

감자 Sucrose Transporter 유전자의 벼 Genome 내로의 도입

백소현¹ · 유남희^{1,3} · 윤성중^{1,2*}

¹전북대학교 농업과학기술연구소, ²전북대학교 농과대학 생물자원과학부, ³(주)그린바이오텍 생명공학연구소

Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.) with Sucrose Transporter cDNA from Potato (*Solanum tuberosum* L.)

BAEK, So Hyeon¹ · YOO, Nam Hee^{1,3} · YUN, Song Joong^{1,2*}

¹Institute of Agricultural Sciences and Technology, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

²Faculty of Biological Resources Sciences, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

³Institute of Biotechnology, Greenbiotech Co., Ltd. Paju, 413-830, Korea

ABSTRACT The transport and allocation of photosynthetic assimilate is an important regulatory factor in plant productivity. In order to modify assimilate partitioning in rice, transgenic plants containing a potato sucrose transporter (SuT) gene were developed. Calli derived from rice seeds (*Oryza sativa* L. cv Dongjin) were cocultured with *A. tumefaciens* LBA 4404 harboring the SuT gene. Calli were transferred to MS medium supplemented with 50 mg/L hygromycin, 500 mg/L carbenicillin, 2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L NAA. After 2 weeks, hygromycin resistant shoots were obtained from the calli on the selection medium. Roots were induced from the putative transgenic shoots on rooting MS medium supplemented with 250 mg/L cabenicillin. Plant regeneration rate from the calli was about 150%. Stable incorporation of the potato SuT gene into rice genomic DNA was confirmed by PCR and Southern blot analysis.

Key words: Agrobacterium-mediated transformation, sucrose transporter, transgenic rice

서 론

다세포 생물은 자원과 정보의 세포간 분배를 통하여 생명 활동을 영위한다. 식물 잎은 태양에너지를 수집하여 동화산물을 합성하고 합성된 동화산물은 sucrose 형태로 각 조직세포에 공급된다. Sucrose는 탄소원자들이 산화적 공격으로부터 보호되어 비환원적이며 물질대사 작용에 민감하지 않기 때문에 식물에서 주요한 당 운반체로 선택되었으며 (Arnold 1968), 녹색 잎에서 합성된 sucrose는 체관부를 통해 수용액 상태로 비광합성기관에 이동하여 에너지원과 탄소원으로 이용된다 (Ward et al. 1998).

Sucrose의 이동은 막에 존재하는 sucrose 수송자에 의해

능동적으로 이루어지는데, 쌍자엽식물인 시금치 (Riesmeier et al. 1992), 감자 (Riesmeier et al. 1993), 담배 (Lemoine et al. 1999), 샬러리 (Noiraud et al. 2000), 애기장대 (Sauer and Stolz 1994; Stadler et al. 1999; Meyer et al. 2000) 등과 단자엽식물인 옥수수 (Aoki et al. 1999), 벼 (Hirose et al. 1997; Matsukura et al. 2000) 등에서 sucrose 수송자 유전자가 분리되어 유전자의 구조와 발현 조절 특성이 상세히 밝혀지고 있다.

식물세포의 세포막과 액포막에 존재하는 sucrose 수송자는 3가지 유형이 존재하는 것으로 알려져 있다. 첫 번째 형은 세포막에 존재하는 원형질막 유입 수송자로 당을 세포 안으로 흡수하는 기능을 하는 프로톤/당 공동수송자형 (proton/sucrose symporter type)이다. 두 번째 형은 액포막에 존재하는 액포막 수송자인데, 이 수송자는 세포질로부터 액포로 당을 수송하는 당/프로톤 역수송자 (sucrose/proton antiporter)이다. 또 다른 수송자형은 세포막에 존재하는 원형질막 유출 수

*Corresponding author. Tel 063-270-2508 Fax 063-270-2640
E-mail sjyun@moak.chonbuk.ac.kr

송자 (plasma membrane efflux carrier)로 체관 가까이에 존재하는 엽육세포로부터 체관으로 당을 배출하거나, 체관을 통해 이동된 당을 저장기관 (sink)으로 유출하는 형이다 (Brisikin et al. 1985).

Riesmeier 등과 Gahrtz 등은 감자와 질경이에서 분리한 sucrose 수송자를 진핵생물인 yeast에 형질전환하여 yeast에서 sucrose가 원활하게 흡수됨을 확인하였다 (Riesmeier et al. 1993; Gahrtz et al. 1996).

