

## Superoxide Dismutase와 Ascorbate Peroxidase를 엽록체에 과발현하는 형질전환 담배의 수분스트레스에 대한 반응

최 선 미·권 석 윤·곽 상 수·박 용 목  
청주대학교 생물학과, \*생명공학연구소 식물세포공학연구실  
(2000년 8월 31일 접수)

### Responses of Transgenic Tobacco Plants Overexpressing Superoxide Dismutase and Ascorbate Peroxidase in Chloroplasts to Water Stress

Sun-Mee Choi, Suk-Yoon Kwon\*, Sang-Soo Kwak\* and Yong-Mok Park  
Department of Biology, Chongju University, \*Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of  
Bioresource and Biotechnology  
Naedok-Dong 36, Chongju 360-764, Oun-Dong 52, Yusong, Taejeon 305-333  
(Manuscript received 31 August, 2000)

To assess resistance of transgenic tobacco plants which overexpress superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) in chloroplasts to water stress, changes in leaf water potential, turgor potential, stomatal conductance and transpiration rate were measured. Leaf water potential in all plants remained high up to day 4 after withholding water but thereafter decreased markedly. In spite of a remarkable decrease in leaf water potential, some of transgenic plants maintained higher turgor potential compared with control plant on day 12. In particular, the transgenic plant expressing MnSOD showed an outstanding maintenance in turgor pressure by osmotic adjustment throughout the experiment, resulting in high stomatal conductance and transpiration rate. However, among transgenic plants, osmotic potential was reduced more effectively in multiple transformants such as the double transformant expressing both MnSOD and APX, and the triple transformant expressing CuznSOD, MnSOD and APX than single transformants. Consequently, further research is needed to get general agreement on the tolerance of transgenic plants to water stress at different growth stages for each transgenic plant.

Key words : antioxidants, environmental stress, osmotic adjustment, tolerance, transgenic plant, turgor pressure, water potential, water stress

#### 1. 서 론

산업혁명 이후 화석연료를 이용하는 공업기술의 발달은 인간생활을 편리하고 윤택하게 한 반면, 대기오염, 토양오염과 같은 국지적 환경오염과 산성비, 오존층 파괴 등과 같은 지구적 규모의 환경문제를 야기 시켰다<sup>1)</sup>.오염에 의한 국지적인 환경의 변화는 식물에 강한 스트레스로 작용하며, 그 결과 변화한 환경에 잘 적응한 종은 분포구역을 확대해 가는 반면, 스트레스에 적응하지 못한 종은 때때로 절멸되기도 하여 오염된 지역을 중심으로 새로운 2차 대상식생이 형성되기도 한다.<sup>2~3)</sup>

식물체가 대기오염물질이나 건조, 저온 등과 같은 환경스트레스에 노출되면 강한 산화력을 가진, 반응성이 높은 superoxide radical ( $O_2^{\cdot -}$ ), hydrogen peroxide

( $H_2O_2$ ), hydroxy radical ( $\cdot OH$ )과 같은 활성산소를 생산하며, 이들 활성산소는 DNA 합성을 억제하고 세포막을 파괴하며 광합성을 저해하는 등, 식물에 치명적인 상해를 입힌다.<sup>4~6)</sup> 식물은 이러한 활성산소로부터 조직을 보호하기 위하여 체내에 항산화시스템을 발전시키고 있으며, 대표적인 것이 APX, SOD, peroxidase, catalase 등과 같은 항산화효소 시스템이다. 그러므로 이들 항산화효소는 환경스트레스에 대한 방어체계의 지표가 될과 동시에 환경스트레스에 대한 식물체의 내성을 나타내는 지표로 이용될 수 있다.

따라서 오염지역에서의 생태계유지와 높은 농업생산력을 유지하기 위하여 항산화효소를 이용한 환경스트레스 저항성품종을 개발하는 것이 절실히 요구되고 있

며, 실제로 선진국을 중심으로 식물바이오테크놀로지를 이용한 환경스트레스 내성식물체 개발에 노력을 경주하고 있다. 그 결과 항산화효소 유전자를 도입한 많은 형질전환 식물체가 만들어져, 저온, 아황산가스, 건조, 오피온 등의 환경스트레스 하에서의 유전자의 발현, 조직의 손상 등을 시험하고 있는 중이지만,<sup>7-12)</sup> 환경스트레스 내성식물체 개발의 실용화를 위해서는 보다 많은 연구결과와 축적이 요구되고 있다.

