Journal of Radiation Industry 4 (3) : 247~252 (2010)

감마선 돌연변이원에 의한 Osmotic 스트레스 저항성 토마토 계통 선발 및 특성

강 권 규[1,2,*] · 정 유 진[2]

[1]한경대학교 원예학과, [2]한경대학교 유전공학연구소

Selection and Characterization of Tomato Plants for Osmotic Stress Tolerance Derived from a Gamma Ray Irradiation

Kwon Kyoo Kang[1,2,*] and Yu Jin Jung[2]

[1]*Department of Horticulture, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea*
[2]*Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea*

Abstract - The present study has been performed to select the osmotic tolerant lines using polyethylene glycol (PEG 6000) through an *in vitro* and *in vivo* mutagensis with a gamma-ray. During the screening, we selected three mutant lines that seemed to confer elevated osmotic tolerance in high concentrations of PEG 6000. Fruits of these mutants (Os-HK101, Os-HK102 and Os-HK103) were increased to sugar concentration, L-glutamine acid, vitamin C content and lycopine content than those of the wild type. Also the chlorophyll contents were few decreased more in the three mutant lines than the WT plants. Our results suggest that the Os-HK101 is characterized as osmotic stress tolerance considering the sugar concentration and lycopine content. It is expected that the result of this study can be used for breeding more competitive species with respect to contents in sugar or functional chemicals from the selected osmotic resistant lines.

Key words : Gamma-ray, Osmotic tolerance, Sugar content, Lycopine

서 론

토마토(Tomato, *Lycopersicon esculentum* MILL)는 가지과 식물로 열대에서는 다년생이지만 온대지역에서는 1년생 식물로 재배된다. 남아메리카의 서부고원지대가 원산지이며, 우리나라에 도입은 1614년대일 것으로 추측하고 있다. 근래 들어 국민소득의 증가와 더불어 생식 위주에서 케찹, 소오스, 쥬스 등 가공용으로도 많이 이용되어 그 수요가 계속 증가하고 있는 실정이다. 따라서 몇몇 토마토 품종은 과실발육, 숙성, 대사물질 등을 분석하기 위한 탁월한 모델식물로 알려져 있다. 또한 토마토는 다른 가지과 식물들에 비해 게놈의 크기가 작고, 이배체 (930 Mb, n=12)로서 많은 형질들이 Mapping 되어 있으며, DNA markers 및 EST clone 등이 개발되어 있는 장점을 갖고 있다 (Emmanuel and Levy 2002). 2004년에 가지과 작물들의 게놈 Project가 국제 컨소시엄 형태로 시작되어, 토마토 Genome의 전 염기배열 분석이 2010년

* Corresponding authors: Kwon-Kyoo Kang, Tel. +82-31-670-5104, Fax. +82-31-670-5100, E-mail. kykang@hknu.ac.kr

현재 약 90% 완료된 상태이다. 이 중 30% 정도의 토마토 cDNA들은 애기장대와 벼에 유사성이 없는 토마토 특이성을 보이고 있으며, 이들 유전자의 대부분은 기능은 아직까지 밝혀지지 않고 있다(Fridman *et al.* 2000; Yamamoto *et al.* 2005). 최근 들어 벼 및 애기장대 등 게놈의 염기배열분석이 완료한 작물들은 Post게놈 연구의 일환으로 유전자의 기능연구에 Forward genetics과 Reverse genetics 방법을 사용하고 있다. 특히 돌연변이원에 의해 얻어진 Phenotypic mutant들은 유전자의 기능을 연구하는 좋은 소재로 이용되어, DB화하고 있다. 토마토의 경우, 약 1,000 Monogenic mutant들이 미국 켈리포니아 대학의 토마토유전자원센터에 (URL http://tgrc.uctavis.edu) 수집되어 있으며, 3,000개 이상의 돌연변이체들이 가지과 게놈 네트워크(http://Zamir.sgn.cornell.edu/mutants/)의 Web site에 정렬되어 있다(Menda *et al.* 2004). 그러나 토마토 게놈내에 기능유전자의 수가 약 30,000～35,000개 정도로 평가되고 있어, 현재의 돌연변이체들만으로는 기능분석 및 유전자원으로서 충분하지 않다. 따라서 많은 연구자들은 돌연변이원으로 EMS, X-ray, fast-neutron irradiation, transposable elements 및 T-DNA 등을 이용하여 많은 토마토 돌연변이체들을 육성하여 보고하였다(Hildering and Verkerk 1965; Knapp *et al.* 1994; Thomas *et al.* 1994; Meissner *et al.* 1997; Li *et al.* 2001; Emmanuel and Levy 2002; Menda *et al.* 2004). 본 연구에서는 토마토 자식계통 “HK101” 종자에 감마선 조사 후, M2 집단을 육성하고, PEG 저항성 돌연변이체를 선발하여 특성분석을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 감마선 조사에 의한 토마토 돌연변이 계통 육성

