내염성 국화 형질전환 계통 육성 및 저항성 검정과 세포특성 변화

강찬호 · 윤성중 · 한범수 · 이공준 · 최규환 · 박종숙 · 신용규

Development of salt-tolerant transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) lines and bio-assay with a change of cell specificity

Chan Ho Kang · Seung Jung Yun · Bum So Han · Gong Joon Lee · Kyu Hwan Choi · Jong Suk Park · Yong Kyu Shin

Received: 12 November 2010 / Accepted: 15 December 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Recently the increasing of vinyl and green houses and development of reclaimed land including Saemangeum induced the need for breeding salt-tolerant crops which can survive and grow in high salinity soil. So we try to develop salt-tolerant transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*.) lines by using anti-porter gene *TANHX* and *HVNHX*. Through marker selection and plant regeneration step, we could get 284 putative transgenic chrysanthemum lines. On selected putative transgenic plants, 40 candidates were used for genetic analysis and 30 lines could be made up of target size band on PCR, so about 75% of marker selected lines were decided as real transgenic lines. Selected 284 transgenic lines were also used for salt-tolerance test as a range of NaCl 0.2 ~ 1.2% (300 mM). As a result of salt-tolerance test, 15 selected transgenic lines could live and grow on the continuous supply of 0.8% (200 mM) NaCl solution and another 7 lines were could survive under 1.2% (300 mM) NaCl solution. This salt-tolerant transgenic lines under salt stress also lead a cell alternation especially a guard cell. A

stressed guard cell be swelled and grow larger in proportion to NaCl concentration. TTC test for cell viability on transgenic chrysanthemum lines pointed out that more strong salt-tolerant lines can be live more than another under same salt stress. The numerical value of strong salt-tolerant 7 transgenic lines were 0.206 ~ 0.331 under 1.2% NaCl stress, and then it's value is more larger than middle salinity lines' 0.114 ~ 0.193 and non-transgenic's 0.046. And the proline contents as indicated stress compound also pointed out that *HVNHX* introduced salt-tolerant transgenic lines were less stressed than other under same salt stress. The contents of strong salt-tolerant transgenic lines were 2.255 ~ 2.638 mg/kg and it is much higher than that of middle salinity lines' 1.496 ~ 2.125.

Keywords Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*), Salt-tolerance, *TANHX*, *HVNHX*, Transgenic

서론

최근 시설재배 면적의 급격한 증가와 새만금 간척지 개발 등 내염성 작물 육성 필요성이 급격히 증가하고 있다. 원예작물의 경우 재배면적 76,453 ha 중 52,949 ha가 시설 재배면적에 해당되고, 반복된 비료와 농약의 투입 등으로 염류집적이 문제되고 있는 시설재배지가 급격히 증가하고 있는 상황이며 새만금 간척지의 경우 총 개발면적 28,300 ha의 30% 해당하는 8,490 ha가 농업 용지로 개발되고 이외의 산업, 관광 및 주거단지 에서도 내염성 원예작물의 수요가 지속적으로 발생될 것으로 예상되어 이에 대한 대비가 필요하다 (Boyer 1982; Ashraf 1999). 특히 국

C. H. Kang (✉) · G. J. Lee · K. H. Choi · J. S. Park · Y. K. Shin
전라북도농업기술원 작목개발팀
(Crop development team, Jeollabukdo Agricultural Research & Extension Services, Iksan 570-703, KOREA)
e-mail: kangho68@korea.kr

