

## 감자 정아 동결보존과정에서 AFP 처리 시 저온관련 유전자의 발현양상

서지향 · 전수민 · Aung Htay Naing · 한증술 · 박인환 · 김창길

### Expression pattern of low-temperature-related genes by the treatment of AFP in the cryopreservation of potato shoot tips

Ji-Hyang Seo · Su Min Jeon · Aung Htay Naing · Jeung Sul Han · In Hwan Park · Chang-Kil Kim

Received: 11 December 2017 / Revised: 18 December 2017 / Accepted: 18 December 2017

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** The expression profiles of low-temperature-related genes were examined in *in vitro* potatoes exposed to a cold condition for 1-3 days. The expression levels of *PPII* and *CI21B* genes were linearly elevated from day 1 to day 3, while the opposite trend was observed for *CBF4* and *CI21A*. In addition, the expression of the genes *CI21A* and *CI21B* varied, along with specific tissues (leaf, stem, and tuber) and the treatment periods. Therefore, potato shoot tips were cryopreserved with LS and PVS2 containing different concentrations of AFP. It can thus be inferred that the presence of AFP in LS and PVS2 was likely to elevate expression pattern of the genes. Furthermore, the concentration of AFP (1,500 ng/ml for LS and 500 ng/mg for PVS2) was the best for the cryopreservation of potatoes.

**Keywords** Real-time PCR, Vitrification, LS, PVS2

#### 서 언

감자는 세계 4대 식량작물 중 하나로 전 세계적으로 많이 재배되고 있고(Lee et al. 2012), 영양번식을 통하여 유전자원을 보존하고 있다(Lizarraga et al. 1989). 하지만 영양번식 방법을

이용할 경우에는 비용과 노력이 많이 들고 바이러스나 세균 및 해충에 노출될 가능성이 크며 또한 자연재해로 인한 유전자원의 손실 가능성과 재배 환경에 제약이 따른다(Seo et al. 2005). 이러한 문제점을 해결하고 유전자원을 장기 저장할 수 있는 가장 효율적인 방법은 액체질소를 활용한 초저온 동결보존법이다(Steponkus 1985; Stushnoff 1985). 초저온동결보존법은 저온에서 동결보호제가 세포 내 수분을 감소시켜 결빙을 줄이고 용질의 농도를 높여 생존율을 높이는 것이 주요 메커니즘이다(Finkle et al. 1985; Withers 1985).

Antifreeze protein (AFP)는 극지방 해양 어류의 조직과 혈액에서 처음 발견되었으며, 동물세포의 초저온동결보존시 유용하게 활용되고 있다(Arav et al. 1993). AFP는 저온에 의해 유도되는 세포막의 손상을 보호 할 수 있고(Yeh and Feeney 1996; Madura et al. 2000), 이는 생체 내에서 얼음결정의 생성 및 재결정화를 억제하여 세포의 손상을 막아 생물체들이 생존할 수 있게 해준다(Davies and Sykes 1997; Davies et al. 2002; D'Amico et al. 2006). 식물 세포에서는 최근에 AFP를 동결보호제로 활용한 동결보존법이 시도되고 있으며, SEM(Scanning Electron Microscope)이나 DSC(Differential Scanning Calorimetry)를 이용하여 AFP의 활성을 확인한 바 있다(Jeon et al. 2015). 최근 동물세포에서 동결보존 과정에 AFP 처리가 다양한 생리활성 유전자 발현에 미치는 영향에 대하여 보고한 바 있다(Jo et al. 2012). 반면 아직까지 식물에서는 AFP 처리 시 저온관련 유전자의 발현에 미치는 영향에 대한 연구결과는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 감자의 초저온 동결보존 기술을 향상시키기 위하여 액체질소에 침지하기 전 전처리 단계에서 다양한 농도의 AFP를 처리하여 저온관련 유전자의 발현양상을 비교 분석하여 초저온 동결보존 시 적정 AFP의 농도를 규명하고자 실험을 수행하였다.

