

엽록소형광 매개변수를 이용한 토마토 유전자원의 유묘 단계 염류 스트레스 수준 평가

신유경¹ · 조정수² · 조명철³ · 양은영⁴ · 안율균⁵ · 황인덕⁶ · 이준구^{7,8,9*}

¹전북대학교 농업생명과학대학 원예학과 대학원생, ²전북대학교 농업생명과학대학 원예학과 박사후 연구원,

³농촌진흥청 국립원예특작과학원 채소과 농업연구관, ⁴농촌진흥청 국립원예특작과학원 채소과 농업연구사,

⁵국립한국농수산대학 교수, ⁶㈜부농종묘 육종연구소 소장, ⁷전북대학교 농업생명과학대학 원예학과 교수,

⁸전북대학교 농업과학기술연구소 교수, ⁹전북대학교 부설 지능형로봇연구소 교수

Application of Chlorophyll Fluorescence Parameters to Diagnose Salinity Tolerance in the Seedling of Tomato Genetic Resources

Yu Kyeong Shin¹, Jung Su Jo², Myeong-Cheoul Cho³, Eun-Young Yang⁴, Yul Kyun Ahn⁵,
In deok Hwang⁶, and Jun Gu Lee^{7,8,9*}

¹Graduate Student, Department of Horticulture, College of Agriculture & Life Sciences, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

²Post-doctoral Researcher, Department of Horticulture, College of Agriculture & Life Sciences, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

³Research Officer, Vegetable Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Wanju 55365, Korea

⁴Researcher, Vegetable Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Wanju 55365, Korea

⁵Professor, Department of vegetable crops, Korea National College of Agriculture and Fisheries, Jeonju 54874, Korea

⁶R&D Director, R&D Center, Bunong seed Co., Ltd., Gimje 54324, Korea

⁷Professor, Department of Horticulture, College of Agriculture & Life Sciences, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

⁸Professor, Korea Institute of Agricultural Science & Technology, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

⁹Professor, Core Research Institute of Intelligent Robots, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

Abstract. To evaluate the possibility of a non-destructive diagnosis of salinity stress in the tomato genetic resources using chlorophyll fluorescence (CF) imaging technique, 49 tomato genetic resources at 3-leaf stages were used in this study. The seedlings were irrigated once a day with tap water and 400 mM NaCl for control and salinity stress treatment, respectively and the CF parameters were assessed during four days of the experimental period. The shoots were collected and used for the measurement of growth parameters, chlorophyll and proline contents at the end of the treatment. The chlorophyll content (a and b) and fresh weight showed differential changes (%) among the susceptible, moderately resistant, and resistant genetic resources, while changes in the proline content were similar in all the genetic resources. All the CF parameters showed a positive or negative response to the salinity stress in which the quantum yield of non-regulated energy dissipation in PSII [Y(NO)] continuously increased regardless of the treatment time in the resistant, moderately resistant and susceptible genetic resources. Y(NO) was used for the screening of the 49 genetic resources and the result showed that the clear differences in Y(NO) among the susceptible, moderately resistant, and resistant genetic resources. It is concluded that the Y(NO) can be used as a CF parameter index for the screening of salinity stress tolerance in tomato genetic resources.

Additional key words : chlorophyll content, proline, salinity stress, tomato genetic resource

서론

최근 파괴적인 식물체 분석 방법 이외에 비파괴적으로 식물의 생리 특성 및 스트레스 수준을 분석 및 평가할 수 있는 다양한 기법들이 개발되고 있으며, 이 중 엽록소형광(Chlorophyll Fluorescence; CF) 측정 기법을 이용해 광합성 과정 중 광에

*Corresponding author: jungu@jbnu.ac.kr

Received April 7, 2021; Revised April 28, 2021;

Accepted April 28, 2021

너지 효율, 열 및 형광을 측정할 수 있다(Cen 등, 2017). 엽록소형광 측정 기법은 일반적으로 광합성 과정이 비생물적 및 생물적 스트레스 영향에 의해 민감하게 반응하는 것에 기인하며, 식물의 광에너지 이용 효율을 다양한 엽록소형광 매개변수로 표현할 수 있다(Maxwell과 Johnson, 2000). 식물의 스트레스 요인에는 박테리아, 곰팡이 및 해충 등에 의한 생물적 요인과 염류, 온도, 건조 및 증기속 등에 의한 비생물적 요인으로 구분할 수 있다(Pérez-Bueno 등, 2019). 엽록소형광 기법을 이용한 생물적 스트레스의 평가에는 Fv/Fm(maximum quantum yield of PSII), Φ PSII(effective quantum yield of PSII), qP(photochemical quenching), NPQ(non-photochemical quenching)의 매개변수가 주로 이용되며, 비생물적 스트레스의 평가에는 Fo(minimum chlorophyll fluorescence), Fm(maximum chlorophyll fluorescence), Φ PSII(effective quantum yield of PSII)의 매개변수들이 주로 이용된다(Strauss 등, 2006; Baker, 2008; Streb 등, 2008).

비생물적 스트레스 요인의 하나인 염류 스트레스는 식물체의 삼투 기능 불균형을 일으키며 엽록소 함량을 감소시킨다고 알려져 있다(Ta'ibi 등, 2016). 이러한 염류 스트레스를 완화시키기 위해 식물은 세포 내에 프롤린을 축적하여 세포질 내 삼투 기능을 유지시켜 수분 흡수를 촉진한다(Heidari, 2010). 시설 및 토경 재배를 통해 생산되는 토마토는 장기재배의 특성상 근권부에 연속적인 양분 공급과 동일 토양 내 연작으로 인하여 지속적인 염류 스트레스를 받으며, 이는 안정적인 과실 생산과 정상적인 생육 발달에 영향을 미치기 때문에(Bacha 등, 2017), 토마토와 같은 장기재배 특성의 작물에서 염류 내성을 보유하고 있는 대목 계통의 선발과 육성이 필요하다(Colla 등, 2010). 또한 이러한 품종 육종 과정에서 다양한 유전자원의 염류 스트레스 내성 평가를 위한 객관적 평가 시스템의 개발이 지속적으로 요구되고 있으며 염류 스트레스를 포함한 다양한 환경 스트레스의 수준을 정량화할 수 있는 기법으로 엽록소형광의 원리가 다양하게 연구되고 있다.

