

Polyamine 함량이 증가된 형질전환 담배 식물체에서의 스트레스 저항성에 관한 연구

원수진, 박기영

순천대학교 자연과학대학 생물학과

전화 (061) 750-3617, FAX (061) 750-3608

초록

We have investigated the effects of abiotic and biotic stresses on leaf senescence using transgenic tobacco plants, in which cellular contents of polyamines were increased by introducing the genes of polyamine and ethylene biosynthesis in sense or antisense orientation. These transgenic plants showed accumulations of polyamines at higher levels than were found in wild-type. Stress-induced senescence was attenuated in transgenic plants compared with wild-type plants, in terms of total chlorophyll loss and phenotypic changes after oxidative stress of hydrogen peroxide(H_2O_2), high salinity, acid stress (pH3.0), ABA and fungal pathogen(*phytophthora parasitica* pv. *Nicotianae*). Transcripts for antioxidant enzyme, glutathione-S-transferase and catalase, were also more abundant in transgenic plants than wild-type plants. These result suggested that higher expression of those genes caused a broad-spectrum resistance to abiotic stress/biotic stress. These phenomena indicate that polyamines may play an important role in contributing to the antioxidant defense function in plants. Our findings suggest that facilitate the improvement of stress tolerance of crop plants.

서론

Polyamine은 모든 생물의 세포내에 존재하는 생장조절물질로서 무기염류의 농도가 높은 상태나 혹은 낮은 pH나 낮은 온도 등의 환경 스트레스에 의해 putrescine이 다량 축적되기도 한다(Galston, 1989). Ethylene 합성은 식물체의 정상적 발달과정 중에 생성될 뿐만 아니라 외부로부터의 다양한 스트레스에 의해서도 증가한다 (Yang and Hoffman, 1984; Theolosis, 1992). ACC synthase와 ACC oxidase는 ethylene 생합성의 key enzyme으로서 SAMDC와 함께 공통의 전구물질로 SAM을 이용하며 식물의 발달과정중 노화에 있어 polyamine과는 상반되는 효과를 보인다(Fuhrer *et al.*, 1982; Winer and Apelbaum, 1986). 농작물의 질과 생산력에 있어서 상당한 손해를 야기하는 환경 스트레스에 맞서기 위해 식물들은 중요한 기작 중 하나인 AOS(activated oxygen species)를 다량 생산하게 된다. AOS를 생성하는 식물체의 이러한 산화적 반응은 식물체가 환경적 스트레스에 대한

방어반응을 일으키는 역할을 하게 된다(Bolwell, 1996). 우리는 polyamine 함량이 증가된 형질전환 식물체에 H₂O₂를 이용하여 산화적 스트레스를 주었을 때 상당한 저항성을 갖고 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 이들 형질전환 식물체가 스트레스를 받는 동안 polyamine 함량 변화와 스트레스에 잘 견디는 그 능력을 알아보기 위해 다양한 스트레스를 처리하여 야생형 식물체와 비교 연구하였다. 또한 스트레스 신호전달 과정에 관여하는 유전자의 발현을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료와 생장조건

식물 배양실(16h-L/8h-D)에서 자란 형질전환 담배(*Nicotiana tabacum* L. cv WISCONSIN 38) 식물체의 T₁세대의 잎을 사용하였다.

2. RNA 분리 및 분석

Total RNA 분리는 guanidium이 첨가된 RNA extraction buffer에서 추출하였고 물-포화된 페놀을 첨가하여 원심분리한 후 0.1% DEPC 용액에 녹여 사용하였다.

3. SAMDC 활성 측정

수확한 조직을 SAMDC extraction buffer에 추출한 후 0.1 μ Ci[carboxy-¹⁴C] SAM (60mCi/mmol)을 기질로 사용하여 방사능을 측정하여 효소활성을 분석하였다.

4. Polyamine 정량

수확한 조직에 perchloric acid로 추출한 dansylation시켜 thin layer chromatography를 수행한 후 spectrofluorophotometer로 형광광도를 측정하였다.

5. 스트레스 조건

250 μ molem⁻²s⁻¹의 빛에 노출시키면서 산화적 스트레스로서 H₂O₂, 고염분 스트레스로서 NaCl, 산성용액 스트레스로서 potassium phosphate(pH3.0) 그리고 100 μ M ABA를 처리하였다.

6. Chlorophyll 함량 분석

수확한 잎조직을 80% 아세톤을 첨가하여 세 번 반복하여 추출한 후 A_{663.6}과 A_{646.6}의 값을 측정하여 총 엽록소의 함량을 구했다.

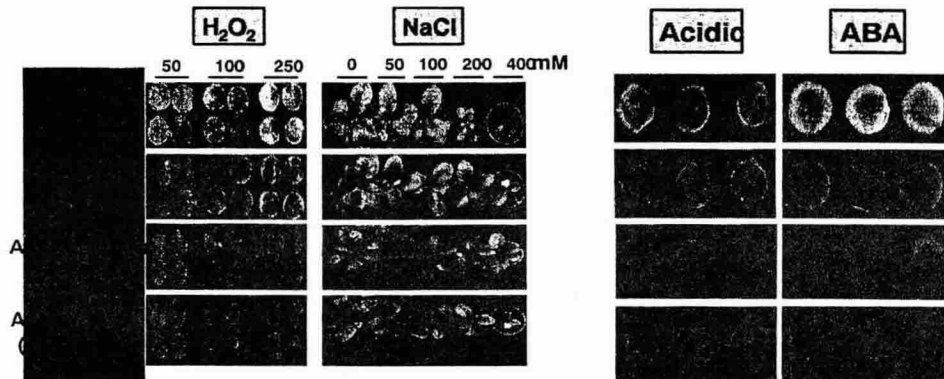
결과 및 고찰

1. SAMDC, CAS, CAO의 gene construct 구조 및 도입 유전자의 존재 확인

각 유전자들을 binary vector인 pBI121에 도입되어 35S CaMV promoter의 조절을 받게 재조합 construct를 제조한 후 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 이용하여 담배잎에 형질전환시켜 T₂세대까지 확보하였다. 형질전환 식물체에서의 재조합 DNA의 도입을 확인하기 위하여 형질전환 식물체에서 total RNA를 분리하여 northern blot을 수행하여 도입된 유전자의 발현을 확인함으로써 이들 식물체는 형질전환식물체임이 확인되었다. .