J.-H. Seo · S. M. Jeon · A. H. Naing · J. S. Han · C.-K. Kim (✉)  
경북대학교 원예학과  
(Department of Horticulture, Kyungpook National University,  
Daegu 41566, Korea)  
e-mail: cckim@knu.ac.kr

I. H. Park  
경북대학교 조경학과  
(Department of Landscape Architecture, Kyungpook National  
University, Daegu 41566, Korea)

**재료 및 방법**

**식물 재료**

본 실험에 사용한 감자(*Solanum tuberosum* L.)는 수미(Superior) 품종을 사용하였으며, MS호르몬 무첨가 배지에서 4주 간격으로 마디배양한 식물체에서 분리한 정단부위를 엽원기 4~5매를 포함시켜 동결보존을 위한 실험재료로 사용하였다. 정단배양에 사용된 배지는 MS 기본배지(Murashige and Skoog 1962)에 3% (w/v) sucrose, 0.75% plant agar를 첨가하여 pH 5.7로 조절한 후, 121°C/1 bar에서 20분간 멸균하여 사용하였다.

AFP 처리 후 저온관련 유전자를 screening 하기 위하여 마디배양을 통하여 얻은 기내 식물체를 기본식물로 하여 생산한 씨감자 1세대 괴경을 온실에 파종하여 4주간 배양시킨 다음 4°C 저온 하에서 광도 37 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 16시간 일장으로 1일, 2일, 3일 처리하고 잎, 줄기, 괴경에서 저온관련 유전자의 발현 여부를 조사하였다.

**RNA 추출 및 RT-PCR**

RNA 추출은 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) 방법에 따라 추출하였고, 추출된 RNA는 UV spectrophotometer nano 2000 프로그램을 사용하여 정량하였다. First-strand cDNA는 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 반응 조건은 30°C 10분, 42°C 30분, 99°C 5분 동안 1cycle로 수행하였다. RT-PCR은 cDNA 2 ul (1 ng/ul), forward primer 10 pmol, reverse primer 10 pmol, PCR reaction mixture (Solgent, Korea) 15 ul, RNase free water를 넣어 총 30 ul로 맞춰 95°C 2분(1 cycle) → 95°C 30초, 59°C 30초, 72°C 10초(30 cycle) → 72°C 5분(1 cycle)로 수행 후, SNA 50 ul/l를 첨가한 2% agarose gel에 로딩 시켰다. 사용된 저온관련 유전자 primer는 Table 1과 같다.

**Real-time PCR**

Real-time PCR은 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 2X SYBR Green PCR master mixture 10 ul, 2 pmol forward primer, 2 pmol reverse primer, cDNA 2 ul (100 ng/ul)를 혼합하고 RNase free water로 총 20 ul로 맞추었다. 반응조건은 holding stage (95°C, 10분, 1 cycle) → cycling stage (95°C, 30초 / 59°C, 30초 / 72°C, 15초, 40 cycles) → melt curve stage (95°C, 15초 / 59°C, 30초 / 95°C, 15초)로 Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)을 사용하였으며, StepOne Software v2.3으로 ΔΔCT 분석하였다. 사용된 primer는 Table 1과 같으며, endogenous control 은 *efl a* (Nicot et al. 2005)을 사용하였다.

**정아 동결보존 과정에서 농도별 AFP 처리**

초저온동결보존을 위하여 2~3 mm 크기의 정아를 10개 채취하여 MS기본배지에 0.3 M sucrose 가 첨가된 pre-culture solution에 넣고 60 rpm 속도로 24시간 진탕배양하였다. Pre-culture 후 정아를 MS기본배지에 0.6 M sucrose와 2 M glycerol 이 첨가된 loading solution (LS)에 옮겨 60 rpm, 90분 진탕배양하였다(Hirai and Sakai 1999). 그 후 MS기본배지에 0.4 M sucrose, 30% (w/v) glycerol, 15% (w/v) dimethyl sulfoxide, 15% (w/v) ethylene glycol이 첨가된 vitrification solution (PVS2) (Sakai et al. 1990)에 옮겨 60 rpm, 30분 진탕배양하였다. 진탕배양한 정아를 1.8 ml cryotube (Thermo Scientific, USA)에 넣어 -196°C 액체질소에 30분 동안 침지한 다음, 38°C 항온수조에서 2분간 해동 시켰다. 해동된 정아는 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> free MS medium에 1.2 M sucrose 가 첨가된 washing solution에 옮겨 60 rpm, 20분 진탕배양 후 RNA 추출에 사용하였다. AFPs (AF Protein Inc., Waltham, MA, USA)는 LS와 PVS2 단계에 각각 0 ng/ml, 500 ng/ml, 1,000 ng/ml, 1,500 ng/ml, 2,000 ng/ml 씩 첨가하였다.