S. J. Yun
전북대학교 생물자원과학부
(Division of Biological Resources Science, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)

B. S. Han
농촌진흥청 국립농업과학원 기능성물질개발과
(National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, KOREA)

화 (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura)는 재배면적 및 경제적 규모면에서의 생산액이 국내 1~2위를 기록하고 있는 중요 화훼작물이며 세계적으로도 소비량이 2위인 절화작물로서 (재배면적 : ('00) 732 → ('06) 805 ha; 생산액 : ('00) 562 → ('06) 915 억원) 수요 확대를 위한 면적 증가와 국화 재배시의 현안 애로사항을 해결하고 국토의 효율적 이용을 통하여 농가의 소득과 국부의 창출을 증대시키기 위해서 내염성을 포함한 내재해성 품종육성이 필요하다. 특히 국화는 로열티 문제 등으로 신품종의 육성이 매우 절실하나 주요 육종 방식이 교배에 의존하고 있어 품종 육성의 한계를 극복하지 못하고 있는 실정인데 최근 전통적인 작물 육종방법을 보완, 발전시키기 위하여 형질전환기술이 활발히 이용되고 있다. 그 결과 유전자변형농산물 (LMO)의 상업화와 재배면적이 급속히 증가하고 있으며 세계적으로 22개국이 LMO의 재배를 승인하였고 LMO 종자의 종자시장 점유율은 22%에 달하고 있다. 식량작물의 경우는 LMO에 대한 소비자의 선호도가 낮은 단점이 있으나 화훼 작물은 LMO에 대한 소비자의 거부감이 낮아 실용화가 용이한 장점을 가지고 있다. 우리나라에서는 농촌진흥청을 중심으로 많은 수의 국화 품종이 개발되어오고 있으나 재배농가의 선호도를 완전히 충족시키지 못해 시장에서 주요하게 거래되고 있는 품종의 상당수가 외국에서 육종된 품종들이 차지하고 있으며 거의 대부분의 육종방식이 교배를 바탕으로 하는 전통육종에 의존하고 있어 유전적 다양성의 한계를 쉽게 넘어서지 못하고 있는 실정이다. 이러한 이유들로 해서 최근에 획기적인 선호품종 개발을 위한 효율적이고 다양한 시도가 이루어지고 있는데 특히 분자육종은 기존의 유익한 형질들을 유지하면서도 단일 유전자의 도입을 통하여 원하는 특성을 특정해서 단시간 내에 빠르게 개량할 수 있는 장점으로 최근 다양한 유전자를 이용한 여러 가지 시도들이 이루어지고 있는 분야이다. 과거 10 여년 전까지는 국화의 형질전환이 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 기술의 개발에 집중되어 왔으나, 최근에는 형태적 생리적 변화, 조기개화, 무촉지성, 내병성, 내충성 등 도입된 유전자의 형질발현에 초점을 맞추어 실질적인 형질개량을 목적으로 하는 시도들이 이루어지고 있다 (Takatsu et al. 1999; Mitouchkina and Dolgov 2000; Kubo et al. 2006; Han et al. 2007). 시험에 사용된 내염성 유전자 *TANHX*, *HVNHX* (Na/H⁺ antiporter)는 전북대학교 윤성중 교수팀이 개발한 유전자로 세포내에 축적된 염 이온 등을 능동수송으로 세포 밖으로 배출시키는 기작을 가지고 있는 것으로 확인되었으며 (Nase et al. 1997; Apse et al. 1999; Hamada et al. 2001; Zhang et al. 2001; Otha et al. 2002; Shi and Zhu 2002; Tian et al. 2006). 미생물 및 벼에서의 유전자 기능 확인을 통하여 생물체 내에서 유효하게 작용할 수 있음이 확인되었다. 이에 anti-porter 유전자인

TANHX, *HVNHX* 유전자를 국화에 도입하고 도입된 유전자의 기능 확인 및 이에 따른 생물검정을 통하여 내염성 향상정도를 구명하는 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

형질전환 국화 품종

시장성과 사용목적 그리고 조직배양과 형질전환 효율성 등을 고려하여 대상재료를 선택 하였는데 standard type의 Paekma, Shuho-no-chikara, Zinba 그리고 spray type인 Pinkpride와 Puma 등 5품종이 형질전환 대상재료로 사용되었다.

유전자

실험에 사용한 *TANHX*, *HVNHX* (Na/H⁺ antiporter) 유전자는 내염성 기능을 강화시키는 유전자로 (Nase et al. 1997; Apse et al. 1999; Hamada et al. 2001; Zhang et al. 2001; Otha et al. 2002; Shi and Zhu 2002; Tian et al. 2006). 전북대학교 윤성중 교수팀이 개발한 유전자를 분양받아 사용하였으며 식물형질전환 vector인 pGA 643에 연결 35S promoter에 의하여 식물에서 발현이 가능하며 kanamycin 유전자에 의하여 선발이 가능하도록 조작되었다. 작성된 유전자 cassette는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain에 형질전환하여 식물체 형질전환에 사용하였다.

