrimeScript 1ststrand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 매뉴얼의 지시에 따라

Table 1. Primer sequences used in the RT-qPCR analysis.

Name	5' - 3'	Product size (bp)
SOD2-1F	AACGTGACTTCGGCTCCGTTGATA	126
SOD2-1R	TAGCAGTAGAAACCACCGCCAGTT	
NDPK2-3F	GGGAAGGTGTTGGTGTGTTGCTT	186
NDPK2-3R	ATAGCTCGCCCTCTTTGAACCACA	
Actin-F	TGCTGATCGTATGAGCAAGGAA	
Actin-R	GGTGGAGCAACAACCTTAATCTTC	

20μL의 cDNA를 합성하였다. 그리고 1μL의 합성된 cDNA와 ACTIN 프라이머를 이용하여 상위의 PCR조건으로 cDNA 합성 여부를 확인한 다음, 각 cDNA를 10배 희석시켜 Reverse Transcription-quantitative PCR(RT-qPCR)에 이용하였다. RT-qPCR 분석을 위하여 기존에 보고된 서열을 기반으로 프라이머를 다자인하고(Table 1) 합성하여 발현분석에 이용하였다. RT-qPCR은 최종 반응액 20μL에 1x SYBR premix EX taq II(TaKaRa, Shiga, Japan), 각 0.4μM 프라이머, 1x ROX reference Dye, 1μL의 cDNA를 혼합하였다. 그 반응액을 Rotor-gene Q cycler(Qiagen, Hilden, Germany)의 3step으로 RT-qPCR을 수행하였으며, 그 반응조건은 95°C에서 10분간 initial denaturation을 수행 후, denaturation 95°C-5초, annealing 60°C-20초, extension 72°C-30초 과정을 40반복하였다. 샘플마다 threshold를 0.05로 설정하여 Ct값을 산출하고 housekeeping 유전자 ACTIN의 Ct값으로 normalization하였다. 상대정량값의 계산은 ΔΔCt법을 이용하였고, 식물 3반복의 상대정량값으로 평균과 표준오차를 계산하였다.

결과 및 고찰

황산화 유전자 SOD2 및 NDPK2 집적 페튜니아 형질전환체 획득

다수 유전자의 집적을 통해 비생물적 또는 생물적 스트레스에 대한 식물의 저항성이나 영양적 가치를 배가시키고자 하는 노력들이 이루어지고 있고, Fraçois et al.(2002)과 Halpin(2005)에 의해 유전자 집적 방법과 그 간의 유전자 집적 연구들에 대한 체계적인 정리가 이루어진 바 있다. 다수 유전자 집적 방법에는 단독 유전자가 도입된 형질전환체간 교잡을 통한 방법, 순차적으로 형질전환을 반복하여 다수 유전자를 한 식물체에 도입하는 방법, 여러 유전자를 한번의 형질전환을 통해 도입하는 방법 등이 있다. 화훼류 중에서는 petunia에서 비생물적스트레스 스트레스 저항성을 증진시키고자 교잡방법이 이용된 바 있고(Lee et al., 2011), Phalaenopsis에서 병 저항성을 증진시키고자 순차적 형질전환 반복방법이 이용된 바 있다(Chan et al., 2005). 본 연구에서는 대기환경오염원에 대한 저항성을 증진시키고자 비생물적스트레스 저항성 유전자로 널리 알려진 SOD2와 NDPK2 유전자가 각각 도입된 SOD2 형질전환 T₄계통과 NDPK2 형질전환 T₂계통간 상호교잡을 실시하였고, 획득한 종자를 파종, 화

Table 2. Gene segregation in first- (TF₁) and second-generation (TF₂) hybrids. TF₁ hybrids were obtained by crossing the transgenic petunia lines N 7-1(T₂) and S(T₄), which carried NDPK2 and SOD2, respectively. TF₂ hybrids were obtained by selfing TF₁, which had two transgenes (SOD2 and NDPK2).