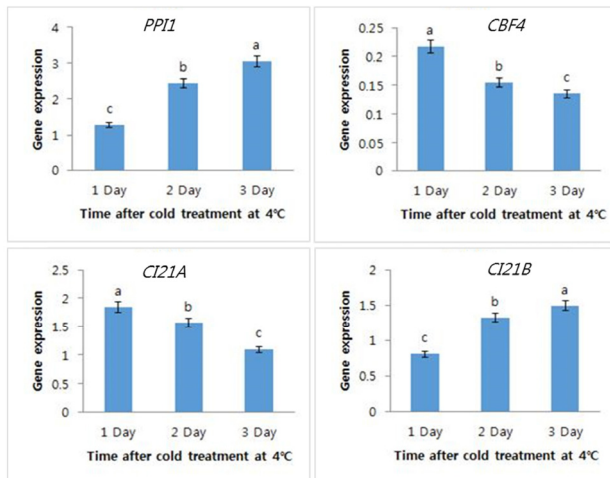
**Table 1** RT-PCR primer sequences and product sizes of low-temperature-related genes

Target gene	Primer	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Gene accession No. (NCBI)
<i>PPI1</i>	Foward	GTT GGC TTG GAT GTT CGT	130	GU808087
	Reverse	TCT CCA CAA CGC CCT TCA AT		
<i>CBF4</i>	Foward	GCG TGT GTT GAG TTT TGA TCA GTT AT	136	EU365379
	Reverse	TTG CGC CCC CTA CGT CTT TGA TTT		
<i>CI21A</i>	Foward	GAT CCA GAA CAT GCA CAC AAA CA	139	U76610
	Reverse	GAC CCC CCT CAG CTT TTT TT		
<i>CI21B</i>	Foward	AGA GGG TGG AVV AGT TGA TTA TG	108	U76611
	Reverse	TTA CGT ACC AAG GCG AAA GCA		
<i>efl a</i>	Foward	GTT CTG CTT TAG TTT GGT CTT TGA TTT	103	AB061263
	Reverse	CGC CAC CGC CTA TCA AGT		

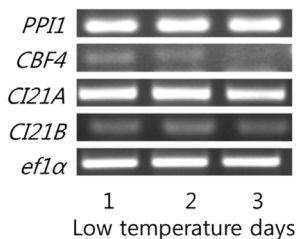
## 결과 및 고찰

### 저온 처리 시 저온 관련 유전자의 발현

감자 정아의 저온처리 시 저온관련 유전자의 발현양을 조사한 결과(Figs. 1, 2), 저온처리 기간이 길어질수록 저온관련 유전자 중 *PPI1*, *CI21B* 유전자의 발현양은 증가하였으나 *CBF4*, *CI21A* 유전자의 발현양은 감소하였다. *PPI1* 유전자는 플라즈마 막 양성자 펌프로 감자 정아와 화아에서 많이 발현되며, 저온 스트레스를 받으면 점차 늘어나며 48시간에 급속도로 늘어나는 것을 확인하였고, 토마토에서도 저온 스트레스를 받을수록 발현양이 증가하는 것으로 알려져 있다(García et al. 2011). *CBF4* 유전자는 저온으로 유전자의 발현이 유도되는데(Carvalho et al. 2011), 감자 뿐 아니라 포도의 잎과 꽃눈에 저온 처리를 하였을 때 24시간 내 급격히 발현하였다가 줄어드는 양상을 나타내고(Xiao et al. 2008), 애기장대와 일부 포도 품종에서는 건조 스트레스에서 발현양이 증가하는 것으로 알려져 있다(Haake et al. 2002; Karimi et al. 2015). *CI21A* 유전자는 토마토의 성숙과 수분 스트레스 관여하는 *ASRs* 유전자와 90% 비슷한 아미노산 sequence를 가지고,



