

AZCA 저항성 돌연변이 세포주로부터 선발 육성한 내염성 벼 돌연변이 계통의 특성 검정

송재영¹, 김동섭¹, 이금주¹, 이인석², 강권규³, 윤성중⁴, 강시용^{1*}

¹한국원자력연구소 정읍분소 방사선연구원, ²고창군농업기술센터, ³한경대학교, ⁴전북대학교

Characterization of Salt Tolerant Rice Mutant Lines Derived from Azetidine-2-Carboxylic Acid Resistant Cell Lines Induced by Gamma Ray Irradiation

Jae Young Song¹, Dong Sub Kim¹, Geung-Joo Lee¹, In Sok Lee², Kwon Kyoo Kang³, Song Joong Yun⁴, and Si-Yong Kang^{1*}

¹Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, 1266 Shinjeong, Jeongeup, Cheonbuk 580-185, Korea

²Agricultural Technology Center, Gochanggun, Cheonbuk 585-800, Korea

³College of Agriculture and Life Science, Hankyong National University, Ansong, Kyunggie 456-749, Korea

⁴Chonbuk National University, Chonju, Cheonbuk 561-765, Korea

ABSTRACT To develop rice (*Oryza sativa* L.) cultivars to be planted on salt-affected sites, cell lines with enhanced proline content and resistance to growth inhibition by Azetidine-2-carboxylic acid (AZCA), a proline analogue, were screened out among calli irradiated with gamma ray of 50, 70, 90, and 120 Gy. The calli had been derived from embryo culture of the cultivar Donganbyeo. Selected AZCA resistant lines that had high proline accumulation were used as sources for selection of NaCl resistant lines. To determine an optimum concentration for selection of NaCl resistant lines, Donganbyeo seeds were initially cultured on the media containing various NaCl concentrations (0 to 2.5%) for 40 days, and 1.5% NaCl concentration was determined as the optimum concentration. One hundred sixteen salt-tolerant (ST) lines were selected from bulked 20,000 seeds of the AZCA resistant M_3 seeds in the medium containing 1.5% NaCl. The putative 33 lines (M_4 generation) considered with salt-tolerance were further analyzed for salt tolerance, amino acid and ion contents, and expression patterns of the salt tolerance-related genes. Out of the 33 lines, 7 lines were confirmed to have superior salt tolerance. Based on growth comparison of the entries, the selected mutant lines exhibited greater shoot length with average 1.5 times, root length with 1.3 times, root numbers with 1.1 times, and fresh weight with 1.5 times than control. Proline contents were increased maximum 20%, 100% and 20% in the leaf, seed and callus, respectively, of the selected lines. Compared to control, amino acid contents of the mutants were 24 to 29%, 49 to 143%, 32 to 60% higher in the leaf, seed and callus, respectively. The ratio of Na^+/K^+ for most of the ST-lines were lower than that of control, ranging from 1.0 to 3.8 for the leaf and 11.5 to 28.5 for the root, while the control had 3.5 and 32.9 in the leaf and root, respectively. The transcription patterns for the *P5CS* and *NHX1* genes observed by RT-PCR analysis indicated that these genes were actively expressed under salt stress. The selected mutants will be useful for the development of rice cultivar resistant to salt stress.

서 론

Mass와 Hoffmann(1976)에 의하면 세계 관개지의 1/3이 높은 염분에 의해 피해를 받고 있다고 한다. 지금까지는 염분에 의한 피해를 줄이기 위해 토양을 개간하거나 수분을 공급하여 제염하는 방법을 주로 이용하여 왔으나, 이러한 방법은 시간과 비용이 많이 들어 효과적이지 못하다. 그러므로 유전자 변이를 통한 내염성 작물의 개발이 시급한 실정이다. 염분 토양이나 저온 및 건조와 같은 abiotic 스트레스는 세계적으로 경작지 확장에 제한을 주고 작물생장에 영향을 주는 아주 심각한 문제이다(Epstein et al. 1980, Yancey et al. 1982). 벼는 염분에 약하여 0.3% 염분에서 피해가 나타난다고 알려져 있다(Mass and Hoffmann, 1977). 내염성 벼 육종연구는 오래 전부터 이루어져 왔는데, 최근에는 halophytic 야생벼의 내염성 형질을 교배에 의해서 도입하거나(Flowers et al. 1990), 내염성 관련 유전자를 삽입하는 형질전환 기법을 이용하여 내염성 벼를 개발하고 있다(Zhu et al. 1998). 그렇지만 물리적 또는 화학적 돌연변이 유기에 의한 내염성 품종개발은 상대적으로 미흡하였다고 할 수 있다.

염분은 초장 및 뿌리의 생육을 억제하고 생산량도 현저하게 감소 시키며(Akbar et al. 1972), 높은 염분농도는 이온 불균형과 수분 포텐셜의 차이를 일으켜 생리적 가뭄현상을 일으킬 수 있다(Rhoades et al. 1990, Zhang and Blumwald 2001). 염분이 높은 토양조건에서 살아가기 위해서는 식물은 생리적 및 유전적인 변화를 통해서 반응한다. 이렇게 수분조건이 불리한 상황에서 내성을 가진 식물들은 세포 내에 수분을 유지시키기 위하여 세포질 내에 많은 유기물을 축적하게 된다. 그 중 한 가지 예로, proline은 염분과 수분 스트레스와 같은 abiotic 스트레스에 피해를 입는 많은 식물에 있어서 osmoprotector로서 삼투압 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Delauney and Verma 1993, Pollard and Wyn Jones 1979). 이런 기능을 갖고 있는 유기물로는 proline 외에도 sugar alcohols (polyol) 및 glycinebetaine 등이 있다 (Csonka and Hanson 1991).