Genotype	Number of analyzed transgenic plants	Number of transgenic plants with only SOD2 gene (A)	Number of transgenic plants with only NDPK2 gene (B)	Number of transgenic plants with both SOD2 and NDPK2 gene (C)	Number of transgenic plants without both SOD2 and NDPK2 gene (D)
[S(T ₄)×N7-1(T ₂)](TF ₁)	28	4	8	11	5
[N7-1(T ₂)×S(T ₄)](TF ₁)	22	3	3	14	2
[S(T ₄)×N7-1(T ₂)](TF ₂)	50	10	14	15	11
[N7-1(T ₂)×S(T ₄)](TF ₂)	80	18	10	50	2

본 정식 후 양친의 유전자인 *SOD2*와 *NDPK2*가 모두 집적된 식물체를 선발하기 위해 PCR 분석을 실시하였다. 그 결과, *SOD2* 형질전환체를 모본으로 하고 *NDPK2* 형질전환체를 부본으로 한 [S(T₄)×N7-1(T₂)](TF₁) 교잡 제1세대의 양친의 유전자 집적 개체의 획득율은 30.0%이었으나, *NDPK2* 형질전환체를 모본으로 하고 *SOD2* 형질전환체를 부본으로 한 [N7-1(T₂)×S(T₄)](TF₁) 교잡 제1세대의 경우는 62.5%로, *NDPK2*가 모본이고 *SOD2*가 부본으로 교잡되었을 때 양친 유전자의 후대 집적율이 2배 정도 더 높았다(Table 2).

SOD2와 NDPK2 유전자 집적 페튜니아 형질전환체의 아황산가스 저항성

PCR 분석에 의해 *SOD2* 및 *NDPK2* 유전자의 집적이 확인된 [S(T₄)×N7-1(T₂)](TF₁) 및 [N7-1(T₂)×S(T₄)](TF₁) 교잡 제1세대를 아황산가스 30ppm에 4시간 노출시키고, 5일 후 평균 피해율을 육안으로 조사한 결과, *SOD2* 및 *NDPK2* 유전자가 각각 도입된 형질전환체 N7-1(T₂)와 S(T₄)는 피해율이 각각 16.6% 및 8.4%인 반면 *SOD2* 및 *NDPK2*가 집적된 [S(T₄)×N7-1(T₂)](TF₁) 및 [N7-1(T₂)×S(T₄)](TF₁) 교잡 제1세대 식물체들의 피해율은 각각 3.7% 및 3.2%로 *SOD2* 및 *NDPK2* 유전자가 단독 도입된 형질전환체에 비해 두 유전자가 집적되었을 때 피해율이 2.6-5.1배 낮았다. 이 결과로 볼 때 *SOD2* 및 *NDPK2* 유전자 집적 개체는 두 유전자 단독 도입된 형질전환체에 비해 아황산가스 저항성이 증대되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 비생물적스트레스 저항성 증진 유전자 집적을 통해 아황산가스 저항성 형질전환체 획득에 관한 연구는 Tseng et al.(2008)에 의해서도 보고된 바 있다. 그들은 본 연구에서 사용한 대장균 유래의 superoxide dismutase 유전자 *SOD*와 catalase 유전자 *CAT*를 각각 삽입하고 있는 아그로박테리움과의 혼합 접종을 통해 *SOD*와 *CAT* 유전자가 동시에 도입된 배추 형질전환체를 획득 후, 자가 채종에 의해 세대진전시킨 T₁ 계통 중 *SOD*나 *CAT* 유전자 단독 혹은 집적 계통을 선발하여 아황산가스 노출하여 피해율을 조사한 결과 본 연구에서와 같이 *SOD*나 *CAT* 유전자 단독보다는 두 유전자가 집적되었을 때 아황산가스 피해율이 39-55% 낮았다고 보고하였다.

아황산가스 저항성 증진 SOD2와 NDPK2 유전자 집적 페튜니아 형질전환체 후대획득

*SOD2*와 *NDPK2* 유전자가 집적된 교잡 제1세대의 아황산가스 처리 실험 후 아황산가스 저항성이 증진된 *SOD2*와 *NDPK2* 유전자 집적 교잡 제1세대의 아황산가스 저항성이 후대에서도 발현되는지를 확인하기 위해서 *SOD2*와 *NDPK2* 유전자가 집적되고 아황산가스 저항성이 증진되었던 [S(T₄)×N7-1(T₂)](TF₁) 및 [N7-1(T₂)×S(T₄)](TF₁) 교잡 제1세대를 자가수분 한 후 획득한 교잡 제2세대를 PCR 분석한 결과, *SOD2* 형질전환체를 모본으로 하고 *NDPK2* 형질전환체를 부본으로 한 [S(T₄)×N7-