본 실험에서는 SOD와 APX 유전자를 염색체에 도입한 다양한 형질전환식물체와 대조식물의 수분스트레스에 대한 반응을 비교하고, 또한 형질전환 식물체간의 삼투조절 능력을 비교함으로써 형질전환 식물체에 의한 환경스트레스 내성식물체 개발의 유용성을 고찰하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 식물재료

생명공학연구소 식물세포공학연구실(대전)에서 비형질전환 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) (대조식물)와 이 품종에 항산화 유전자를 도입한 형질전환 담배 7종을 재료로 이용하였다. 실험에 사용한 SOD와 APX 유전자는 완두콩(*Pisum sativum*)에서 분리한 것이다.<sup>11,13-14)</sup> 유전자와 형질전환 담배 품종의 종류는 한 종류의 유전자를 도입한 단일형질전환체로는, CuZnSOD가 염색체에 도입된 식물체 (이하 CuZnSOD 식물체로 약함), MnSOD식물체, APX식물체, 이중형질전환체로는, CuZnSOD 식물체에 APX 유전자를 도입한 CA식물체, APX 식물체에 MnSOD 유전자를 도입한 AM식물체, 삼중형질전환체로는 CA식물체를 모본으로 하여 AM식물체와 교잡하여 얻은 C/A식물체와 AM식물체를 모본으로 하여 CA식물체와 교잡하여 얻은 A/C식물체의 7종류를 이용하였다.<sup>15)</sup>

2.2. 식물의 재배 및 수분스트레스 처리

사래에 한천배지를 만든 후 이들 종자를 파종하고 25℃, 40 μmole m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>의 광조건의 생장상에서 발아시켰다. 일반식물과 형질전환 식물체의 비교를 위해서 발아 후 식물체의 자엽이 두장 나왔을 때 시판의 부농상토 5호와 모래(<2mm)를 반반 채운 직경 4.5cm, 높이 10.0cm의 플라스틱 화분에 이식하고, 이것을 기온 25.0±3℃의 온실로 옮겨 5주간 키운 후, 잎이 6-7장이 되었을 때 재료로 이용하였다. 토양함수량 저하에 따른 형질전환 식물간의 삼투조절 능력 비교를 위해서는 직경 3.0cm, 높이 8.0cm의 화분을 이용하였으며, 식물체도 약 3주간 생육하여 잎이 4-5장인 식물을 재료로 이용하였다. 건조처리 시작 전까지는 매일 충분한 물을 주었다. 수분스트레스는 식물체에 수분 공급을 중단함으로써 유도하였다.

2.3. 수분포텐셜, 삼투포텐셜 및 기공전도도의 측정

식물의 기공전도도는 Steady-State Porometer(LI-1600, Licor, USA)를 이용하였으며, 식물의 수분포텐셜은 Microvoltmeter (C 52, Wescor, USA)를 이용하여 측정

하였다. 식물의 삼투포텐셜은 액체질소를 이용하여 잎의 세포를 파괴한 후 수분포텐셜과 같은 방법으로 측정하였으며, 팽압은 이들 값으로부터 얻었다.

3. 결과 및 고찰

식물은 기공을 통하여 이산화탄소를 고정시키는 동안 많은 수분을 증산에 의해 대기 중으로 방출하며, 그 결과 잎의 함수량이 감소하고 수분포텐셜이 저하한다<sup>16)</sup>. 건조과정에서의 잎의 수분포텐셜의 변화를 보면, 건조처리 후 4일 동안은 모든 식물체에서 높은 수분포텐셜을 나타내어 약 -5.0bars 전후를 기록하였으나, 시간이 경과하면서 잎의 수분포텐셜은 현저히 저하하였다 (Fig. 1).

