

CLP, Dhn5 유전자의 도입에 의한 고비사막 자생식물 *Artemisia adamsii*의 내건성 및 내동성 증진

한규현, 황철호*

단국대학교 생명자원과학부

Transformation of *Artemisia adamsii*, Endemic to a Gobi Desert, with CLP, Dhn5 to Enhance Environmental Stress Tolerance

Kyu Hyun Han, Cheol Ho Hwang*

School of Bioresource Sciences, Dankook University, Chonan 330-714, Korea

ABSTRACT Freezing and drought tolerances in plants are very important for survival in the desert. In an effort to reduce desertification in Gobi, a molecular breeding of *Artemisia adamsii* using the *CLP* (chitinase like protein, antifreeze protein) and *Dhn5* (dehydrin5) genes from barley is performed by introducing them into *Artemisia adamsii* via *Agrobacteria*. We had found an optimal combinatorial concentration of hormones at 0.05mg/L of NAA and 0.5mg/L of BA for growth of callus in *Artemisia adamsii*. In addition, the higher rate of callus induction using hypocotyl as explant was observed comparing to explants of stem and leaf. There were some variations in the level of the proteins expressed among the transgenic lines such that the lines of *CLP* (CS1-5, 1-7, 4-4) and *Dhn5* (DS2-2, 2-3) lines produce the protein to higher levels. The transgenic lines showing a higher level of *Dhn5* exhibited better growth than nontransgenic callus in presence of 10 and 20% PEG. In case of the *CLP* transgenic lines, both CS1-5 and CS1-7 showed a higher level of freezing tolerance determined by ion leakage test.

Key words: *Artemisia adamsii*, CLP, dehydrin5, drought tolerance, freezing tolerance, Gobi desert

서 론

사막은 극단적인 환경 스트레스 조건에 의해 서식 식물종의 분포를 조절한다. 한반도에 영향을 미치는 황사 발원지인 고비사막은 건조 외에 저온에 의한 식물종의 제한이 뚜렷한 지역이다. 사막화 과정 중의 식물종 천이는 최종적으로 썩류가 사구의 우점종으로 출현한다 (Woo et al. 2000). 썩류는 다른 식물에 비해 내환경성이 높아 극한의 조건에서 생육하는 최후의 식물이며, 이의 분포에 따라서 사막화 진행을 포함하는 다양한 환경변화를 기록하는 지표식물로 이용된다 (Subally and Quezel 2002). 몽골의 스텝과 고비사막의 접경지역에 폭넓

게 자생하며 고비사막의 확장을 저지하는 식물 중 하나인 *Artemisia adamsii*의 형질전환에 의한 내환경성 증진은 고비 인접지역의 사막화 방지에 중요하다 (Zhang 1996). 실제로 다양한 종의 *Artemisia*를 내몽골 지역의 철도 보호용 사구 고정 식물로 이용하고 있다 (Woo et al. 2000).

식물 환경스트레스 요인인 저온, 한발, 염 등에 반응하는 다양한 식물 유전자의 도입을 통해 식물의 환경 스트레스 내성을 증진한 예가 많이 있다 (Xiong et al. 2002). 특히 저온 환경에서 결빙은 성장한 얼음결정에 의한 비가역적인 물리적 파괴를 통해 식물을 고사하게 한다 (Griffith et al. 1992). 월동식물인 보리, 호밀 등은 저온순화를 통해 세포 밖 공간에 반결빙 단백질 (CLP, TLP, GLP)을 축적하여 얼음결정의 성장을 막아 내동성을 증진한다. 반결빙 단백질은 식물 병원균에 의해 유도되는 PR 단백질과 유사하나 저온에서 발현되는 단백

*Corresponding author Tel 041-550-3626 Fax 041-553-1618
E-mail sfoho@dankook.ac.kr

질만이 반결빙 활성도를 갖는 것으로 알려져 있다 (Griffith et al. 1999). Hwang 등 (2000)은 담배 식물체에 보리 CLP를 형질 전환 하여 식물조직 수준에서 내동성의 증가를 확인하였다.

건조는 식물이 사막 환경에서 직면하는 환경 스트레스로서 얼음결정 형성 시 주변세포의 수분장해를 동반하기에 저온에 의한 식물의 고사기작과 밀접하게 연관된다 (Shinosaki 2000). 건조 및 저온 모두에 의해 유도되는 보리의 Dehydrins (DHNs, LEA D-11)는 12개의 유전자로 구성된 그룹이며 C-terminal 부분에 많은 수의 Lysine이 존재하는 K-segment와 Serine이 다량 존재하는 S-segment로 구성되어 있어 인산화에 영향을 준다 (Zhu et al. 2000). Dehydrins는 식물 성장점 주위의 막에 존재하며 성장점으로부터의 수분 유출을 감소시켜 내동성 증대에 직접적으로 관여하며 Dhn5는 건조보다는 저온에 의해 유도된다 (Zhu et al. 2000). 실제로 저온처리로 보리에서 축적되는 Dhn5의 양과 식물체 수준의 내동성 정도는 정의 상관을 보였다 (Sung 2001).

