

CAX1 형질전환체 벼의 *In Vivo*에서 주요특성 분석

김경민*[†]

*경북대학교 생태자원응용학부

Major character analysis of CAX1 (cation exchanger 1) transgenic rice plants in *In Vivo*

Kyung-Min Kim*[†]

*School of Applied Ecological Resources, Kyungpook National University, Sangju, 742-711, Korea

ABSTRACT This study was carried out to develop transgenic rice cultivars with the CAX1 (accession no. U57411) gene. We successfully selected the transgenic rice plants over-expressing the *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 (accession no. U57411) gene in T₆ generation. The brown rice of the CAX1 expressing rice contained 13.4~68.0 % more calcium (Ca²⁺) than that of the wild type and 5 lines were selected based on the phenotypes compared to the control cultivar at the GMO field. The CAX1 expressing transgenic rice plants were similar in phenotype to the wild type during the whole growth period. Also these selected 4 lines appeared to be resistant to blast, cold and water solution compared with the wild type. Difference in 1,000 grain weight of brown rice was observed among each line but grain shape did not show any morphological alternations. These results suggest the enhanced Ca-substrate specificity of CAX1 exchanger in donor plant. Therefore, intact CAX1 exchanger can be functionally useful for Ca²⁺ nutrient enrichment of rice with reduced accumulation of undesirable cation.

Keywords : Rice, CAX1, Gene expression, Disease resistance, Cold resistance

칼슘은 식물 또는 동물의 생육에 중요한 역할을 하며, 다중성 신호전달 경로에 관련되어 있다. 세포질 내의 칼슘 농도는 100~200 nM로 엄격히 조절되나 일부기관에서는 μM ~mM 수준의 고농도 칼슘이 존재한다고 한다(Bush, 1995; Sanders et al., 1999). 식물체 내 칼슘의 농도는 여러 요인의 영향을 받는다. 저온, 염분, 가뭄 등과 같은 환경적 stress는 세계적으로 작물의 생산성에 막대한 영향을 끼친다. 이런 불량한 성장조건에서 살아남기 위해서는 식물은

여러 가지 대응방안을 개발해낸다. 환경 스트레스에 의해 유발되는 유전자를 생산하여 불리한 조건이 되면 방어기작이 발생하게 되어 하부 신호전달계를 통하여 수십 여종의 생체 방어 관련 유전자(pathogenesis-related protein gene)의 발현을 증폭시켜 자체방어를 가능하게 하며(Saijo et al., 2002), 유리칼슘의 일시적인 농도증감으로 biotic stress와 abiotic stress의 불량환경에 생물학적으로 반응한다(Knight et al., 1997; Tahtiharju et al., 1997). 식물이 저항성 증진을 하기위해서 Ca²⁺은 intracellular 이온신호에 따라 식물 액포에서 이동된다(Marty, 1999). 식물 세포내 액포막에 존재하는 다양한 이온 carrier, 그 중 특히 Ca²⁺ transporter는 Ca²⁺의 세포질 내 수준을 조절할 뿐만 아니라, 이러한 액포와 세포질간의 Ca²⁺ 이동은 다양한 생체신호전달과 밀접한 연관을 가진다(Allen et al., 1995). Mg²⁺와 K⁺의 농도, cold shock, 병원균 침입 등의 생물학적 반응들에 의해서 담배 세포내의 Ca²⁺ 농도가 증가하며, Alfalfa에서 4°C로 처리했을 때 Ca²⁺의 세포내 유입이 현저히 증가하였다(Barlka & Pantoja, 1996; Hirschi, 1999; Kitigawa & Yoshizaki, 1998; Monroy & Dhindsa, 1995). 분자생물학의 발달과 더불어 식물체내 Ca²⁺ 축적과 농도조절에 관련된 여러 가지 중요 유전자가 분리되고 있다(Cheng et al., 2004). *Arabidopsis*에서 동정된 H⁺/Ca²⁺ 수송체의 CAX1(cation exchanger 1, accession no. U57411)은 식물 체내의 다양한 pattern의 Ca²⁺ 농도의 증가 혹은 축적은 하부 신호전달계를 통하여 수십여종의 생체방어 관련 유전자들의 발현을 증폭시켜 자체 방어를 가능하게 한다(Hirschi et al., 1996). CAX1은 액포막에 위치하는 Ca²⁺/H⁺ antiporter로서 액포 내로 Ca²⁺를 수송하는데, 이 유전자가 과발현된 담배는 Ca²⁺의 축적량이 형질전환되지 않은 식물체에 비해 뿌리에서는 2배, 엽조직에서 30% 이상 높아진다. 더욱이 CAX1 유전자가 과발현된 토마토의 과실과 당근 뿌리에서도 각각 정상식물체에 비해 150%와 60%의 Ca²⁺