생체 내 아미노산 생합성은 피드백 제어(feedback inhibition)에 의해 그 양이 조절되는데, 아미노산 유사체의 저항성 기작은 목적하는 아미노산 생합성 과정에서 주요 효소의 변형에 의해 이러한 피드백 제어장치에 결합이 생겨 발생한다고 여겨지고 있다(Hasegawa and Mori 1986). 그 중 L-Azetidine-2-carboxylic acid(AZCA), proline 유사체는 단백질 합성 시에 proline과 경합적으로 결합함으로써 단백질 구조와 기능을 변형시킨다(Takeuchi and Prockop 1969). 고등식물에

서 proline 유사체에 저항성을 갖는 세포주들은 proline 함량이 증가되면서 염분과 저온에 저항성을 보이는 것으로 보고되었다(Van Swaaij et al. 1986). 이러한 결과를 이용하여 Chandler와 Thorpe 등(1987)은 proline 유사체를 이용한 내염성 벼 선발을 보고하기도 했다. 따라서 proline 유사체에 대한 저항성 돌연변이체는 고등식물에서 염분토양, 수분 스트레스, 저온 및 proline 생합성 연구에 유용한 재료로 쓰여지는 것으로 알려졌다(Mifflin et al. 1983).

고등식물에서 proline 축적은 새롭게 합성되거나(Delauney et al. 1993), 이화작용(Peng et al. 1996) 및 단백질 합성의 감소에 의한 증가, 또는 단백질 분해 등에 의해 생체 내에 축적되는 것으로 알려져 있으며(Forlani et al. 1997), 일반적으로 식물에서 proline 전구체로서는 glutamate와 ornithine 이 보고되고 있고, 식물에서 glutamate로부터의 합성 과정에는 두개의 효소 즉, $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*)와 $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase (*P5CR*)이 관여하는데, 이 *P5CS*효소는 glutamate를 $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate (*P5C*)으로 환원시켜 proline으로 전환시키는 반응에 촉매역할을 하며, 합성된 proline에 의한 피드백 조절로 영향을 받는 효소이다. 염과 수분 스트레스 하에서 proline 생합성의 촉진은 *P5CS*와 *P5CR* mRNA 발현의 증가와 관련되어 있다(Roosens et al. 1999).

또한 식물이 염분 스트레스에 노출되면 세포질 속에 여러 기관과 효소들의 기능에 해를 주는 Na^+ 농도를 낮추고, Na^+/K^+ 비율을 낮게 유지하기 위해 효율적으로 K^+ 를 흡수하고 세포질에서 Na^+ 를 제거 또는 배출해야 한다. Na^+/H^+ 이온 교환펌프와 관련된 *NHX1* 유전자는 염분을 액포로 구획하거나 원형질막을 통하여 밖으로 배출한다(Aharon et al. 2003). 따라서 내염성이 강한 식물들이나 개체들은 이 유전자의 기능이 높아진다고 알려져 있다.

본 연구는 감마선 조사에 의해 선발된 AZCA 저항성 돌연변이체 후대 중에 NaCl에 내성을 갖는 개체를 기내에서 선발하였고, 그 선발 계통의 생리적 특성을 규명하고 내염성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 *P5CS*와 *NHX1* 유전자를 이용하여 이들 개체들이 높은 염 농도 하에서 mRNA 로 전사되는 과정을 RT-PCR 을 통해 알아보기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

내염성 선발을 위한 적정농도 선정

내염성 벼 선발을 위한 염분 피해 정도를 규명하기 위해서 동안벼(*Oryza sativa* L.) 종자를 75% ethanol에 30 초간 표면 살균한 후, tween-20이 2~3방울 첨가된 5% sodium hypochlorite로 30분간 소독하였다. 살균된 종자는 멸균수로 4회 행구

*Corresponding author Tel 063-570-3310 Fax 063-570-3319

E-mail: sykang@kaeri.re.kr

어 물기를 제거한 후 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 및 2.5% NaCl이 함유된 1/2 Murashige and Skoog (MS) agar 배지에 치상하여 27±1°C에서 40일간 생장시켜 생육조사를 통해 적정 선발농도를 결정하였다.

내염성 계통 선발

내염성 개체를 선발하기 위해서 사용된 종자는 AZCA 저항성 돌연변이후대 M₃ 종자 20,000개를 이용하였다(Hyun et al. 2003). M₃ 종자를 위와 같은 방법으로 살균하여 선행 연구를 통해 결정된 내염성 선발 적정농도인 NaCl 1.5%가 함유된 1/2 MS배지에 치상하여 40일 동안 배양한 후, 내염성 개체를 선발하였다. 이렇게 선발된 개체들은 Salt Tolerant(ST) 벼로 명명하였고, 이 개체들을 각각 계통으로 하여 유리온실에서 M₄ 세대를 양성 하였다. 자가수정으로 얻어진 각각의 ST 계통(M₄) 종자를 1/2 MS 배지에 치상하여 7일간 배양 후, 1.2% NaCl 이 함유된 1/2 MS 배지에 30일간 배양하여 염에 강한 계통들을 2차 선발하였다.

내염성 M₄종자의 배발생 캘러스 유도 및 증식

선발된 돌연변이 계통들의 세대 진척 과정에서 후 세대로의 NaCl 저항성 유전 여부를 알아보기 위하여 M₄ 세대 내염성 계통 종자를 75% EtOH에 30초간 표면살균하고, tween-20 2~3방울 첨가된 5% sodium hypochlorite에 30분 소독한 후, 멸균수에 4회 행구고 물기를 제거한 뒤 MS 기본배지에 2mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose와 8 g/L agar 를 첨가한 배지에 치상하여 28±1°C에서 40일 동안 암배양하여 캘러스를 유도하였다. 유도된 캘러스는 동일 배지에 1차 계대배양 후 1.2% NaCl 및 2mg/L 2,4-D 가 함유된 MS 기본배지에 2차 계대배양하여 캘러스 생체중과 생존율을 조사하였다.