토마토 자식계통 “HK101”은 한경대학교 유전육종학 실험실에서 2002년부터 육성한 자식계통(S6)의 약 6,000립 종자를 이용하여 한국원자력연구원 방사선 과학연구소의 코발트 60 유래인 감마선을 각각 25, 50, 100 Gy 선량으로 조사하였다. 조사한 종자는 2일간 28°C에서 최아처리한 후, 128공 육묘 tray에 파종하여, 발아율, chlorophyll 변이 등을 조사하였다. M_1 식물체들은 발아 4주 후, 한경대학교 원예학과 육종포장 및 greenhouse에 휴간거리 3 m, 주간거리 35 cm으로 정식하였다. 관수 및 병해충 방제 등 토마토 비배관리는 농촌진흥청 원예특작과학원 토마토 표준재배법에 준하였다. 시비량은 N-12, P-11, K-11 (kg/10a)하였으며, 각 선량별 일부 식물체를 선정하여 수확과수, 과실 중량, 과형, 당도 및 열과를 조사하였다. M_2 종자의 육성은 감마선 처리 후, LD_{50}의 선량을 설정하여, M_1 식물체별로 1화방에서 3화방을 이용하여 수확하였다.

2. Osmotic 저항성 토마토 식물체 선발

돌연변이체 선발을 위한 공시 재료는 감마선 조사 유래 M_2 종자을 75% 에탄올에 30초간 표면소독 한 후, 3% 차염소산나트륨 용액에 30분간 처리하고, 멸균수로 2회 세척하여 무균조작에 사용하였다. Osmotic 스트레스 저항성 돌연변이체의 1차 선발은 10% PEG 6000을 함유한 MS 한천배지에 무균적으로 파종하여 뿌리 및 줄기 생육이 왕성한 개체를 선발하여 후보 돌연변이체로 선발하였다. 선발한 후보 돌연변이체는 순화한 후, 온실에서 생육시켜 계통별로 종자를 육성하여, 계통별 10립씩 10% PEG 6000을 함유한 MS 한천배지에 무균적으로 파종하여 Osmotic 스트레스 저항성을 보인 계통을 최종적으로 선발하였다.

3. Osmotic 저항성 계통의 특성분석

선발한 Osmotic 스트레스 저항성 계통(Os-HK101, Os-HK102, Os-HK103)의 종자는 2010년 3월 28일 파종하고, 16공 연결포트에 육묘 후, 5월 15일 190 cm 휴장에 휴간과 주간의 거리는 60 cm × 40 cm의 재배밀도로서 정식하였다. 재배는 노지지주재배로 하고, 비배관리는 농촌진흥청 원예연구소 토마토 표준재배법으로 하였다. 입모조사 후, 완숙과의 수확은 7월 20일부터 8월 25일까지 하여 평량한 후, −40°C에 동결하여 분석할 때까지 보관하였다. 당함량은 디지털 당도계(ATAGO. Digital refractometer)를 이용한 Brix 당도로, 산함량은 과즙 2 ml에 증류수 8 ml를 가한용액을 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.1이 될 때까지 적정한 후, 적정에 소모된 NaOH의 양을 이용하여 타르타르산의 함량으로 환산하였다. 카로테노이드 색소의 정량은 박 등(1997)이 보고한 방법을 수정하여 사용하였다. 동결샘플을 실온에 해동하여 믹서기로 마쇄한 후, 여액을 4°C에서 원심분리(7,000 rpm, 15 min)한 후, 침전물만을 회수하여 실온에서 증류수로 용해시켜, 일정량의 Acetone 첨가하여 색소성분을 추출 여과하였다. 여과한 Acetone 추출물을 회전진공증발 농축기로 농축하였다. 총 카로테노이드 함량은 diethyl ether를 Control 용매로 사용하여 UV-vis spectrophotometer (Shimadzu UV-160A, Tokyo, Japan) 460 nm에서 측정하여 계산하였다. L-glutamin산은 L-glutamin산 측정 kit (Toyobo co. Japan)를

