

# 두 가지 항산화유전자를 동시에 발현시킨 형질전환 툴 페스쿠 식물체의 환경스트레스에 대한 내성 특성 해명

이상훈\*\* · 이기원\* · 김기용\*\* · 최기준\*\* · 서 성\*\* · 곽상수\*\*\* · 권석윤\*\*\* · 윤대진\* · 이병현\*

## Characterization of Transgenic Tall Fescue Plants Expressing Two Antioxidant Genes in Response to Environmental Stresses

Sang-Hoon Lee\*\*, Ki-Won Lee\*, Ki-Yong Kim\*\*, Gi Jun Choi\*\*, Sung Seo\*\*,  
Sang-Soo Kwak\*\*\*, Suk-Yoon Kwon\*\*\*, Dae-Jin Yun\* and Byung-Hyun Lee\*

### ABSTRACT

Environmental stress is the major limiting factor in plant productivity. As an effort to solve the global food and environmental problems using the plant biotechnology, we have developed transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants via *Agrobacterium*-mediated gene transfer method. To develop transgenic tall fescue plants with enhanced tolerance to the environmental stresses, both CuZn superoxide dismutase (CuZnSOD) and ascorbate peroxidase (APX) genes were incorporated in a pIG121 binary vector and the both of the genes were controlled separately by an oxidative stress-inducible sweet potato peroxidase 2 (SWPA2) promoter expressed in chloroplasts. Leaf discs of transgenic plants showed 10-30% less damage compared to the wild-type when they exposed to a wide range of environmental stresses including methyl viologen (MV), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and heavy metals. In addition, when 200 μM MV was sprayed onto the whole plants, transgenic plants showed a significant reduction of visible damage compared to wild-type plants that were almost damaged. These results suggest that over expression of CuZnSOD and APX genes in transgenic plants might be a useful strategy to protect the crops against a wide range of environmental stresses.

(Key words : *Agrobacterium*, APX, CuZnSOD, Tall fescue, Transformation)

### I. 서 론

식물은 생물학적 스트레스뿐만 아니라 건조, 고온, 저온, 염 및 중금속 등의 물리·화학적인 비생물학적 스트레스에 노출되면 생체내에서

생명에 필수원소인 산소(O<sub>2</sub>)가 superoxide radical (·O<sub>2</sub>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical (·OH) 등과 같은 반응성이 높은 독성의 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 변하게 된다 (Foyer 등, 1994; Asada,

\* 경상대학교 응용생명과학부 (Division of Applied Life Science (BK21 program), Gyeongsang National University)

\*\* 농촌진흥청 축산과학원 (National Institute of Animal Science, RDA)

\*\*\* 한국생명공학연구원 바이오소재연구부 (Division of Biomaterials Science, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology)

Corresponding author: Byung-Hyun Lee, Major of Dairy Science, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea  
Tel : +82-55-751-5418, Fax : +82-55-751-5410, E-mail : hyun@gsnu.ac.kr

1999). 이들 ROS는 강력한 산화력을 가지고 있어서 세포막의 파괴, 단백질 분해, DNA 합성 억제, 광합성반응 억제, 엽록체 파괴 등 생체 내에서 심각한 생리적인 장애를 주며 심할 경우는 식물체가 고사하게 된다. 이러한 환경스트레스에 대해 방어하기 위해 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) 등의 항산화효소와 ascorbate (vitamin C, ascorbic acid), 비타민 E (tocopherol), glutathione 등의 저분자 항산화물질이 식물체내에서 활성산소 제거에 관여 한다 (Foyer 등, 1994; Noctor와 Foyer, 1998).

특히 식물세포에 있어서 엽록체는 고농도의 산소와 광합성 전자전달계가 존재하는 세포내 소기관이기 때문에 외부의 환경스트레스를 받으면 다량의 활성산소가 생성되어 직접적으로 손상을 받아 작물의 생산성 감소를 초래한다. 따라서 복합적인 환경스트레스 하에서도 내성을 가지도록 엽록체의 항산화기구를 효율적으로 제어할 수 있다면 식물의 생산성 향상에 크게 기여할 수 있을 것이다.