[†]Corresponding author: (Phone) +82-54-530-1233

(E-mail) kkm@knu.ac.kr

<Received July 24, 2009>

증가가 확인되었으며(Park et al., 2004), 감자에서는 잎과 괴경에서 모두 1.5~3.0 배의 칼슘함량 증가를 확인하였다(Oh et al., 2005). 우리나라는 세계 인구 40%가 주식인 벼 작물에서 생산성이 증대된 형질고정계통이 육성된 것은 제초제 저항성 2건으로(Jeon et al., 2007) 세계적인 형질전환 작물시장규모와 겨루기 위해서는 미비한 실정이다. 국내에서는 형질전환 작물 관련 실험 등이 유전적 안전성을 기반으로 후대선발, 포장 단계에서 진행되고 있다(Kim et al., 2008; Jang et al., 2003; Waterer et al., 2000). 본 시험은 *CAX1* 유전자가 도입된 형질전환체 벼를 포장에서 칼슘함량 및 농업적 형질, 형질전환체의 후대안전성 평가모델 시스템을 파악하고자 수행하였다.

재료 및 방법

CAX1 형질전환체 벼 계통의 분자생물학적인 분석

T₃에서 T₆ 세대별 형질전환체임을 확인하기 위하여, 각 공시계통별 120개 식물체의 잎을 채취하여 DNA 추출은 다음과 같은 방법에 따라 추출하였다. 신선한 잎 20mg을 e-tube에 넣고 질소를 넣고 시료를 간다. 700 µl DNA extraction buffer [2% w/v CTAB, 1.42M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 2% w/v polyvinylpyrrolidone(pvp-40), 5.0 mM ascorbic acid, 4.0 mM diethyldithiocarbamic acid], 10 µl RNaseA를 튜브에 넣는다. vortex 한 다음 65°C에 30분간 넣어둔다. 700 µl PCI(Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol 25:24:1)를 e-tube에 넣고, 20분간 shaking 한다. 15,000 rpm으로 10분간 원심한 후, 상등액 500 µl를 pipette으로 떠내어 다른 e-tube에 옮긴다. 350 µl isopropanol를 상등액 담은 e-tube에 넣고 shaking하여 잘 섞는다. Deep freezer(-70°C)에 20분 동안 처리한 다음 상온에서 얼어있는 e-tube를 녹이고 15,000 rpm으로 10분간 원심 한다. 원심 한 후 생긴 pellet만 남기고 액체는 pipet을 이용하여 버린다. 500 µl 70% alcohol로 세척하고 pellet만 남기고 70% alcohol은 버린다. e-tube 뚜껑을 열어 건조시킨 후 멸균수를 e-tube에 넣고 냉장고에 보관하면서 overnight 한 후 농도체크를 한다. 목적으로 하는 유전자의 판별을 위하여, 5'-TgCCgCCATTATTTgCACCT(forward)와 5'-TgTCATCCCAACCAACCATg(reverse)를 primer로 하였다. 각 PCR 반응액은 1 µl template DNA, 2 µl 10X buffer, 0.5 µl 5 mM dNTP, 0.5 µl forward primer, 0.5 µl reverse primer, 0.2 µl Tag DNA polymerase(2 unit) 등의 조성으로 총 반응액을 20 µl로, PCR증폭시간은 94°C에 5분간 예열(pre-denaturation) 하였고, 94°C에 30초간(denaturation), 55°C에 30초(annealing), 72°C에서 30초(polymerization)간

을 1 cycle로 하여 총 30cycle을 하였으며 최종 DNA 합성은 72°C 7분간하여, Biometra PCR(German) 기기를 이용하여 수행하였다. 합성된 DNA는 1.2% agarose gel에서 전기영동(100 volts, 1시간)하고 EtBr(Ethidium Bromide)로 염색하여 UV illuminator로 확인하였다.

벼의 약 및 현미 캘러스 유도 및 형질전환 식물체 육성

2,4-D(2 mg/L), casein hydrolysate(2 g/L), sucrose(30 g/L) 및 gelrite(5 g/L) 등이 첨가된 N₆배지에서 형성된 백진주벼의 캘러스와 2 mg/L NAA, 0.2 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose 및 5g/L gelite등이 첨가된 N₆-Y₁배지에서 형성된 형질전환체 캘러스를 이용하여 *Agrobacterium* vector와의 co-cultivation에 이용하였고, pCAX1이 형질전환된 *Agrobacterium* LBA 4404의 배양에는 50 mg/L의 kanamycin과 250 mg/L의 streptomycin이 첨가된 LB배지(10 g/L Trypton, 5 g/L Yeast-extract, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar, pH 7.0)를 이용하였다. 벼 완숙현미 유래 및 약배양 유래의 캘러스를 형질전환시키기 위하여 적정밀도(10⁷ cells/mL)로 자란 *Agrobacterium* 배양액에 캘러스를 10초 정도 감염시킨 다음, 1 mg/L의 NAA, 5 mg/L의 kinetin, 30 g/L의 sucrose와 5 g/L의 gelrite가 첨가된 N₆배지에서 3일간 공동배양하였다. 형질전환된 식물체를 얻기 위하여 *Agrobacterium* vector와 공동배양된 캘러스를 1 mg/L의 NAA, 5 mg/L의 kinetin, 50 mg/L의 kanamycin, 30 g/L의 sucrose와 5 g/L의 gelrite가 첨가된 N₆ 배지에서 1주 동안 명상태(2,500Lux)로 배양한 다음, 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 50 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin, 30 g/L sucrose와 5 g/L gelrite가 첨가된 N₆배지에 이식하였다. 배양조건은 1일 14시간, 2,500 Lux로 조절된 명상태에서 식물체를 재분화 시키고, 식물체 순화는 26°C가 유지되고 Yoshida 수경액(Yoshida et al., 1976)에 2주 도안 차광 재배하면서 새로운 뿌리가 발견될 때 플라스틱 포트(20×17 cm)에 1본씩 이식하여 온실에서 재배하였다.