토마토에 NaCl을 처리한 경우 일부 엽록소형광 매개변수가 생육단계에 따라 변화하는데, 생육 초기보다는 후기에 Y(PSII), qP 및 NPQ의 변화가 나타나며(Zribi 등, 2009). 시금치, 옥수수, 유채 및 밀에서도 염류 스트레스 처리 시, 광계II의 효율을 나타내는 Y(PSII), qP 및 NPQ의 감소가 확인된다(Mehta 등, 2010). 이와 같이, 작물의 광합성 효율을 간접적으로 판단할 수 있는 엽록소형광 매개변수를 활용하면 비파괴적으로 대량 유전자원 간의 염류 스트레스 내성의 차이를 구분할 수 있으며, 이를 염류 스트레스 저항성 유전자원에 대한 객관적 선발 평가 방법에 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 더불어 일부 염류 스트레스 내성 평가 연구에서는 다양한 농도별

염류 스트레스 처리 결과가 큰 차이를 보이지 않았기 때문에, 본 연구에서는 염류 스트레스에 강한 유전자원 선발을 위해 고농도의 염류 스트레스 처리가 필요하다(Stevens 등, 2006; Zribi 등, 2009; Shin 등, 2020b). 따라서 본 연구는 토마토 유전자원 49점을 대상으로 일정 범위의 염류 스트레스를 처리하고, 폐쇄형 식물공장 내 인공광 조건에서 염류 스트레스 수준 평가를 위한 엽록소형광 매개변수를 선발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 재배 환경조건

본 연구는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 채소과에서 분양받은 토마토 유전자원 49점을 이용하였다. 토마토의 육묘를 위해 50공 플러그 트레이에 원예용 상토 2호 초록이(Nongwoobio Co Ltd., Suwon, Korea)를 충전하고 0.5cm 깊이에 1립씩 파종하였으며 버미클라이트로 일정하게 복토하였다. 균일하게 파종한 유전자원은 토마토 전문 육묘업체 관리 하에 연동형 플라스틱 온실에서 재배되었다. 토마토 유전자원의 염류 스트레스 저항성 수준 평가를 위해 다른 비생물적 스트레스(온도, 광 및 건조 등) 요인의 노출을 최소화하기 위하여, 다단형 인공광이 설치되어 있는 폐쇄형 식물공장 내에서 처리 기간 동안 실험이 진행되었다. 염류 스트레스 처리 기간 내 폐쇄형 식물공장의 환경은 온도 24/18°C(주/야), 일장 14/10h(주/야), 습도 60 ± 3%로 유지하였다. 인공 광원은 식물 재배용 형광등(TLD 32W/865RS, Philips, Amsterdam, Netherlands)을 사용하였으며, 광도는 SpectraPen(LM500, PSI, Drasov, Czech)를 이용하여 성장점 기준 200 ± 10 μmol·m⁻²·s⁻¹로 유지하여 실험 종료 시점까지 재배하였다. 전문 육묘 관리 하에 재배된 18일차의 유묘를 운반하여 염류 스트레스 처리 기간 내 동일한 재배환경에서 3일 동안 적응시킨 후 균일한 생육 수준을 보이는 식물체를 선발하였다. 이후 선발된 식물체는 대조구(비염류 스트레스 처리)와 염류 스트레스 처리구(400mM)를 설정하고 처리구별로 각각 3반복하여 실험에 이용하였다.

2. 염류 스트레스 처리 방법

본 연구에 앞서 수행된 연구에서는 토마토 상용품종을 대상으로 일정 기간 동안 염류 스트레스 농도별 엽록소형광 매개변수의 변화를 모니터링하였다(Shin 등, 2020b). 본 연구는 앞서 수행된 연구를 바탕으로 보다 단기간 내 염류 저항성 및 감수성 유전자원 선발을 위하여 고농도의 염류 스트레스 NaCl 400mM 선정하고 이를 염류 스트레스 내성 평가를 위한 엽록소형광 매개변수를 선발하고자 하였다. 더불어 선행 연구에서 고농도 염류 스트레스의 경우 7일 이내에 외형적으

로 염류 스트레스 영향에 따른 변화를 확인할 수 있었으므로, 본 연구에서는 염류 스트레스 처리 기간을 5일 동안으로 한정하여 실험을 수행하였다. 이후 토마토 유전자원에 대하여 염류 스트레스를 처리하기 위해 NaCl(Sodium chloride, Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd, Korea) 400mM($EC\ 33dS \cdot m^{-1}$) 용액을 총 5일 동안 매일 오전 1회 20분간 저면관수의 형태로 공급하였다. 염류 스트레스 처리 시점을 기준으로, D0(염류 스트레스 처리 0일차, 0h), D1(염류 스트레스 처리 1일차, 24h), D2(염류 스트레스 처리 2일차, 48h), D3(염류 스트레스 처리 3일차, 72h), 및 D4(염류 스트레스 처리 4일차, 96h)의 5 단계로 염류 스트레스 처리 시점을 기준으로 구분하였다. 염류 스트레스 처리 후 날짜별 토마토 유전자원의 유묘를 식물 개체별로 3반복하여 선정하여 엽록소형광 측정에 이용하였다.

3. 엽록소형광 측정

엽록소형광의 측정에는 엽록소형광 이미지 장치(Chlorophyll fluorescence imaging; Closed Fluorcam FC 800-C, PSI, Drasov, Czech)를 이용하였다. 염류 스트레스에 민감하게 반응하는 엽록소형광 매개변수의 선발을 위해 Quenching act 2 프로토콜을 사용하여 103개의 엽록소형광 매개변수를 모니터링하였으며, 이들 획득된 다수의 매개변수 중 염류 스트레스 평가 연구(Tsai 등, 2019; Zhao 등, 2019; Shin 등, 2020a; Shin 등, 2020b)에 이용된 대표적이라고 판단되는 12개의 엽록소형광 매개변수를 선발하여 분석하였다(Table 1). 카메라와 식물체 생장점과의 거리는 18-20cm으로 유지하였으며, 식물체는 20분간 암적응시킨 후 전체적인 잎의 형광 발생 범위를 1200-1300 수준으로 균일하게 분포되도록 Act 2 light,

Super light, Sensitivity 및 Shutter를 설정하였다. 엽록소형광 측정 기준은 염류 스트레스 평가 기간 내 동일하게 유지되었으며, 유전자원별 초장을 고려하여 식물체와 카메라 간 거리를 일정하게 조정하여 측정하였다.