최근 목초 또는 사료작물에 유용유전자의 도입을 통한 신품종 개발 연구가 많이 시도되고 있으며, 특히, 환경스트레스에 대한 내성을 향상시키기 위한 사료작물의 형질전환 식물체 개발에 관한 연구가 많이 보고되고 있다 (Spangenberg 등, 1998; Lee 등, 2004; Dang과 Qu, 2005; Wang과 Ge, 2005; Lee 등 2006). 톨 페스큐는 다년생 화분과 목초로서 공원, 골프장 등에 있어서 토양보존용 잔디로도 많이 개발되어 이용되고 있다 (Buckner 등, 1979). 본 연구에서는 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환

법으로 산화스트레스 유도성 promoter인 SWPA2 promoter 하류에 CuZnSOD와 APX가 동시에 엽록체에 발현하는 벡터로 형질전환하여 다양한 환경스트레스에 대해 내성을 가지는 형질전환 톨 페스큐를 개발하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료

형질전환을 위한 식물재료로는 톨 페스큐의 Kentucky-31 품종을 사용하였다. 종자살균은 성숙종자의 종피를 제거한 다음 70% ethanol에서 30초간 살균한 후, 30% sodium hypochlorite 용액에서 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균한 종자는 멸균수로 3회 세정한 후, 멸균된 filter paper에 옮겨 물기를 제거하고 MS 배지 (Murashige와 Skoog, 1962)를 기본으로 하는 캘러스 유도배지 (Lee 등, 2004)에 치상한 후 암상태에서 6주간 배양하여 캘러스를 유도하였다. 유도된 캘러스를 5 mm 크기로 절단하여 새로운 캘러스 유도배지에서 암상태로 3주간 계대배양하여 캘러스를 증식시킨 후 *Agrobacterium* 감염을 이용한 형질전환에 이용하였다.

### 2. *Agrobacterium* 배양 및 발현벡터

형질전환을 위한 발현벡터는 산화스트레스 유도성 SWPA2 promoter (Kim 등, 2003)를 이용하여 카사바 cytosolic CuZnSOD (Lee 등, 1999)와 완두 APX (Allen 등, 1997)가 동시에

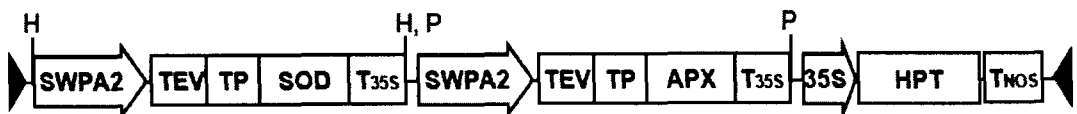


Fig. 1. Plant transformation vector pSSA-H. SWPA2pro, Sweetpotato peroxidase (SWPA2) promoter; SOD, cassava CuZnSOD; APX, pea ascorbate peroxidase; TEV, tobacco etch virus 5'-untranslated region; 35S, Ter CaMV 35S terminator; TP, chloroplast-targeted transit peptide.

엽록체에서 발현될 수 있도록 연결한 후, hygromycin phosphotransferase (HPT)를 선발 표지로 가지고 있는 pCAMBIA1300 발현백터를 제작하여 pSSA-H로 명명하였다(Fig. 1). 발현백터를 *Agrobacterium* strain EHA105에 형질전환한 후, 단일 colony를 선발하여 kanamycin (Km)과 hygromycin (Hm)이 각각 50 mg/L로 첨가된 YEP 액체배지에 접종, 배양하여 캘러스의 감염에 이용하였다. *Agrobacterium*의 감염과 공동배양은 Lee 등 (2004)의 방법에 준하여 실시하였다.

### 3. 형질전환 및 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스를 이용한 형질전환은 Lee 등 (2004)의 방법에 준하여 실시하였다. 성숙종자로부터 유도된 3-5 mm 크기의 캘러스를 *Agrobacterium*을 현탁시킨 접종배지에 1시간 침지시켜 감염시킨 다음, 여분의 *Agrobacterium*을 멸균된 filter paper 위에서 제거하였다. 감염시킨 캘러스를 공동배양배지 (MS medium, 3 mg/L 2,4-D, 200  $\mu$ M AS, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 3 g/L Gelite)에 계대한 후 26°C에서 5일간 암상태로 공동배양 하였다. 공동배양한 캘러스는 500 mg/L cefotaxime이 첨가된 공동배양배지로 세정하여 *Agrobacterium*을 제거한 후, post-culture배지 (MS medium, 500 mg/L cefotaxime, 3 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 500 mg/L L-proline, 3 mg/L thiamine-HCl, 30 g/L sucrose, 3 g/L Gelite)에 7일간 배양하였다. 공동배양과 post-culture가 끝난 캘러스는 선발배지 (N6 medium, 250 mg/L cefotaxime, 25 mg/L hygromycin, 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 500 mg/L L-proline, 3 mg/L thiamine-HCl, 30 g/L sucrose, 3 g/L Gelite)에서 3주간 배양하여 hygromycin 내성을 보이는 캘러스만을 선발하여 다시 50 mg/L Hm이 첨가된 선발배지에 옮겨 4주간 배양하여 살아남