*Artemisaia*속 식물의 생물공학적인 연구는 항종양, 항말라리아 물질인 artemisinin 생산을 위한 조직배양 및 형질전환연구가 있다. Vergauwe 등 (1996a)은 *Agrobacterium*을 이용해 개똥쑥 (*A. annua* L.)에 β -glucuronidase 유전자를 형질전환하고 재분화하였다. 또한 artemisinin 생합성 관련 유전자의 과발현을 통해 artemisinin 함량을 증가시켰다 (Ghosh 1997; Geng 2001). 조직배양 관련 연구로는 wormwood (다복쑥쑥, *A. absinthium* L.)와 이집트 자생종 (*A. judica* L.), 국내 자생 그늘쑥 (*A. sylvatica* MAX)을 이용하여 기관분화를 통해 재분화 및 세균 유도에 성공한 사례가 있다 (Nin 1997; Liu 2003; Shin 2003). 또한 선발배지에 첨가되는 kanamycin의 첨가가 재분화를 감소시키고, 대체 항생제로 vancocin의 첨가가 형질전환 캘러스의 재분화율을 증가시킨다는 보고가 있다 (Vergauwe et al. 1996b). 그러나 *Artemisia adamsii*와 관련된 연구는 지상부에서 약리활성의 주성분으로 aborescin에 대한 분석 연구 (Bohlamm et al. 1985) 외에 없기에, *Artemisaia*속 일부식물의 형질전환 연구보고를 근거로 고비사막 자생식물인 *Artemisia adamsii*에 내환경성 유전자의 도입을 시도하였다.

0.5 cm로 절단하고 MS 고체배지 (5 mg/L 2,4-D, 3% sucrose)에서 배양하여 캘러스를 유도하였고, 유도된 캘러스를 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L NAA와 0.1, 0.5, 1 mg/L BAP의 조합으로 구성된 18처리의 MSA 고체배지 (2% sucrose)에서 3반복으로 배양하여 캘러스 발생 및 생장의 최적조건을 규명하였다.

Vector 구축 및 형질전환

황 등 (2000)이 내동성이 강한 동보리 1호로부터 분리한 CLP 유전자와 Dhn5 유전자를 Hind III와 Cla I, Sca I 과 Xho I 을 이용하여 절단 후 pGA748에 삽입하여 35S promoter와 NOS 3' terminator 사이에서 이들의 조절에 의해 발현하도록 하였고 (Figure 2), NPT II 유전자를 통해 형질전환체를 선발하였다. 재조합된 DNA는 freeze-thaw 방법을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입하였다.

무균상태에서 발아하여 3주간 자란 유식물체를 MS 고체배지 (MS, hormone free, 3% sucrose)에서 12주간 생육시킨 후,

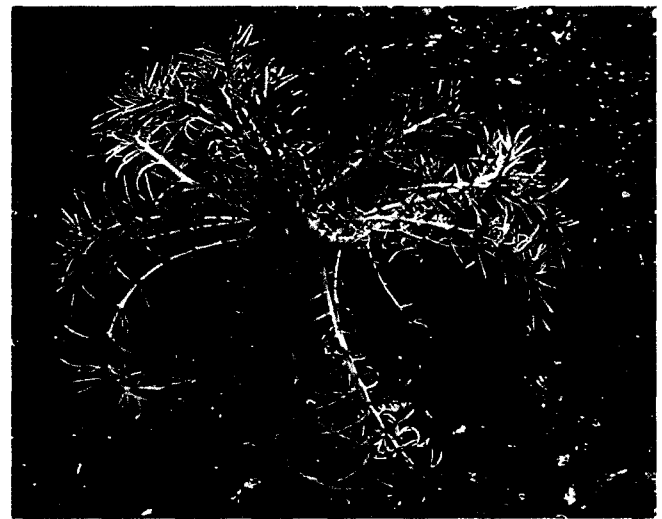


Figure 1. *Artemisia adamsii* grown for 4 months after germination in the pot.

재료 및 방법

식물재료 및 조직배양

2001년 10월 몽골국립농과대학 B. Buyanchimeg 교수의 자문을 받아 몽골 고비사막에서 자생하는 *A. adamsii*의 종자를 현지에서 직접 채집하였다. 실험실 내에서 전처리 없이 토양에서 발아시켜 식물을 유도하였고 실온, 8/16시간의 광/암 조건에서 재배하였다 (Figure 1). 종자를 70% EtOH에 30초간 4회 표면살균 후, 멸균 증류수로 5회 수세한 다음 0.3% Gelrite 고체배지에 치상하여 25°C 암 조건에서 발아시켰다. 배축을