**Fig. 1** Low-temperature-related gene expressions at the cold treatment days in the shoot tips of *Solanum tuberosum*



**Fig. 2** Analysis of the low-temperature-related gene expressions by RT-PCR. The explants exposed to cold condition at 4°C dark for 1 day, 2 days and 3 days. The housekeeping gene *efl1α* was used as reference

*CI21B* 유전자와는 60% 비슷한 아미노산 sequence를 가진다. 또한 24시간 암 상태로 저온 처리했을 때 *CI21A* 유전자는 거의 발현 되지 않았다(Schneider et al. 1997). 본 실험 결과에서는 *CI21A* 유전자의 발현양은 저온처리 기간이 길어질수록 줄어들었고, 그와 반대로 *CI21B* 유전자는 저온처리 기간이 길어질수록 발현양이 증가하였다. 이는 2개의 유전자가 33% 다른 아미노산 sequence 차이로 인해 같은 처리에서 다른 유전자 발현 양상을 보이는 것으로 판단된다.

### 잎, 줄기, 괴경에서의 저온 관련 유전자의 발현

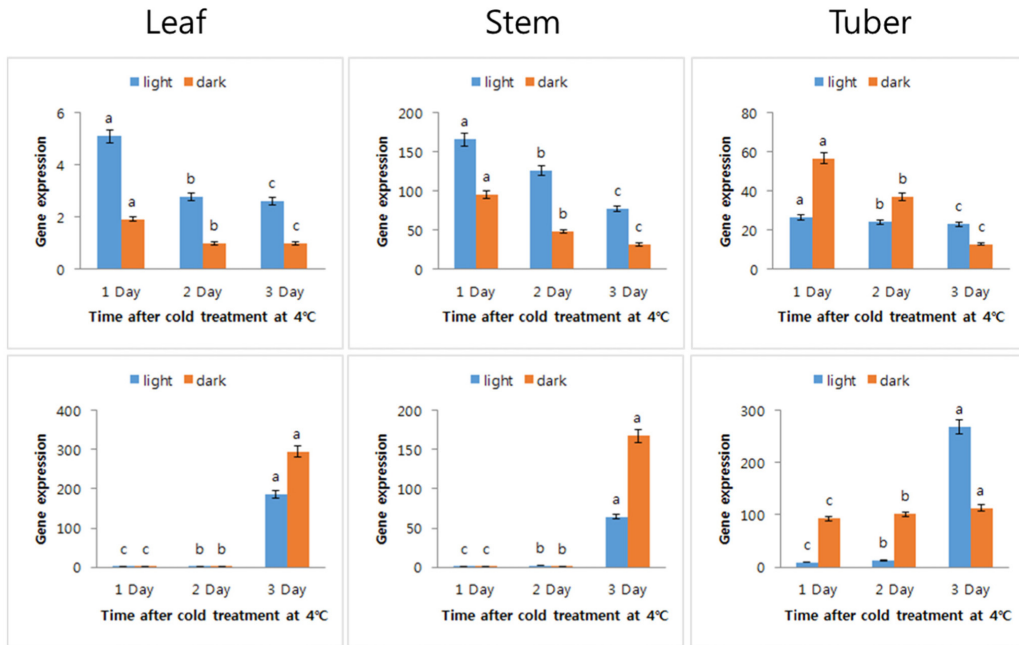
저온 관련 유전자 중 *CI21A*, *CI21B* 유전자의 잎, 줄기, 괴경에서 명 처리와 암 처리 기간별 유전자 발현 양상은 Figure 3과 같다. *CI21A* 유전자는 저온 처리 기간이 경과할수록 모든 조직에서 발현양이 감소하였으며 잎과 줄기에서는 명 처리 시 더 많이 발현되었고, 괴경에서는 암 처리 시 더 많은 양이 발현되었다. 괴경에서 유전자 발현양 감소율은 명 처리에 비해 암 처리가 더 컸으며 또한 잎과 괴경에 비하여 줄기에서 발현양이 현저히 많았다.