은 캘러스로부터 식물체를 재분화시켰다. 재분화된 식물체는 50 mg/L Hm이 첨가된 1/2MS 배지가 들어있는 배양병에 옮겨준 후, 4주간 배양하여 정상적으로 뿌리가 발육되고 살아남는 개체만을 선발하여 pot로 이식하여 온실에서 재배하였다.

### 4. 도입 유전자의 확인

온실에서 재배한 형질전환 식물체로부터 genomic DNA를 CTAB법 (Murray와 Thompson, 1980)에 준하여 분리한 후, Lee 등 (2006)의 방법에 준하여 pSSA-H 백터의 hpt 유전자의 sense primer 5'-AATTGATCAGCGTTGGTGG-3'와 anti-sense primer 5'-GGTGTAGAGCATTAC-GCTGC-3'을 사용하여 증폭시킨 후 0.8% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. PCR로 형질전환이 확인된 개체는 genomic DNA를 20  $\mu$ g을 *Hind*III와 *Pst* I으로 각각 절단하여 0.8% agarose gel로 전기영동한 후, Southern blot 분석을 실시하였다. Southern blot 분석을 위한 probe DNA는 pSSA-H 백터의 SOD와 APX 유전자를 Lee 등 (2006)의 방법에 준하여 PCR로 증폭시킨 후 0.8% agarose gel 전기영동으로 정제하여 사용하였다.

### 5. 산화스트레스 내성 검증

형질전환 식물체의 산화스트레스에 대한 내성 검증을 위하여 온실에서 8주간 배양한 형질전환 식물체로부터 잎 절편을 조제하여 산화스트레스 (10  $\mu$ M MV, 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 중금속 (CdCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 250  $\mu$ M)을 포함하고 있는 용액에 띄워 광조건에서 24 및 48시간 동안 배양하여 엽록체의 손상 정도를 조사하였다. 또한, 산화스트레스와 중금속 처리시 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 생성량을 Balestrasse 등 (2006)의 방법에 준하여 조사하였다.

식물체 수준에서 MV 처리에 의한 내성 정도를 조사하기 위해 온실에서 8주 동안 생육시킨 비형질전환 식물체와 SSA 형질전환 식물체에 0.1% Tween 20을 포함하는 0, 100, 및 200  $\mu$ M MV 용액 25 ml를 spray하여 분사하고 7일 후에 식물체 잎에 나타나는 손상정도를 조사하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 형질전환 식물체의 선발 및 도입유전자 확인

성숙종자로부터 유래된 캘러스를 *Agrobacterium*으로 감염시켜 50 mg/L의 Hm이 첨가된 선발배지에서 선발한 후, 재분화된 형질전환 식물체를 pot로 이식하여 기내에서 순화시킨 후 온실에서 8주간 재배하였다. 형질전환 식물체의 genome내에 pSSA-H 발현벡터가 가지는 T-DNA 영역이 도입되었는지를 확인하기 위해 온실에서 재배중인 형질전환 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 추출한 후 Hm 유전자의 일부 염기서열의 primer로 하여 PCR로 확인하였다. 그 결과 비형질전환 식물체의 genomic DNA로부터는 증폭된 DNA 단편을 확인할 수 없었으나 형질전환식물체에서는 약 0.8 kb의 PCR 증폭산물이 관찰되었다 (결과 미제시).

또한, 형질전환 식물체의 genome내에 CuZnSOD와 APX 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위해 Southern blot 분석을 실시하여 본 결과, 비형질전환 식물체에서는 CuZnSOD와 APX probe와 결합하는 DNA 단편을 확인할 수 없었으나, 형질전환식물체에서는 단편이 관찰되어 T-DNA가 틀 페스큐 형질전환체의 genome내에 안정적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

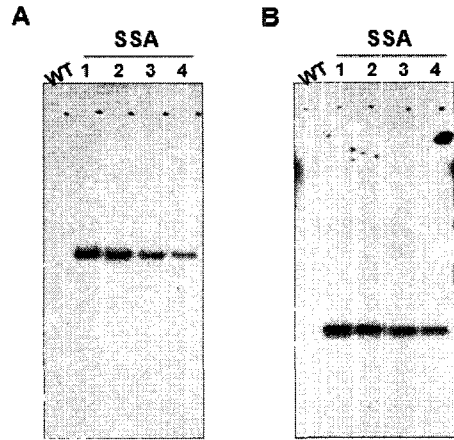


Fig. 2. Southern blot analysis of SSA-transgenic tall fescue plants. Genomic DNA of transgenic (1-4) and wild-type plants (WT) were digested with *Hind*III or *Pst* I, and hybridized with cassava CuZnSOD (A) and pea APX probes (B).