아미노산 및 이온함량 분석

내염성 형질을 갖는 선발계통 (ST-13과 ST-16) 과 대조구의 아미노산 함량을 측정하기 위해, ST-13 과 ST-16에 각각 48시간 동안 염 처리한 식물체 잎과 1.2% NaCl에서 형성된 callus 그리고 종자에서 아미노산 함량을 조사하였다 (Pico-Tag method (Waters), Tarr, 1986). 내염성 계통으로 선발된 7 계통 (M₄)과 대조구를 1/2 MS 배지에서 14일간 생장시킨 유묘를 48시간 동안 1.5% NaCl 용액에 침지한 후, 잎과 뿌리에서 이온함량을 분석 하였다(Gange TJ and Page AL 1974).

M₄ 세대 선발 ST 식물체로부터 Total RNA 분리

대조구와 염분 처리된 식물체의 잎으로부터 Trisol-reagent (Gibco BRL)방법에 의해 total RNA를 추출하였다. 식물체 1g 을 액체질소에서 약 15분 정도 마쇄한 후, 조직을 pyrex tube(50ml)로 옮겨 Trisol-reagent 10 ml을 넣고 실온에서 5분 동안 반응시키고, 4°C에서 14,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 새 튜브에 옮겨 2 ml chloroform 을 첨가하고 15초간 vortex 후 실온에서 2-3분간 안정화 시킨 뒤, 4°C에서 15분 동안 10,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상층액 약 6 ml 정도를 새로운 튜브로 옮겨, 2.5 ml Isopropanol과 2.5 ml 침전용액(0.8M sodium acetate와 1.2M NaCl)을 넣고 혼합한 후 실온에서 10분간 침전시킨 뒤, 10,000 rpm에서 10분간 원심하였다. 상층액을 제거하고, 10 ml의 75% 에탄올(DEPC처리 물을 이용하여 제조)을 넣고 4°C, 6,500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 5-10분간 공기 중에서 건조 시킨 뒤 침전된 RNA를 DEPC로 처리된 증류수에 희석한 후 55-60°C에서 10-15분간 용해시켜 acrylamide gel에서 전기영동을 통해 확인하였다.

RT-PCR에 의한 발현 분석

Total RNA 1 ug 을 모형으로 해서 SuperScript™ II (Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA 합성하였다. Second strand의 증폭은 P5CS 및 NHX1 primer, Taq polymerase(NEB)을 이용하여 GeneAmp PCR system(PE Applied Biosystem, USA)에서 통상의 방법으로 수행하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 2분간 cDNA 예비 분리한 후 94°C 에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 1분을 1 반응주기로 하여 30 주기동안 증폭하였고 마지막으로 72°C에서 10분간 마지막으로 연장반응 시켰다. 최종 PCR 산물은 1.5% agarose gel상에서 전기영동으로 분리하여 ethidium bromide로 염색을 하여 확인하였다.

결과 및 고찰

내염성 개체 선발을 위한 염분농도 선정

내염성 식물을 선발하기 위해서는 외부 영향이나 염분의 불균형 분포 등의 환경조건을 배제할 수 있는 *in vitro* 실험이 요구되므로, 식물 생육상 및 선발을 위한 적정 농도의 규명이 필요하다. 적정 농도를 설정하기 위해 원품종인 동안벼 종자를 각기 다른 염농도를 처리한 후 조사한 결과, 염분농도가 점차 증가함에 따라 신초길이, 뿌리길이, 뿌리수 및 생체중 모두 감소하였다(Fig. 1). 조사한 모든 항목은 NaCl 처리와 함

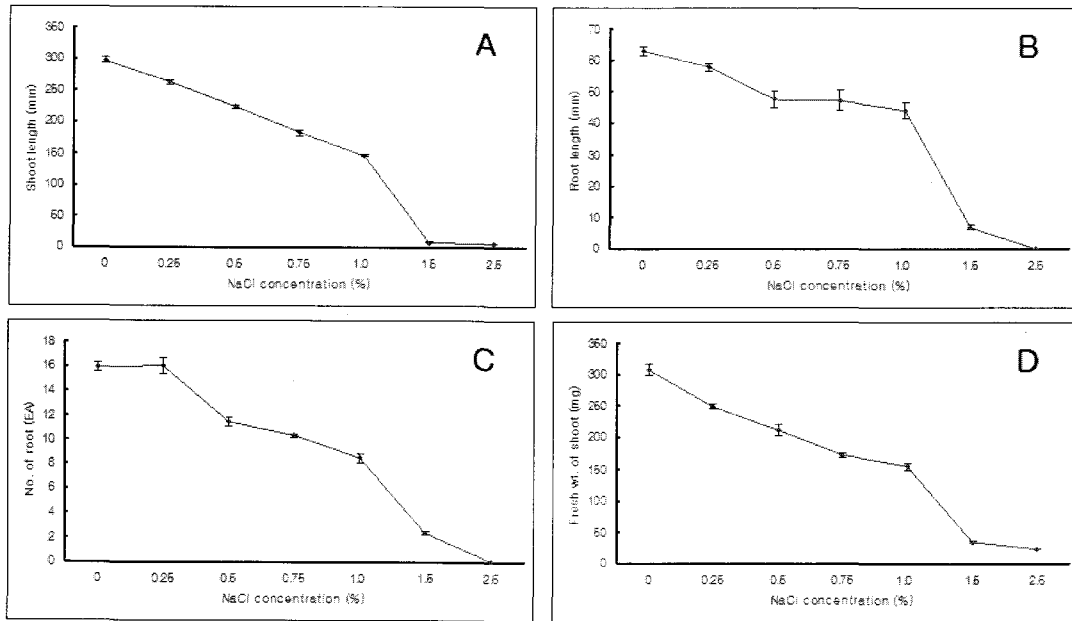


Figure 1. Effect of various NaCl concentrations on shoot length (A), root length (B), root number (C), and fresh weight (D) of seedlings (n=10) for 40 days after NaCl treatment.