재해저항성 형질전환 식물체 육성을 위한 형질전환

국화 형질전환은 *Agrobacterium*-mediated 형질전환과 (Cough and Bent 1988; Sasidharanpillai et al. 2004) particle bombardment 방법이 (Tan et al. 2005) 동시에 사용되었는데 *Agrobacterium*-mediated 형질전환은 *TANHX*-LBA4404, *HVNHX*-LBA4404를 YEP 배지에서 O.D.₆₂₀=0.5가 될 때까지 48시간 동안 배양한 후 MM과 IM 배지로 옮겨 각각 24시간 동안 배양하여 활성화 시킨 후 acetosyringone이 첨가된 활성배지로 계대하여 6시간 동안 배양한 용액을 1/30 으로 희석시켜 멸균된 흡지에 도포하고 형질전환 대상 재료인 국화의 줄기, 잎과 72시간 동안 공동 배양하여 형질전환 하였다. particle bombardment 방법은 유전자를 담은 vector를 추출 분리하여 1.0 μ m 직경의 gold particle에 coating한 후 target 거리 9 cm에서 helium 가스 압력 1,100 psi로 분사하여 형질전환 하였다 (Table 1). 형질전환체의 선발은 1차적으로 Kanamycin 50 mg/L를 선발마커로 하여 캘러스 상태에서 이루어 졌으며 선발된 캘러스로부터 식물체를 재분화하여 기내 및 토양순화 시킨 후 잎을 채취하여 Plant DNA preparation kit (Corebio co.)를 이용하여 genomic DNA

를 분리한 후 PCR을 통하여 형질전환 식물체를 확인하였다.

PCR 분석

PCR 분석은 ASTEC PC808 gradient PCR 기종으로 실시하였으며 Primer는 Forward : GATCTGATTGAAGCTTCCCGC GTCT, Reverse : GGAGACACTCGGTACCGTTGTAAGTGA 로 구성하였고 PCR 조건은 Pre-denature 94°C 4 min. 후 Denature 94°C 1 min., annealing 58°C 1 min extension 72°C 2 min.을 35 cycle 반복하고 last extension을 10 min. 실시하였다.

형질전환 식물체 배양 및 형질전환 식물체 재분화

국화의 형질전환 식물체 배양은 3%의 sucrose가 포함된 MS salt 배지에서 2,4-D 1.0 mg/L 성장조절제가 함유되고 300 mg/L의 cefotaxime과 50 mg/L의 kanamycin이 포함된 선발배지 상에서 *Agrobacterium tumefaciens*에 의해서 형질전환된 개체가 분화되어 callus가 형성될 수 있도록 유도하였는데 선발 마커를 통하여 분화된 캘러스가 형성된 후에는 3%의 sucrose가 포함된 MS salt배지 (Murashige and Skoog 1962)와 1.0 mg/L naphthalene acetic acid와 1.0 mg/L benzyl-adenine이 함유되고 300 mg/L의 cefotaxime과 50 mg/L의 kanamycin이 포함된 국화 형질전환식물체 재분화 배지로 분열하고 있는 캘러스를 계대하여 shoot를 유도시키고 shoot가 유기된 식물체를 성장조절제 무 첨가 MS 배지로 전환하여 발근시킨 다음 토양 순화를 실시하여 만들어진 식물체를 대상으로 유전분석을 실시하였다.