Table 1. Characteristics of tomato fruits obtained to gamma ray irradiation

Radiation dose (Gy)	No. of plants	No. of harvested fruits	Weight of harvested fruits (g)	Weight of one fruit (g)	Sugar concentration (Brix)	Rate of cracking fruit (%)
0	20	59.8	406.6	6.8	8.81	13.7
25	70	57.6	403.2	7.0	8.88	17.7
50	67	54.7	333.7	6.1	8.71	16.8
100	77	50.6	293.5	5.8	8.90	14.2

사용하였다. 각 분석에서 당도, 산도, pH는 2회, 카로테노이드 색소는 4회 측정하여 평균치를 구하였다.

결과 및 논의

1. 감마선 조사에 의한 토마토 형질 변화

토마토 종자에 여러 선량으로 감마선을 조사하여 파종 및 정식 후, 수확에 이르기까지 순조로운 생육과정을 거쳐 과실을 수확하였다. 수확은 약 1개월 정도에 걸쳐 개체별로 과실 수확수, 과중, 당도 및 열과를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 개체별 과실 수확수를 살펴보면 50 Gy 이하의 선량구에서는 무처리에 비해 약간 감소하는 경향을 보였으나, 100 Gy 선량구에서는 큰 감소를 보였다. 1개 과실의 과중은 무 처리에 비해 50 Gy 및 100 Gy 조사구에서 약 15% 정도 감소하는 경향을 보였다. 과실에 대한 당도는 거의 모든 처리구에서 8.8～8.9 Brix의 오차 범위 내로 큰 변화를 보이지 않았다. 열과율은 조사 선량구 모두에서 무 처리구에 비해 증가하였다. 따라서 토마토 종자에 감마선을 조사하면, 당대 (M_1세대)에 영향을 주는 factor로 과실 수확수의 감소, 1과중의 감소 및 열과가 증가하는 현상이 나타났다. 또한 몇몇 조사한 항목에서도 무 처리에 비해 조사 선량구에서 표준오차 범위에서 존재하지만, 개체별로 살펴보면 감마선 조사에 의해 여러 형질에서 변화를 초래하였다. 그중에서 개체별 평균당도는 9 Brix가 넘는 개체들도 조사되었다. 따라서 감마선 조사가 토마토 유전변이 창출에 효과가 있다고 생각된다.

2. 토마토 Osmotic 스트레스 저항성 돌연변이 계통 선발

Osmotic 스트레스 저항성 개체를 선발하기 위하여, PEG 6000 농도를 저농도에서 고농도가 포함한 MS배지에서 생육상을 살펴본 결과 7%의 PEG 6000에서 뿌리 및 줄기생장을 현저히 감소되었다(Fig. 1A). 따라서 감마선 조사 유래 M_2종자 약 10,000립을 10% PEG 6000가 함유한 MS배지에 무균적으로 파종한 결과 파종한 종자의 약 90%는 발아가 되지 않았으며, 발아한 종자의 대부분은 뿌리 및 줄기생육이 되지 않아 결국 고사되었다(Fig. 1B). 그 중 뿌리 및 줄기 생장이 되어 온전한 식물체로서 전개된 개체를 후보 저항성 돌연변이체로 선발하였다. 선발된 후보 저항성 돌연변이체는 총 57개로 뿌리 및 줄기 생장에서 다양한 경향을 보였다(Fig. 1B, C). 선발된 57 후보 돌연변이체로부터 자식종자를 육성하여,