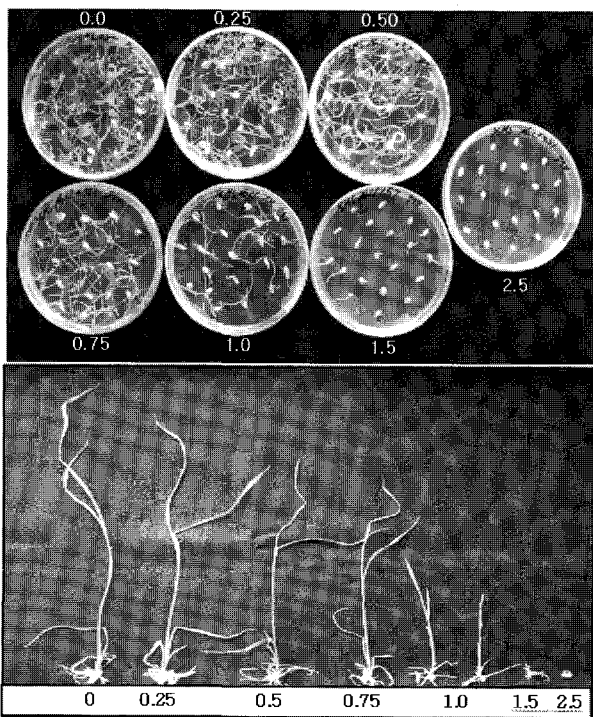


Figure 2. Growth of Donganbyeo in 40 days on the media containing various NaCl concentrations. The numbers in the figure indicate NaCl concentration (%).

계 감소하기 시작하여, 1% NaCl 농도에서는 약 50% 정도의 생육억제를 나타냈다. 또한 NaCl 1.5%에서는 발아 후 얼마 되지 않아서 모두 갈변하여 고사하였다 (Fig. 2). 생장이 50%로 억제된 NaCl 1% 농도에서는 생리적으로 염분에 적응하여 생존할 여지가 있어 염분에 강한 개체를 선발하기 위해서는 이보다 높은 염농도인 1.5%를 선발농도로 결정하였다. 또한 proline 은 환경 스트레스를 받는 식물에서 이온불균형, 이온

독성 및 생리적 수분 스트레스로부터 보호 작용이 있는 것으로 보고되고 있어(Igarashi et al. 1997), 본 실험에서 사용한 AZCA 저항성 돌연변이 벼의 proline 함량이 높기 때문에 내염성 개체 선발시 좀 더 높은 농도의 염분에서 선발하였다.

AZCA 저항성 M₃ 세대에서 내염성 개체 선발

Pearson et al. (1960)은 벼에서 염분에 가장 민감한 시기가 유묘기이기 때문에, 이 시기에 내염성 벼를 선발하는 것이 적당하다고 하였다. 따라서, 수확된 AZCA 저항성을 가진 M₃ 종자 약 20,000 개를 염분 적정 선발 농도인 1.5% NaCl 이 포함된 1/2 MS 배지에 치상하여 40일간 배양하여 내염성 개체를 선발하고자 하였다. 그 결과 대조구는 발아되지 않거나 발아 후 바로 고사하였고 AZCA 저항성 후대 돌연변이 개체들은 염에 저항성을 보이는 것과 민감한 것으로 분류되어 나타났다. 대조구와 돌연변이체를 지상부 및 뿌리의 생육 상태를 비교하여 염에 강한 116 개체를 내염성 개체로 선발하였다 (Fig. 3). 이런 결과는 방사선에 의해 유도된 proline 함량이 높은 AZCA 저항성 세포주로부터 내염성 벼 개체 선발이 가능함을 의미하며, 또한 AZCA 저항성 계통들에서 proline 증가가 유전적으로 다음 세대까지 유지되었기 때문이라고 생각된다. 이러한 방사선 돌연변이 기술과 기내배양 접목에 의한 선발방법은 작물 육종에 유용한 방법으로 입증된 바 있다 (Ahloowalia 1990). 이런 기술들을 활용하여 여러 작물에서도 환경스트레스 저항성 작물들을 선발하였는데, 벼에서는 내염성과 Tryptophan 아날로그인 5 MT 저항성 형질 등이 시도된 바 있었다(Kim et al. 2004, Lee et al. 2002, Lee et al. 2000)

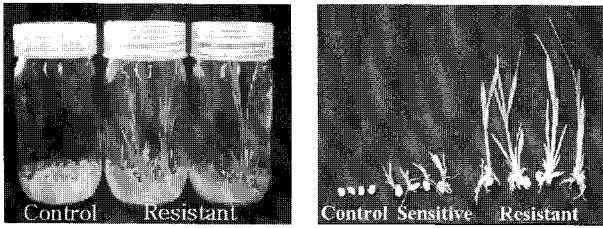


Figure 3. Growth comparison of control (Donganbyeo) and AZCA resistant M₃ plants cultured on 1/2 MS medium containing 1.5% NaCl for 40 days.

Table 1. Growth comparison of Donganbyeo (control) and salt tolerant M₄ rice seedlings¹.