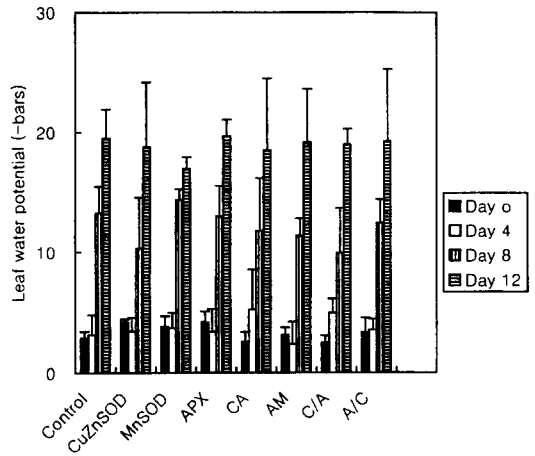


Fig. 1. Changes of leaf water potential after withholding water in different lines of transgenic tobacco plants. Bars indicate standard deviation (n = 3 to 5).

건조처리 후 12일이 경과하였을 때 대조식물과 형질전환식물은 모두 -17.0bars 이하의 낮은 수분포텐셜을 나타내었다. 잎의 수분포텐셜 저하는 생장의 정지, 기공폐쇄, 광합성 저하를 가져오고, 지속적인 수분포텐셜의 저하는 잎의 위조와 고사를 초래하는 등, 식물의 생리작용에 여러 가지 영향을 미친다.<sup>17-19)</sup> 식물체에서의 팽압의 유지는 생장을 지지해 줄 뿐만 아니라 초본성 식물의 형태를 유지시켜 주는 중요한 작용을 한다.<sup>20-21)</sup> 그러므로 수분포텐셜이 저하할 때 팽압을 유지할 수 있는 능력은 식물의 적응의 한 형태로 여겨지고 있다.<sup>18)</sup> 실제로 건조지역에 사는 많은 식물들과 수분스트레스에 적응한 식물들이 능동적으로 세포 내에 용질을 축적하여 삼투포텐셜을 낮춤으로서 수분포텐셜의 저하에도 불구하고 팽압을 유지하는 것이 알려지고 있다.<sup>22)</sup> 건조과정에서 식물의 팽압변화를 비교해 보면, 처리시작 4일까지는 종류간 팽압의 현저한 차이는 보이지 않았으며 그 값도 약 10bars 정도로 높게 유지되었다 (Fig. 2).

Superoxide Dismutase와 Ascorbate Peroxidase를 업록체에  
과발현하는 형질전환 담배의 수분스트레스에 대한 반응

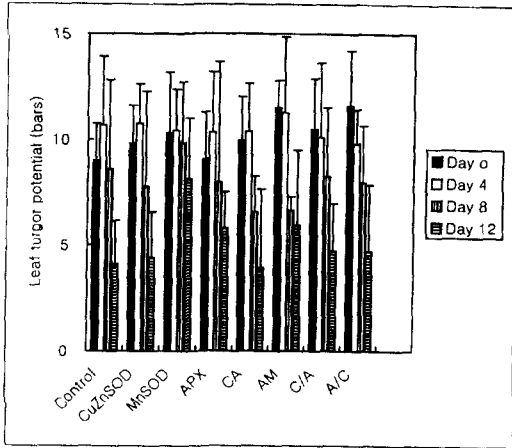


Fig. 2. Changes of leaf turgor potential after withholding water in different lines of tobacco plants. Bars indicate standard deviation (n = 3 to 5)

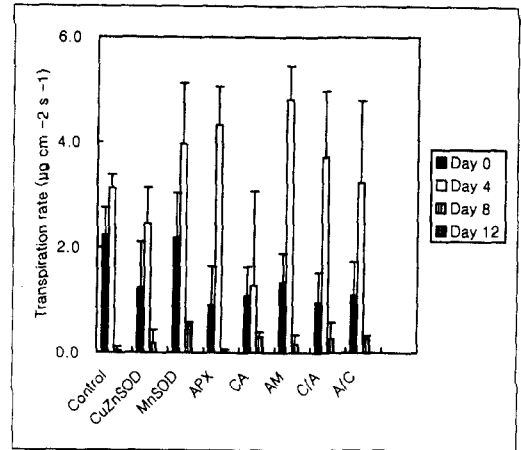
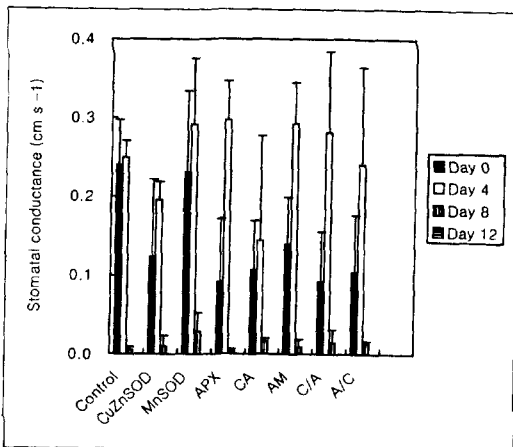