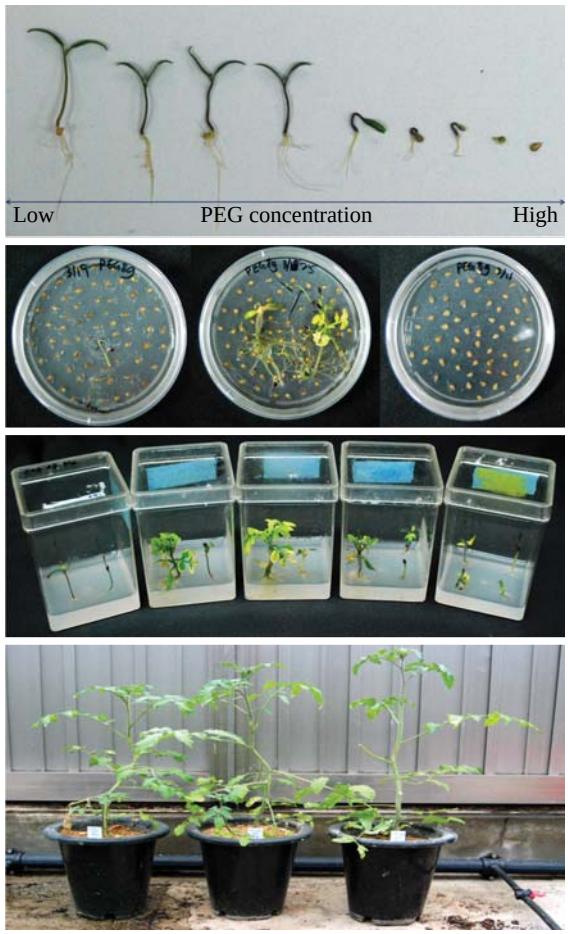

Fig. 1. *In vitro* selection of osmotic resistance mutant lines from M_2 generation seeds derived from a gamma ray irradiation. A: Tomato seedling to PEG concentration, B and C: Selection of osmotic resistance mutants, D: Acclimatization of osmotic resistance mutants.

계통별로 10립씩 10% PEG 6000가 함유한 MS배지에 무균적으로 파종한 결과 Osmotic 스트레스 저항성을 보인 Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103 등 3계통을 최종적으로 선발하였다(Fig. 1D). Osmotic 저항성 돌연변이체는 M_2 종자 10,000립에서 3식물체를 선발된 것으로 미루어 볼 때, 0.0003%의 빈도로 매우 낮은 선발을 보였다.

3. Osmotic 스트레스 저항성 계통 (Os-HK101, Os-HK102, Os-HK103)의 특성분석

Osmotic 스트레스 저항성 계통인 Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103을 대상으로 과실 생육을 녹색과 및 완숙과인 빨간 과실로 나누어 당도를 측정한 결과 Table 2와 같다. 선발한 3계통 중에서 당도는 녹색과 과실에서 완숙과 과실의 약 55% 수치를 보였으며, 녹색과 부터 완숙과에 이르는 기간은 약 일주일 정도로 완숙과에서 선발한 Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103 계통은 대조구에 비해 당도가 1～1.5 Brix 정도가 상승되었다. 그러나 당함유율(포도당/과당)은 당도에 비해 증가폭이 적게 나타났다. 토마토 과실에서 포도당과 과당의 비율은 과실의 숙기에 따라 거의 일정하게 유지되며, 완숙기에서 포도당의 비율이 약간 상승되는 경향을 보였다(Table 2). 선발한 3계통의 과실에서 맛의 성분을 결정하는 L-glutamine 산의 함유량을 측정한 결과 착색 정도에 따라 증가되었으며, 대조구에 비해 선발한 계통에서 15～50%의 증가를 보였고, 그 중 Os-HK101 계통이 가장 높게 나타났다(Table 3). 비타민 C 함유량은 선발한 품종이 대조구에 비해 높은 경향을 보였으며, 그 중 Os-HK103 계통이 완숙기에 가장 높게 나타났다(Table 4). 선발한 3계통에서 과실 숙기에 따라 클로로필, 라이코핀 및 황색색소류 등 색소류의 함량을 측정한 결과 Table 5와 같다. 클로로필 함량은 과실의 착색이 시작되면서부터 현저하게 감소되어 완숙과의 함량이 4.2～4.4 범위이었으며, 이와 반대로 리이코핀 함유량은 완숙과의 Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103계통의 과실에서 각각 171.8, 118.7 및 177.6으로 나타났다. 또한 Carotin 류 및 키산토필류를 포함한 황색 색소류는 3계통 모두에서 거의 유사한 비율로 증가하였다.