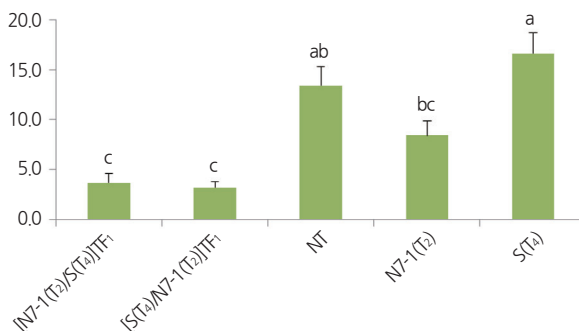


Fig. 1. Visible injury (%) in the first-generation hybrids (TF₂) carrying the transgenes *NDPK2* and *SOD2*, obtained by crossing transgenic petunia lines N 7-1(T₂) and S(T₄). NT represents a non-transgenic control. Visible injury was determined 5 days after exposure to SO₂ gas (30 ppm) for 4 hours. Data are presented as mean ± SD. Different letters on the bars represent significant differences between NT and the transgenic lines, determined by Duncan's multiple range test ($p \leq 0.01$).

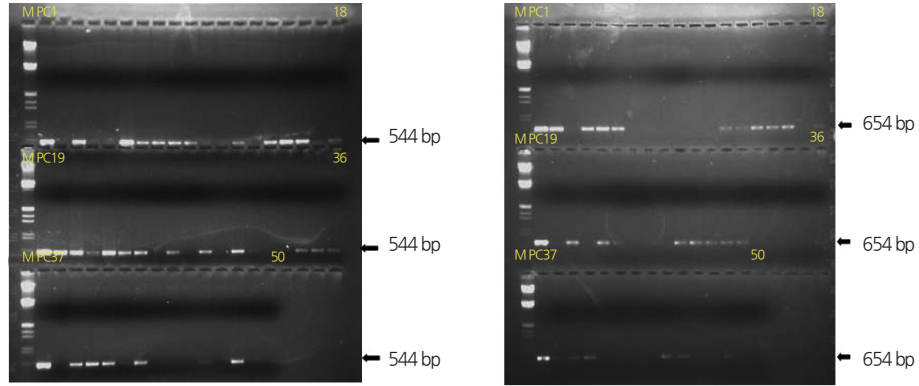


Fig. 2. PCR analysis of the second-generation (TF₂) hybrids using primers specific for *NDPK2*- (A) or *SOD2*- (B): M, λEcoRI + HindIII molecular marker; PC, positive control; 1-50, progenies (TF₂ of the first-generation hybrids (TF₁), carrying two transgenes (*SOD2* and *NDPK2*)). TF₂ hybrids were obtained by selfing TF₁ hybrids, which were obtained through reciprocal crosses of two transgenic petunia lines, N 7-1(T₂) and S(T₄), carrying the transgenes *NDPK2* and *SOD2*, respectively. TF₂ hybrids were resistant to SO₂ gas.

1(T₂)(TF₂) 교잡 제2세대의 양친 유전자 집적 개체 획득율은 39.3%이었으나, *NDPK2*형질전환체를 모본으로 하고 *SOD2*형질 전환체를 부분으로 한 [N7-1(T₂)×S(T₄)](TF₁) 교잡 제2세대의 경우는 63.6%로, 교잡 제1세대와 마찬가지로 *NDPK2*가 모본 이고 *SOD2*가 부분으로 교잡되었을 때 양친 유전자의 후대 집적율이 2배 정도 더 높았다(Fig. 2 and Table 2).