형질전환 식물체 내염성 생물검정

형질전환 계통의 내염성 향상 정도를 확인하기 위하여 내염성 생물검정을 실시하였다. 생물검정은 크게 실내검정과 실외검정으로 구분하여 실시하였는데 실내검정은 다시 형질전환체의 잎을 대상으로 1.2% NaCl 수용액에 침지시킨 후 세포 고사 정도를 관찰하는 Leaf salt-tolerance test와 (Lim et al. 2007) 형질전환 식물체를 1.2% NaCl 수용액이 들어있는 플라스크에 침지시키고 상대적인 활력도를 비교하는 NaCl solution soaking test로 구분하여 실시하였다. 실외검정은 기내에 있는 형질전환 식물체를 4주간에 걸쳐 Jiffy 7 포트에 토양 순화시킨 후 NaCl 수용액을 0.2 (50 mM) ~ 1.2% (300 mM) 농도로 48시간 주기로 50 ml 씩 8주간 저면 관수하여 염에 대한 내성 향상 정도를 관찰하였으며 염액 관수 제거 후 회복여부를 관찰하기 위하여 2주간 무염수를 공급하면서 잎의 위조회복 및 식물체 분화 재생 여부를 관찰하였다.

전자현미경 관찰

전자현미경은 JEOL, SEM-5410-LV 모델을 사용하여 세포의 기공특성 등 식물체의 표층 형태 변화를 관찰하였다. 샘플은 스트레스 처리가 완료된 잎을 채취하여 0.4×0.4 cm로 절단한 후 2% aldehyde 용액에 2시간 전고정 한 후 phosphate buffer로 20분씩 3회 수세한 다음 2% osmium tetroxide로 2시간 후고정하여 phosphate buffer로 20분씩 3회 수세한 시료를 에탄올 (50, 70, 80, 90, 95, 100%)로 탈수하였다. 탈수된 시료는 100% isoamyl acetate에 치환시켜 critical point dryer로 임계 건조시키고 gold coating 한 후 주사전 자현미경 (SEM : JSM-5410LV)으로 관찰하였다.

TTC 측정

살아있는 세포를 검정 확인하기 위하여 분광광도계 SHIMADZU UV-Visible 1650 PC를 이용하여 TTC 검정을 실시하였다. 우선 직경 7 mm Leaf disc 2개를 만들고 0.08% TTC 용액 3 ml에 암상태로 20시간 동안 정치시키고 3 ml 95% EtOH을 첨가하고 끓여서 알코올을 발산시킨 후 다시 95% EtOH 3 ml를 첨가시킨 후 vortex 하고 425 nm 파장에서 분광광도계로 측정하였다.

Proline 함량측정

재해에 대한 저항성 축적물질인 proline 함량을 측정하여 세포내 저항성 증진 정도를 비교하였다. 분석대상은 줄기, 잎, 뿌리 등 식물체 부위 중 가장 높은 proline 함량 변화를 나타낸 줄기를 대상으로 하였으며 분석기기는 분광광도계 SHIMADZU UV-Visible 1650 PC를 사용하였다. 분석방법은 줄기 1 g을 액체질소로 마쇄하고, Nin hydrin과 acetic acid 혼합용액 2 ml로 30분간 끓인 후 toluene 2 ml를 첨가하여 520 nm 파장에서 분광광도계로 측정하였다.

결과 및 고찰

내염성 형질전환 식물체 육성을 위한 형질전환 및 형질전환체 선발

내염성 국화 형질전환 식물체 육성

국화 형질전환은 Table 1과 같이 시행하였다. *Agrobacterium*-mediated 형질전환과 particle bombardment법을 사용하여 형질전환 하고 형질전환 선발 마커인 kanamycin 50 mg/L로 첨가한 선발배지에서 형질전환된 캘러스를 분리한 결과 *TANHX* 유전자를 도입한 국화 수방력 (Shuho-no-chikara) 과 핑크프라이드 (Pinkpride) 품종에서 각각 128개체와 67

Table 1 The transformation condition for chrysanthemum

Methods of transformation	Agrobacterium culture	Media for Selection	Inoculation
<i>Agrobacterium</i>	YEP 1day→ MM 1day → IM+As broth 6 hr	MS+PPT 5 + cefotaxime 300 mg·L ⁻¹	30 times for 72 hrs.
Gene-gun	Vacuum(inches Hg)	Target Distance (Cm)	Helium Pressure (psi)
	28	9	1,100
			Particle Size (μ)
			1.0 gold

※ MM medium was composed of K-buffer 10 ml, M-N solution 20 ml, CaCl₂·2H₂O (1% W/V) 1 ml, 20% glucose (W/V) 10 ml, 0.01% FeSO₄ (W/V) 10 ml and 20% (NH₄)₂SO₄ (W/V) 2.5 ml