Plants	Shoot length (mm)	Root length (mm)	Root number (ea)	Fresh weight (mg)
Control	60.9±2.6 [*]	21.6±1.6	8.5±0.4	89.7±2.2
ST-09	93.6±6.3	25.0±2.2	9.2±0.4	135.9±7.2
ST-10	100.9±7.3	25.3±2.5	10.3±0.3	138.2±5.1
ST-13	71.8±4.3	34.9±2.7	10.3±0.3	146.5±8.4
ST-16	83.5±7.8	30.4±4.7	8.2±0.5	118.1±8.0
ST-29	100.5±5.6	26.7±2.1	10.0±0.3	161.6±4.1
ST-31	94.1±3.1	21.2±1.9	11.8±0.3	140.5±2.9
ST-88	103.5±6.3	33.2±4.2	7.4±0.4	121.5±5.8

¹Values=Means±SE
n=3

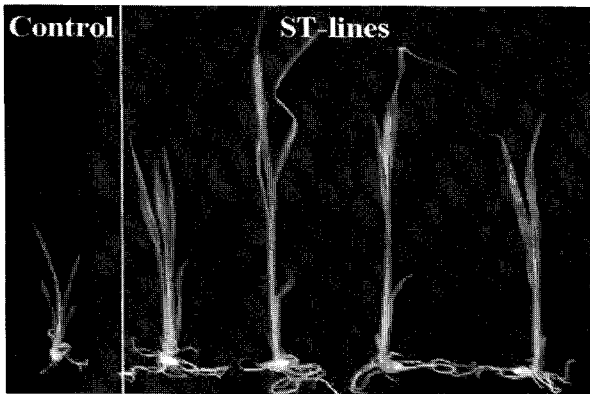


Figure 4. Growth comparison of control and the selected mutants (M₄ generation) after 40 days of culture on the medium containing 1.2 % NaCl. Plants that germinated on the NaCl-free medium were transferred to the medium with NaCl after 10 days of culture.

내염성 2차 선별을 통하여 진정한 내염성 계통을 선별하기 위해서 1차 선별된 내염성 116계통으로부터 자가수정을 통해 얻은 M₄종자를 각 계통별로 내염성 1차 선별방법과는 다르게 염에 가장 민감한 유묘시기에 생육과 생장상태를 알아보기 위해 1/2 MS 배지에서 7일간 배양 후, 선별 적정농도보다 한 단계 낮은 1.2% NaCl 농도에서 2차 선별하였다. 그 결과, 총 116 계통 중에서 유묘기에 강한 염 저항성을 나타내는 33 계통을 선별할 수 있었고, 33계통 중에서도 생육 상태가 가장 좋은 7 계통을 선정하여 줄기 및 뿌리의 생육상태를 대조구와 비교한 결과, 신초길이는 평균 1.5배, 뿌리길이는 1.3배, 생

Table 2. Survival rate and fresh weight of calli grown in the medium containing 1.2% NaCl for 30 days.

	Callus no. inoculated (ea)	Callus no. survived (ea)	Survival rate of callus (%)	Fresh weight of 5 calli (mg)
Control (Donganbyeo)	200	18	9	44.2±5.8
ST-13	200	32	16	71.2±4.0
ST-16	200	34	20	89.8±6.4

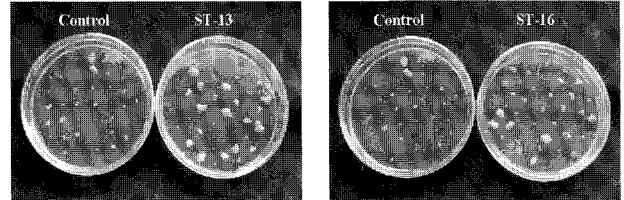


Figure 5. Callus growth of control, ST-13, and ST-16 transferred onto the medium with 1.2% NaCl.

체중은 1.5배 증가하였고 뿌리 수는 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 1, Fig. 4). 이와 같이 표현형의 생육상태를 대조구와 비교하여 내염성을 선별하는 방법은 벼 (Zhang et al. 1995), 밀 (Sadat Noori and McNeilly 2000) 등 여러 작물에서 이용되었다. 이를 통해 본 실험에서 선발 육성한 M₄ 세대는 염에 대한 저항성을 보여주는 것으로 확인되었다.

후세대 내염성 유전 검정

식물체에서 내염성을 확인한 계통으로부터 다음세대로 내염성 특성이 유전되었는지를 확인하기 위해 염에 가장 저항성을 보인 ST-13과 ST-16 계통의 종자로부터 염분 존재하에서 캘러스 형성과 생체중을 조사하였다. 그 결과 대조구, ST-13, ST-16의 형성은 각각 9%, 16%, 20%로 나타났다. 생체중은 대조구와 비교했을 때, ST-13은 1.6배, ST-16은 2배 증가한 것을 관찰할 수 있었다(Table 2, Fig. 5). 본 실험에서 처리한 1.2% 염분 농도는 캘러스 수준에서의 내염성 선별을 위해서는 높은 농도이기 때문에 대체로 대조구와 ST 계통의 캘러스 생존율이 높진 않았지만 ST-13 과 ST-16 의 캘러스 생존율과 증식율이 높은 것으로 보아, 선발 계통들로부터 자가수정에 의해 유도된 후세대의 선발계통이 내염성을 유지하고 있어 내염성 특성이 유전됨을 확인할 수 있었다.

내염성 계통 아미노산 함량 분석

Proline 함량은 내염성 계통이 대조구보다 잎, 종자 및 캘러스에서 최대 20%, 100%, 20%로 증가하였고, 필수아미노산함량도 대조구에 비해 각각 24~29%, 49~143%, 32~60%로 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Table 3). 이 결과로부터 선발된 ST-13와 ST-16 내염성 계통은 전체적인 아미노산 함량이 높

Table 3. Comparison of the amino acid contents in the leaf, seed and callus of the salt-tolerant ST-13 and ST-16 mutants grown in the 1.2% NaCl with non-salt treated Donganbyeo^{1,2}.