SOD2와 NDPK2 유전자 집적 페튜니아 형질전환체 후대의 아황산가스 저항성 재확인

SOD2 및 *NDPK2* 유전자 집적 식물체의 아황산가스 저항성을 재확인하기 위하여 아황산가스 저항성 *SOD2* 및 *NDPK2* 유전자 집적 형질전환체를 자가수분 후 획득된 [S(T₄)×N7-1(T₂)](TF₂) 및 [N7-1(T₂)×S(T₄)](TF₂) 개체들 중 PCR분석에 의해 *SOD2* 및 *NDPK2* 유전자의 집적이 확인된 식물체들을 아황산가스 30ppm에 노출시키고 5일 후 평균 피해율을 육안으로 조사한 결과, *SOD2* 및 *NDPK2* 유전자 집적 식물체 후대에서도 아황산가스저항성 특성이 안정적으로 발현함을 확인하였다 (Fig. 3).

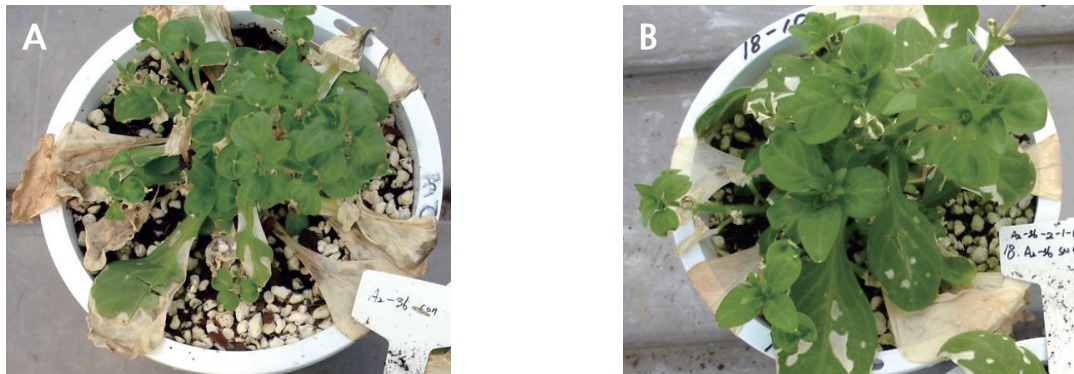


Fig. 3. Comparison between a second-generation hybrid [S(T₄)×N7-1(T₂)](TF₂) petunia plant and a non-transgenic petunia plant, 5 days after exposure to SO₂ gas (30 ppm) for 4 hours: (A) non-transgenic plant, (B) transgenic petunia plant. The second-generation hybrid had two transgenes (*SOD2* and *NDPK2*) and was obtained by selfing the first-generation hybrids, which were obtained through reciprocal crosses of transgenic petunia lines N 7-1(T₂) and S(T₄).

아황산가스 저항성 증진 SOD2와 NDPK2 유전자 집적 페튜니아 형질전환 후대의 광합성 효율 증진 확인

식물 광합성 기작 시스템II(PSII) 효율 조사 결과에서도 SOD2 및 NDPK2 유전자 집적 식물체 후대들이 비형질전환체에 비하여 아황산가스에 대한 저항성이 증진되어 아황산가스에 대한 스트레스를 덜 받고 있음을 확인할 수 있었다. 아황산가스 처리 받은 $[S(T_4) \times N7-1(T_2)](TF_2)$ 및 $[N7-1(T_2) \times S(T_4)](TF_2)$ 개체들 중 아황산가스 피해가 가장 적은 잎과 가장 많은 잎의 식물 광합성 기작 시스템II(PSII) 효율 조사 결과, 아황산가스 피해가 가장 적은 잎의 경우, 아황산 처리 후 2일 5일 Fv/Fm이 비형질전환체는 평균 0.782인데 $[S(T_4) \times N7-1(T_2)](TF_2)$ 와 $[N7-1(T_2) \times S(T_4)](TF_2)$ 식물체는 각각 평균 0.798과 0.783이었으며, 아황산 가스 피해가 가장 많은 잎의 경우, 아황산 처리 후 6일 Fv/Fm이 비형질전환체는 평균 0.691인데 $[S(T_4) \times N7-1(T_2)](TF_2)$ 와 $[N7-1(T_2) \times S(T_4)](TF_2)$ 식물체는 각각 평균 0.787과 0.786이었다. 식물이 스트레스에 노출되었을 때 잎의 Fv/Fm이 0.83 정도 보다 낮을수록 식물이 스트레스 노출 정도가 심함을 나타내므로(Bjorkman and Demmig, 1987), SOD2 및 NDPK2 유전자의 집적 식물체 후대들이 비형질전환체에 비하여 스트레스에 대한 저항성이 증진되어 스트레스를 덜 받고 있음을 의미한다고 할 수 있다(Figs. 4 and 5).