#### 2. 잎 절편 수준에서의 내성 검정

형질전환 식물체의 산화스트레스에 대한 내성 정도를 검정하기 위하여 각각의 식물체로부터 잎 절편을 조제한 후 산화스트레스 (MV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 및 중금속 스트레스 (Cd, Cu, As)에 각각 처리한 후, 각각의 처리구에서의 잎의 손상정도를 비교하였다. 그 결과, 모든 스트레스 처리구에서 처리 후 24시간째부터 차이를 나타내기 시작하였으며 처리 48시간째의 경우는 모든 처리구에서 SSA 형질전환 식물체가 비형질전환 식물체에 비해 잎 절편의 엽록소 탈색정도가 훨씬 낮게 나타났다 (Fig. 3).

또한, SSA 형질전환 식물체와 비형질전환 식물체내에 축적된 활성산소의 생성정도를 조사해 본 결과, 산화스트레스와 중금속 스트레스 처리 후의 세포내 활성산소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 축적량이 비형질전환체가 SSA 형질전환체에 비해 훨씬 많이 축적되었음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

이러한 결과는 SWPA2 프로모터에 의해 엽록체 내에서 동시에 발현되어 축적된 SOD와

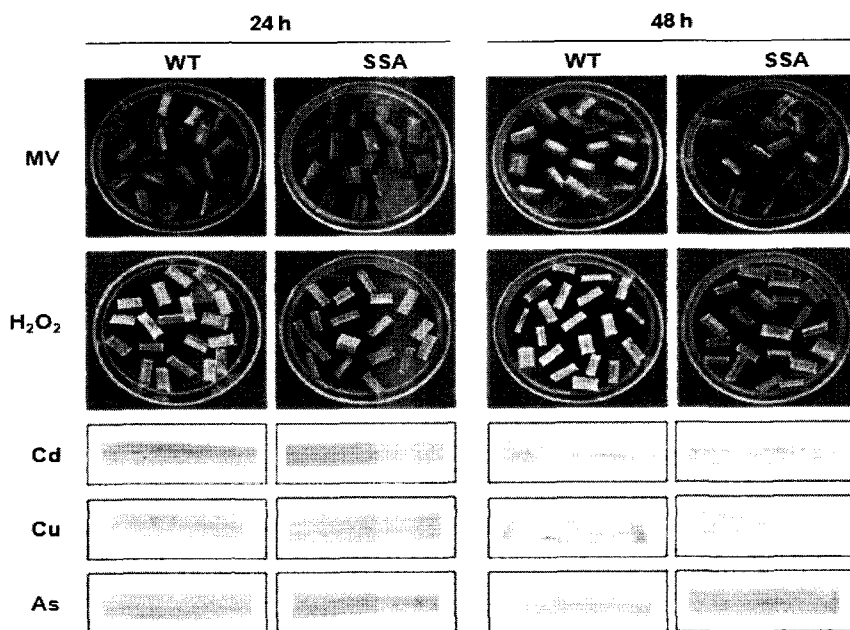


Fig. 3. Visible damage in detached leaves of wild-type and SSA plants exposed to MV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and heavy metals for 24 h or 48 h.