저온 저장시 감자의 괴경에서 *CI21A* 유전자는 발현양이 증가하는 것으로 알려져 있으나(Schneider et al. 1997), 본 연구에서는 발현양이 줄어든 것으로 나타나 연구결과가 상이하였는데 이는 사용된 괴경의 생육시기에 따른 생리적 특성 및 품종간 특성 등이 상이한 것에 기인한 것으로 판단된다(Mustafa et al. 2005). *CI21B* 유전자는 저온 처리 기간이 경과할수록 부위별 발현양이 늘었고 잎과 줄기에서는 저온 5일째 급격히 많이 발현되었다. 괴경에서는 저온 초기에는 암 처리가 더 많이 발현하지만, 저온 5일째 명 처리에서 급격히 발현양이 증가하였다.

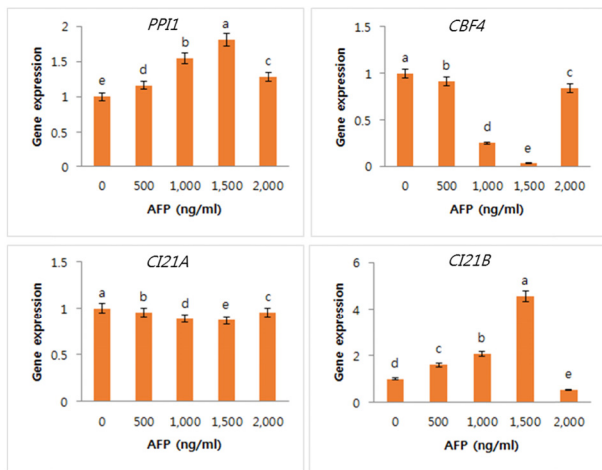
### LS와 PVS2에 AFP 농도별 처리 시 저온 관련 유전자의 발현

초저온동결보존에서는 액체질소에 침지하기 전에 동결보존액을 첨가하거나, 동결보존액을 처리하여 세포의 수분 함량을 줄이는 것이 중요하다. 그렇지 않을 경우, 수분이 동결되면서 식물 조직을 파괴하여 해를 입힌다. AFP는 결빙에 의한 기계적 스트레스로부터 식물 조직을 보호하는데 중요한 역할을 하는데(Atıcı and Nalbantoğlu 2003), 작은 얼음 결정에 결합하여 치명적인 얼음의 생성과 재결정을 억제한다(Pertaya et al. 2008). 동물세포 초저온 동결보존에서도 많이 사용되고 있으며, 식물세포의 국화와 버 등의 초저온동결보존에도 사용되고 있다(Wang et al. 2000; Jeon et al. 2015).

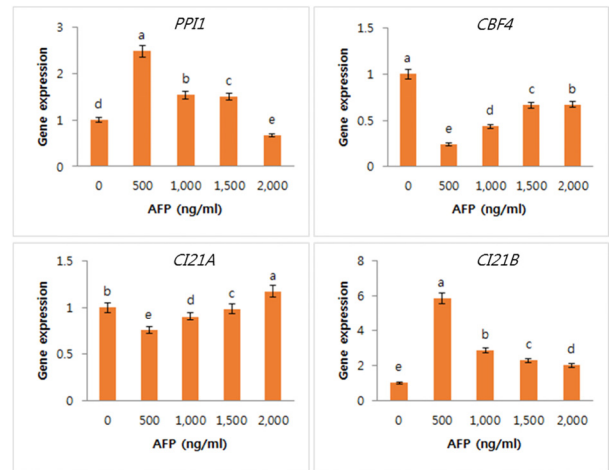
초저온동결보존 과정에서 LS와 PVS2 처리 단계에 AFP를 농도별로 처리하고 저온관련 유전자들의 발현 양상을 조사한 결과, 4°C 저온 처리한 정아의 유전자 발현 양상과 LS와 PVS2의 AFP 특정 농도에서의 저온 관련 유전자 발현 양상이 같은 것으로 나타났다. LS에서 AFP 1,500 ng/ml을 처리했을



