

형질전환된 토마토 캘러스의 Superoxide Dismutase와 Peroxidase 활성

유정민 · 정형진* · 김경민¹ · 곽상수²

안동대학교 자연과학대학, ¹경북대학교 농과대학, ²생명공학연구소 식물생화학연구소

Superoxide Dismutase and Peroxidase Activity of Transformed Callus in Tomato

YOO, Jung Min · JEONG, Hyung Jin* · KIM, Kyung Min¹ · KWAK, Sang Soo²

College of Natural Science, Andong National University, Andong, 760-380, Korea: ¹College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea: and ²Plant Biochemistry Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon, 305-606, Korea. *Corresponding author.

This study was carried out to investigate activity difference in the superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) of tomato callus transformed with *Agrobacterium* containing the GUS gene. Than those of other two tomato cultivars, the hypocotyl explant of JA101 was shown to have higher POD and SOD specific activity of 23 unit/mg protein and 2,156 unit/mg protein, respectively. Relatively high frequency of callus formation was obtained from the hypocotyl explant on MS medium containing 1 mg/L 2,4-D for 30 days and its POD(47 unit/mg protein) and SOD (95,786 unit/mg protein) specific activities were higher than other 2,4-D concentration. The hypocotyl explant and callus cocultivated with *Agrobacterium* for 72 hours were transferred to MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D, 30 mg/L kanamycin, 30 g/L sucrose and 4 g/L Gelrite. The hypocotyl explants transferred to the medium formed callus with 45.5% efficiency after 8 weeks. The transformation efficiency confirmed by GUS assay was 21.6%. POD specific activity of the transformed callus (54 unit/mg protein) were somewhat lower than the non-transformed callus (64 unit/mg protein) and SOD specific activity of the transformed callus (30,300 unit/mg protein) were also lower than the non-transformed callus (37,077 unit/mg protein). However there was no significant difference in POD and SOD isozyme patterns between the transformed and the non-transformed calluses. From these results, it revealed that there was no difference of antioxidant enzyme activities between the transformed callus and the non-transformed callus in tomato

Key words: transformed callus, *Agrobacterium*, superoxide dismutase, peroxidase

토마토는 당, 산도, 비타민 A, C, B₁ thiamin, B₂ riboflavin, B₃ niacin, 칼슘, 미네랄 등의 함량이 높은 채소로서, 온도, 일조량과 같은 환경요인에 의해서 생육의 영향을 받는다. 환경스트레스는 식물내에 존재하는 산소를 활성산소종(O₂⁻, OH[·], H₂O₂)으로 전환시켜 생체내 대사과정에 장애를 유발함으로써 생산성에 감소를 초래한다(Allen, 1995; Runeckless and Krupa, 1994). 이때 식물은 활성산소종으로부터 자신을 보호하기 위하여 superoxide dismutases (SOD), peroxidase (POD) 등의 역할이 필요한 것으로 알려져 있다(Alscher and Hess, 1993). Rao et al.,(1996)은 ultraviolet-B (UV-B)와 ozone (O₃)등에 노출된 식물에서 SOD 활성이 증가하는 것으로 보고하였다. 또한 최근에 발

달되고 있는 형질전환기법은 경제적으로 중요한 식물체에 유용한 유전자를 도입시킴으로써 스트레스에 대한 식물체의 방어기작을 생리학적, 분자생물학적 측면에서 구명하는데 이용되고 있다 (Tepperman and Dunsmuir, 1990; Bowler et al., 1991). 우리나라에서는 You 등(1997)이 토마토의 현탁배양세포에서의 SOD 활성연구를 수행하고 있으나 형질전환된 세포의 항산화효소 활성과 관련된 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 토마토의 줄기조직을 이용하여 *Agrobacterium*과 공동배양하여 형질전환된 캘러스와 형질전환이 되지 않은 캘러스와의 SOD, POD 활성을 비교하여 형질전환된 식물체의 환경안전성 평가의 기초자료로 제시하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 이용된 토마토 품종은 중앙종묘(부산육종연구소)에서 분양받은 방울토마토형의 JA101과 강육토마토(Kangyuktomato), 광수토마토(Kwangsutomato)를 사용하였다.