Fig. 3. Changes of stomatal conductance (upper) and transpiration rate (lower) after withholding water in different lines of tobacco plants. Bars indicate standard deviation (n = 3 to 5).

그러나 건조처리 8일 때에는 처리간의 차가 나타나기 시작하여, 12일 때에는 MnSOD 식물체와 APX 식물체 그리고 AM 식물체에서 5bars 이상의 팽압을 유지한 반면, 대조식물과 CuZnSOD 식물체, CA 식물체에서 상대적으로 낮은 팽압을 나타내었다. MnSOD 식물체는 초기 값의 78.8%에 해당하는 8.13bars를 나타내어 가장 높은 팽압을 유지하였다. 이와 같은 식물의 삼투조절은 여러 종의 식물에서 알려지고 있으며, 식물체 내의 잎, 줄기, 자엽, 뿌리, 등의 여러 기관에서 일어나고 있다.<sup>23)</sup>

수분스트레스 하에서 팽압의 유지는 세포의 신장속도를 유지시키고, 기공개도를 높게 유지시켜 광합성을 유지하게 하며, 건조 조건하에서의 생존을 연장시킨다.<sup>23)</sup> 건조과정에서의 잎의 기공전도도와 증산속도를 보면, 건조 8일째부터 모든 식물에서 기공전도도와 증산속도가 현저하게 감소하였다 (Fig. 3).



이러한 결과는 Fig. 2의 팽압 변화와 모순되는 결과이다 (Figs. 2, 3). 기공개폐의 조절에는 여러 가지 인자가 관여하고 있는 것이 알려지고 있으며, 기공은 수분이용효율을 최대화시키는 방향으로 조절되며,<sup>21)</sup> 특히 상대습도, 토양수분 등에 의해 조절되고 있는 것이 알려지고 있다.<sup>25-28)</sup> 일반적으로는 수분스트레스하에서 잎의 팽압의 소실이 기공폐쇄의 원인으로 인식되어져 왔다.<sup>21)</sup> 그러나 최근에는 수분스트레스하에서 기공을 조절하는 우선적인 인자는 식물호르몬인 abscisic acid (ABA)이며 이 ABA는 뿌리에서 만들어져 증산류에 의해 수송된 것이라는 학설이 보편적으로 인정되고 있다. 따라서 기공은 잎의 수분상태보다는 토양의 수분상태에 더욱 민감하게 반응하여 폐쇄한다는 것이다.<sup>29-30)</sup> 따라서 본 연구에서 보여진 건조처리 후 8일에서의 팽압과 기공전도도 및 증산속도의 불일치는 이러한 원인에 의한 것으로 사료된다. 그러나 전체적으로는 건조처리 후 8일째에 모든 식물체의 기공전도도와 증산속도가 현저히 감소하였지만 그 감소의 정도는 다르게 나타났다. 즉, APX 식물체를 제외한 모든 형질전환체 식물이 대조식물에 비해 높은 값을 나타내었으며, 특히 MnSOD 식물체가 가장 높은 기공전도도와 증산속도를 나타내었다 (Figs. 2, 3). 이것으로 볼 때, 비록 우선적인 기공의 조절은 토양의 건조상태에 민감하게 반응한다 하더라도 삼투조절에 의한 팽압의 유지는 기공전도도와 증산을 유지하는데 기여하고 있는 것으로 보여진다. 또한 비록 측정하지는 않았지만 기공전도도와 증산속도로 미루어 볼 때 MnSOD 식물체의 광합성 속도도 타 식물에 비해 높았음이 틀림없다. 이것은 수분스트레스하에서 대조식물에 비해 높은 광합성효율과 성장을 보였던 MnSOD 형질전환 알팔파에서의 연구와 일치하는 것으로,<sup>8)</sup> 잎의 수분포텐셜이 저하할 때 삼투포텐셜을 낮추는 삼투조절을 통하여 기공전도도와 증