**Fig. 3** Gene expressions of *CI21A* (top) and *CI21B* (bottom) in light (16 hr light, 8hr dark) and dark (24 hr dark) conditions during the cold treatment period in the leaf, the stem, and the tuber of *Solanum tuberosum*



**Fig. 4** Expressions of the low-temperature-related genes treated with different concentrations of AFP in LS using real-time PCR



**Fig. 5** Expressions of the low-temperature-related genes treated with AFP at different concentrations in PVS2 using real-time PCR

때, *PPI1*과 *CI21B* 유전자의 발현양은 크게 증가하였으나, *CBF4*, *CI21A* 유전자는 발현량이 다소 미미하였다(Fig. 4). PVS2에서는 AFP 500ng/ml을 처리했을 때, *PPI1*과 *CI21B* 유전자의 발현양은 증가하였으며, *CBF4*, *CI21A* 유전자는 발현양은 상대적으로 적었다(Fig. 5). 이는 LS 단계에서 물리적으로 침투된 AFP가 LS보다 고농도인 PVS2 단계에서 삼투압 현상으로 다시 용액 쪽으로 빠져 나오면서 나타난 현상으로 판단된다. AFP는 저온에 노출되었을 때 농도에 비례하여 동결점을 낮추지 않고(Fletcher et al. 2001), 벼의 배형성 현탁 세포에서는 고농도의 AFP 처리가 효과적이지 않다고(Wang et al. 2000) 하는 결과와 본 실험 결과와 일치하였다. 이상의 결

과를 종합해볼 때 감자 유전자원을 동결보존하기 위하여 동결보존 과정 중 LS 단계에서 AFP 1,500ng/ml 와 PVS2 단계에서 AFP 500ng/ml 처리하는 것이 저온관련 유전자 발현을 촉진시켜 초저온동결보존 후 식물체 재생에 보다 효과적일 것으로 판단된다.

**적 요**

기내배양한 감자에 1일, 2일, 3일간 저온처리 후 저온관련 유전자의 발현양상을 조사하였다. 저온 처리 기간이 늘어날수

록 *PP1I*, *CI21B* 유전자의 발현양은 증가하였고, *CBF4*, *CI21A* 유전자의 발현양은 감소하였다. 또한 *CI21A*와 *CI21B* 유전자의 잎, 줄기, 괴경에서 명 처리와 암 처리 기간별로 저온 처리 기간에 따른 유전자의 발현의 차이를 보았다. 이에 근거하여 감자 정아의 동결과정 중에서 LS단계와 PVS2 단계에서 AFP를 농도별로 처리하였다. 그 결과, 저온처리 기간이 늘었을 때의 유전자 발현양상과 AFP 특정 농도에서의 발현 양상이 동일하였다. LS단계에서는 1,500 ng/ml AFP 처리와, PVS2단계에서 500 ng/ml AFP 처리가 감자 정아의 초저온동결보존에 효과적이라는 것을 유전자의 발현 양상으로 확인하였다.

## 사 사

본 논문은 정부(환경부)의 재원으로 국립생물자원관의 지원을 받아 수행하였습니다(NIBR201713101).