캘러스유도 및 형질전환

종자를 2% NaOCl에 30분간 소독후 멸균수로 3회 수세한 후 0.2% Gelrite가 함유된 MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지에 과중하여 26±1°C, 명소에서 2 주간 무균발아하였고 이때 얻은 hypocotyl을 재료로 하여 품종간 POD, SOD 활성을 조사하였다. 캘러스의 형질전환 실험에서는 공시재료의 hypocotyl을 5 mm 길이로 잘라 1~5 mg/L 2,4-D가 함유된 MS고체배지에 치상하여 26±1°C, 암소에서 배양하여 캘러스를 유도한 후, 25 mg/L kanamycin이 함유된 LB(1% Trypton, 0.5% Yeast-extract, 0.8% NaCl, 1.5% Agar, pH 7.0) 액체배지에 26±1°C, 암소에서 3일간 진탕배양한 *Agrobacterium* strain(LBA 4404/pBII21, Figure 1)과 공동배양 하였다.

무균발아 후 10일 동안 자란 방울토마토의 hypocotyl을 5 mm 크기로 절취하여 *Agrobacterium* suspension에 수 초간 침적한 후 kanamycin이 들어 있지 않은 MS 고체배지에 72 시간 공동배양한 후, 1 mg/L 2,4-D와 30 mg/L kanamycin이 함유된 MS 고체배지에 26±1°C 암소에서 배양하였다. 형질전환된 캘러스를 확인하기 위하여 5-bromo-4-chloro-3-ido-glucuronidase (X-gluce) 용액에 37°C에서 24시간 반응시킨 후 GUS 양성반응(청색)을 나타내는 캘러스의 수를 조사하였다(Jefferson, 1987). 대조구는 *Agrobacterium*으로 형질전환시키지 않은 캘러스를 사용하였다.

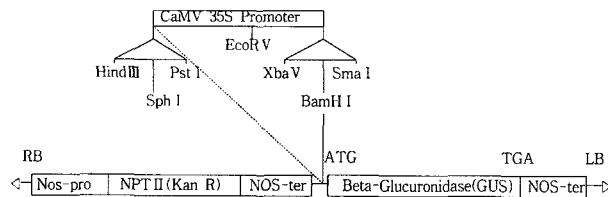


Figure 1. Structure and gene map of the binary vector pBI 121.

POD, SOD 활성측정

Hypocotyl 절편체와 캘러스의 생체중을 각각 0.2 g 씩 0.5 mL 0.05 M 인산 완충액(pH 7.8)과 함께 마쇄한 후, 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액을

조효소액으로 사용하였다. POD 활성은 pyrogallol(Sigma, Cot# P-0381)을 기질로 사용하고 100 µL 조효소액에 2.9 mL assay buffer를 첨가하여 420 nm에서 20초간 상온에서 흡광도변화를 측정하였다. POD 활성은 다음과 같은 공식으로부터 구하였다.

$$\text{POD activity (units/g 시료)} = \frac{\Delta A_{420}}{12} \times \text{dilution factor} \times \text{total coenzyme solution}(\mu\text{l})$$

*12 : 420 nm에서의 흡광계수

$$\text{POD specific activity (unit/mg protein)} = \text{POD activity (unit/g)/mg protein}$$

SOD 활성은 McCord와 Fridovich(1969)의 방법에 따라 xanthine/xanthine oxidase system을 superoxide radicals(O₂·)의 공급원으로 이용하여 superoxide radicals에 의한 cytochrome c의 환원속도를 550 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. SOD 활성은 다음의 식으로부터 구하였으며, SOD 활성 1 unit는 25°C에서 반응을 시작하여 150초간 550 nm에서 흡광도 변화를 조사하여 xanthine oxidase 활성이 50% 억제되는 것으로 정의하였다.

$$\text{SOD activity (units/g 시료)} = \frac{1 \text{ unit}}{1 \text{ unit of SOD } (\mu\text{l})} \times \frac{1}{\text{g}} \times \text{dilution factor} \times \text{total coenzyme solution}(\mu\text{l})$$

$$\text{SOD specific activity (unit/mg protein)} = \text{SOD activity (unit/g)/mg protein}$$

POD, SOD의 isozyme pattern 확인

POD, SOD의 isozyme pattern은 Beauchamp와 Fridovich (1971)의 방법에 준해서 수행하였는데, POD의 경우는 12% acrylamide gel에서 15 mV에서 15분, 25 mV에서 45분간 전기영동한후 POD 단백질의 발색반응은 benzidine solution과 3% H₂O₂를 1 : 1로 혼합해서 사용하였다. SOD의 경우는 13% acrylamide gel에서 215 V에서 40분간 전기영동한후 gel의 염색은 negative staining solution에서 30분간 암상태로 shaking시켜 발색반응을 보았으며, 단백질 정량은 Bradford(1976) 방법에 준해서 실시하였다.