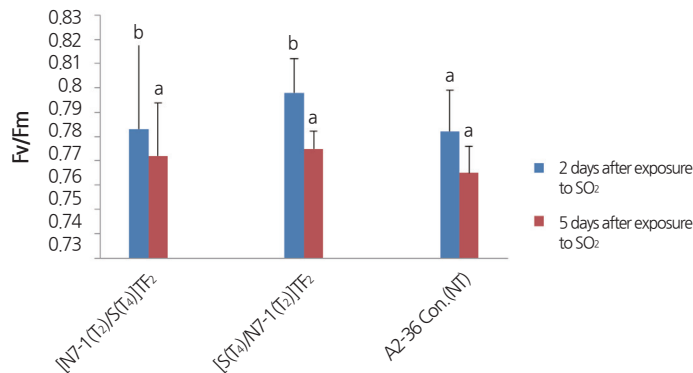


Fig. 4. Photosynthetic efficiency of the least damaged leaf in a second-generation hybrids (TF_2) plant 2 or 5 days after exposure to SO_2 gas (30 ppm) for 4 hours; NT was a non-transgenic control. Data are presented as mean \pm SD. Different letters on the bars represent significant differences between the NT control and transgenic lines according to Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$). TF_2 hybrids were obtained by selfing the first-generation hybrids, which were obtained through reciprocal crosses of transgenic petunia lines N 7-1(T_2) and S(T_4); TF_2 hybrids carried the two transgenes *NDPK2* and *SOD2*.

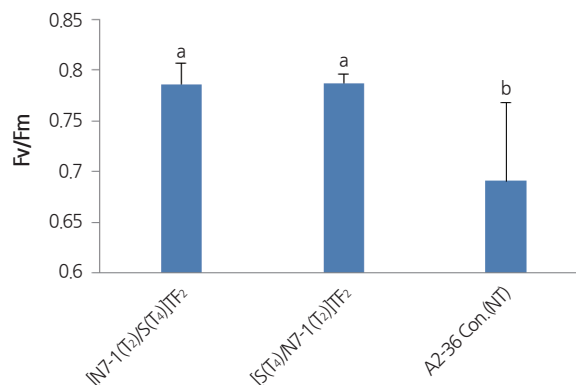


Fig. 5. Photosynthetic efficiency of the most damaged leaf in a second-generation hybrid (TF_2) plant 5 days after exposure to SO_2 gas (30 ppm) for 4 hours; NT was a non-transgenic control. Data are presented as mean \pm SD. The letters on the bars represent significant differences between the NT control and transgenic lines according to Duncan's multiple range test ($p \leq 0.01$). TF_2 hybrids were obtained by selfing the first-generation hybrids, which were obtained through reciprocal crosses of transgenic petunia lines N 7-1(T_2) and S(T_4); TF_2 hybrids carried the two transgenes *NDPK2* and *SOD2*.