※ IM buffer was made of 40 mM MES buffer (pH 5.3) 40 ml, 10 mM glucose, 50% glycerol 10 ml and Acetosyringone 2 ml with MM medium

Table 2 The production of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) transgenic plants which resistive to salt by culture media selection

Gene	Variety of Chrysanthemum	No. of transgenic calli(ea)	No. of plantlet transgenic plants(ea)
<i>TANHX</i>	Shuho-no-chikara	128	48
	Pinkpride	67	22
	Paekma	160	48
<i>HVNHX</i>	Shuho-no-chikara	284	68
	Zinba	286	80
	Puma	420	124

Marker selection

Plant regeneration

Transgenic plant

Soil acclimation

Fig. 1 The production of soil acclimated *HVNHX* transgenic chrysanthemum plants

※ Used variety of chrysanthemum was Paekma and transformation was done according to table 1

개체의 선발 마커 저항성 캘러스가 분리되었으며 이 캘러스를 재분화 배지로 치상하여 식물체로 분화시킨 결과 각각 48개와 22개의 완전한 형질전환 개체가 분리되었다.

또한 *HVNHX* 유전자를 백마 (Paekma) 등 4품종에 형질전환 시킨 결과 백마 (Paekma) 품종에서 160개의 선발 마커 저항성 캘러스와 48계통의 재분화 형질전환 식물체가 선발되었으며 수방력 (Shuho-no-chikara)은 284개체와 68계통 신마 (Zinba)는 286개체와 80계통 그리고 푸마 (Puma) 품종에서는 각각 420개체의 저항성 캘러스와 124계통의 식물체가 재분화 선발되었다 (Table 2). 이렇게 기내 재분화한 식물체를 기내 순화 과정과 토양 순화과정을 거친 결과 최종적으로 284개체의 형질전환체가 외부 순화되어 유전분석과 생물검정의 재료로 사용되었다 (Fig. 1).

순화된 계통들 중 40개체를 우선적으로 선발하여 PCR 검정을 실시하여 유전자 도입여부를 확인하였다. PCR 분석 결과 30계통에서 2,500 base pair 길이의 target band가

확인되어 75%의 배지 선발 성공률이 확인되었다 (Fig. 2).

재해저항성 형질전환 식물 계통 생물검정

내염성 형질전환 계통의 Leaf salt-tolerance test 및 NaCl solution soaking test

내염성 유전자 도입 형질전환 개체의 선발 기간을 단축시키고 선발의 효율성을 높이기 위해서 형질전환 대상개체에 대한 실내검정을 실시하였다. 검정은 크게 형질전환체의 잎을 NaCl 수용액에 침전시키고 갈변 정도를 관찰 상대적 고사정도를 측정하는 Leaf salt-tolerance test와 식물체 전초를 NaCl 수용액에 담그고 식물 상태를 관찰하는 NaCl solution soaking test를 동시에 실시하였다.

검정 결과 비형질전환체에 비해 형질전환 식물체의 잎은 NaCl 1.2% 수용액에 침지한지 4주 후에도 거의 고사되지 않고 원형 상태를 유지하고 있어 내염성 기작이 세

Fig. 2 The genetic analysis of *HVNHX* transgenic chrysanthemum plants by PCR

Classification		Leaf anti-salinity test	NaCl solution soaking test		
			Need days for death	Picture	
				Plant	Root
Control (Non-transformant)			26
Transgenic lines	JB-CP-AS 28		52
	JB-CP-AS 43		48
	JB-CP-AS 76		56

Fig. 3 The leaf salt-tolerance and NaCl solution soaking test of *HVNHX* transgenic lines (Variety : Paekma and zinba) under supply of 1.2% NaCl solution

※ For leaf salt-tolerance test cut leaf of transformants were soaked with 1.2% NaCl sol. for 4 weeks and for NaCl soaking test transformant lines were soaked with 1.2% NaCl sol. for 8 weeks