Table 2. Change of sugar concentration and rate of fructose/glucose during maturation period of fruits in osmotic tolerance lines derived from a gamma ray irradiation

Lines	Sugar concentration (Brix)		Rate of fructose/glucose (%)	
	Green fruit	Red fruit	Green fruit	Red fruit
Wild type	4.32	8.81	0.86	0.82
Os-HK101	4.61	9.78	0.88	0.90
Os-HK102	4.48	10.11	0.92	0.89
Os-HK103	4.36	9.98	0.89	0.91

Table 3. Change of L-glutamine acid content during maturation period of fruits in osmotic tolerance lines derived from a gamma ray irradiation

Lines	L-glutamine acid (mg)	
	Green fruit	Red fruit
Wild type	62.42	146.86
Os-HK101	68.78	219.41
Os-HK102	69.36	210.11
Os-HK103	64.38	169.98

4. Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103 계통의 Osmotic 스트레스 반응

Osmotic 스트레스 반응 실험을 하기 위해, Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103계통으로부터 성숙한 잎을 채취하여, 3% H_2O_2, 250 mM NaCl 및 10% PEG 용액에서 경시적으로 Chlorophyll 함량을 측정한 결과 대조구와 거의 유사하거나 약간 감소하였다(Fig. 2). 또한 선발한 계통들은 Osmotic 스트레스에 저항능력을 가지고 있으며,

Table 4. Change of vitamin C content during maturation period of fruits in osmotic tolerance lines derived from a gamma ray irradiation

Lines	Vitamin C (mg)	
	Green fruit	Red fruit
Wild type	26.34	23.61
Os-HK101	31.63	29.43
Os-HK102	27.81	26.54
Os-HK103	32.12	36.78

Table 5. Change of plant pigment content during maturation period of fruits in osmotic tolerance lines derived from a gamma ray irradiation

Lines	Chlorophyll (mg kg^{-1})		Lycopine (mg kg^{-1})		Yellow pigment (mg kg^{-1})	
	Green fruit	Red fruit	Green fruit	Red fruit	Green fruit	Red fruit
Wild type	25.4	4.2	2.3	93.0	7.1	14.0
Os-HK101	30.9	4.4	4.1	171.8	6.9	19.6
Os-HK102	54.7	4.2	0.3	118.7	10.4	27.1
Os-HK103	43.2	4.1	1.3	177.6	12.1	26.3