산의 유지에 기여함을 시사하고 있다. 그러나 삼투조절의 범위나 지속기간은 수분스트레스의 발생속도, 스트레스의 정도, 식물의 종 그리고 건조의 방법 등에 따라 서로 달라질 수 있다.<sup>23)</sup> 따라서 보다 효율적인 건조저항성 품종을 선발하기 위해서는 형질전환 식물체간의 삼투조절능력을 비교하는 것이 필요하다.

능력이 뛰어남을 알 수 있다 (Figs. 4, 5). 이 결과는 위의 첫 번째 실험 결과와 상치되는 결과로서 항산화효소 유전자가 복합적으로 도입된 식물이 강한 삼투조절 능력을 가지고 있을 가능성을 시사하는 것이다.

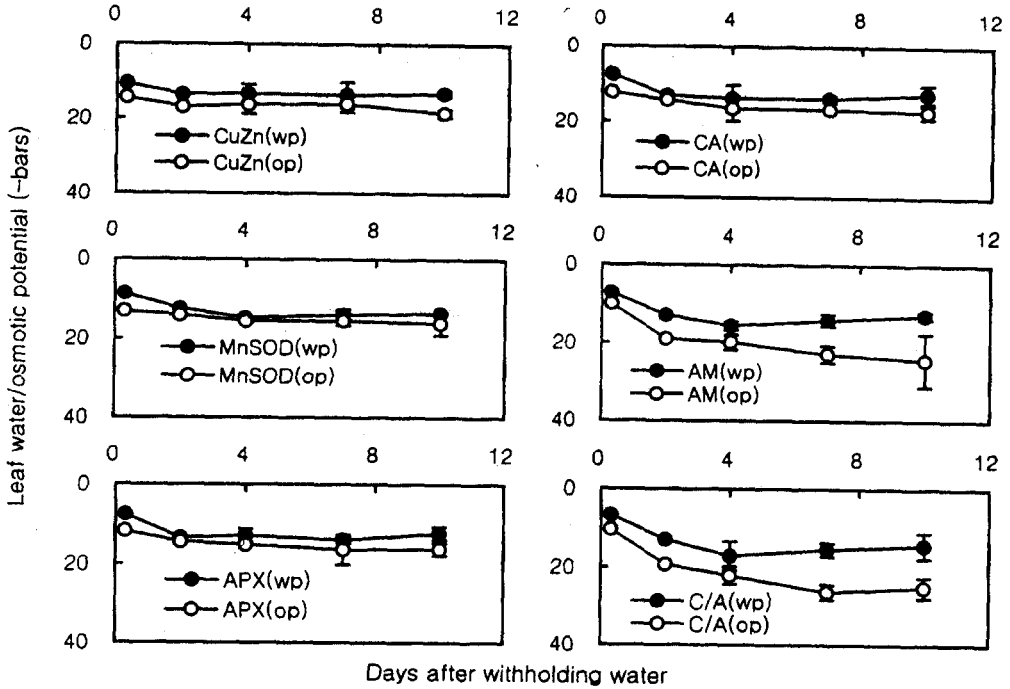


Fig. 4. Changes of leaf water potential(wp) and osmotic potential(op) after withholding water in different lines of transgenic tobacco plants. Bars indicate standard deviation (n = 3).

Fig. 4는 건조과정에 있어서 잎의 수분포텐셜이 저하할 때 삼투포텐셜의 변화를 2-3일 간격으로 나타낸 것이다. 여기에서는 Fig. 2에서 보였던 변화 패턴과는 약간 다른 양상을 나타내었다.