포 수준에서 이루어지고 있음이 확인되었고 식물체 전초를 1.2% NaCl 수용액에 침지시킨 상태에서 고사에까지 이르는 기간도 비형질전환체의 26일에 비하여 48~56일로 최대 2.2배까지 연장되었다. 또한 식물체 뿌리 발달이나 세포고사를 관찰한 결과 비형질전환체에 비해 고사 정도가 낮고 활발하게 성장하는 특성을 보여 염에 대한 내성이 증가하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

염에 대한 내성을 보다 실질적으로 확인하기 위하여 토양 순화 과정을 거쳐 Jiffy pot에 이식된 형질전환 식물체를 대상으로 주기적으로 NaCl 수용액을 농도별로 관수한 결과 NaCl 0.8% (200 mM) 수용액을 8주간 관수한 상태에서도 생장이 가능한 중 내염성 8계통이 선발되었으며 (Fig. 4) 같은 조건에서 1.2% (300 mM) NaCl 수용액을 관수한 상태에서도 생장이 가능한 강 내염성 7계통이 또한 선발되었다 (Fig. 5).

염처리에 의한 식물체의 특성변화를 세포 수준에서 해석하고자 전자현미경을 2,000배 수준으로 하여 염농도 처

Fig. 4 The bioassay of salt-tolerance test for *HVNHX* transgenic chrysanthemum lines (Used variety : Paekma and puma) under supply of 0.8% NaCl solution for 8 weeks : 8 lines were selected through bioassay

Fig. 5 The bioassay of salt-tolerance test for *HVNHX* transgenic chrysanthemum lines (Used variety : Paekma and Puma) under supply of 1.2% NaCl solution for 8 weeks : 7 lines were selected through bioassay

리별 형질전환체와 비형질전환체의 기공구조 변화를 관찰하였다. 대체적으로 염 처리 농도가 증가할수록 공변 세포가 비후화 되는 특성이 나타났는데 세포내 수분 손실 억제와 구조강화에 의한 세포 파괴를 최소화하기 위한 방어적 현상으로 추정하고 있으며 비후화 정도를 비교해 볼 때 형질전환 식물체의 비후화 정도가 비형질전환체에 비해 강하게 나타나 염에 대한 내성이 강화된 원인이 세포조직의 치밀도 증가와 일정정도 연계되어 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

식물이 스트레스에 대항하기 위하여 분비하는 (Aspinall and Paleg 1981; Hareet al. 1988; Lutts et al. 1996; Fariba and Ali 2005) 아미노산인 proline의 함량을 형질전환체와 비형질전환체간 비교하고 형질전환 계통별로 비교 측정된 결과는 Figure 7과 같다. 측정 결과 비형질전환체인 control

Fig. 6 The change of guard cell with continuous supply of 0.8% NaCl solution for 8 weeks : Through electron microscope (JEOL SEM 5410 LV, 2000 times) research, can see swelled and bigger guard cells of *HVNHX* transgenic plants (Used variety : Paekma)

의 Proline 함량이 상대적으로 높게 측정되었는데 이는 비형질전환 식물체의 경우 염에 대한 저항 기작이 없어서 높은 스트레스를 받고 여기에 대응하기 위하여 상대적으로 많은 양의 proline을 분비한 것으로 판단되며 형질전환 계통 간 비교에서는 강 내염성 형질전환 계통의 proline 함량 수치가 NaCl 처리 농도가 높아질수록 증가하는 경향을 나타내어 강 내염성 7계통은 1.2% NaCl 처리에서 2.255 ~ 2.638 mg/g의 proline 농도로 중 내염성 형질전환 계통의 1.496 ~ 2.125에 비해 높게 형성되었다. 염 처리 후 세포의 생존정도 비교를 통한 내염 스트레스에 대한 저항성 정도를 측정하고자 TTC검정 (Iborra et al. 1992)을 실시한 결과 강 내염성 계통의 TTC 수치가 높게 나왔으며 NaCl 처리 농도가 높아질수록 TTC 수치가 낮아지는 경향이었으나 강 내염성 7계통은 1.2% NaCl 처리에서도 0.206 ~ 0.331로 비형질전환체의 0.046, 중 내염성 계통의 0.114 ~ 0.193에 비해 높은 세포생존 비율을 나타내었다 (Table 2).