본 연구는 sucrose를 체관으로 적재하는 감자의 sucrose 수송자를 벼에 형질전환하여 sucrose 수송효율 변화에 따른 식물의 생리적 반응 특성을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

Callus 유도

농촌진흥청 호남농업시험장에서 분양받아 재배한 동진벼 성숙종자의 영을 제거하고 2% sodium hypochlorite에 50분간 교반하여 표면살균하였으며, 멸균수로 5회 세척한 후 2 mg/L 2,4-D가 첨가된 N₆ (Chu et al. 1975) callus 유도 배지에 15립씩 치상하였다. 25°C, 암조건에서 4주간 배양한 후 단단하면서도 잘 분리되는 callus를 분리하여 callus 유도배지에 옮겨 3일간 25°C, 암조건에서 전배양하였다.

Sucrose 수송자 분리 및 형질전환

실험에 사용된 감자의 sucrose 수송자 (sucrose transporter, SuT) 유전자는 감자의 total RNA를 이용하여 RT-PCR을 통해 분리하였다. 분리한 SuT 유전자를 포항공대에서 분양받은 ubiquitin promoter를 갖는 pGA 1611 vector에 재조합하여 (Figure 1) freezing-thawing 방법을 이용하여 *A. tumefaciens* LBA 4404에 도입하였다 (An et al. 1988).

pGA-SuT 유전자 재조합체가 도입된 *A. tumefaciens* LBA 4404를 4 mg/L tetracycline이 포함된 AB (3 g/L K₂HPO₄, 1 g/L NaH₂PO₄, 1 g/L NH₄Cl, 0.15 g/L KCl, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.012 g/L CaCl₂ · 2H₂O, 0.025 g/L FeSO₄ · 7H₂O, 5 g/L glucose) 액체배지에서 28°C, 암상태로

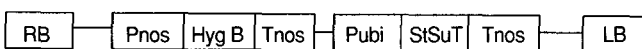


Figure 1. Partial structure of the binary vector, pGA-SuT, containing sucrose transporter (SuT) expression cassette. Abbreviations used are : Pnos, nopaline synthase promoter; Hyg B, hygromycin phosphotransferase gene; Tnos, polyadenylation signal of the nopaline synthase gene; Pubi, polyubiquitin gene promoter; StSuT, *Solanum tuberosum* sucrose transporter; RB, T-DNA right border; LB, T-DNA left border.

72시간 동안 진탕배양 (250 rpm)하였다. *Agrobacterium* 배양액을 원심분리하여 수확한 후 100 μM acetosyringone이 첨가된 AAM (75 mg/L glycine, 877 mg/L glutamine, 266 mg/L aspartic acid, 50 mg/L casamino acid, 65.5 g/L sucrose, 35 g/L glucose, NH₄NO₃와 KNO₃를 제외하고 2.74 g/L KCl이 첨가된 MS 기본배지, pH 5.2) 액체배지에 10배 희석하여 전배양한 callus를 30분간 접종하였다. *Agrobacterium*을 접종한 callus는 100 μM acetosyringone, 2 mg/L 2,4-D, 10 g/L glucose가 첨가된 N₆ 배지에 치상하여 21°C, 암상태에서 3일간 배양하였다 (Yoo and Yun 2000).

형질전환 식물체 선발

*Agrobacterium*과 공동배양한 callus를 500 mg/L carbenicillin, 40 mg/L hygromycin B, 2 mg/L 2,4-D가 첨가된 N₆ 배지에 옮긴 후 25°C, 암상태에서 배양하면서 형질전환체를 1차 선발하였다. 형질전환체 2차 선발은 1차 선발하여 증식한 callus를 500 mg/L carbenicillin, 50 mg/L hygromycin B, 1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L BA가 첨가된 N₆ 배지에 옮긴 후 25°C, 암상태에서 배양하며 실시하였다. 2차 선발배지에서 증식된 callus를 250 mg/L carbenicillin, 2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L NAA, 20 g/L sorbitol, 50 g/L sucrose가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 재분화 배지에 치상하고 25°C, 연속조명 조건에서 배양하였다. 재분화 배지에서 분화된 신탄초를 MS 기본배지에 옮겨 뿌리를 유도하고, 얻어진 식물체를 pot에 이식하여 온실에서 순화시킨 후 특성을 검정하였다.