Amino acid	Leaf			Seed			Callus		
	Control (Donganbyeo)	ST-13 (Ratio*)	ST-16 (Ratio)	Control (Donganbyeo)	ST-13 (Ratio*)	ST-16 (Ratio)	Control (Donganbyeo)	ST-13 (Ratio*)	ST-16 (Ratio)
His	13.2**	17.2(1.3)	15.5(1.2)	4.1	6.2(1.5)	9.9(2.4)	24.5	29.3(1.2)	35.8(1.5)
Thr	30.8	40.3(1.3)	40.9(1.3)	6.8	10.6(1.6)	16.5(2.4)	53.1	62.6(1.2)	76.3(1.4)
Lys	9.9	12.8(1.3)	16.3(1.6)	2.2	3.4(1.6)	5.8(2.7)	8.5	21.9(2.6)	27.9(3.3)
Tyr	2.1	3.1(1.5)	4.7(2.2)	0.3	0.4(1.4)	0.7(2.7)	11.7	14.0(1.2)	15.3(1.3)
Val	42.0	51.2(1.2)	53.3(1.3)	11.1	16.6(1.5)	28.2(2.5)	59.7	83.1(1.4)	101.5(1.7)
Met	4.0	5.9(1.5)	6.0(1.5)	1.0	1.5(1.6)	2.5(2.7)	10.1	14.7(1.5)	18.0(1.8)
Ile	26.3	31.5(1.2)	34.5(1.3)	5.9	9.1(1.5)	16.1(2.7)	33.2	52.8(1.6)	64.6(1.9)
Leu	49.4	59.7(1.2)	62.1(1.3)	12.4	18.0(1.5)	32.7(2.6)	53.1	90.3(1.7)	110.0(2.1)
Phe	19.9	24.8(1.2)	27.8(1.4)	5.0	7.7(1.6)	13.2(2.7)	35.9	42.9(1.2)	52.4(1.5)
Trp	0.6	0.8(1.3)	0.7(1.2)	0.1	0.2(1.1)	0.2(1.4)	0.8	1.1(1.4)	1.5(1.9)
Pro	44.9	54.1(1.2)	52.2(1.2)	16.5	23.5(1.4)	33.1(2.0)	99.3	103.4(1.0)	121.3(1.2)
Total	243.1	301.4(1.2)	314(1.3)	65.3	97.0(1.5)	159.0(2.4)	390.0	516.2(1.3)	624.4(1.6)

¹Values in the parenthesis indicate the ratio of the mean value of ST-13 and ST-16 to the Donganbyeo.

²Numbers given are umole/mg dry weight.

Table 4. Comparison of the ion contents in the leaves and roots of the control and ST M₄ lines.

Plants	Leaves			Roots		
	K ⁺ (%)	Na ⁺ (%)	Na ⁺ /K ⁺ ratio	K ⁺ (%)	Na ⁺ (%)	Na ⁺ /K ⁺ ratio
Control	3.58	12.4	3.46	0.26	8.57	32.9
ST-9	3.03	6.96	2.29	0.24	6.77	28.2
ST-10	2.84	4.9	1.72	0.62	7.14	11.5
ST-13	3.04	3.11	1.02	0.22	6.28	28.5
ST-16	2.57	3.27	1.27	0.26	4.83	18.5
ST-29	1.45	5.44	3.75	0.37	7.47	20.1
ST-31	3.25	4.87	1.49	0.40	7.84	19.6
ST-88	3.58	4.84	1.35	0.28	5.71	20.3

았으며, 특히 내염성 등 스트레스 저항성 대사와 관련이 깊은 것으로 알려진 proline의 함량이 높은 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는, AZCA (proline 유사체)는 단백질 합성 시에 proline과 경합적으로 결합함으로써 단백질 구조와 기능을 변형시켜 염분내성이 증가한다는 것을 간접적으로 보여주고 있음을 알 수 있었다(Takeuchi and Prockop 1969). 다른 아미노산처럼 Proline 생합성에서도 피드백 조절이 관여하는데 염 스트레스 조건에서 주요 효소로 알려진 P5CS 단백질이 방사선 조사에 의해 유전자 염기서열 변화로 구조가 변환되어 proline이 P5CS에 결합을 못하므로 억제조절 기능이 변화되어 proline 합성이 증가되고, 증가된 proline이 삼투압 보호물질로 작용하여 염분 조건에서 저항성 기작을 보인 것으로 판단된다.

이온함량 분석

이온함량 분석 결과, 잎에서 Na⁺/K⁺ ratio는 대조구는 3.46으로 나타났고, 내염성 계통에서는 이보다 낮은 평균 1.02-2.29 범위를 보였다(Table 4). ST-29는 대조구에 비해 Na⁺/K⁺ ratio이 높게 나왔는데 염 처리 배지에서 생육이 좋은 것으로 보아 염에 대한 다른 메커니즘이 관계된 것으로 생각 되어진다. 뿌리에서는 Na⁺/K⁺ ratio은 대조구는 32.9으로 나타났고, 내염성을 보인 계통들은 11.5-28.5 범위에 있는 것으로 나타났다(Table 4). 식물세포에서 Na⁺ 이온은 액포막에서 H⁺-ATPase 의한 pH차이를 통해 Na⁺/H⁺ antiporter에 의해 액포안으로 분출되고, 결과적으로 식물체에서 Na⁺/K⁺ 비율을 낮게 만들기 때문에 내염성의 특성을 나타내는 것과 관련이 있다고 보고되었다(Garcia-Agustin and Primo-Millo 1995). 또한, 염분 스트레스하에서 proline, glycine betaine, polyols 과 같은 화합물들의 생합성 또는 흡수가 증가하여 삼투압보호 역할을 하여 스트레스 (Na⁺, Cl⁻)의 손상을 줄이며, 세포질에 수분흡수를 용이하게 함으로써 삼투 포텐셜을 감소시켜 단백질 구조를