4. 지상부 생체중 조사

토마토 유전자원 49점의 비교를 위해 염류 스트레스 처리 4일차(D4)에 전자저울(UX420H, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)을 이용하여 유묘의 지상부 생체중을 측정하였다. 또한 염류 스트레스 영향을 정량적으로 판단하기 위해 엽록소 및 프롤린 함량 분석을 실시하였다. 각 유전자원 49점의 지상부를 동결 건조기(FD5508, IIShinBioBase Co., Ltd., Korea)를 이용하여 동결 건조하였으며, 막자사발로 균일하게 마쇄한 후 $-20^{\circ}C$ 에서 보관하여 분석에 이용하였다.

5. 엽록소 함량 분석

엽록소 a와 b는 Warren(2008)의 방법을 변형하여 분석하였다. 균일하게 마쇄한 지상부의 샘플시료 50mg과 100% methanol 10mL를 15mL tube에 넣고 실온에서 4시간동안 추출하였다. 이후 추출액은 $2400 \times g$ 에서 10분간 원심분리한 후 상층액만을 분리하여 분석에 이용하였다. 96플레이트에 $200 \mu L$ 씩 분주하고, 분광광도계(Multiskan Go; Thermo Fisher Scientific Oy., Vantaa., Finland)를 이용하여 흡광도 652와 665nm에서 측정하였다.

6. 프롤린 함량 분석

프롤린 함량은 Bates 등(1973)의 방법을 수정하여 분석

Table 1. Information of chlorophyll fluorescence parameters used in this study.

Classification	Description
Fo	Minimum fluorescence in dark-adapted state
Fm	Maximum fluorescence in dark-adapted state
Fv/Fm	Maximum quantum yield of PSII photochemistry measured in the dark-adapted state
Fv/Fm_Lss	Exciton transfer efficiency from antenna pigments to the reaction center of PSII in the light-adapted state
QY_Lss	Effective quantum yield of photochemical energy conversion in PSII
NPQ_Lss	Stern-Volmer non-photochemical quenching coefficient
qN_Lss	Coefficient of non-photochemical quenching of variable fluorescence
qP_Lss	Coefficient of photochemical quenching of variable fluorescence based on the puddle model of PSII
qL_Lss	Coefficient of photochemical quenching of variable fluorescence based on the lake model of PSII
Rfd_Lss	Chlorophyll fluorescence decrease ratio. In this case, F _s is obtained after illumination with continuous saturating irradiance. RFD is an indicator of the photosynthetic quantum conversion and is correlated with CO ₂ fixation rates
Y(NO)	Quantum yield of non-regulated energy dissipation in PSII
Y(NPQ)	Quantum yield of regulated energy dissipation in PSII

하였다. 균일하게 마쇄한 지상부의 샘플시료 50mg과 3% sulfosalicylic acid 3mL를 15mL tube에 넣고 균질화하여 실온에서 30분 동안 추출하였다. 추출액은 원심분리기(1736R; Labogene Co., Ltd., Korea)를 이용하여 3500rpm에서 10분 동안 원심분리하였으며, 이후 상층액을 0.45µm 실린지 필터로 여과하였다. 여과된 상층액 500µL, acetic acid 500µL 및 acid ninhydrin acid ninhydrin를 15mL tube에 넣고 혼합하여 95°C의 항온수조에서 1시간 동안 150rpm으로 유지한 뒤 얼음물을 이용하여 빠르게 냉각하였다. 충분히 냉각된 혼합액에 toluene 1mL을 혼합하고 균질화하였다. 이어서 분리된 상층 toluene을 200µL 씩 96 플레이트에 분주하고, 분광광도계를 이용하여 흡광도 520nm에서 측정하였다. 계산은 L-proline(Sigma-Aldrich Co., Inc., USA)을 이용하여 표준 곡선을 사용하여 정량화하였다.

7. 통계 분석

엽록소형광 매개변수, 엽록소 및 프롤린의 분석 결과는 3 반복의 평균 ± 표준오차(SE)로 산출하였다. 본 연구결과 그래프 작성에는 SigmaPlot(SigmaPlot 12.5, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)을 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 염류 스트레스에 따른 유전자원의 생체중, 엽록소 및 프롤린 분석

토마토 유전자원 49점에 염류 스트레스 400mM 수준으로 처리하고 최종적으로 지상부 생체중, 엽록소 및 프롤린 함량을 분석하여 스트레스 수준을 비교하였다. 염류 스트레스를 처리한 대부분의 유전자원은 대조구에 비해 지상부 생체중과 총 엽록소 함량이 감소하였으며, 프롤린 함량이 급격하게 증가하였다. 49점의 유전자원 중 염류 스트레스에 내성이 있다고 판단되는 염류 저항성 유전자원 19TRS13, 중도 저항성을 보인 19TRS04와 감수성 유전자원 19TRS07을 선발하고 비교하였다(Fig. 1). 염류 저항성 유전자원인 19TRS13과 중도 저항성으로 판단되는 19TRS04의 생체중 감소율은 각각 38.1%, 38.8%로 유사하였으나, 상대적으로 감수성 유전자원인 19TRS07은 감소율이 50.8%로 가장 큰 것으로 나타났다(Fig. 1A). 이때, 염류 스트레스에 중도 저항성으로 판단되는 유전자원 19TRS04의 프롤린 함량 편차가 가장 크게 확인되었다. 염류 저항성, 중도 저항성 및 감수성 유전자원에서 프롤린 함량이 대조구에 비해 98% 이상의 높은 증가율을 확인하였다(Fig. 1B). 각 유전자원의 프롤린함량 증가율은 유사하였