2. 스트레스 처리 후 잎의 손상 정도 비교

산화 스트레스는 빛($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$)을 가하면서 다양한 농도의 H_2O_2 를 처리한 결과 현저하게 잎절편 가장자리에서 백화현상이 유도되었는데 250mM H_2O_2 를 처리한 경우에 야생형 식물체는 잎의 상처나 백화현상이 더 심하게 나타나는 등 형질전환 식물체가 야생형 식물체보다 눈에 띄게 산화 스트레스에 대해 높게 나타났다. 염분 스트레스를 0, 50, 100, 200, 400mM NaCl로 처리한 결과 야생형 식물체의 처리구에서는 점차적인 황백화현상이 보였으며 전체적으로 NaCl의 농도가 증가할수록 생장이 억제되었고 잎크기도 심하게 감소하였다. 형질전환 식물체에서는 50mM에서 200mM NaCl 농도까지 염분 스트레스에 대해 크게 영향을 받지 않았으며 잎의 크기나 식물체의 발달정도가 염분 스트레스를 처리하지 않은 대조구와 거의 유사하였는데 이는 형질전환 식물체가 야생형 식물체보다 염분스트레스에 대한 내성이 훨씬 높았음을 의미한다. 산성 스트레스는 5mM potassium phosphate buffer(pH3.0)를 처리하였는데 처리 후 1일째 잎 가장자리에 괴사현상이 나타났는데 형질전환 식물체보다 야생형의 잎절편이 더욱 심하게 나타났다. 100 μM 의 ABA 스트레스는 처리 1일째 잎절편 가장자리에서 현저하게 황백화 현상이 일어났는데 형질전환 식물체보다 야생형 식물체에서 더욱 빠르게 엽록소 분해가 유도되었다.



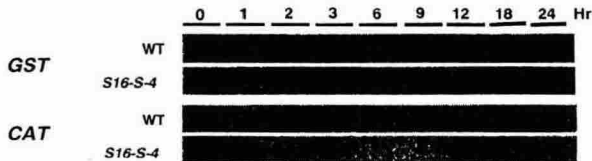
3. 곰팡이 감염 후 식물체의 손상 정도 비교

생물적 스트레스로서 fungal pathogen인 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* 감염시킨 결과 감염후 4일째부터 곰팡이가 급속도로 번져갔으며 야생형식물체는 감염후 7일째부터 서서히 죽어갔다. 반면에 형질전환 식물체는 감염시킨지 10일째에도 비교적 건강한 상태를 유지하였다.



4. 항산화효소의 발현분석

100mM H₂O₂를 처리한 후 산화적 스트레스에 대해 방어적인 역할을 하는 효소인 항산화효소의 발현을 분석한 결과 SAMDC 과다발현 식물체에서 GST(glutathionine S-transferase)의 유전자 발현이 야생형보다 더 많은 양이 유도되었으며 오랜 시간 지속되었다. 또한 catalase 유전자의 발현도 더 일찍 유도되었다.



요약

Polyamine 함량이 증가된 형질전환 식물체들은 H₂O₂ 처리에 의해서 야기된 산화적스트레스에 대해 야생형 식물체보다 조직 손상이 월등히 낮았으며 백화와 괴사되는 정도도 훨씬 낮았으며 chlorophyll 양의 손실도 비교적 적은 편이었다. 또한 고염분 스트레스를 처리하면서 T₁ progeny를 성장시켜 본 결과에 의하면 형질전환 식물체의 성장정도가 야생형보다 비교적 높게 유지되었으며 4달 정도까지 생장이 지속되었지만 야생형 식물체에서는 생장이 거의 정지되어 식물체가 고사하였다. 그 외에 ABA를 처리하여 노화를 유도한 경우 야생형에서 훨씬 빠르게 노화가 일어났으며 형질전환 식물체 앞에서는 노화가 크게 지연되었다. 또한 pH3.0의 potassium phosphate를 처리한 경우에도 야생형의 앞보다 형질전환 식물체 앞에서 갈변등의 세포 손상이 크게 지연되었다. 곰팡이 감염에서도 높은 저항성을 보였으며 항산화효소인 GST와 CAT 유전자 발현이 증가하였다. Ethylene 발현 저해 식물체에서도 스트레스를 처리한 후 ethylene 생합성 효소의 발현이 억제되면서 스트레스 저항성을 나타내었다. 따라서 이러한 스트레스에 의하여 유도되는 노화의 지연현상이 야생형 식물체보다 형질전환 식물체 앞에서 두드러지게 나타나는데 그 기작은 polyamine이 이러한 스트레스를 완화시키는데 작용하였기 때문이라고 생각된다.

참고문헌

- Galston,A.W.(1989)
- Lee,S.H. and Park,K.Y.(1991)
- Sambrook,J., Fritsch,E.F.and Maniatis,T.(1989)
- Tabor,C.W. and Tabor,H.(1984) Polyamines.
- Weaver,L.M., Gan,S., Quirino,B. and Amasino,R.M.(1998)