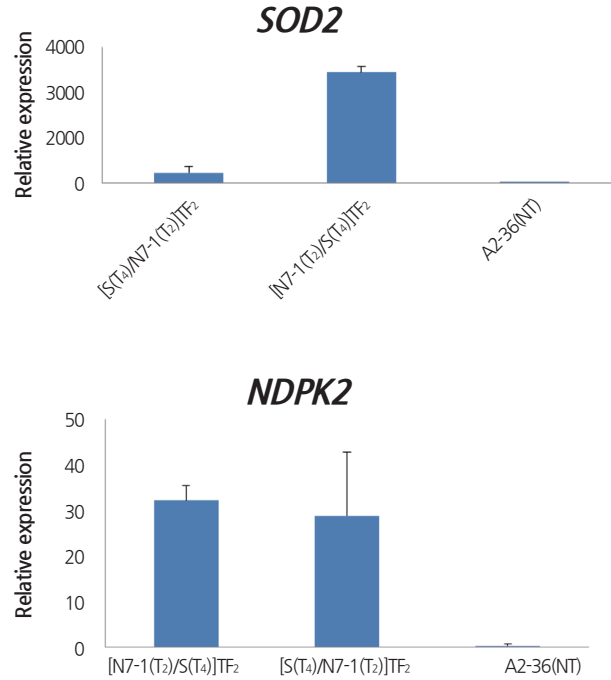


Fig. 6. Real-time PCR analysis of the second-generation hybrids (TF₂). TF₂ hybrids had two transgenes (*NDPK2* and *SOD2*) and were obtained by selfing the first-generation hybrids, which were obtained from reciprocal crosses of transgenic petunia lines N7-1(T₂) and S(T₄). TF₂ hybrids were resistant to SO₂ gas. NT was a non-transgenic control.

아황산가스 저항성 증진 SOD2와 NDPK2 유전자 집적 페튜니아 형질전환 후대의 도입 유전자 발현 확인

RT-qPCR 분석에 의해 *SOD2*와 *NDPK2* 유전자 집적 후 아황산가스 저항성 2계통, [N7-1(T₂)×S(T₄)](TF₂)와 [S(T₄)×N7-1(T₂)](TF₂), 식물체에서의 *SOD2*와 *NDPK2* 유전자 발현을 조사한 결과, 2계통 모두 *NDPK2* 유전자의 발현은 비형질전환체 보다 약 30배가 증가하였고, *SOD2* 유전자의 발현의 경우 [N7-1(T₂)×S(T₄)](TF₂)계통은 비형질전환체 보다 약 3000배 이상 높았으며, [S(T₄)×N7-1(T₂)](TF₂) 계통은 비형질전환체 보다 약 200배 이상 높아, 2계통의 아황산가스 저항성 특성이 유전자 집적에 의한 효과임을 알 수 있었다(Fig. 6).

이상의 연구는 교잡방법을 이용하여 획득된 비생물적 스트레스 저항성 유전자 *SOD2* 및 *NDPK2* 집적에 의해 아황산 가스 저항성이 증진될 수 있는 가능성을 제시하였다고 할 수 있다. 본 연구를 통해 획득된 아황산가스 저항성 증진 페튜니아 형질전환 계통 [N7-1(T₂)×S(T₄)](TF₂)와 [S(T₄)×N7-1(T₂)](TF₂)는 아황산 가스를 포함한 대기환경 오염 저항성 페튜니아 품종 개발을 위하여 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

초 록

유전자 집적에 의해 아황산가스 저항성 증진 페튜니아를 개발하고자 비생물적 스트레스 저항성 유전자로 널리 알려진 *SOD2*와 *NDPK2* 유전자가 각각 도입된 *SOD2* 형질전환 계통 SOD2-2-1-1-35(T₄)[S(T₄)]와 *NDPK2* 형질전환 계통 NDPK2-7-1(T₂)[N7-1(T₂)]간 상호교잡을 실시하여 교잡 제1세대를 획득하였다. 교잡 제1세대 중 *SOD2*와 *NDPK2* 유전자가 모두 집적된 개체 획득율은 32.1-73.0%이었고, *SOD2*와 *NDPK2* 유전자가 모두 집적된 개체는 *SOD2* 또는 *NDPK2* 유전자가 단독 도입된 개체에 비해 아황산가스 30ppm 처리 피해율이 2.6-5.1배 낮아 아황산가스 저항성이 증진되었음을 확인하였다. 또한 아황산가스 저항성이 증진된 교잡 제1세대를 자가수분에 의해 세대진전 시켜 획득한 교잡 제2세대의 아황산가스 저항성 검정을 통하

여 교잡 제1세대에서의 아황산가스 저항성이 후대에서도 안정적으로 발현함을 확인하였다. 또한, 광합성 효율 증진 조사를 통해 아황산가스 저항성이 증진된 SOD2와 NDPK2 유전자 집적 후대가 아황산 가스에 대한 스트레스를 덜 받고 있음을 확인하였고, RT-qPCR 분석을 통해 SOD2와 NDPK2 유전자 집적 후대의 아황산가스 저항성 증진이 SOD2와 NDPK2 유전자 집적에 의한 효과임을 확인하였다.