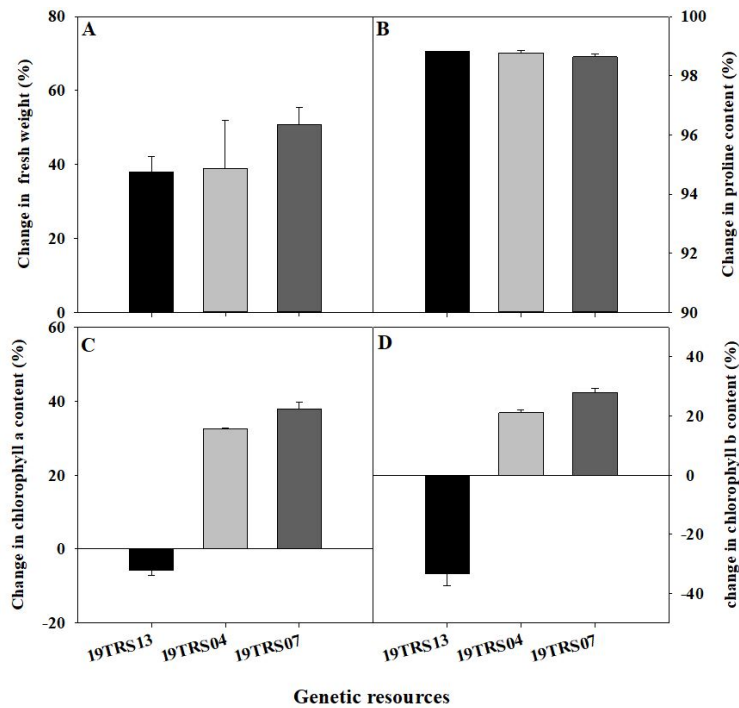


Fig. 1. Effect of salinity stress (400 mM NaCl) in shoot fresh weight (A), proline content (B), chlorophyll a content (C), and chlorophyll b content (D) in the seedlings of the susceptible (19TRS13), moderately resistant (19TRS04) and resistant (19TRS07) tomato genetic resources. Each value was calculated by using [(control-salinity stress)/control] × 100%. Each value represents the mean ± SE of three replications.

으며, 염류 스트레스 수준에 따라 염류 저항성, 중도 저항성 및 감수성 유전자원 순의 함량 차이를 보였다. 유전자원 내 프롤린 함량 간의 차이는 확인하였으나, 대조구에 비해 모든 유전자원에서 유사한 수준의 증가율로 나타났다. 중도 저항성 및 감수성 유전자원에서 엽록소 a와 b의 감소가 나타났다. 중도 저항성 유전자원 19TRS04와 감수성 유전자원 19TRS07의 엽록소 a의 감소율은 각각 32.4%, 37.8%로 나타났으며, 엽록소 b의 경우 각각 21%, 27.8%로 확인되었다(Fig. 1C와 D). 염류 저항성 유전자원인 19TRS13의 엽록소 a의 함량이 상대적으로 증가하였다. 본 연구에서 활용된 유전자원별 총 엽록소 및 프롤린 함량의 차이는 식물체 내 염류 스트레스에 따른 대응 기작 때문으로 판단된다. 유묘가 염류 스트레스에 노출되는 시간이 길어질수록 외형 변화가 심하게 나타났다. 염류 스트레스 처리 후 D2부터는 엽의 끝 부분이 안쪽으로 접착 말려 들어가 지상부가 위축되었으며, 엽색의 경우 대조구에 비해 염 스트레스 처리 후에는 엽색이 급격하게 황화되는 경향을 확인하였다. 토마토는 비교적 염류 스트레스에 강한 작물로 알려져 있으나, 지속적이며 강한 염류 스트레스에 노출되었을 경우 삼투압 현상으로 식물체내 수분 감소를 보이며 광합성 기능이 감소하게 된다(Bacha 등, 2017). 또한 극심한 염류 스트레스에 노출된 식물체는 체내 생리기작의 저하로 세포내 엽록소가 파괴된다(Al-Saadly 등, 2012). 따라서 식물은 이러한 삼투압 및 광합성 기능 정상화를 위하여 체내에서 스트레스 피해를 저감시키는 역할로 프롤린을 생성한다고 알려져 있다(Reddy 등, 2015). 지상부 위축과 엽색의 황화 증상은 염류 스트레스에 노출된 다른 작물에서의 반응과 동일하였으며, 이러한 프롤린 함량의 축적 및 엽록소 함량의 감소는 유전자원에 따라 다르다는 연구 결과와 유사하였다(Agami, 2013; Gharsallah 등, 2016).

2. 염류 스트레스에 따른 유전자원 별 엽록소형광 매개변수 변화

토마토 유전자원 49점의 염류 스트레스 수준을 평가하기 위해 Quenching Act 2 프로토콜을 이용하여 엽록소형광을 측정하였으며, 내염성 평가에 효과적인 엽록소형광 매개변수의 선별을 위하여 염류 저항성 자원인 19TRS13, 중도 저항성 자원인 19TRS04 및 감수성 자원 19TRS07을 각각 대표 자원으로 선정하였다(Fig. 2). 염류 스트레스를 처리한 49점의 유전자원에 대해서 12개 엽록소형광 매개변수의 수준 차이를 확인하였다. 염류 스트레스 조건에서 중도 저항성 및 감수성 유전자원의 Fo(암적응 시 최소 형광)는 증가하고, Fm(암적응 시 최대 형광)는 감소하였으며, 염류 저항성 유전자원은 변화가 없는 것으로 나타났다. Fv/Fm 및 Fv/Fm_Lss는 감수성인

19TRS04와 19TRS07 자원에서 염류 스트레스 처리된 D2부터 감소하는 경향을 보였으며, 19TRS04의 Fo는 D3부터 증가하였다. Fm은 암적응 시 광계II의 반응 중심의 폐쇄 상태에서 얻어지는 최대 형광 값으로 광계II의 전자 전달 수준을 반영하며, 비생물적 및 생물적 스트레스를 받을 경우 민감하게 반응하는 매개변수이다(Baker, 2008; Fujii 등, 2016). 염류 스트레스를 처리한 모든 유전자원에서 Fm의 감소를 확인하였으며, 이는 광계II의 전자 전달 수송 능력의 감소 때문으로 판단된다(Ranjbarfordoei 등, 2006). Fv/Fm은 가장 널리 사용하는 엽록소형광 매개변수로서 암적응을 거친 식물체의 1차 광화학 최대 양자 수율을 나타낸다(Baker, 2008). Shin 등(2020)에서는 NaCl 200mM 이하에서 Fv/Fm의 변화가 나타나지 않았으나, 고농도 염류 스트레스 연구에서는 Fv/Fm의 유의한 감소를 확인하였다(Qiu와 Lu, 2003).