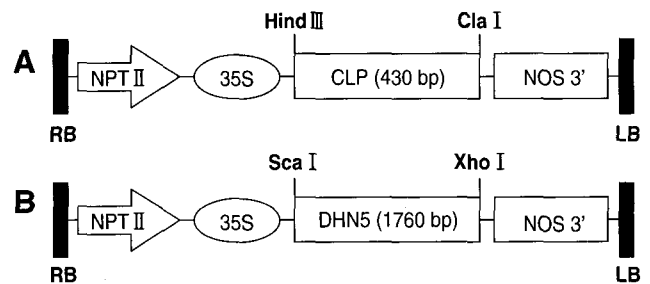


Figure 2. Construction of pGACLP (A), pGADHN5 (B) from a ligation of a Hind III and Cla I, Sca I and Xho I fragment of CLP cDNA, DHN5 cDNA from barley into pGA748. Expressions of the CLP and DHN5 gene are under regulation of the 35S promoter. RB: right board, LB: left board, NPT II : neomycin phosphotransferase II, 35S: CaMV 35, NOS 3': nopaline terminator.

잎, 줄기, 뿌리를 각기 0.3 cm로 절단하여 MSA (MS, 2% sucrose, 0.05 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP) 액체배지에서 2일간 25°C 암 조건에서 진탕배양하였다. M₉ 배지에서 2일간 37°C 암 조건으로 배양한 *Agrobacterium* 30 mL를 침전 후 20 mL MSA 액체 배지에 희석한 다음 *A. adamsii*의 잎, 줄기, 뿌리 절편과 10분간 암 조건에서 공동배양하였다. 이후 MSA 배지에서 3일간 25°C의 암 조건에서 80 rpm으로 진탕배양한 후 20 mg/L의 kanamycin이 포함된 MSA 고체배지 (0.3% Gelrite)로 옮겨 형질전환 캘러스를 선별하였다.

PCR 분석

0.2 g의 캘러스를 액체질소로 급속냉각한 후 마쇄하여 CTAB방법 (Rogers et al. 1985)으로 DNA를 추출하여 spectrophotometer (UV/Vis spectrophotometer, ATI Unicam사)로 정량하였다. PCR primers는 OligoLite ver 6.35 (Molecular Biology Insights, Inc.)를 이용하여 3종의 유전자를 대상으로 primer [NPT II(정방향 5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3', 역방향 5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA-3'), CLP(정방향 5'-CCG CCT ACC AGT TCC ATT-3', 역방향 5'-GCC AAG CAT GCC GCA GTA-3'), Dhn5(정방향 5'-CCC GAG TGA GAG GAT CCG CGC AAG-3', 역방향 5'-CGG TGT GTG CAT GCT GCC CA-3')]를 설계하였다.

PCR 반응은 NPT II는 95°C에서 5분간 반응 후, 95°C 1분, 68°C 1분, 72°C 1분간 30회, CLP는 95°C 5분간 반응 후, 95°C 1분 55°C 1분, 72°C 1분간 30회, Dhn5는 95°C 1분, 63°C 1분, 72°C 1분간 30회 반복 실시하였다. 얻어진 PCR 산물은 1% TAE agarose gel을 이용하여 전기영동하였다.

CLP, Dhn5 단백질 분석

0.2 g의 캘러스를 4°C 상태에서 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후, 동량의 2X protein sample buffer (0.125M Tris-Cl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 0.0025 g Brilliant Blue R)를 넣고 다시 분쇄하였다. 30초 간격으로 vortexing과 얼음에 두는 과정을 5회 반복한 후, Sonic dismembrator (Fisher scientific사)로 초음파 분쇄하였다. 이후 30초 간격으로 vortexing과 얼음에 두는 과정을 5회 반복한 후 4°C, 13000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 회수하고 -20°C에 보관하였다.

추출된 total protein은 15% (CLP), 12% (Dhn5) polyacrylamide gel에서 전기영동 하였으며, 전기영동이 끝난 gel을 Towbin buffer (18.3 mM Tris-Cl, 150 mM Glycine, 20% Methanol)에서 70V로 2.5시간 동안 Nitrocellulose membrane (Protran, S&S사)에 electro-blotting하고, blotting이 끝난 membrane을 TBST (100mM Tris-Cl pH8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 10분간 washing한 후, TBST에 5% nonfat dry milk가 포함된

용액으로 45분간 blocking하였다. 일차항체는 본 실험실에서 토끼로부터 제작한 CLP, Dhn5 항혈청을 1 : 10,000의 비율로, 이차항체는 anti-rabbit IgG-AP conjugate (Promega사)를 1 : 7,500의 비율로 TBST용액에 희석하여 사용하였다. 반응 후 AP system (NBT, BCIP; Promega사)을 사용하여 상온의 암 조건에서 발색반응을 진행하였다.

내건성, 내동성 측정

내건성을 측정하기 위해 동량의 캘러스 조직을 0, 10, 20, 30, 40%의 PEG가 포함된 MSA agar 배지에서 3반복으로 28일간 암 상태에서 배양하였다. 이후 캘러스의 생체중 및 건물중을 측정하여 스트레스 하에서 생장률로 상대적인 내건성을 비교하였다.