형질전환 유전자 확인

SuT 유전자의 벼 genome 내로의 전이여부는 PCR과 Southern blot 분석을 통하여 조사하였다. Hong 등 (1993)의 방법을 이용하여 선발된 벼 형질전환체로부터 genomic DNA를 추출하고 genomic DNA와 감자의 sucrose 수송자 유전자 특이적 정방향 primer (5'-TCACTAAAGCTTATG GAGAATG-3')와 역방향 primer (5'-AAGTGGTACCTT CTCCTTCTTC-3')를 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응액 25 μL의 조성은 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μM primer, 200 μM dNTP, 주형 DNA 10 ng 그리고 *Taq* polymerase 1 unit이었다. PCR 반응은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 반응을 거친 후 증폭반응 (94°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 2분간 반응)을 40회 진행하였고 최종 신장반응은 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR 산물은 0.5 μg/ml EtBr이 포함된 1% agarose gel에서 전기영동 후 UV하에서 확인하였다.

Genomic DNA에 대한 PCR 분석에 의해 감자의 SuT 유전자 전이가 확인된 벼 형질전환 식물체를 대상으로 Rogers와 Bendich (1988)의 방법을 변형하여 DNA를 추출하였다.

추출한 DNA 10 µg을 *Hind* III로 소화시킨 다음 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 capillary transfer 방법 (Southern 1975)으로 nylon membrane에 전이시켰다. SuT 유전자의 검출은 Dig Nucleic Acid Detection kit (Roche, Germany)를 이용하여 실시하였다. 잡종화반응은 65°C에서 16시간 실시하였으며 잡종화가 끝난 membrane은 0.5X wash solution으로 68°C에서 15분간 2회 세척하였다.

결과 및 고찰

저항성 callus 선발

감자의 sucrose 수송자 유전자가 도입된 *A. tumefaciens* LBA 4404와 공동배양한 벼의 callus를 약 3주간 배양하였다. 대부분의 callus는 배양중 증식이 억제되고 갈변하였으나, 일부 callus는 왕성하게 증식하였으며 갈변된 callus의 일부 세포로부터도 callus가 출현하여 빠른 속도로 증식하였다. 왕성하게 증식하는 callus를 선발하여 식물체 재분화 재료로 사용하였다.

형질전환과 식물체 재분화

2차 선발을 통해 증식된 callus를 재분화 배지에 치상하였다. 치상 1주일 경부터 녹점이 형성되었으며, 2주 후부터 신초와 뿌리가 형성되었다 (Figure 2A). 식물체 재분화는 50 mg/L hygromycin B에 저항성을 갖는 2차 선발 callus로부터 약 150%의 출현율을 나타내었는데, 이같이 높은 재분화율은 선발된 callus로부터 1개 이상의 신초가 형성되었기 때문이다. 소식물체의 길이가 3 cm 이상일 때 건전한 식물체 생육을 위해 1/2 MS 기본배지에 계대배양하였으며 (Figure 2B), 양액배지에서 10일간 순화 후 온실 pot에 이식하여 특성검정을 실시하였다 (Figure 2C).

형질전환 유전자 확인

재분화된 유식물체 내로의 sucrose 수송자 유전자 삽입 여부를 확인하기 위해 genomic DNA를 추출하고 감자의 sucrose 수송자 유전자 특이적인 primer 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. Lane 1은 sucrose 수송자 유전자가 재조합된 binary vector에서 증폭된 단편이며, lane 3, 4, 5는 형질전환된 벼로부터 증폭된 DNA 단편이다. 형질전환된 식물체에서는 예상된 크기인 1.6 kb의 DNA 단편이 증폭되었으나, 형질전환하지 않은 식물체 (lane 2)에서는 DNA 단편이 증폭되지 않아 감자의 sucrose 수송자 유전자가 벼 게놈상에 삽입된 것으로 추정되었다 (Figure 3A).

PCR 분석을 통해 유전자의 삽입이 확인된 3개의 식물체와

형질전환하지 않은 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 *Hind* III 제한효소로 소화시킨 후 감자 SuT probe를 이용하여 Southern 분석을 실시한 결과 형질전환된 3개의 식물체 모두에서 6.7 kb 이상의 단편이 검출되었으나 (lane 2~4), 대조 식물체에서는 단편이 검출되지 않았다 (lane 1). Southern 분석결과 형질전환 식물체에 따라 1개 (lane 4) 또는 2개 (lane 2, 3)의 단편이 검출된 것으로 보아 감자의 sucrose 수송자 유전자는 벼의 genome에 1개 또는 2개 이상이 삽입된 것으로 추정된다 (Figure 3B). 이와 같은 결과는 선발된 벼



Figure 2. Transgenic rice shoots transformed with StSuT cDNA growing on the medium containing 50 mg/L hygromycin (A). Regenerated rice plantlets growing in the rooting medium (B). Transgenic plants grown for 5 months in soil (C).