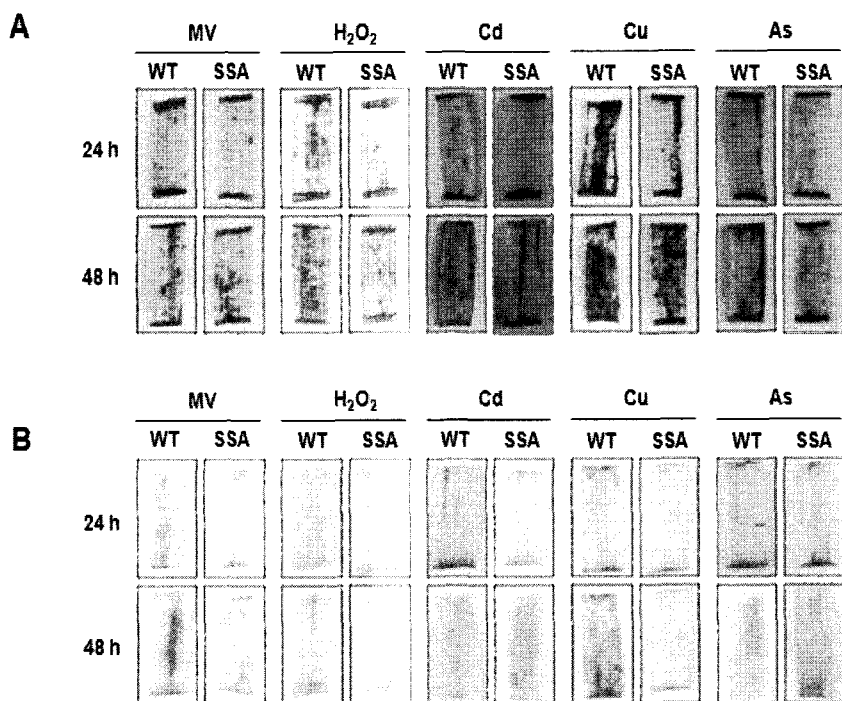


Fig. 4. Histochemical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) and O<sub>2</sub><sup>-</sup> (B) in detached leaves of wild-type and SSA plants exposed to MV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and heavy metals for 24 h or 48 h.

APX가 정상적으로 기능하여 산화스트레스와 중금속 스트레스 처리시 발생된 활성산소종을 효율적으로 제거하였기 때문일 것으로 추측된다.

### 3. 유식물체 수준에서의 내성 검정

식물체 수준에서 산화스트레스처리에 따른 내성 정도를 조사하기 위해 온실에서 8주 동안 생육시킨 비형질전환 식물체와 SSA 형질전환 식물체에 0.1% Tween 20을 포함하는 0, 100 및 200  $\mu\text{M}$  MV 용액 25 ml을 spray하여 분사하고 7일 후에 식물체 잎에 나타나는 손상 정도를 조사하였다. 그 결과 MV를 처리한 후 광 조건에서 24시간째 부터 잎의 손상이 관찰되었다. 100  $\mu\text{M}$  MV를 처리하여 7일간 배양했을 경우 비형

질전환 식물체는 잎 조직의 일부분이 고사되었으나 SSA 형질전환 식물체는 거의 손상을 받지 않았다. 또한, 200  $\mu\text{M}$  MV를 분사시켜 7일간 배양했을 경우, 비형질전환 식물체는 잎 조직의 대부분이 고사되었으나 SSA 식물체는 일부분만이 손상을 받아 MV에 대한 내성이 월등히 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 5).

이러한 결과는 엽록체에서 MV에 의해 유도되는 산화스트레스에 의해 SWPA 프로모터가 SOD와 APX 유전자를 강하게 발현시켜 세포 내의 활성산소를 효율적으로 제거하고 있음을 나타낸 결과이다. 이와 같은 유사한 연구결과가 형질전환 담배 (Kwon 등, 2002)와 감자 (Tang 등, 2006) 등에서도 보고된 바 있다.

## IV. 요약

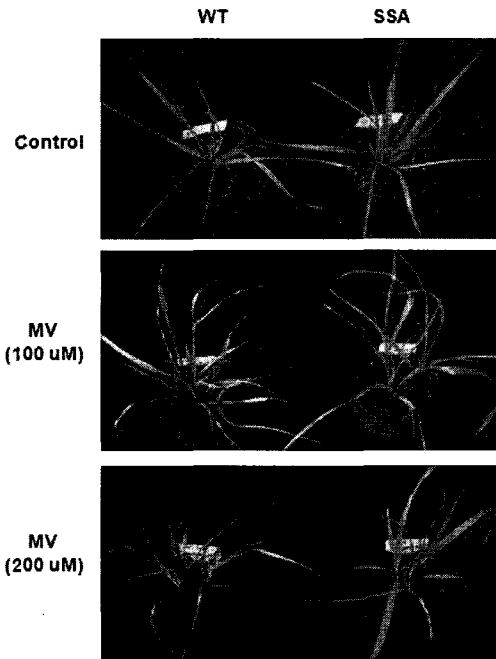


Fig. 5. Differential visible damages in the leaves of wild-type and SSA plants at 7 days after treatment with 0, 100 or 200  $\mu\text{M}$  MV. WT, wild-type tall fescue plants; SSA, transgenic tall fescue plants.