식물은 광합성에 이용되는 빛에너지 외에 잔여 에너지는 형광과 열로 방출된다고 알려져 있다(Ruban, 2016). 특히 염류,

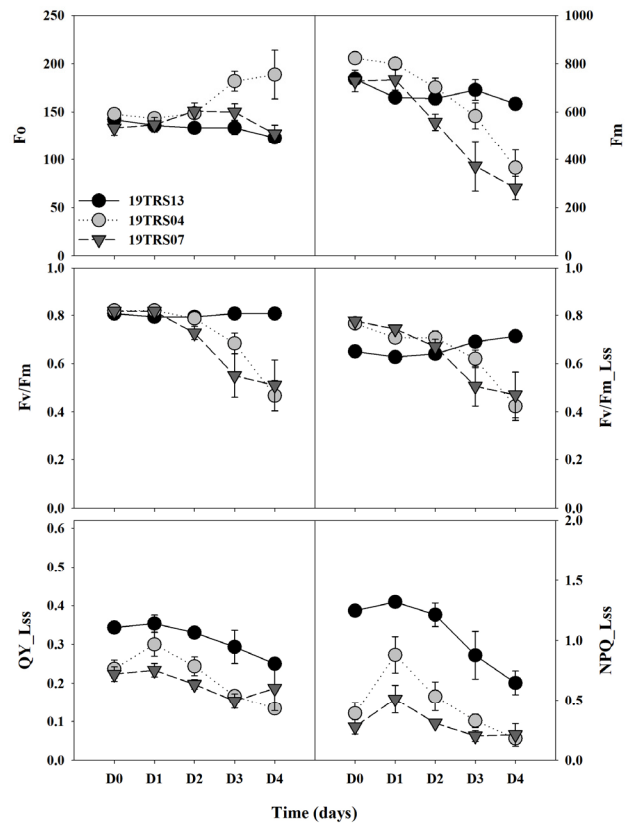


Fig. 2. Changes in the chlorophyll fluorescence (CF) parameters of tomato genetic resources during the different stress time. Description of each CF parameter is presented in table 1. D0, D1, D2, D3, and D4 represent the 0, 1, 2, 3, and 4 days after the salinity stress treatment, respectively. Each value represents the mean \pm SE of three biological replications.

건조 등 다양한 스트레스에 노출될 경우 광합성 기구의 보호 기능(비광화학적 형광소멸, NPQ)이 작동한다고 알려져 있다 (Murchie와 Lawson, 2013). 일반적으로 NPQ는 스트레스에 노출될 경우, 증가한다고 알려져 있으나 본 실험에서는 고농도의 염류 스트레스(NaCl 400mM)로 인해 NPQ가 지속적으로 감소됨을 확인하였다. NPQ의 감소는 상대적으로 단기간 동안 대량 유전자원의 염류 스트레스 수준을 평가하기 위해 고농도의 염류 스트레스 처리에 따른 영향으로 판단되며, 이는 오이, 토마토를 대상으로 염류 스트레스를 부여한 연구 결과, 고농도의 염류 스트레스는 광합성 기능에 피해를 주었기 때문으로 판단되며 본 연구 결과와도 유사한 것을 확인하였다 (Shin 등, 2020a; Shin 등, 2020b; Zhu 등, 2019).

염류 스트레스에 영향을 받은 유전자원의 qN_Lss , qP_Lss , qL_Lss 및 Rfd_Lss 를 통해 염류 저항성과 감수성 유전자원 간의 차이를 구분할 수 있었으나, 중도저항성 유전자원과 감수성 유전자원 간의 차이를 구분하기 어려운 것으로 나타났다 (Fig. 3). qP_Lss 는 광합성 시 광계II의 가변 형광의 광화학적 광수준을 나타내며, 일반적으로 광계II의 전자전달 수송 활성과 QA의 환원 상태를 반영한다(Backhausen 등, 2005). 즉, 빛에 노출된 식물체의 광계II 내 반응센터의 빛에너지 활용 수준을 나타내며, 실제 빛에너지 이용 효율을 나타낸다(Prinzenberg 등, 2018). 이러한 결과는 염류 스트레스에 의해 QA의 산화능력과 광계II의 전자전달 활성이 감소된 연구결과와 일치하였다(Nan 등, 2018).

Rfd_Lss (엽록소 형광 감소비율, the fluorescence decrease ratio)는 광합성 활성 상태를 확인할 수 있으며, 수분 스트레스 탐지, 광합성 수준에 관한 연구에 적용할 수 있다(Lichtenthaler 등, 2007). 염류 스트레스로 인해 각각의 유전자원의 qN_Lss , qP_Lss 및 Rfd_Lss 는 감소하는 경향을 보였으며, 이는 다른 작물 대상으로 염류 스트레스 평가한 연구결과와 유사하였다(Kalhor 등, 2018; Adhikari 등, 2019). 본 연구결과를 통해 염류 스트레스의 영향으로 일부 매개변수의 감소를 확인하였으나, 유전자원 간의 염류 스트레스 내성 차이의 명확한 평가에는 활용이 어려울 것으로 판단된다. 본 연구결과에서 해당 매개변수의 감소는 염류 스트레스 영향에 따른 광합성 기능 비활성화로 인한 것으로 선행 연구결과와 유사하였으며, 이러한 엽록소형광 매개변수의 차이는 각각의 엽록소형광 매개변수 반응, 작물 및 스트레스 유형에 따라 광계II의 최대 효율이 다르기 때문으로 판단된다(Lu와 Zhang, 2000; Prinzenberg 등, 2018; Nan 등, 2018; Najjar 등, 2019).

qL_Lss 는 lake 모델을 기반으로 광계II 반응 센터의 광화학적 효율을 나타내며, 개방 상태에서의 광계II의 비율을 반영하기 때문에 Y(PSII) 매개변수와 높은 상관 관계가 있는 대표적인

매개변수이며, 염류 스트레스 하에 감소한다고 알려져 있다 (Tsai 등, 2019). 연구결과를 통해 qL_Lss 와 Y(NO)는 반대되는 경향을 보였으며, 염류 감수성 유전자원은 Y(NO)와 동일하게 염류 스트레스 처리 D2에서 감소하였다. 이러한 결과는 광계II의 광에너지 효율을 나타내는 qL_Lss , Y(NO) 및 Y(PSII)와의 상관관계에 따른 연관성으로 판단된다. 본 연구결과를 통해 qL_Lss 와 Y(NO)를 토마토 유전자원의 염류 스트레스 수준을 평가할 수 있는 엽록소형광 매개변수로 판단되나, 이전 선행연구 결과를 바탕으로 연관성이 보다 높은 Y(NO)를 선발하였다.