내동성의 경우는 Park 등 (2000)의 방법을 이용하여 캘러스 0.2 g을 유리시험관에 넣고, 저온수조를 이용하여 상온에서 2°C까지 2시간 동안 하강하고, 2°C에서 -2°C까지 30분에 걸쳐 온도를 하강한 후, 조직의 결빙을 유도하기 위해 400 mg의 얼음 조각을 넣었다. 2°C/30분의 속도로 -2°C에서 -8°C까지 수조의 온도를 내리면서 -2, -4, -6, -8°C에서 각각 sample을 채취하였다. 시험관에 3 mL의 증류수를 넣고 90 rpm에서 2시간 진탕하였다. 세포 유출물은 Spectrophotometer (ATI Unicam사)를 이용하여 흡광도 (265 nm)를 측정하였다. 이후 시험관을 autoclave (1.5기압, 20분)한 후 동일한 방법으로 흡광도 (265 nm)를 측정하여 이를 100% 이온 유출로 보고, 저온처리 시 유출된 이온의 양을 상대적 양으로 계산하여 캘러스 간의 가능한 차이를 보정하여 비교하였다.

결과 및 고찰

NAA, BAP 조성에 따른 캘러스 유도 및 생육

*A. adamsii*의 캘러스 유도는 2~3일에 이루어져서 일반적으로 3~4주가 소요되는 다른 *Artemisia*속 식물에 비해 상당히 빨랐다 (Vergauwe, 1996a). 다양한 호르몬 농도 조건에서의 성장을 확인한 결과, 0.05 mg/L의 NAA와 0.5 mg/L의 BAP 조건과 0.1 mg/L의 NAA와 0.5 mg/L의 BAP가 포함된 배지의 암 조건 하에서 최적의 캘러스 생장을 보였다 (Table 1). 잎, 줄기 그리고 뿌리 절편의 캘러스 형성 효율을 비교한 결과, MSA 배지에서는 잎 절편이 31%로 줄기 (23%) 및 뿌리 (21%)에 비해 10% 높았으나, MSA2 배지에서는 뿌리에서만 12%의 캘러스 유도율을 보였다 (Table 2). 형질전환 후의 캘러스 유도에서는 위와 같은 두 가지 배지조건에서 모든 조직으로부터 2~50% 이상의 캘러스 유도율을 확인할 수 있었으며 조직에 따라 다양한 유도율을 보였으나 줄기 절편에서 비교적 높은 유도율을 보였다 (Table 3).

액체배지에서의 캘러스 배양은 시간이 경과함에 따라 조직이 경화되고 고사하여 건전한 생육이 이루어지지 않아 고체배지에서 배양하였다. 광 조건에서는 캘러스의 녹색화가 3~4 일 만에 빠르게 진행되었다. 선행된 실험의 2,4-D와 kinetin 또는 2ip 조합에서 둔화된 캘러스 생육을 관찰하여 (결과 미제시) *A. adamsii*의 캘러스 배양에는 BAP와 NAA가 적절함을 확인하였다. 이는 *A. annua*에 farnesyl diphosphate synthase 유전자의 형질전환 후 캘러스 유도에 0.1 mg/L의 NAA와 0.5 mg/L

의 BAP가 최적의 조건임을 밝힌 연구결과 (Chen 등, 2000)와 일치하였다. 다양한 조합의 NAA와 BAP 농도에서 효율의 차이는 있으나 직접 신토가 유도되는 *A. annua*와 다르게 *A. adamsii*는 위의 조건에서 기관분화가 일어나지 않았다.

Table 1. Effect of growth regulators (NAA and BAP) on callus induction* of *A. adamsii*

BAP (mg/L)	NAA (mg/L)					
	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2
0.1	+	++	+	+	+	+
	+	++	+	+	+	-
	+	++	+	+-	+	-
0.5	+	+++	++-	+-	+	-
	+	+++	++-	+	+	-
	+	+++	++-	+	+	-
1	+	++	+	+	+	+
	+	++	+	+	+	+
	+	++	+	+	+	-

*Levels of relative induction of callus are expressed as +: low, ++: medium, +++: high, and -: very low.

Table 2. Efficiencies of callus induction of *A. adamsii* using explants from different tissues and two different media

Media	MSA*			MSA2**		
	Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root
Callus induction rate (callus/explant)	31.25% (5/16)	23.07% (3/13)	21.05% (4/19)	0% (0/19)	0% (0/5)	12.5% (2/16)

* : 0.05 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP

** : 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L BAP

Table 3. Efficiencies of CLP, Dhn5 transformation using explants from different tissues and two different media in *A. adamsii*

Media	Tissue	Rate of callus induction (callus/explant)	
		CLP	Dhn5
MSA*	Leaf	40.35% (23/57)	2.59% (2/77)
	Stem	53.73% (36/67)	27.27% (9/33)
	Root	51.11% (23/45)	27.58% (8/29)
MSA2**	Leaf	50.58% (43/85)	11.94% (8/67)
	Stem	51.51% (17/33)	30.76% (8/26)
	Root	42.22% (19/45)	24.13% (7/29)