추가주요어: 교잡 제1세대, 광합성 효율, 유전자 양적 발현 증합효소연쇄반응, 교잡 제2세대

Literature Cited

- Bjorkman O. and B. Demmig. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170:489-504.
- Chan Y.L., K.H. Lin, Sanjaya, L.J. Liao, W.H. Chen, and M.T. Chan. 2005. Gene stacking in *Phalaenopsis* orchid enhances dual tolerance to pathogen attack. *Transgenic Res.* 14:279-288.
- Francois, I.E.J.A., W.F. Broekaert, and B.P.A. Cammue. 2002. Different approaches for multi-transgene-stacking in plants. *Plant Sci.* 163:281-295.
- Gao X.H., Z.H. Ren, Y.X. Zhao, and H. Zhang. 2003. Overexpression of SOD2 increases salt tolerance of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 133:1873-1881
- Halpin C. 2005 gene stacking in transgenic plants-the challenge for 21st century plant biotechnology. *Plant Biotechnol. J.* 3:141-155.
- Kalunke R.M., M. Janni, S. Bebedetelli, and R. D'Ovidio. 2013. Using biolistics and hybridization to combine multiple glycosidase inhibitor transgenes in wheat. *Euphytica* 194:443-457.
- Kim Y.H., S. Lim, S.H. Han, J.J. Lee, K.J. Nam, J.C. Jeong, H.S. Lee, and S.S. Kwak. 2015. Expression of both CuZnSOD and APX in chloroplasts enhances tolerance to sulfur dioxide in transgenic sweet potato plants. *C. R. Biol.* 338:307-313.
- Lee S.Y., B.H. Han, E.W. Noh, and S.S. Kwak. 2009a. Transferase of SOD2 or NDP kinase 2 genes into purebred lines of petunia. *J. Plant Biotechnol.* 36:144-148.
- Lee S.Y., J.L. Kim, and D.Y. Kim. 2011. Identification of enhanced resistance to abiotic stress induced by methyl viologen in progeny from a cross of transgenic lines of *Petunia*. *Flower Res. J.* 19:269-273.
- Lee S.Y., J. L. Lee, J.H. Kim, and K.J. Kim. 2015. Enhanced removal of exogenous formaldehyde gas by *AtFALDH*-transgenic *Petunia*. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 56:247-254.
- Lee Y.R. S.Y. Choi, O.K. Kwon, and E.J. Huh. 2009b. Injury symptoms of orchids by sulfur dioxide gases in greenhouse. *Flower Res. J.* 17:214-241.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2014. 2013 Statistics of floriculture crops. p. 12-15.
- Nakamura M, M. Kuramata, I. Kasugai, M. Abe, and S. Youssefian. 2008. Increased thiol biosynthesis of transgenic poplar expressing a wheat O-acetylserine(thiol) lyase enhances resistance to hydrogen sulfide and sulfur dioxide toxicity. *Plant Cell Rep.* 28:313-323.
- Nian H.J., D.J. Zhang, Z.D. Zeng, J.P. Yan, K.Z. Li, and L.M. Chen. 2014. Over-expression of heat shock factor gene (*AtHsfA1d*) from *Arabidopsis thaliana* confers formaldehyde tolerance in tobacco. *Acta Physiol. Plant.* 36:1455-1462.
- Su X.H., P. Zhou, R. Wang, Z.P. Luo, and Z.L. Xia. 2015. Overexpression of the maize psbA gene enhances sulfur dioxide tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 120:303-311
- Tang L., S.Y. Kwon, D.J. Yun, S.S. Kwak, and H.S. Lee. 2004. Selection of transgenic potato plants expressing NDP Kinase 2 gene with enhanced tolerance to oxidative stress. *Korean J. Plant Biotechnol.* 31:191-195.
- Tseng M.J., C.W. Liu, and J.C. Yiu. 2008. Tolerance to sulfur dioxide in transgenic Chinese cabbage transformed with both the superoxide dismutase containing manganese and catalase gene of *Escherichia coli*. *Sci. Hortic.* 115:101-110.
- United States Department of Agriculture. 2011. Floriculture crops 2010 summary. p. 12-23.
- Zhao F.Y., S.L. Guo, H. Zhang, and Y.X. Zhao. 2006. Expression of yeast SOD2 in transgenic rice results in increased salt tolerance. *Plant Sci.* 170:216-224.