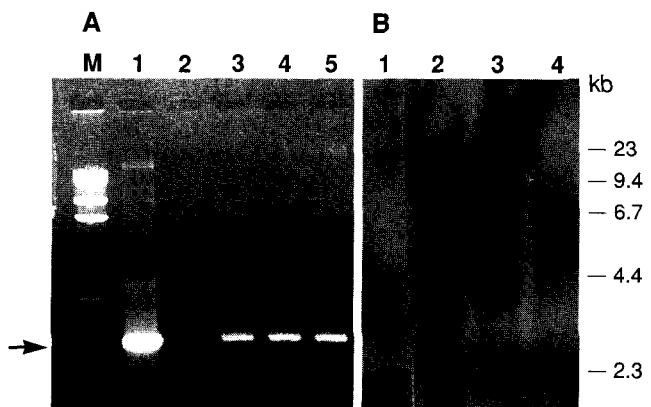


Figure 3. PCR (A) and Southern blot analysis (B) of StSuT transgene. A; M, lamda DNA/*Hind* III DNA marker; lane 1, pGA-SuT plasmid vector; lane 2, nontransgenic plant; lanes 3-5, transgenic plants transformed with pGA-SuT; 1.6 kb amplification products are arrowed, B; Lane 1, nontransgenic plant; lane 2-4, transgenic plants transformed with pGA-SuT.

형질전환 식물체에 외래 유전자인 감자 sucrose 수송자 유전자가 안정적으로 도입되었음을 의미한다.

동화산물의 여러 비동화기관으로의 분배 조절 기작은 식물체의 생산성과 밀접한 관계가 있으며 sucrose 수송자는 동화산물의 체계적인 분배를 조절하는 중요한 요인인 것으로 알려져 있다. Sucrose 수송자는 *Vicia faba*의 자엽이 발달하는 동안 분화되는 전이세포에서 발견되어 (Harrington et al. 1997) 외부에서 sucrose를 공급할 경우에는 전이세포의 분화나 수송자의 발현도 억제된다. 발달중인 잎에서는 잎의 해면조직의 크기가 최종 크기의 35~75% 이상에 도달하여 독립적인 광합성이 가능한 단계에서 수송자가 발현된다 (Lemoine et al. 1992). 환경요인도 sucrose 수송자 발현에 영향을 미치며 사탕무 잎에서 sucrose 수송자 유전자의 전사는 상처나 노화처리에 의해 촉진되나 sucrose 수송 활성은 상처처리에 의해서만 촉진되었다 (Sakr et al. 1993). 잎의 sucrose 농도는 일종의 신호로 작용하며 소위 sucrose 의존성 신호전달 경로는 성숙한 잎에서의 sucrose 수송자 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Chiou and Bush 1998).

동화기관에서 어느 농도 이상의 sucrose가 합성되면 sucrose가 액포로 수송되어 일시적으로 저장된다. 세포 내 sucrose는 엽육세포에서 세포간극을 거쳐 체관세포로 수송되어 비동화기관으로 수송된다 (Lemoine 2000). 체관세포로의 sucrose 적재까지의 각 단계는 sucrose 수송자에 의해 조절되므로 sucrose 수송자는 sucrose 수송효율에 중요한 영향을 미친다. 그러므로 sucrose 수송자의 발현조절은 저장기관으로의 sucrose 분배 증대를 통한 수확지수 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 연구 결과를 통해 얻은 sucrose 수송자 형질전환 벼 계통의 광합성 효율, 동화물질 분배효율, 건물중, 화분발아율, 뿌리의 분화발달 등을 조사하여 동화물질의 분배효율 개선에 필요한 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