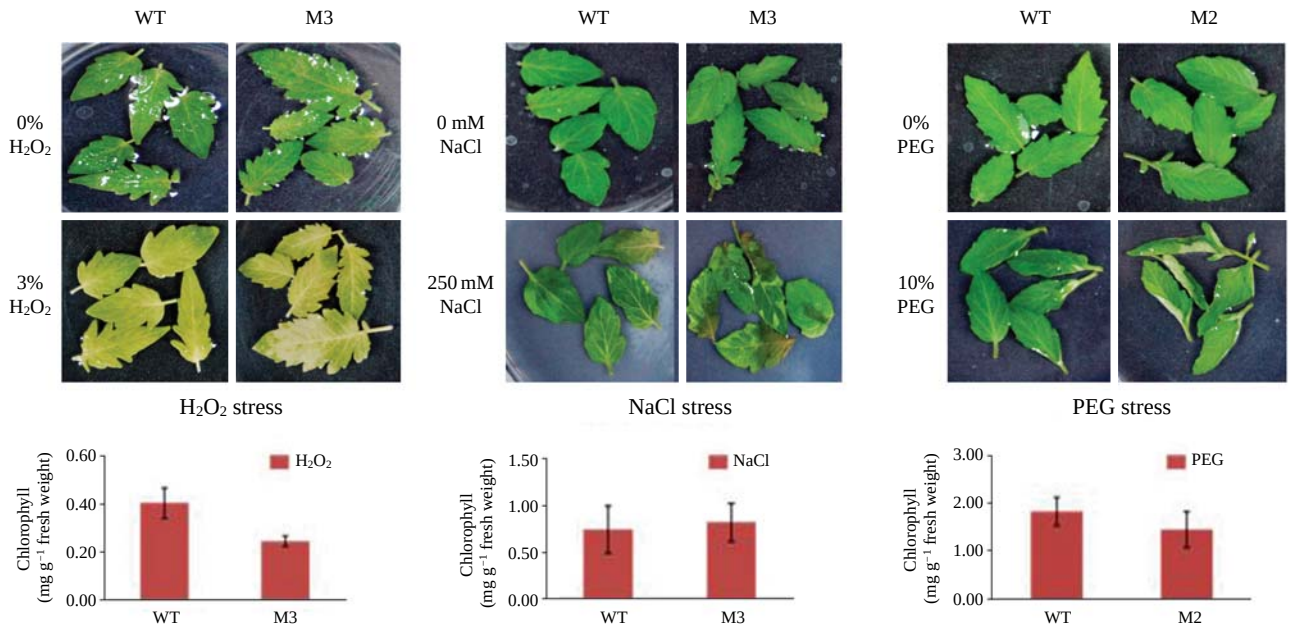

Fig. 2. Chlorophyll content of osmotic resistance mutant lines derived from a gamma ray irradiation. WT: wild type, M3: Os-HK103 line, M2: Os-HK102 line.

이를 통해 물 및 영양분의 이용이 증가될 수 있다고 생각된다. 따라서 본 실험에서 선발한 Osmotic 저항성 돌연변이 계통들(Os-HK101, Os-HK102, Os-HK103)은 궁극적으로 세포내 세포액의 삼투압 관련 유전자들의 돌연변이가 일어나, 물 및 영양분의 수용 및 공급에서 변화되어 과실내의 당도의 변화, L-glutamine 산, 비타민 및 Lycopine함량의 변화가 초래된 것으로 생각된다. 선발한 3계통들(Os-HK101, Os-HK102, Os-HK103)을 이용하여, 고당도, 고색소 및 고품질 토마토 품종육성을 위한 육종소재로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(총괄과제번호: 308020-5) 지원에 의해 이루어진 것입니다.

참 고 문 헌

박용곤, 강윤한, 이병우, 석호문. 1997. 저장중 호박분말의 카로테노이드 색소 변화. 한국식품영양과학회지. **26**(1):32-36.

Emmanuel E and Levy AA. 2002. Tomato mutants as tools for functional genomics. *Curr. Biol.* **5**:112-117.

Fridman E, Pleban T and Zamir D. 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:4718-4723.

Hildering GJ and Verkerk K. 1965. Chimeric structure of the tomato plant after seed treatment with Ems and X-rays. pp. 317-320. *In*: The Use of Induced Mutations in Plant Breeding, Pergamon Press, Oxford (Rep FAO and IAEA).

Knapp S, Larondelle Y, Robberg M. Furtek D and Theres K. 1994. Transgenic tomato lines containing Ds elements at defined genomic positions as tools for targeted transposon tagging. *Mol. Gen. Genet.* **243**:666-673.

Li X, Song Y, Century K, Straight S, Ronald P, Dong X, Lassner M and Zhang Y. 2001. A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. *Plant J.* **27**:235-242.

Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y and Levy A. 1997. A new model system for tomato genetics. *Plant J.* **12**:1465-1472.

Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y and Zamir D. 2004. In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant J.* **38**:861-872.

Thomas CM, Jones D, English JJ, Carroll BJ, Bennetzen JL, Harrison K, Burbidge A, Bishop GJ and Jones JDG. 1994. Analysis of the chromosomal distribution of transposon-carrying T-DNAs in tomato using the inverse polymerase chain reaction. *Mol. Gen. Genet.* **242**:573-585.

Yamamoto N, Tsugane T, Watanabe M, Yano K, Maeda F, Kuwata C, Torki M, Ban Y, Nishimura S and Shibata D. 2005. Expressed sequence tags from the laboratory-grown

miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom and mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in tomato cultivars. *Gene* **356**:127-134.

Van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G and Tanksley S. 2002. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant. Cell.* **14**:1441-1456.

Manuscript Received: August 11 2010
Revision Accepted: August 30, 2010