첫 번째 실험보다 엽면적이 작았던 두 번째 실험에서는 전체적으로 높은 수분포텐셜을 나타내었다 (그림 1, 4). 뿐만 아니라 건조과정에서 가장 높은 팽압을 유지 하였던 MnSOD식물체는 팽압을 약 2-4bars 정도로 유지한 반면, AM식물체, C/A식물체는 팽압이 약 3-10까지로 MnSOD식물체 보다 높게 유지되었다. 이러한 삼투조절에 의한 팽압의 유지는 수분포텐셜이 감소할 때 삼투포텐셜을 더욱 낮게 유지함으로써 가능하다. 따라서 건조의 정도를 나타내는 토양함수량의 변화에 대한 잎의 삼투포텐셜의 변화를 보면 그 차가 더욱 확실해 진다 (Fig. 5). 토양함수량의 변화에 따른 잎의 삼투포텐셜의 변화는 크게 두 개의 그룹으로 나뉘어 졌다. 즉, CA식물체를 제외하면 하나의 유전자를 도입한 식물에 비해 두 개 이상의 항산화효소 유전자를 도입한 식물이 토양의 함수량 감소에 따른 수분스트레스에 대해 잎의 삼투포텐셜 조절

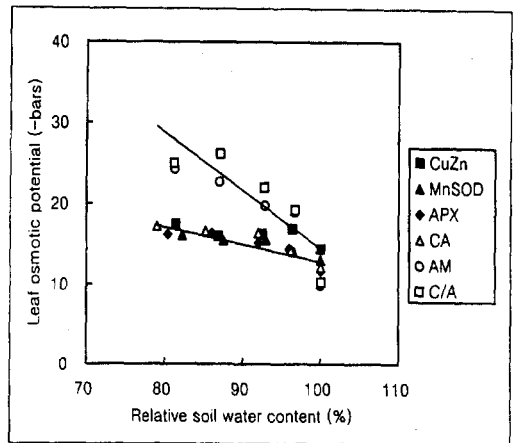


Fig. 5. Relationship between relative soil water content and leaf osmotic potential in different lines of transgenic tobacco plants. Each point indicate the mean of triplicate measurements.

Superoxide Dismutase와 Ascorbate Peroxidase를 염록체에  
과발현하는 형질전환 담배의 수분스트레스에 대한 반응

4. 결 론

환경스트레스 내성식물 개발의 일환으로 항산화효소 superoxide dismutase와 ascorbate peroxidase 유전자를 염록체에 도입한 형질전환 담배의 수분스트레스에 대한 반응을 조사하였을 때, 이들의 건조전항성은 실험조건에 따라 부분적으로 달라졌다. 따라서 환경스트레스 내성식물을 개발하고 이것을 실용화하기 위해서는 각각의 형질전환 식물체의 생육 단계에 따른 수분스트레스에 대한 반응에 대한 검정이 필요하며, 이러한 데이터가 축적되었을 때 환경스트레스 내성식물체의 실용화가 가능할 것이다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 생명공학실용화사업단 과제(NB1170)로 수행되었다. 수분포텐셜 측정기를 빌려 준 권덕기 교수님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1) Freedman, B., 1992, Environmental ecology. Delhousie University Press, Halifax. 424pp.  
 2) 김종갑, 1992, 온산공단 주변 해송림의 초본식생에 관한 조사, 한국생태학회지, 15, 247-255.  
 3) 박용목, 최창렬, 1998, 칩(*Pueraria thunbergiana*) 조직수분관계의 일변화 특성 한국생태학회지, 21, 89-96.  
 4) Fadzillah, N. M., V. Gill, R. P., Finch and R. H. Burdon, 1996, Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot culture of rice. *Planta*, 199, 552-556.  
 5) Sakaki, T., N. Kondo and K. Sugahara, 1983, Break down of photosynthetic pigments and lipids in spinach leaves with ozone fumigation: role of active oxigens. *Physiol. Plant*, 59, 28-34.  
 6) Sminoff, N., 1993, The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.*, 125, 27-58.  
 7) Aono, M. H., Saji, A. Sakamoto, K. Tanaka, N. Kondo and K. Tanaka, 1995 Paraquat tolerance of Transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. *Plant Cell Physiol.*, 36, 1687-1691.  
 8) McKesie, B. D., S. R. Bowley, E. Harjanto and O. Leprince, 1996, Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.*, 111, 1177-1181.  
 9) McKesie, B. D., S. R. Bowley and K. S. Jones, 1999, Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.*, 119, 839-847.  
 10) Roxas, V. R. K., Smith, E. R. Allen and R. D. Allen, 1993, Overexpression of glutathione