## References

- Arav A, Rubinsky B, Fletcher G, Seren E (1993) Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Molecular reproduction and development* 36:488-493
- Atıcı Ö, Nalbantoğlu B (2003) Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry* 64:1187-1196
- Carvalho MA, Pino M-T, Jeknić Z, Zou C, Doherty CJ, Shiu S-H, Chen TH, Thomashow MF (2011) A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance: *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*, and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 62:3807-3819
- D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports* 7:385-389
- Davies PL, Baardsnes J, Kuiper MJ, Walker VK (2002) Structure and function of antifreeze proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 357:927-935
- Davies PL, Sykes BD (1997) Antifreeze proteins. *Current opinion in structural biology* 7:828-834
- Ekins S, Murray G, Hawksworth G (1996) ULTRASTRUCTURAL AND METABOLIC EFFECTS AFTER VITRIFICATION OF PRECISION-CUT LIVER SLICES WITH ANTIFREEZE PROTEINS. *Cryo-letters* 17:157-164
- Finkle B, Zavala M, Ulrich J (1985) Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. *AGRIS*
- Fletcher GL, Hew CL, Davies PL (2001) Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annual review of physiology* 63:359-390
- García MNM, País SM, Téllez-Iñón MT, Capiati DA (2011) Characterization of StPPI1, a proton pump interactor from *Solanum tuberosum* L. that is up-regulated during tuber development and by abiotic stress. *Planta* 233:661-674
- Haake V, Cook D, Riechmann J, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 130:639-648
- Jeon SM, Naing AH, Park KI, Kim CK (2015) The effect of antifreeze protein on the cryopreservation of chrysanthemums. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 123:665-671
- Jo JW, Jee BC, Suh CS, Kim SH (2012) The beneficial effects of antifreeze proteins in the vitrification of immature mouse oocytes. *PLoS One* 7:e37043
- Karimi M, Ebadi A, Mousavi SA, Salami SA, Zarei A (2015) Comparison of CBF1, CBF2, CBF3 and CBF4 expression in some grapevine cultivars and species under cold stress. *Scientia horticulturae* 197:521-526
- Lee Y-J, Jeong J-C, Yoon Y-H, Hong S-Y, Kim S-J, Jin Y-I, Nam J-H, Kwon O-K (2012) Evaluation of Quality Characteristics and Definition of Utilization Category in Korean Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars. *Korean Journal of Crop Science* 57:271-279
- Lizarraga R, Huaman Z, Dodds JH (1989) In vitro conservation of potato germplasm at the International Potato Center. *American Journal of Potato Research* 66:253-269
- Madura JD, Baran K, Wierzbicki A (2000) Molecular recognition and binding of thermal hysteresis proteins to ice. *Journal of Molecular Recognition* 13:101-113
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-49722
- Mustafa RM, Abeer MA, James G, Song JY, Benildo GR (2005) The OsLti6 genes encoding low-molecular-weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature. *Gene* 344:171-180
- Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany* 56:2907-2914
- Pertaya N, Marshall CB, Celik Y, Davies PL, Braslavsky I (2008) Direct visualization of spruce budworm antifreeze protein interacting with ice crystals: basal plane affinity confers hyperactivity. *Biophysical journal* 95:333-341
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9:30-33
- Schneider A, Salamini F, Gebhardt C (1997) Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene *ci21A* of potato. *Plant physiology* 113:335-345
- Seo H-W, Yi J-Y, Park Y-E, Cho J-H, Hahm Y-I, Cho H-M (2005) Cloning of coat protein gene from Korean isolate potato leafroll virus (PLRV) and introduction into potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of Plant Biotechnology* 32:243-250
- Steponkus PL (1985) Cryobiology of isolated protoplasts: applications to plant cell cryopreservation. *Cryopreservation of plant cells and organs* CRC Press, Boca Raton:49-60
- Stushnoff C (1985) The potential use of in vitro storage for

- temperate fruit germ-plasm: a status report. *In*, IBPGR
- Wang J, Bian H, Zhang Y, Cheng H (2000) The dual effect of antifreeze protein on cryopreservation of rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells. *Cryo letters* 22:175-182
- Withers LA (1985) Cryopreservation of cultured cells and meristems. *Cell culture and somatic cell genetics of plants* 2:253-316
- Xiao H, Tattersall EA, Siddiqua MK, Cramer GR, Nassuth A (2008) CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*. *Plant, cell & environment* 31:1-10
- Yeh Y, Feeney RE (1996) Antifreeze proteins: structures and mechanisms of function. *Chemical Reviews* 96:601-618