* : 0.05 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP

** : 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L BAP

형질전환 및 형질전환체 분석

*A. adamsii*의 잎, 줄기, 뿌리절편에 *Agrobacterium*을 이용하여 *CLP*, *Dhn5* 유전자 도입 후 각각 161, 42개의 형질전환 세포 주를 얻었다. *CLP* 형질전환의 경우 MSA 배지에서는 잎 절편에서 40.35%, 줄기 절편에서 53.73% 뿌리 절편에서 51.11%로 전반적으로 높은 형질전환율을 보였으며, MSA2 배지에서는 잎 절편에서 50.58%, 줄기 절편에서 51.51%, 뿌리 절편에서 42.22%의 형질전환율을 보였다. *Dhn5*의 경우 MSA 배지에서는 잎 절편에서 2.59%, 줄기 절편에서 27.27%, 뿌리 절편에서 27.58%의 형질전환율을 보였으며 MSA2 배지에서는 잎 절편에서 11.94%, 줄기 절편에서 30.76%, 뿌리 절편에서 24.13%의 형질전환율을 보여, 비형질전환 조직의 캘러스 유도와는 다르게 두 배지에서 모든 절편체로부터 일정 수준 이상의 캘러스 유도율을 확인하였다 (Table 3). 잎, 줄기, 뿌리에서 유도된 CLP 또는 *Dhn5* 형질전환 세포 주를 각각 선택하여 *NPTII* 유전자의 도입을 확인하기 위해 PCR을 수행한 결과 형질전환 캘러스에서 700 bp의 예상된 크기의 PCR 산물을 확인하였다 (Figure 3A). *CLP*와 *Dhn5*의 PCR에서도 마찬가지로 형질전환 캘러스에서 예상된 크기인 430 bp와 1760 bp의 증폭된 PCR 산물들을 확인하였다 (Figure 3B, C).

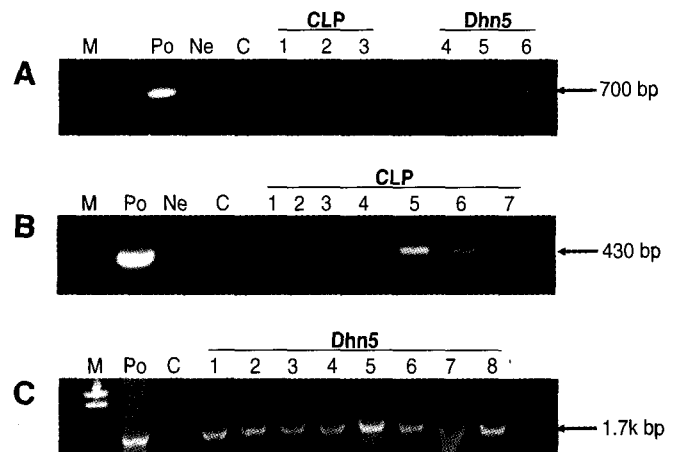


Figure 3. Confirmation of the presences of *NPT II* (A), *CLP* (B), *Dhn5* (C) genes introduced in transgenic *A. adamsii* callus cell by PCR with *NPT II*, *CLP*, *Dhn5* primers. M: λ Hind III marker, Po: positive control (A: pGA748 vector; B: pGACLP C: pGADhn5), Ne: negative control (A: pET-32(a) vector; B: pGA748 vector), C: nontransgenic callus. A, 1: CS1-5, 2: CS1-7, 3: CS4-4, 4: DS1-5, 5: DS2-2, 6: DS2-3; B, 1: CS1-1, 2: CS1-2, 3: CS1-3, 4: CS1-4, 5: CS1-5, 6: CS1-7, 7: CS4-4; C, 1: DS1-1, 2: DS1-2, 3: DS1-3, 4: DS1-4, 5: DS1-5, 6: DS2-1, 7: DS2-2, 8: DS2-3.

도입된 유전자의 발현을 확인하기 위해 CLP 형질전환 캘러스의 전체 단백질을 대상으로 western 분석을 실시하였다. 동보리 1호로부터 분리한 각 유전자를 *E. coli*에서 발현시켜 항원을 확보하였고 항원을 토끼에 주입하여 제작한 항체를 이용하여 반응 시킨 결과 예상된 크기의 약 27.7 KD 단백질이 형질전환 캘러스에서 확인되었다. 비형질전환 캘러스에서는 발현이 관찰되지 않는 것으로 보아 외래 유전자 도입에 의한 발현임을 확인하였다 (Figure 4A). Scion image (beta ver 4.0.2, Scion corporation사)를 통한 이미지 분석 결과 CS4-4 세포 주에 비해 CS1-5와 CS1-7의 CLP 발현량이 1.5, 1.03배 높은 것으로 나타났다. Dhn5 세포 주를 대상으로 시행한 western 분석 결과 DS2-3와 DS2-2에서 예상된 58.8 KD의 단백질을 확인하였다. DS2-3이 DS2-2보다 높은 수준 (3.7배)의 발현을 보였고, DS1-5에서는 Dhn5의 발현을 관찰할 수 없었다 (Figure 4B). PCR 결과에서 각 유전자의 도입을 확인하였으나 western 분석에서 해당 단백질이 발현되지 않아 유전자의 삽입 후 발현이 억제된 것으로 예상된다 (Vance 2001).