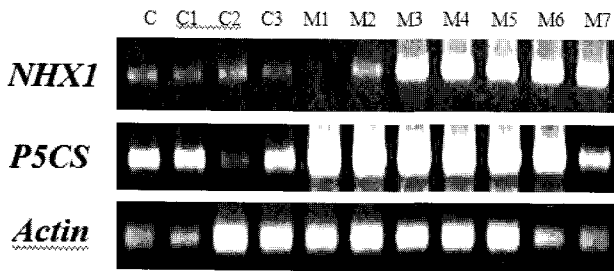


Figure 6. RT-PCR analysis of Donganbyeo, control and ST lines with *nhx1*, *p5cs* and actin. Lane C; Donganbyeo, Lane C1-C3; control treated with 1.5% NaCl for 12, 24, and 48 h, respectively, Lane M1-M7; ST-lines treated with 1.5% NaCl for 48 h (M1; ST-9, M2; ST-10, M3; ST-13, M4; ST-16, M5; ST-29, M6; ST-31 and M7; ST-88).

안정화 시킴으로써 높은 염농도하에서 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다(Yancey 2001). 본 실험에서 내염성이 강한 변이체에서 이전의 보고에서처럼 삼투압 보호 역할을 하는 proline의 축적 증가와 잎과 뿌리에서 비교구로 사용된 동안 벼보다 낮은 Na^+/K^+ 비율을 보인 것은 내염성 기작에서 위의 현상이 적어도 관여함을 간접적으로 말해주고 있고, 이들 형질을 조절하는 유전자의 관련성을 유추할 수 있었다.

RT-PCR analysis

위의 결과를 토대로 내염성과 관련된 유전자 중 proline 합성과 Na^+ 흡수를 조절하는 *P5CS*와 *NHX1* 유전자를 이용하여 대조구와 내염성 계통간 전사체 발현 양상을 알아보기 위하여, 염 처리 후 대조구 (0 h, 12 h, 24 h, 48 h)와 7 ST 계통 (ST-9, ST-10, ST-13, ST-16, ST-29, ST-31, ST-88, 48 h) 간 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 대조구는 염처리에 의해 *NHX1*과 *P5CS*의 발현차이를 보이지 않았으나, 돌연변이 계통에서는 *NHX1*의 경우 M1(ST-9) 과 M2(ST-10) 를 제외한 M3~M7(ST-13, 16, 29, 31, 88) 계통은 발현이 높게 나타났고, *P5CS* 유전자의 경우에는 M1-M6에서 발현이 대조구에 비해 높게 나타났다(Fig. 6). 돌연변이 선발계통에서 내염성과 관련된 유전자로 알려진 *NHX1*, *P5CS*의 유전자 발현증가와 proline의 축적은 내염성과 상관관계가 있다고 보고 되었다 (Igarashi et al. 1997). 이후 Northern을 통해 발현양에 대한 차이를 살필 것이며 그 결과로부터 proline 합성에 관여하는 *P5CS*와 Na^+/H^+ antiporter에 관여하는 *NHX1*의 양적 변화를 검증 할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 벼 배 배양 캘러스에 방사선 조사와 AZCA 처리를 통해 AZCA 저항성 세포주를 선발 육성하고 proline 함량이

증가된 선발 계통을 중심으로 염분 스트레스에 저항성을 갖는 벼 계통을 육성하고 그 기작을 밝히고자 하였다. 먼저, 1) AZCA 저항성 후대로부터 NaCl 저항성 식물체를 선발하고, 2) 선발된 저항성 계통의 생리적 생화학적 특성을 분석하였으며, 3) 분자적 특성을 RT-PCR을 통해 조사하고 유전적 변이를 탐색하였다. AZCA 저항성 M₃ 3,000 계통으로부터 얻어진 약 20,000 종자에 염분 적정 선발 농도로 밝혀진 1.5%의 염분을 처리하여 내염성 (ST) 벼 116 개체를 선발하고, M₄ 후대 세대를 양성하였다. ST M₄ 세대에서 2차 내염성 계통 선발을 위해서 M₄ 세대계통을 1.2% NaCl 에서 대조구와 생육 조사한 결과, 대조구 식물은 생육이 약하고 성장이 지연되는 것을 볼 수 있었다. 내염성 계통(ST-13, ST-16)으로부터 유도된 캘러스에 NaCl 처리한 결과, 대조구, ST-13, ST-16의 생존율은 9%, 16%, 20%로 나타났다. 또한, 필수 아미노산 함량을 잎, 종자 및 캘러스로 나누어 분석한 결과 ST-13와 ST-16는 대조구와 비교하여, 1) 잎에서는 약 1.24, 1.3배, 2) 종자에서는 1.49, 2.43배, 3) 캘러스에서는 1.32, 1.60배 증가하는 것이 확인되었다. 내염성 계통과 대조구에서 이온함량을 비교한 결과 잎과 뿌리에서 K^+ , Na^+ 및 Na^+/K^+ 비율을 보면 대조구보다 Na^+/K^+ 비율이 낮아진 것이 확인 되었다. 내염성과 연관된 유전자 *P5CS*, *NHX1*를 이용하여 RT-PCR 실험을 수행한 결과, 돌연변이 계통에서 이들 유전자의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 선발된 계통은 내염성 육종 및 기초 연구를 위한 재료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 과학기술부 원자력연구개발 사업과 농촌진흥청 바이오그린 21 사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