결과 및 고찰

토마토 품종의 hypocotyl에서 POD와 SOD의 활성을 측정 한 결과(Table 1), POD, SOD 비활성(unit/mg protein)은 JA101이 각각 23과 2,156 unit/mg protein로 다른 토마토 보다 높게 나타났다.

POD, SOD 비활성이 높게 나타난 방울토마토 세포의 배

Table 1. Peroxidase and superoxide dismutase activity in hypocotyl among three different tomatos.

Cultivars	Peroxidase activity		Superoxide dismutase activity	
	unit/g fr. wt.	unit/mg protein	unit/g fr. wt.	unit/mg protein
JA101	0.72	23.0	69	2156
Kangyuktomato	1.64	2.3	305	430
Kwangsutomato	0.83	1.4	299	516

Table 2. Effects of 2,4-D concentration on callus formation, POD and SOD activity in hypocotyl explants of JA101.

Conc. of 2,4-D(mg/L)	Fresh weight of callus (mg/explant)	Peroxidase activity (unit/mg protein)	Superoxide dismutase activity (unit/mg protein)
1	218	47	95786
3	99	26	44551
5	162	21	16902

양조건 적정화를 위하여 2,4-D 농도에 따른 POD, SOD 활성을 조사한 결과(Table 2), 2,4-D양에 따라 캘러스 생장은 다소의 차이를 보여 1 mg/L 농도에서 218 mg으로 가장 무겁게 나타났다. POD 비활성은 캘러스 성장과 유사하게 2,4-D의 양이 1 mg/L일 때 각각 47 unit/mg protein로 가장 높았고, SOD 비활성도 1 mg/L에서 95,786 unit/mg protein로 높게 나타났다. 이와 같이 캘러스 성장과 POD, SOD 활성은 서로 연관성이 있을 것으로 보인다. 캘러스의 성장과정에 따른 POD, SOD의 비활성 차이를 조사해 본 결과(Table 3), 1 mg/L 2,4-D에서 배양된 캘러스의 POD 비활성은 4주에는 높았으나 8주로 배양기간이 길어짐에 약 1/3로 감소하였고, SOD 비활성은 9배로 증가하였다. 이는 고구마로부터 유기된 캘러스 현탁배양초기에는 2,4-D를 첨가하였을 때 POD활성은 증가하나 배양 후기에는 감소되는 경향(Kwak et al., 1994)과 유사하게 나타났다. 따라서 본 실험에서도 캘러스 성장기간이 길어짐에 따라 POD 활성은 뚜렷하게 감소하는 경향으로 나타났고, SOD 활성은 대체로 증가하는 경향이였다.

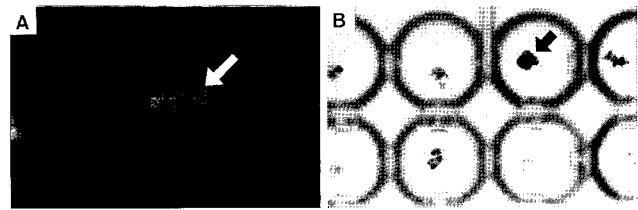
Hypocotyl 절편체 또는 8주된 캘러스에 *Agrobacterium*을 공동배양하여 형질전환시키고 형질전환된 캘러스 개체를 조사해 본 결과(Table 4), hypocotyl 절편체에서는 8주된 캘러스보다 45.3%로 캘러스 형성율이 높게 나타났고, 이중 X-gluc 양성반응을 보인 것은 21.6%였으나, 캘러스로부터 재형성된 것은 양성반응이 나타나지 않았다(Figure 2). McCormick et al.,(1986)은 토마토 잎 절편체를 이용하여 *Agrobacterium*과 공동배양 한것에서 캘러스 형성률은 품종에 따라 7-14%로 보고 하고 있어서, 본 실험과 비교해보면 캘러스 형성률은 hypocotyl 조직을 이용한 것이 높게 형성됨을 알수 있어서 형질전환 효율 향상시키는데는 실험에 이용되는 공시재료의 선택이 중요하다고 생각된다.