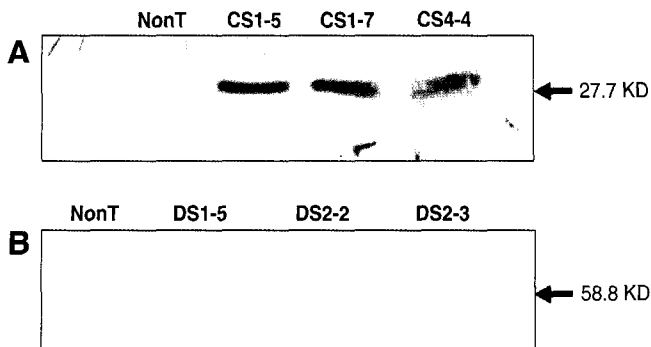


Figure 4. Western analysis showing the CLP (A) and Dhn5 (B) proteins from the transgenic *A. adamsii* callus. NonT: non-transgenic; CS1-5, CS1-7, CS1-1: transgenic lines with CLP gene; DS1-5, DS2-2, DS2-3: transgenic lines with Dhn5 gene.

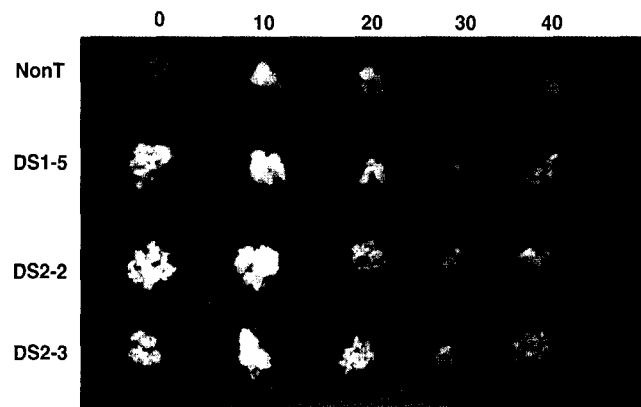


Figure 5. Growth of transgenic callus of *A. adamsii* with a barely Dhn5 gene in PEG (0 to 40%). NonT: non transgenic; DS1-5, DS2-2, DS2-3: transgenic lines with Dhn5 gene.

형질전환 세포의 내건성 변화

Dhn5 형질전환 캘러스에서 내건성의 변화를 확인하기 위해 배지에 PEG를 0%에서 40%의 농도로 첨가하여 28일간 생장을 관찰하였다 (Figure 5). 형질전환 캘러스는 모든 처리구에서 비형질전환 캘러스에 비해 생육이 증가하였다. 특별히 0% 조건에서도 형질전환 캘러스의 생장이 좋은 것은 Dhn5의 발현이 스트레스 없는 조건에서도 *A. adamsii* 캘러스 생장을 돕는 것으로 여겨진다. 또한 형질전환 여부와 관계없이 모든 캘러스가 10% PEG 조건에서 0%보다 더 높은 생장률을 보였다. 이는 *A. adamsii* 캘러스가 약간의 건조 하에서 최적의 생육을 보이고 그렇지 않은 조건에서 생장률이 낮은 것으로 미루어 무처리 조건이 스트레스 조건으로 여겨져 사막자생 식물 고유의 특성에 기인된 것으로 이해되어지나 이의 자세한 기작은 더 조사하여야 할 것이다. PEG 처리에 따른 캘러스의 생체중 또는 건물중의 변화는 유사한 경향을 보여, 본 실험을 통해 확인된 생장률의 차이는 수분함량의 차이보다는 세포의 분열에 따른 생장을 반영한 것으로 보여진다. PEG 처리에 따른 건조 스트레스 조건에서 Dhn5 형질전환 캘러스가 비형질전환 캘러스보다 고사 진행이 감소하는 것으로 관찰되었다 (Figure 5).