Fig. 7 The proline (as a indicated compound) contents of *HVNHX* chrysanthemum transgenic lines according to NaCl concentration (0.8 ~ 1.2%)

Table 2 The cell viability (TTC) test on *HVNHX* transgenic chrysanthemum lines by using spectrophotometer SHIMADZU UV-Visible 1650 PC

Classification			Viability (A _{485nm})		
			NaCl 0.6%		NaCl 1.2%
T r a n s g e n i c	control(Non-transgenic)		0.230	0.082	0.046
	Strong salt-tolerant Lines	JB-CP-AS 28	0.407	0.395	0.331
		JB-CP-AS 43	0.412	0.342	0.296
		JB-CP-AS 48	0.388	0.314	0.235
		JB-CP-AS 53	0.402	0.340	0.278
		JB-CP-AS 55	0.342	0.286	0.224
		JB-CP-AS 68	0.390	0.328	0.293
		JB-CP-AS 76	0.364	0.315	0.206
	Mid salt-tolerant Lines	JB-CP-AS 3	0.267	0.264	0.128
		JB-CP-AS 15	0.260	0.226	0.142
		JB-CP-AS 23	0.286	0.232	0.169
		JB-CP-AS 24	0.290	0.260	0.176
		JB-CP-AS 26	0.290	0.280	0.191
		JB-CP-AS 29	0.304	0.190	0.114
		JB-CP-AS 34	0.284	0.248	0.193
		JB-CP-AS 39	0.246	0.265	0.185

적 요

최근 시설재배의 증가나 새만금 간척지의 개발 등 염류 농도가 높은 토양에서의 작물 재배에 대한 수요가 점차적으로 증가하고 있는 상황에서 고염환경 하에서 세포내로 주입된 염 분자를 제한된 구역으로 격리하여 염류내성을 주도록 하는 anti-porter 유전자 *TANHX*, *HVNHX*를 우리나라 주요 화훼작물이며 수출유망 작물인 국화로 도입하는 분자유종이 백마 등 5품종에 대하여 이루어졌다. 선발 마커를 이용한 배지선발 과정을 통하여 선발된 기내 식물체 390개체를 대상으로 토양 순화를 거쳐 284계통의 국화 형질전환체가 획득되었으며, 얻어진 식물체 중 임의로 40계통을 선발하고 PCR을 거쳐 진성 여부를 확인한 결과 30계통에서 target band가 검출되어 75%의 배지선발 성공률을 나타내었다. PCR 분석 선발 계통을 포함하여 토양 순화된 284계통을 대상으로 직접적으로 NaCl 0.2~1.2% (300 mM) 범위로 내염성 생물검정을 실시한 결과 NaCl 0.8% (200 mM) 농도에서도 생존 및 생장이 가능한 15계통이 선발되었으며 이중 7계통은 NaCl 1.2% (300 mM) 내에서도 생존이 가능하였다. 내염성 특성형질 도입을 위하여 anti-porter 유전자 *HVNHX*가 도입되어 선발된 형질전환 계통의 스트레스 저항성 정도 및 세포 형태적 특성변화가 관찰되었다. 선발된 계통은 NaCl 1.2% (300 mM) 처리 생존가능 7계통을 포함하여 NaCl 0.8% (200 mM) 관수 처리 하에서 생존 및 생장이 가능한 15계통이었다. 세포형태 특성은 전자현미경 (SEM)을 이용하여 형질전환체 및 비 형질전환체의 공변세포를 염 처리 후 관찰함으로써 이루어졌는데 형질전환체, 비형질전환체 모두 무처리에 비해 NaCl 처리한 식물체의 공변세포의 두께가 두꺼워지고 조직 치밀도가 증가하였으며 형질전환체의 경우 비 형질전환체에 비해 두꺼워지는 정도나 조직의 치밀도 증가 정도가 높아 염에 대한 내성이 강화되었음을 알 수 있었고 염 처리 후 세포의 생존정도 비교를 통한 내염 스트레스에 대한 저항성 정도를 측정하고자 TTC 검정을 실시한 결과 강 내염성 계통의 TTC 수치가 높게 나왔으며 NaCl 처리 농도가 높아질수록 TTC 수치가 낮아지는 경향이었으나 강 내염성 7계통은 1.2% NaCl 처리에서도 0.206~0.331로 비형질전환체의 0.046 중내염성 계통의 0.114~0.193에 비해 높은 세포생존 비율을 나타내었다. 또한 식물이 스트레스에 대항하기 위하여 분비하는 아미노산인 Proline의 함량을 계통별로 측정할 결과 강 내염성 형질전환 계통이 높게 나왔으며 NaCl 처리 농도가 높아질수록 증가하는 경향을 나타내어 강 내염성 7계통은 1.2% NaCl 처리에서 2.255~2.638 mg/kg로 중 내염성 형질전환 계통의 1.496~2.125에 비해 높게 형성되었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호 : 201004010610010010400) 지원에 의해 이루어진 것입니다.