일반적으로 Y(NO)는 광합성 반응 센터 내의 총 에너지 분포를 나타낸다(Tsai 등, 2019). 염류 스트레스 처리 기간 동안 내에 염류 스트레스의 저항성 유전자원으로 판단되는 19TRS13의 Y(NO)는 일정하게 유지되었으며, 상대적으로 염류 스트레스에 약하다고 판단되는 19TRS04와 19TRS07의 Y(NO)는 2일차부터 유의적으로 증가하였다. 또한 육안판단이 정확

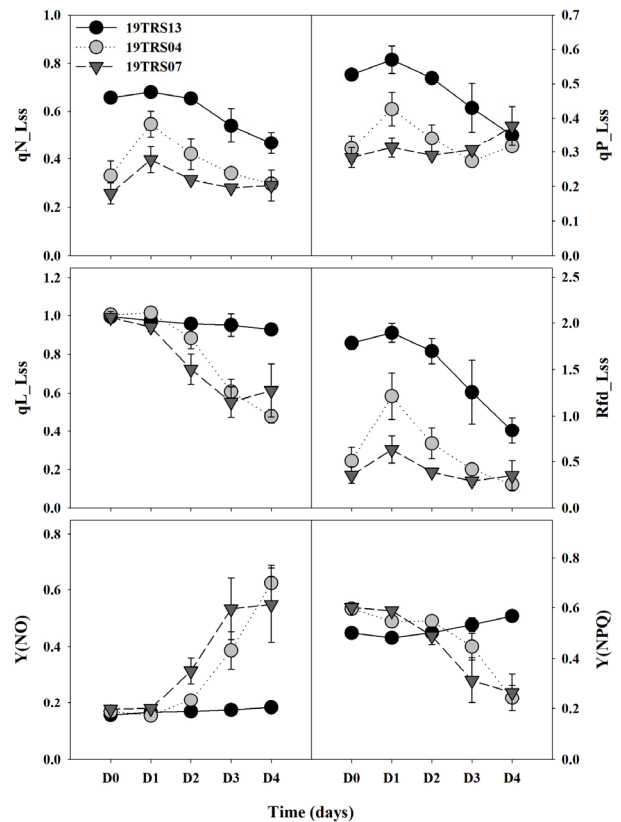


Fig. 3. Changes in the chlorophyll fluorescence (CF) parameters of tomato genetic resources during the different stress time. Description of each CF parameter is presented in table 1. D0, D1, D2, D3, and D4 represent the 0, 1, 2, 3, and 4 days after the salinity stress treatment, respectively. Each value represents the mean \pm SE of three biological replications.

하게 이루어지지 않은 D2 시점에 염류 스트레스에 감수성 19TRS07과 염류 저항성으로 판단되는 19TRS13이 Y(NO) 지수의 변화에 의해 유의적으로 구분됨을 확인하였다. 일반적으로 스트레스에 노출된 식물체의 Y(NO)는 증가하며, 이는 광계II의 광화학 효율 및 기능이 저하되고, 또한 염류 스트레스에 노출될 경우 증가한다는 기존의 연구결과와 일치하였다(Sánchez-Moreiras 등, 2020; Shin 등, 2020).

본 연구에서 집중적으로 평가한 12개의 엽록소형광 매개변수 중 토마토 유묘의 염류 스트레스 수준의 판별이 가능했던 광계II의 비조절 에너지 소산양자 수율[Y(NO)]에 대해서 49점 유전자원간 차이를 분석하였다(Fig. 4). 대부분의 유전자원은 염류 스트레스 처리 초기 단계인 D1 시점에 Y(NO) 매개변수의 변화가 없었으며, D2 시점에는 일부 염류스트레스에 민감한 유전자원에서 Y(NO)가 증가하였다. 염류 스트레스 처리 후 D2 시점부터 49점의 유전자원 중 염류 스트레스에 저항성이 있다고 판단되는 19TRS11, 19TRS19 및 19TRS20 등은 Y(NO)의 변화가 없었으며, 상대적으로 염류 스트레스에 감수성 유전자원인 19TRS07, 19TRS06 및 19TRS08은 증가하였다. 이러한 Y(NO)의 유전자원별 반응 차이는 기존 염류 스트레스에 따른 엽록소형광 매개변수 측정 연구결과와 유사하였다(Shin 등, 2020a; Shin 등, 2020b). 따라서 Y(NO)는 염류 스트레스 처리 후 D2 시점에 다른 엽록소형광 매개변수에 비해 명확하게 유전자원 간의 염류 스트레스 수준을 평가할 수 있는 매개변수로 판단되며, 향후 qL_{Lss} 매개변수에 대해서 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구결과로, 토마토 유전자원의 염류 단계에서의 염류 스트레스 수준을 보완적으로 평가할 수 있을 것으로 판단되는 매개변수로서 Y(NO)를 선발하였다. 광합성 반응 센터 내의 총에너지 분포를 나타내는 Y(NO)는 염류 스트레스 처리 후 초기 단계에서 염류 스트레스에 저항성을 지닌 유전자원과 저항성이 없는 감수성 유전자원 간의 차이를 객관적으로 확인할 수 있었다. 본 연구는 토마토 유전자원의 염류 단계에서의 염류 스트레스 수준 평가를 위한 엽록소형광 매개변수 선발의 선도적인 연구로 판단된다. 향후 다양한 비생물적 스트레스의 수준을 판별할 수 있는 엽록소형광 매개변수의 선발 관련 연구가 추가적으로 필요할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구에서는 토마토 유전자원 49점을 대상으로 엽록소형광 측정 프로토콜인 Quenching act 2를 이용하여 염류 스트레스 수준을 구분할 수 있는 엽록소형광 매개변수를 선발하기 위해 수행되었다. 염류 스트레스 평가는 3엽기 유묘 단계의 토마토 유전자원 49점을 대상으로, 1일 1회 NaCl 400mM로 저면관수를 처리하였다. 염류 스트레스 처리 4일차에 토마토 유묘의 지상부 생체중, 엽록소 및 프롤린 함량 분석을 실시하였다. 토마토 유전자원 49점의 지상부 생체중 및 엽록소 함량은 대부분 감소하였으며, 프롤린 함량 증가율은 유전자원 별로 유사하였다. 대표적인 12개의 엽록소형광 매개변수는 염류 스트레스에 노출되는 기간이 길어질수록 증감하는 경향을 보