동화산물의 분배 효율 개선을 통한 생산성 향상 가능성을 조사하고자 감자의 sucrose 수송자 유전자를 벼에 형질전환하였다. 동진벼로부터 유도된 callus를 감자의 sucrose 수송자 유전자가 도입된 *A. tumefaciens* LBA 4404와 공동배양한 후, 선발배지에서 증식된 callus를 250 mg/L carbenicillin, 2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L NAA가 첨가된 MS 배지에 옮겨 약 2주 후부터 소식물체를 얻었다. Carbenicillin 250 mg/L 첨가된 MS 기본 배지에서 소식물체의 발근을 유도하여 재분화 식물체를 얻었다. 선발된 callus는 약 150%의 높은 식물체 재분화율을 보였다. 재분화 식물체에 대한 PCR 분석을 수행하여 감자의 sucrose 수송자 유전자가 삽입된 형질전환 벼 식

물체를 선발하였다. 선발된 형질전환 식물체에 대한 Southern blot 분석을 통하여 외래유전자인 감자 sucrose 수송자 유전자가 벼 genome 내에 안정적으로 도입되었음을 확인하였다.

인용문헌

- An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988) Binary vectors. *Plant Molecular Biology Manual* A3:1-19
- Arnold WN (1968) The selection of sucrose as the translocate of higher plants. *J. Theor. Biol.* 21(1):13-20
- Aoki N, Hirose T, Takahashi S, Ono K, Ishimaru K, Ohsugi R (1999) Molecular cloning and expression analysis of a gene for a sucrose transporter in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Physiol.* 40(10):1072-1078
- Briskin DP, Thornley WR, Wyse RE (1985) Membrane transport in isolated vesicles from sugarbeet taproot. *Plant Physiol.* 78:871-875
- Chiou TJ, Bush DR (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:4784-4788
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY and Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinic.* 18:659-668
- Gahrtz M, Schmelzer E, Stolz J, Sauer N (1996) Expression of the PmsUC1 sucrose carrier gene from *Plantago major* L. is induced during seed development. *Plant J.* 9(1):93-100
- Harrington GN, Nussbaumer Y, Wang XD, Tegeder M, Franceschi VR, Frommer WB, Patrick JW and Ofler CE (1997) Spatial and temporal expression of sucrose transport-related genes in developing cotyledons of *Vicia faba* L. *Protoplasma* 200:35-50
- Hirose T, Imaizumi N, Scofield GN, Furbank RT, Ohsugi R (1997) cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* 38(12):1389-1396
- Hong W, Meiqing Q and Adrian JC (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Research* 21(17):4153-4154
- Lemoine R (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:246-262
- Lemoine R, Burkle L, Barker L, Sakr S, Kuhn C, Regnacq M, Gaillard C, Delrot S, Frommer WB (1999) Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Lett.* 454(3):325-330
- Lemoine R, Gallet O, Gaillard C, Frommer W, Delrot S (1992) Plasma membrane vesicles from source and sink leaves-changes in solute transport and polypeptide composition. *Plant Physiol.* 100:1150-1156
- Matsukura Ca, Saitoh T, Hirose T, Ohsugi R, Perata P, Yamaguchi

- J (2000) Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression Of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant Physiol.* **124**(1):85-94
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hummer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N** (2000) AtSUC3, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant J.* **24**(6):869-882
- Murashige T and Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**:473-497
- Noiraud N, Delrot S, Lemoine R** (2000) The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiol.* **122**(4):1447-1455
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB** (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* **11**(13):4705-4713
- Riesmeier JW, Hirner B, Frommer WB** (1993) Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *Plant Cell.* **5**:1591-1598
- Rogers SO and AJ Bendich** (1998) Extraction of DNA from plant tissues. *In* *Plant Molecular Biology Manual* (ed by Gelibien et al.)
- Sakr S, Lemoine R, Gaillard C, Delrot S** (1993) Effect of cutting on solute uptake by plasma membrane vesicles from sugar beet (*Beta vulagris* L) leaves. *Plant Physiol.* **103**:49-58
- Sauer N, Stolz J** (1994) SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J.* **6**(1):67-77
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:505-517
- Stadler R, Truernit E, Gahrz M, Sauer N** (1999) The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* **19**(3):269-278
- Ward JM, Kuhn C, Tegeder M, Frommer WB** (1998) Sucrose transport in higher plants. *Int Rev Cytol.* **178**:41-71
- Yoo NH, Yun SJ** (2000) Transformation of rice (*Oryza sativa* L.) with phosphate transporter cDNA from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Korean J. Plant Tissue Culture* **27**(6):441-445

(접수일자 2001년 1월 25일)