환경스트레스에 강한 내성을 지닌 신품종 톨 페스큐를 개발할 목적으로 산화스트레스에 의해 강하게 유도되는 SWPA2 promoter 하류에 CuZnSOD와 APX 유전자가 엽록체에 동시에 발현하도록 제작한 벡터를 *Agrobacterium*법을 이용하여 톨 페스큐에 도입하였다. Hygromycin이 첨가된 선발배지에서 내성을 가지며 재분화된 형질전환 식물체를 pot로 이식하여 기내 순화 시킨 후, Southern 분석을 실시하여 본 결과, 발현벡터의 T-DNA 영역이 형질전환 식물체의 genome에 성공적으로 도입되었음을 확인하였다. 형질전환 식물체 잎 절편을 산화스트레스와 중금속을 포함하고 있는 용액에 처리하여 엽록체의 손상 정도를 조사한 결과, 비형질전환체에 비해 형질전환체는 강한 내성을 나타내었다. 또한 유식물체 수준에서 MV를 처리하여 내성을 비교한 결과, 비형질전환체에 비해 형질전환체는 손상을 덜 받았다. 이와 같은 연구결과는 CuZnSOD와 APX 유전자를 엽록체에 동시발현시키는 기술이 다양한 환경스트레스에 대해 복합재해내성을 가지는 다양한 작물을 개발하는데 유용하게 이용될 수 있음을 나타낸 결과이다.

## V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비지원(과제번호 20070301034015)에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

## VI. 인 용 문 헌

1. Allen, R.D., R.P. Webb and S.A. Schake. 1997. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radical Biol. Med.* 23:473-479.
2. Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
3. Buckner, R.C., J.B., Powell and R.V. Frakes. 1979. Historical development. In: Buckner RC, Bush LP(eds) *Tall Fescue*. *Agronomy* 20:1-8.
4. Balestrasse K.B., G.O. Noriega, A. Batlle and M.L. Tomaro. (2006) Heme oxygenase activity and oxidative stress signaling in soybean leaves. *Plant Sci.* 170:339-346.
5. Dong, S. and R. Qu. 2005. High efficiency transformation of tall fescue with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 168:1453 - 1458.
6. Wang, Z.-Y. and Y. Ge. 2005 *Agrobacterium*-mediated high efficiency transformation of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *J. Plant Physiol.* 162:103-113.
7. Foyer, C.H., P. Descourviere, and K.J. Kunert. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17:507-523.
8. Kim, K.Y., S.Y. Kwon, H.S. Lee, Y. Hur, J.W. Bang and S.S. Kwak. 2003. A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Mol. Biol.* 51:831-838.
9. Kwon, S.Y., Y.J. Jeong, H.S. Lee, J.S. Kim, K.Y. Cho, R.D. Allen and S.S. Kwak. 2002. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ.* 25:873-882.
10. Lee, S.-H., D.-G. Lee, H.-S. Woo, K.-W. Lee, D.-H. Kim, S.-S. Kwak, J.S. Kim, H.G. Kim, N. Ahsan, M.S. Choi, J.K. Yang and B.-H. Lee. 2006. Production of transgenic orchard-grass via *Agrobacterium*-mediated transformation of seed-derived callus tissues. *Plant Sci.* 171:408-414.
11. Lee, S.-H., D.-G. Lee, H.-S. Woo and B.-H. Lee. 2004. Development of transgenic tall fescue plants from mature seed-derived callus via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Asian-Aust J. Anim. Sci.* 17:1390-1394.
12. Lee, H.S., K.Y. Kim, S.H. You, S.Y. Kwon and S.S. Kwak. 1999. Molecular characterization and expression of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Mol. Gen. Genet.* 262:807-814.
13. Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
14. Murray, M.G. and P.F. Tompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res.* 8:4321-4325.

15. Noctor, G. and C.H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:249-279.
16. Spangenberg, G., Z.Y. Wang and I. Potrykus. 1998. Biotechnology in forage and turf grass improvement. In: Frankel et al (Eds), *Monographs on theoretical and applied genetics*, Vol. 23, Springer Verlag, Heidelberg, p.192-211.
17. Tang, L., S.Y. Kwon, S.H. Kim, J.S. Kim, J.S. Choi, K.Y. Cho, C.K. Sung, S.S. Kwak and H.S. Lee. 2006. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature *Plant Cell Rep.* 25: 1380-1386.