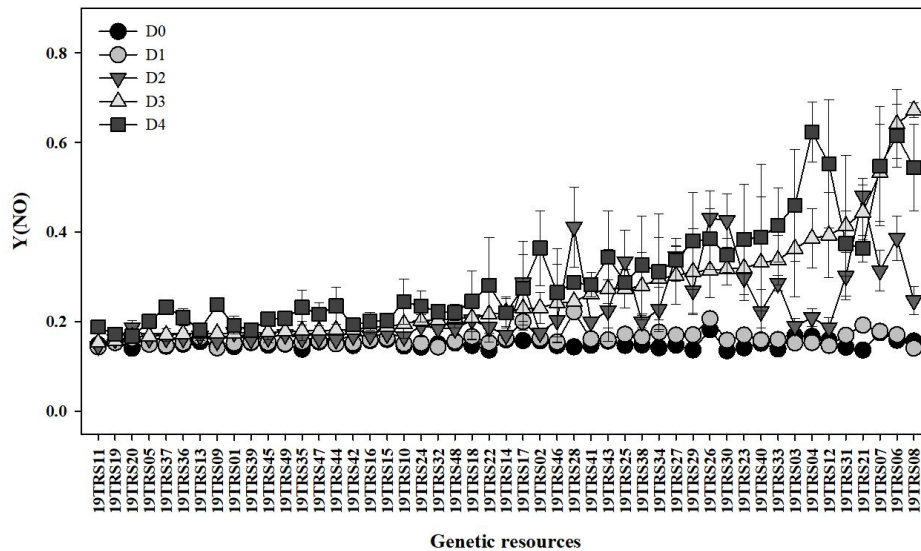


Fig. 4. Changes in the quantum yield of non-regulated energy dissipation in PSII [Y(NO)] of tomato genetic resources during the different stress time. D0, D1, D2, D3, and D4 represent the 0, 1, 2, 3, and 4 days after the salinity stress treatment, respectively. Each value represents the mean \pm SE of three biological replications.

였으며, 염류 스트레스에 노출될수록 Y(NO)는 증가하였다. 본 연구결과에서 유전자원 49점의 광계II의 비조절 에너지 소산의 양자 수율[Y(NO)]은 염류 스트레스 하에 차이를 보였으며, 염류 스트레스에 저항성을 지닌 염류 저항성 유전자원과 염류 스트레스에 감수성 유전자원 간의 차이를 확인할 수 있는 염록소형광 매개변수로 판단되며, 토마토 유전자원에 대해 염류 스트레스 수준을 평가할 수 있는 보완적인 도구로 활용 가능하다고 판단된다.

추가 주제어: 비파괴진단, 유전자원 평가, 염류 스트레스, 엽록소형광, 프롤린

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 공동연구사업 농축산물 수출 확대장애요인 채소기술개발(PJ0135612021) 과 이공분야 대학중점 연구소 지원사업/한국연구재단 (NRF-2019R1A6A1A09031717)에 의해 수행되었음.

Literature Cited

- Adhikari N.D., I. Simko, and B. Mou 2019, Phenomic and physiological analysis of salinity effects on lettuce. *Sensors (Basel)* 19:4814. doi:10.3390/s19214814
- Agami R.A. 2013, Alleviating the adverse effects of NaCl stress in maize seedlings by pretreating seeds with salicylic acid and 24-epibrassinolide. *South African J Bot* 88:171-177. doi:10.1016/j.sajb.2013.07.019
- Al-Saady N.A., A.J. Khan, L. Rajesh, and H.A. Esehie 2012, Effect of salt stress on germination, proline metabolism and chlorophyll content of Fenugreek (*Trigonella foenum-gracium* L.). *J Plant Sci* 7:176-185. doi:10.3923/jps.2012.176.185
- Bacha H., M. Tekaya, S. Drine, F. Guasmi, L. Touil, H. Enneb, T. Triki, F. Cheour, and A. Ferchichi 2017, Impact of salt stress on morpho-physiological and biochemical parameters of *Solanum lycopersicum* cv. *Microtom* leaves. *South African J Bot* 108:364-369. doi:10.1016/j.sajb.2016.08.018
- Backhausen J.E., M. Klein, M. Klocke, S. Jung, and R. Scheibe 2005, Salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L. var. *Desirée*) plants depends on light intensity and air humidity. *Plant Sci* 169:229-237. doi:10.1016/j.plantsci.2005.03.021
- Baker N.R. 2008, Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review Plant Bio* 59:89-113. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759
- Bates L.S., R.P. Waldren, and I.D. Teare 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39:205-207. doi:10.1007/BF00018060
- Cen H., H. Weng, J. Yao, M. He, J. Lv, S. Hua, H. Li, and Y. He 2017, Chlorophyll fluorescence imaging uncovers photosynthetic fingerprint of citrus huanglongbing. *Front. Plant Sci* 8:1509. doi:10.3389/fpls.2017.01509
- Colla G., Y. Rouphael, C. Leonardi, and Z. Bie 2010, Role of grafting in vegetable crops grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae* 127:147-155. doi:10.1016/j.scienta.2010.08.004
- Fujii R., N. Yamano, H. Hashimoto, N. Misawa, and K. Ifuku 2016, Photoprotection vs. photoinhibition of photosystem II in transplastomic lettuce (*Lactuca sativa*) dominantly accumulating astaxanthin. *Plant and Cell Physiology* 57:1518-1529. doi:10.1093/pcp/pcv187
- Gharsallah C., H. Fakhfakh, D. Grubb, and F. Gorsane 2016, Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars. *AoB Plants* 8:plw055. doi:10.1093/aobpla/plw055
- Heidari, M. 2010, Nucleic acid metabolism, proline concentration and antioxidants enzyme activity in canola (*Brassica napus* L.) under salinity stress. *Agric Sci China* 9:504-511. doi:10.1016/S1671-2927(09)60123-1
- Kalhor M.S., S. Aliniaiefard, M. Seif, E.J. Asayesh, F. Bernard, B. Hassani, and T. Li 2018, Enhanced salt tolerance and photosynthetic performance: Implication of γ -amino butyric acid application in salt-exposed lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. *Plant Physiol Biochem* 130:157-172. doi:10.1016/j.plaphy.2018.07.003
- Lichtenthaler H.K., F. Babani, and G. Langsdorf 2007, Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity in sun and shade leaves of trees. *Photosynth Res* 93:235-244. doi:10.1007/s11120-007-9174-0
- Lu C., and J. Zhang 2000, Role of light in the response of PSII photochemistry to salt stress in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J Exp Bot* 51:911-917. doi:10.1093/jxb/51.346.911
- Maxwell K., and G.N. Johnson 2000, Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J Exp Bot* 51:659-668. doi:10.1093/jexbot/51.345.659
- Mehta P., A. Jajoo, S. Mathur, and S. Bharti 2010, Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiol Biochem* 48:16-20. doi:10.1016/j.plaphy.2009.10.006
- Murchie E.H., and T. Lawson 2013, Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J Exp Bot* 64:3983-3998. doi:10.1093/jxb/ert208
- Najar R., S. Aydi, S. Sassi-Aydi, A. Zarai, and C. Abdelly 2019, Effect of salt stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Medicago truncatula*. *Plant Biosys* 153:88-97. doi:10.1080/11263504.2018.1461701
- Nan X., Z. Huihui, Z. Haixiu, W. Yining, L. Jinbo, X. Li, Y. Zepeng, Z. Wenxu, Q. Yi, and S. Guangyu 2018, The response of photosynthetic functions of F1 cutting seedlings