Table 3. Changes of SOD and POD activity according to culture period in MS medium containing 2,4-D.

Conc. of 2,4-D(mg/L)	Peroxidase activity (unit/mg protein)		Superoxide dismutase activity (unit/mg protein)	
	4 weeks	8 weeks	4 weeks	8 weeks
	1	155	47	10282
3	183	26	8159	44551
5	142	21	12669	16902

Table 4. Difference of transformation efficiencies between hypocotyl and calli via *Agrobacterium*.

Sources	No. of explants		GUS expressing	
	cultured	callusing (%)	positive (%)	negative (%)
Hypocotyl	300	136 (45.3)	28 (21.6)	108 (78.4)
Callus	230	16 (7.0)	0 (0.0)	16 (100)

**Figure 2.** Transformation of hypocotyl by cocultivating with *Agrobacterium* in JA101. A: Callus formation(←), B: Transformed callus confirmed by GUS assay(←).**Table 5.** Comparison of the antioxidant enzyme activity between control and transformed callus.

Origin	POD activity (unit/mg protein)	SOD activity (unit/mg protein)
Transformed callus	54 ± 7.8 ^a	30,300 ± 2700
Non-transformed callus	64 ± 4.0	37,077 ± 900

*X ± SD

*Agrobacterium*으로 형질전환 시킨 캘러스의 POD, SOD의 활성을 측정해 본 결과(Table 5), POD 비활성의 경우 형질전환된 캘러스는 54 unit/mg protein이고, 형질전환 되지 않은 캘러스는 64 unit/mg protein로 나타났으며, SOD 비활성도 형질전환된 캘러스가 약간 낮은 경향으로 나타났다. Yutaka et al.,(1994)은 CMV 외피단백질 유전자를 맬론에 형질전환한 실험에서, 형질전환된 식물체와 형질전환되지 않은 식물체의 뿌리조직으로부터 페놀성 화합물의 차이를 비교해 보았으나 새로운 페놀성 화합물이 검출되지 않았으며, 또한 식물체에서 대기중으로 방출되는 휘발성 물질 분석에서도 새로운 물질이 발견되지 않았다고 하였다. 따라서

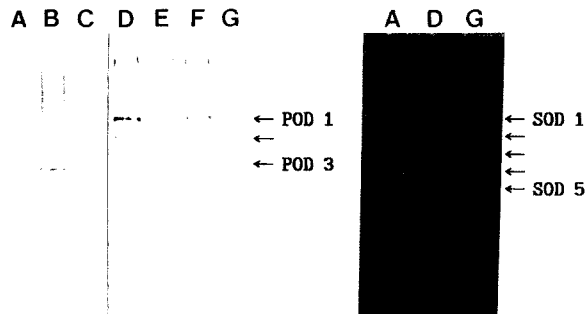


Figure 3. Isozyme patterns of POD and SOD in tomato hypocotyl and callus. A: JA101 hypocotyl, B: Kangyuktomato hypocotyl, C: Kwangsutomato hypocotyl, D: callus from hypocotyl on MS1D, E: callus from hypocotyl on MS3D, F: callus from hypocotyl on MS5D, G: transgenic callus by LBA 4404/pBI12L.

본 연구 결과에서도 형질전환된 캘러스와 형질전환되지 않은 캘러스의 SOD와 POD 비활성 차이는 인정할 수 없는 것으로 생각된다.

배양조건에 따른 POD, SOD isozyme pattern을 분석한 결과(Figure 3), hypocotyl의 경우에는 POD 3(편의상 전기영동에서 적게 이동한 isozyme 순으로 POD 1에서 POD 3로 하였음)으로 한 개의 isozyme이 존재하는 반면 캘러스는 POD 1, 2번으로 hypocotyl과 다르게 2개의 isozyme이 존재하며 그 종류도 서로 다르게 나타났다. 즉 hypocotyl과 캘러스간 POD의 isozyme pattern과 수는 뚜렷한 차이를 보였다. 그러나 캘러스에서는 형질전환 유무에 상관없이 POD 1, 2만이 뚜렷하게 존재하여, isozyme pattern에는 차이가 없었고 또한 2,4-D 양의 변화에 대해서도 차이가 없었다. *Agrobacterium*에 의해 형질전환된 캘러스와 형질전환되지 않은 캘러스사이에는 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다. SOD isozyme pattern은 hypocotyl에서는 SOD 4번과 5번 2개의 isozyme이 존재하나, 캘러스에서는 SOD 1, 2, 3, 4로 4개의 isozyme이 존재하였으며, 특히 SOD 2번의 isozyme이 강하게 나타났다. 형질전환되지 않은 캘러스와 형질전환된 캘러스간에도 isozyme 패턴에는 차이가 없었다. You et al.(1996)은 토마토 식물체의 줄기에서 5개의 SOD isozyme이 존재한다고 보고하였으나, hypocotyl에 2개의 isozyme이 존재하는 것으로 나타나 본 실험과는 차이가 있었으며, 토마토 현탁배양 세포에서는 4개의 SOD isozyme이 존재한다고 보고하였는데, 이는 본 실험 결과와 유사한 경향이였다.