생체중 및 건물중의 비교시 DS2-2, DS2-3 캘러스는 10% PEG의 조건에서 유의적 수준으로 비형질전환 캘러스 (NonT) 보다 높은 생장률을 보였다. 생체중은 DS2-3이 western 분석

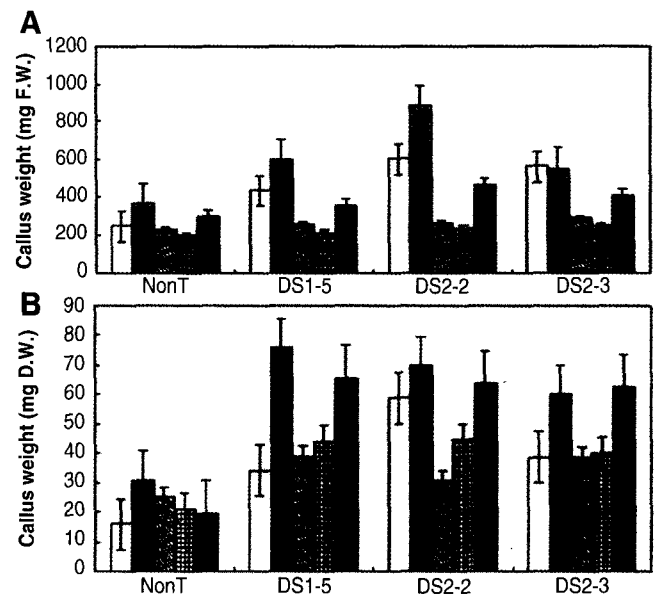


Figure 6. Increasing rates as shown with fresh (A), dry (B) weight of callus of *A. adamsii* with a barely Dhn5 gene grown in media supplemented with PEG. Weight were calculated by cell mass increased for 28 days' incubation. Value presented are the average of 3 independent samples. NonT: non-transgenic; DS1-5, DS2-2, DS2-3: transgenic lines with Dhn5 gene. 0% PEG (□), 10% PEG (■), 20% PEG (■), 30% PEG (■), and 40% PEG (■).

결과 (Figure 4B)에서 보여준 높은 수준의 Dhn5 양과는 다르게 DS2-2보다 10% PEG 조건에서만 낮은 성장률을 보였고, 더 높은 수준의 농도의 PEG 처리에서는 유사하거나 다소 높은 성장률을 보였다 (Figure 6A). 건물 중의 비교에서도 DS2-2, DS2-3 캘러스가 비형질전환 캘러스 (NonT)보다 높은 성장률을 보였다 (Figure 6B). PEG 처리실험은 stress가 가해진 상태이기 때문에 Dhn5 단백질의 발현 정도가 다를 것으로 예상되어 Figure 4의 western 분석으로 확인한 무처리 조건에서의 Dhn5 축적량과 PEG 처리 조건에서의 내성은 경우에 따라 다르게 나타날 수도 있을 것으로 생각된다.

형질전환 세포의 내동성 변화

CLP 형질전환 캘러스의 내동성 증진효과를 관찰하기 위한 이온 유출 측정에서 결빙온도를 -2°C에서 -8°C로 내리는 조건에서 CS1-5와 CS1-7 캘러스의 이온 유출량이 비형질전환 캘러스에 비해 적었다 (Figure 7). Western 분석에서 CLP 발현량이 비교적 높은 것으로 보였던 CS1-5, CS1-7 캘러스의 결과와 일치하였다 (Figure 4). 두 세포주간에 -4°C에서 -6°C까지는 CS1-5의 유출량이 높고, -8°C에서는 CS1-7이 더 높아지는 차이를 확인하였다. 얼음결정 형성에 의한 세포의 물리적 파괴로 유출된 이온의 양이 내동성 정도의 부의 상관을 보여준 예 (Park 2000)를 근거로 CLP 형질전환 *A. adamsii* 캘러스의 내동성이 증진되었음을 확인할 수 있었다. 예외적으로 다른 캘러스에 비해 낮은 CLP 단백질 발현량 (Figure 4)을 보인 CS4-4가 -8°C에서 대조구보다 많은 이온 유출을 보여, 일정 수준 이상의 CLP 축적만이 내동성에 기여하는 것으로 여겨진다.

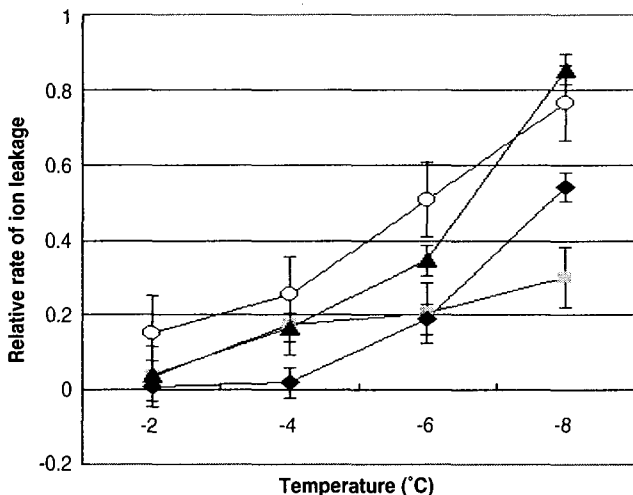


Figure 7. Ion leakage test showing a freeze tolerance of transgenic callus of *Artemisia adamsii* with a CLP gene introduced. The relative ion leakage at -2, -4, -6, -8°C were measured using spectrophotometer. Value presented are the average of 3 independent samples. Non-transgenic callus (-○-), Transgenic callus line : CS1-5 (-✕-), CS1-7 (-◆-), CS4-4 (-▲-).