인용문헌

- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285:1256-1258
- Ashraf M (1999) Breeding for salinity tolerance proteins in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13:17-42
- Aspinall D, Paleg LG (1981) Proline accumulation, physiological aspects. In: The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Paleg LG and Aspinall D (Ed.). Academic Press New York 206-240
- Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218:443-448
- Cough SJ, Bent A (1988) A simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-743
- Fariba A, Ali AE (2005) Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na⁺/K⁺ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under *in vitro* salt stress. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 1(4):212-216
- Hamada A, Shono M, Xia T, Ohta M, Hayashi Y, Tanaka A, Hayakawa T (2001) Isolation and characterization of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Mol Biol* 46:35-42
- Han BH, Suh EJ, Lee SY, Shin HK, Lim YP (2007) Selection of non-branching lines induced by introducing *Ls*-like cDNA into chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) "Shuho-no-chikara". *Scientia Horticulturae* 115: 70-75
- Hare PD, Cress WAJ, Staden V (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ* 21:535-554
- Iborra JL, Guardiola J, Montaner S, Canovas M, Manjon A (1992) 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for immobilized plant cells. *Biotechnology Techniques* 6:319-322
- Kubo T, Tsuru M, Tsukimori A, Shizukawa Y, Takemoto T, Inaba K, Shiozaki S (2006) Morphological and physiological changes in transgenic chrysanthemum *morifolium* Ramat. 'Ogura-nishiki' with *rolC*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 75:312-317
- Lim PO, Kim YM, Breeze E, Koo JC, Woo HR, Ryu JS, Park DH, Beynon J, Tabrett A, Buchanan Wollaston V, Nam HG (2007) Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants. *The Plant Journal* 52:1140-1153
- Lutts S, Kinet JM, Bouharmon J (1996) Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars

- differing in salinity tolerance. *Plant Growth Regul* 19:207–218
- Mitiouchkina TY, Dolgov SV (2000) Modification of chrysanthemum plant and flower architecture by *rol C* gene from *Agrobacterium rhizogenes* induction. *Acta Hort* 508:163–169
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nass R, Cunningham KW, Rao R (1997) Intra-cellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem* 272: 26145–26152
- Ohta M, Hayashi Y, Nakashima A, Hamada A, Tanaka A, Nakamura T, Hayakawa T (2002) Introduction of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Letter* 532:279–282
- Sasidharanpillai VK, Rachel WM, Vanga SR, Basuthkar JR, Manchikatla VR (2004) genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci* 166:731–738
- Shi HZ, Zhu JK (2002) Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* 50:543–550
- Takatsu Y, Nishizawa Y, Hibi T, Akutsu T (1999) Transgenic chrysanthemum (*Dendranthera grandiflorum*) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cineria*). *Sci Hort* 82:113–123
- Tan CP, Qin S, Zhang Q, Jiang P, Zhao FQ (2005) Establishment of a micro-Particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. *The Journal of Microbiology* 43:361–365
- Tian L, Huang CL, Yu R, Liang RF, Li ZL, Zhang LS, Ang YQ, Zhang XH, Wu ZG (2006) Overexpression *AtNHX1* confers salt-tolerance of transgenic tall fescue. *African Journal of Biotechnology* 5(11):1041–1044
- Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E (2001) Engineering salt tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12832–12836