적 요

토마토에서 GUS 유전자를 가진 *Agrobacterium*을 이용하여 형질전환된 캘러스와 형질전환되지 않은 캘러스의 peroxidase(POD)와 superoxide dismutase(SOD) 활성 차이를

조사하여 형질전환된 세포의 안전성평가의 기초자료로 삼고자 얻어진 결과는 다음과 같다. JA101 종자로부터 형성된 hypocotyl의 POD, SOD 비활성은 각각 23 unit/mg protein와 2,156 unit/mg protein로 공시품종 중 가장 높은 활성을 나타내었다. Hypocotyl 절편체로부터 유도한 캘러스 생장은 1 mg/L 2,4-D의 농도에서 가장 좋았으며, 1 mg/L 2,4-D가 함유된 배지에서 유도된 캘러스에서 POD 와 SOD 비활성은 각각 47 unit/mg protein 와 95,786 unit/mg protein로 높게 나타났다. *Agrobacterium* 과 hypocotyl 절편체와의 공동배양으로부터 형성된 캘러스중 21.6%의 형질전환된 캘러스를 얻을 수 있었으며, 형질전환된 캘러스의 POD 비활성은 54 unit/mg protein로 형질전환 되지 않은 캘러스의 64 unit/mg protein보다 낮게 나타났고, SOD 비활성은 형질전환된 캘러스가 30,300 unit/mg protein로 형질전환되지 않은 캘러스의 37,077 unit/mg protein 보다 낮게 나타났다. 형질전환된 캘러스와 형질전환되지 않은 캘러스간의 isozyme pattern 차이는 인정할 수 없었다.

인용 문헌

- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107:1049-1054
- Alscher RG, Hess JL (1993) Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton 1-17
- Beauchamp C, Freidovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276-287
- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montague M, Inz D (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* 10:1723-1732
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405
- Kwak SS, Kim SK, Jung KH, Yoo SH, Park IH, Liu JR (1994) Improvement of peroxidase productivity by optimization of medium composition and cell inoculum size cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Korean J Plant Tissue Culture* 21:91-97
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte(Hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055
- McCormick S, Niedermeyer J, Fry J, Barnason A, Horsch R, Fraley R (1986) Leaf transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 5:81-84
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and

- bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP** (1996) Ultraviolet-B-and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **110**:125-136
- Runeckless VC, Krupa SV** (1994) The impact of UV-B radiation and ozone on terrestrial vegetation. *Environ Pollut* **83**:191-213
- Tepperman JM, Dunsmuir P** (1990) Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol Biol* **14**:501-511
- You SH, Huh GH, Kwon SY, Lee HS, Bang JW, Kwak SS** (1997) Superoxide dismutase activity in suspension cultured cells of tomato (*Lycopersicon esulentum* Mill). *Korean J Plant Tissue Culture* **24**: 57-61
- You SH, Kim SW, Kim SH, Liu JR, Kwak SS** (1996) Selection and isoenzyme analysis of plant cell lines for high yields of superoxide dismutase. *Korean J Plant Tissue Culture* **23**: 103-106
- Yutaka T, Oosawa K, Nishimura S, Watanabe S, Tsuchiya K, Yoshioka K, Fujisawa I, Nakajima K** (1994) Environmental risk evaluation of the transgenic melon with coat protein gene of cucumber mosaic virus in a closed and semi-closed greenhouse(Ⅱ). *Breeding Science* **44**: 207-211

(1998년 1월 22일 접수)