- from *Physocarpus amurensis* Maxim (♀) × *Physocarpus opulifolius* “Diabolo”(♂) and the parental seedlings to salt stress. *Front Plant Sci* 9:714. doi:10.3389/fpls.2018.00714
- Pérez-Bueno M.L., M. Pineda, and M. Barón 2019, Phenotyping plant responses to biotic stress by chlorophyll fluorescence imaging. *Front Plant Sci* 10:1135. doi:10.3389/fpls.2019.01135
- Prinzenberg A.E., M. Viquez-Zamora, J. Harbinson, P. Lindhout, and S.V. Heusden 2018, Chlorophyll fluorescence imaging reveals genetic variation and loci for a photosynthetic trait in diploid potato. *Physiologia Plantarum* 164:163-175. doi:10.1111/ppl.12689
- Qiu N., and C. Lu 2003, Enhanced tolerance of photosynthesis against high temperature damage in salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica* plants. *Plant, Cell & Environ* 26:1137-1145. doi:10.1046/j.1365-3040.2003.01038.x
- Ranjbarfordoei A., R. Samson, and P.V. Damme 2006, Chlorophyll fluorescence performance of sweet almond [*Prunus dulcis* (Miller)] D. Webb in response to salinity stress induced by NaCl. *Photosynthetica* 44:513-522. doi:10.1007/s11099-006-0064-z
- Reddy P.S., G. Jogeswar, G.K. Rasineni, M. Maheswari, A.R. Reddy, R.K. Varshney, and P.B.K. Kishor 2015, Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Physiol Biochem* 94:104-113. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.05.014
- Ruban A.V. 2016, Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiol* 170:1903-1916. doi:10.1104/pp.15.01935
- Sánchez-Moreiras A.M., E. Graña, M.J. Reigosa, and F. Araniti 2020, Imaging of chlorophyll a fluorescence in natural compound-induced stress detection. *Front Plant Sci* 11. doi:10.3389/fpls.2020.583590
- Shin Y.K., S.R. Bhandari, J.S. Jo, J.W. Song, M.C. Cho, E.Y. Yang, and J.G. Lee 2020a, Response to Salt Stress in Lettuce: Changes in Chlorophyll Fluorescence Parameters, Phytochemical Contents, and Antioxidant Activities. *Agronomy* 10:1627. doi:10.3390/agronomy10111627
- Shin Y.K., S.R. Bhandari, M.C. Cho, and J.G. Lee 2020b, Evaluation of chlorophyll fluorescence parameters and proline content in tomato seedlings grown under different salt stress conditions. *Hortic Environ Biotechnol* 61:433-443. doi:10.1007/s13580-020-00231-z
- Stevens J., T. Senaratna, and K. Sivasthamparam 2006, Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane Stabilisation. *Plant Growth Regul* 49:77-83. doi:10.1007/s10725-006-0019-1
- Strauss A.J., G.H.J. Krüger, R.J. Strasser, and P.D.R.V. Heerden 2006, Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient OJIP. *Environ Exp Bot* 56:147-157. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.01.011
- Streb P., S. Aubert, E. Gout, J. Feierabend, and R. Bligny 2008, Cross tolerance to heavy-metal and cold-induced photoinhibition in leaves of *Pisum sativum* acclimated to low temperature. *Physiol Mol Bio Plants* 14:185-193. doi:10.1007/s12298-008-0018-y
- Taïbi K., F. Taïbi, L.A. Abderrahim, A. Ennajah, M. Belkhodja, and J.M. Mulet 2016, Effect of salt stress in growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African J Bot* 105:306-312. doi:10.1016/j.sajb.2016.03.011
- Tsai Y.C., K.C. Chen, T.S. Cheng, C. Lee, S.H. Lin, and C.W. Tung 2019, Chlorophyll fluorescence analysis in diverse rice varieties reveals the positive correlation between the seedlings salt tolerance and photosynthetic efficiency. *BMC Plant Biology* 19:403. doi:10.1186/s12870-019-1983-8
- Warren C.R. 2008, Rapid measurement of chlorophylls with a microplate reader. *J Plant Nutrition* 31:1321-1332. doi:10.1080/01904160802135092
- Zhao C., O. Zayed, F. Zeng, C. Liu, L. Zhang, P. Zhu, C.C. Hsu, Y.E. Tuncil, W.A. Tao, N.C. Carpita, and J.K. Zhu 2019, Arabinose biosynthesis is critical for salt stress tolerance in Arabidopsis. *New Phytologist*, 224:274-290. doi:10.1111/nph.15867
- Zhu Y.F., Y.X. Wu, Y. Hu, X.M. Jia, T. Zhao, L. Cheng, and Y.X. Wang 2019, Tolerance of two apple rootstocks to short-term salt stress: focus on chlorophyll degradation, photosynthesis, hormone and leaf ultrastructures. *Acta Physiol Plant* 41:87. doi:10.1007/s11738-019-2877-y
- Zribi L., G. Fatma, R. Fatma, R. Salwa, N. Hassan, and R.M. Néjib 2009, Application of chlorophyll fluorescence for the diagnosis of salt stress in tomato “*Solanum lycopersicum* (variety Rio Grande)”. *Scientia Horticulturae* 120:367-372. doi:10.1016/j.scienta.2008.11.025