적 요

고비사막 접경지역의 식물인 *Artemisia adamsii*의 내건성 및 내동성 증진을 위해 조직배양과 CLP 및 Dhn5 유전자의 형질전환을 수행하였다. 다양한 호르몬 농도 조건에서의 성장을 확인한 결과, 0.05 mg/L의 NAA와 0.5 mg/L의 BAP 조건과 0.1 mg/L의 NAA와 0.5 mg/L의 BAP가 포함된 배지의 암조건 하에서 최적의 캘러스 성장을 확인하였으며 유전자 도입 및 유전자의 발현이 확인된 캘러스가 세포 수준에서도 내건성 및 내동성이 증진되었음을 확인하였다. 그러나 *Artemisia*속 다른 식물과 다르게 조직절편에서 직접 기관분화를 유도하거나 캘러스를 통한 식물체 재생에 어려움이 있어 식물체 수준에서 형질전환에 따른 환경스트레스 내성의 증진을 확인하지 못하고 있다. 앞으로 진행될 *A. adamsii*의 식물체 재생에 대한 연구를 통해 내동성 및 내건성이 증진된 식물체를 육성하여 고비사막 지역적응력을 조사할 예정이다.

사사 - 본 연구는 2002학년도 단국대학교 대학 연구비의 지원으로 연구되었음.

인용문헌

Bohlmann F, Hartono L, Jakupovic J Huneck S (1985) Guaianolides related to arborescin from *Artemisia adamsii*. *Phytochemistry* 24: 1003-1007

Chen DH, Ye HC, Li GF (2000) Expression of chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci* 155: 179-183

Geng S, Ma M, Ye HC, Liu BY, Li GF, Chong K (2001) Effects of ipt gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L. *Plant Sci* 160: 691-698

Ghosh B, Mukherjee S, Jha S (1997) Genetic transformation of *Artemisia annua* by *Agrobacterium tumefaciens* and artemisinin synthesis in transformed cultures. *Plant Sci* 122: 193-199

Griffith M, Yang DSC, Ala P, Hon WC, Moffat BA (1992) Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol* 100: 593-596

Griffith M, Yu XM (1999) Antifreeze proteins in winter rye leaves from oligomeric complexes. *Plant Physiol* 119: 1361-1369

Hwang, CH, Park, HW, Min, SR, Liu, JR (2000) Freeze tolerance enhanced by antifreeze protein in plant. *Kor J Plant Tiss Cul* 27: 339-343

Li XR, Ma FY, Xiao HL, Wang XP, Kim KC (2003) Long-term effects of revegetation on soil water content of sand dunes in arid region of Northern China. *J Arid Env* (in press).

Liu CZ, Murch SJ, EL-Demerdash M, Saxena PK (2003)

- Regeneration of the egyptian medicinal plant *Artemisia judaica* L. Plant Cell Rep 21: 525-530
- Nin S, Bennici A, Roselli G, Mariotti D, Schiff S, Magherini R (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. (wormwood) and production of secondary metabolites. Plant Cell Rep 16: 725-730
- Park HW (2000) Cloning of freezing tolerance related genes from barley (*Hordeum vulgare* L.) and Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) and their expression in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). MS thesis, Dankook university, Cheon-an, Korea
- Rogers SO, Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol Biol 5: 69-76
- Shin SH, Yang DC (2003) Optimum condition for mass culture of hairy roots from *Artemisia sylvatica* MAX. Koran J Plant Biotech 30: 65-71
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Cur Opi in Plant Biol 3: 217-223
- Subally D, Quezel P (2002) Glacial or interglacial: *Artemisia*, a plant indicator with dual responses. Rev Palaeobot Palynol 120: 123-130
- Sung HC (2001) Analysis of freezing tolerance using differential expression of freezing tolerance-related genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). MS thesis, Dankook university, Cheon-an, Korea
- Vance V, Vaucheret H (2001) RNA silencing in plants defence and counterdefence. Science 292: 2277-2280
- Vergauwe A, Cammaert R, Vandenberghe D, Genetello C, Inze D, Montagu MV, Eeckhout EVD (1996a) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rep 15: 929-933
- Vergauwe A, Geldre EV, Inze D, Montagu MV, Eeckhout EVD (1996b) The use amoxicillin and ticarcillin in combination with a β -lactamase inhibitor as decontaminating agents in the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. J Biotech 52: 89-95
- Woo BM, Lee KJ, Jun KS, Kim KH, Choi HT, Lee SH, Kim SU, Lee SH (2000) Studies on the desertification combating and sand industry development (I). Kor Soc Env Res Rev Tech 3: 45-76
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell 5: 165-183
- Zhang W, Skarpe C (1996) Small-scale vegetation dynamics in semi-arid steppe in inner Mongolia. J Arid Env 34: 421-439
- Zhu B, Chio DW, Fenton R, Close TJ (2000) Expression of the dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. Mol Gen Gennet 264: 145-153

(접수일자 2003년 11월 7일, 수리일자 2003년 12월 3일)