인용문헌

- Aharon GS, Apse MP, Duan X, Hua X, Zhang H.-X, Blumwald E (2003) Characterization of a family of vacuolar Na^+/H^+ antiporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* 253: 245-256
- Ahloowalia BS (1990) In vitro radiation induced mutagenesis in potato. pp. 39-46. In : Sangwan RS and Sangwan-Norreel BS (Eds.). *The impact of Biotechnology in Agriculture*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Akbar, Yabuno T, Nakao S (1972) Breeding for saline-resistant varieties of rice: I. variability for salt tolerance among some rice varieties. *Jpn J Breed* 22: 277-284
- Chandler SF, Thorpe TA (1987) Proline accumulation and sodium sulphate tolerance in cellular cultures of *Brassica napus* L. cv. Wester. *Plant Cell Rep* 6: 176-179
- Csonka LN, Hanson AD (1991) Prokaryotic osmoregulation:

- genetics and physiology. *Annual Review of microbiology* 45: 569-606
- Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4: 215-223
- Delauney AJ, Hu C.-AA, Kishor PBK, Verma DPS (1993) Cloning of ornithine δ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J. Biol Chem* 268: 18673-18678
- Epstein E, Norlyn JD, Rush DW, Kingsbury RW, Kelly DB, Cunningham GA, Wrona AF (1980) Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* 210: 399-404
- Flowers TJ, Flowers SA, Hajibagheri MA, Yeo AR (1990) Salt tolerance in the halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Tateoka. *New Phytol* 114: 675-684
- Forlani G, Scainelli D, Nielsen E (1997) 1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from cultured cells of potato. *Plant Physiol* 113: 1413-1418
- Gange TJ and Page AL (1974) Rapid acid dissolution of plant tissue for cadmium determination by atomic absorption spectrophotometry. *At Absorpt Newsl* 13: 131
- Garcia-Agustin P, Primo-Millo E (1995) Selection a NaCl-tolerant citrus plant. *Plant Cell Rep* 14: 314-319
- Hasegawa H, Mori S (1986) Non-proline accumulating rice mutants resistant to hydroxyl-L-proline. *Theol Appl Genet* 72: 226-230
- Hyun DY, Lee IS, Kim DS, Lee SJ, Seo YW, Lee YI (2003) Selection of Azetidine-2-carboxylic Acid Resistant Cell Lines by *in vitro* Mutagenesis in Rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Biotechnology* Vol. 5(1): 43-49
- Igarashi Y, Yoshiba I, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Shinozaki K (1997) Characterization of the gene for delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the statement of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Mol Biol* 33: 857-865
- Kim DS, Lee IS, Jang CS, Hyun DY, Seo YW, Lee YI (2004) Selection of 5-methyltryptophan resistant rice mutants from irradiated calli derived from embryos. *Euphytica* 135: 9-19
- Lee IS, Kim DS, Hyun DY, Lim YP, Lee YI (2002) *In vitro* selection and characterizations of gamma radiation-induced salt tolerant lines in rice. *Korean J. Plant Biotechnology*
- Lee HY, Bae CH, Lim YP, Park RD, Cho BH, Lee SI, Choi HC, Kim HI (2002) Characterization of the 5-methyltryptophan resistant mutant lines selected by mutagenized seeds in rice. *Korean J. Plant Tissue Culture* Vol. 27(6): 453-459
- Mass EV, Hoffman G (1976) Managing saline soil for irrigation. Texas Technical Inst, Texas
- Mass EV, Hoffmann GJ (1977) Crop salt tolerance-current assessment. *J Irrig Drainage Div. ASCE* 103: 115-134
- Mifflin BJ, Bright SWJ, Rognes SE, Kueh JHS (1983) Amino acids, nutrition and stress: the role of biochemical mutants in solving problems of crop quality. In: Kosuge T, Meredith C. P. Hollaender A (eds) *Genetic engineering of plants - an agricultural perspective*. Plenum Press, London, pp. 391-414
- Pearson GA, Ayers AD, Eberhard DL (1960) Relative salt tolerance of rice during germination and early seedling development. *Soil Sci* 102: 151-156
- Pollard A, Wyn Jones RG. (1979) Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta* 144: 291-298
- Peng Z, Lu Q, Verma DPS (1996) Reciprocal regulation of pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol. Gen. Genet* 253: 334-341
- Rhoades JD, Loveday J (1990) Salinity in irrigated agriculture. In: American Society of Civil Engineers, Irrigation of Agricultural Crops. pp 1089-1142 American Society of Agronomists
- Roosens NH, Willem R, Li Y, Verbruggen I, Biesemans M, Jacobs M (1999) Proline metabolism in the wild-type and in a salt tolerant mutant of *Nictiana plumbaginifolia* studied by ¹³C-nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiol* 121: 1281-1290
- Sadat Noori SA, McNeilly T (2000) Assessment of variability in salt tolerance based on seedling growth in *Triticum durum* Desf. *Genet. Res. Crop Evol* 47: 285-291
- Takeuchi T, Prockop DJ (1969) Biosynthesis of abnormal collagens with amino acid analogs. *Biochim. Biophys. Acta*, 175: 142-155
- Tarr GE (1986) Methods of protein microcharacterization. In: Shively JE ed., Humana press, Clifton NJ pp. 155-194
- Van Swaaij AC, Jacobsen E, Kiel JAKW, Feenstra WJ (1986) Selection, characterization, and regeneration of hydroxyproline-resistant cell lines of *Solanum tuberosum*: tolerance to NaCl and freezing stress. *Physiol Plant* 68: 359-366
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte system. *Science* 217: 1214-1222
- Yancey PH (2001) Water Stress, Osmolytes and Proteins. *Amer. Zool* 41:699-709
- Zhang HX., Blumwald E (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* 19(8): 765-768.
- Zhang GY, Guo Y, Chen SL, Chens SY (1995) RFLP tagging of a salt tolerance gene in rice *Plant Sci* 110:227-234
- Zhu, Su BJ, Chang M, Verma DPS, Fan YL, WU R (1998) Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. *Plant Sci* 139: 41-48

(접수일자 2006년 10월 5일, 수리일자 2007년 1월 10일)