S-transferase /glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedling during stress. *Nature Biotech* 15:988-991.  
 11) Sen Gupta, A., R. P. Webb, A. S. Holaday and R. Allen, 1993, Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.*, 103, 1067-1073.  
 12) Tepperman J. M. and P. Dusmuir, 1990, Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol. Biol.*, 14, 501-511.  
 13) Allen, R. D., Webb, R. P. and S.A. Schake, 1997, Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Rad. Biol. Med.* 23, 473-479.  
 14) Schake, S. A., 1995, Analysis of pea chloroplastic MnSOD overexpressing in tobacco. MS Thesis, Texas Tech University, Lubbock TX, USA.  
 15) Kwon, S. Y., H. S. Lee and S. S. Kwak, 1999, Manipulation of antioxidative mechanism in chloroplasts. *The Symposium on Plant Biotechnology*, 13, 79-84.  
 16) Teare, I. D., E. T., Kanemasu, W.L. Power and H.S. Jacobs, 1973, Water-use efficiency and its relation to crop canopy area, stomatal regulation, and root distribution. *Agro. J.*, 65, 207-210.  
 17) Boyer, J. S., 1970, Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean and sunflower at various leaf water potentials. *Pl. Physiol.*, 46, 233-235.  
 18) Hsiao, T. C., 1973 Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24, 519-570.  
 19) Kriedemann, P., 1986, Stomatal and photosynthetic limitations to leaf growth. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13, 15-31.  
 20) Frensch Jürgen and T.C. Hsiao, 1994, Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential, *Plant Physiol.*, 104, 247-254.  
 21) Kramer, P. J., 1983 Water relations of plants. Academic Press, New York. 489pp.  
 22) Turner, N. C. and J. E. Begg, 1981, Plant water relations and adaptation to stress. *Plant Soil*, 58, 97-131.  
 23) Turner, N. C. and M. M. Jones, 1980, Turgor maintenance by osmotic adjustment. *In* Turner, N. C. and P. J. Kramer (eds.), *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. Wiley, New York, pp. 87-103.  
 24) Farquhar, G. D. E. D. Schulze and M. Kupper, 1980, Responses to humidity by stomata of *Nicotiana glauca* L. and *Corylus avellana* L. are consistent with the optimization of carbon dioxide uptake with respect to water loss. *Aust. J. Plant*

- Physiol., 7, 315-327.
- 25) Gollan T., N.C., Turner, E.D. Schulze, 1985, The responses of stomata and leaf gas exchange to vapor pressure deficits and soil water content. III. In the sclerophyllous woody species *Nerium oleander*. *Oecologia*, 65, 356-362.
- 26) Meinzer F.C., T.M. Hinckley and R. Ceulemans, 1997, Apparent responses of stomata to transpiration and humidity in a hybrid poplar canopy. *Plant Cell and Environment*, 20, 1301-1308.
- 27) Schuze, E.D. and A.E. Hall., 1982, Stomatal responses, water loss and CO<sub>2</sub> assimilation rates of plants in contrasting environments. *In* Lange, O.L., P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler (eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 181-230.
- 28) Turner N.C., E.D. Schulze and T. Gollan, 1984, The responses of stomata and leaf gas exchange to vapor pressure deficits and soil water content. I. Species comparisons at high soil water contents. *Oecologia*, 63, 338-342.
- 29) Loewenstein N.J. and S.G. Pallady, 1998 Drought tolerance, xylem sap abscisic acid and stomatal conductance during soil drying: a comparison of canopy trees of three temperate deciduous angiosperms. *Tree Physiology*, 18, 431-439.
- 30) Zhang J. and W.J. Davies, 1990, Changes in the concentration of ABA in the xylem sap as function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant Cell and Environment*, 13, 277-285.