CAX1 형질전환체 벼 계통 육성 및 농업적 특성

본 연구에 사용된 시험재료는 2006년부터 2008년 하계에 경북대학교 농업생명과학대학 실습포장에서 표준재배법으로 재배한 공시계통인 일품벼와 함께 *Agrobacterium* vector를 이용한 *Arabidopsis thaliana* Ca²⁺/H⁺ 수송체 유전자인 *CAX1*(cation exchanger 1)이 도입된 T₄~T₆ 계통을 시험재료로 사용하였다. 각 세대별 포장특성조사는 하계에 T₃세대까지 34계통을 모식물인 일품벼와 공시하였고, 그 외 종자 내 칼슘함량 조사를 비롯한 5가지 실험에는 이전

에 실시한 Southern 분석 결과 CAX1 prove의 band 양상이 뚜렷이 나타난 7계통(T-14, T-15, T-17, T-18, T-19, T-20, T-24)을 T₄~T₆ 계통에서 공시하였다. 생육특성은 2008년 하계에 T₄~T₆의 7계통과 모품종인 일품벼를 대상으로 간장, 수장, 수수를 농촌진흥청의 농사시험 조사기준에 따라 조사하였다. 계통 당 10개체씩 5반복으로 측정하여 평균을 구하였다. 병해저항성은 2007년에서 2008년까지 포장실험에서 가장 많이 발견되는 8월 30일에 도열병과 잎집무늬마름병의 병징을 관찰하였으며 모식물인 일품벼를 대조구로 7계통 형질전환체와 비교해 병해가를 조사하였다. 방제가는 아래와 같은 공식으로 조사하였다.

방제가

$$= [(\text{무처리 피해도} - \text{처리구 피해도}) / \text{무처리 피해도}] \times 100$$

T₆ 계통들의 동일한 환경요인에서 쌀의 무기성분과 환경 적응성 조사를 위하여 온실에서 파종한 후 본엽이 4매가 출현하였을 때 Yoshida 수경액(Yoshida et al., 1976)으로 1주일 간격으로 수경액을 교환하였다. 수경액은 1.43 mM N, 0.37 mM P, 0.51 mM K, 1 mM Ca, 1.6 mM Mg이며 배양용기 크기(35.5×29×24 cm)이다. 조절된 일장은 주야(13시/11시간), 온도는 주야(30°C/20°C), 1일 상대습도는 45%이었다. 저온저항성은 T₆세대 7계통과 모품종인 일품벼를 5 cm 깊이로 상토를 채운 플라스틱 상자(32×25×10 cm)에 2.0×0.5 cm 간격으로 계통 당 10립씩 3반복으로 파종하여 15일(4~5엽기)간 2007년 동계 온실에서 재배하였다. 저온저항성 실험을 수행하기 위해 정상적인 생육조건

의 집단과 저온처리 집단으로 구분하여 각 계통을 2집단으로 분할하였다. 정상적인 생육조건인 집단은 동계온실에서 재배하고, 저온처리를 하는 집단을 17°C로 유지되는 growth chamber에서 재배하였다. Growth chamber 내 광 조건은 14 hr(100 lux)/10 hr(암상태)로 하였다. 각각의 조건에서 3주간 생장 시키면서 1주마다 초장을 조사하였다. 저온 처리된 계통에 대해서 잎의 chlorophyll값은 SPAD-502(soil plant analysis development)으로 조사하였다(Minolta Camera Co., Osaka, Japan). 측정은 1주마다 벼 잎의 변이를 고려하여 각각 잎의 상, 중, 하를 3반복으로 측정하였다.

형질전환체의 종자내의 칼슘 함량 분석

칼슘분석을 위하여 CULTURE YZER-mini Techno medica, Co.(Japan)에 전처리하여 분석하였다. 전처리액은 제현기를 이용하여 가루낸 15 g 현미에 동량의 물을 넣고 30분 간격으로 vortex 4번을 한 뒤 정지한 후, 상층액 10ml을 상온에서 1일 정치한다. 상온에서 Vortex한 액을 1시간 침지, e-tube에 상층액 1.5 ml을 옮긴다. 1200 rpm 2분 동안 원심분리기에서 한 후, 10분 후 상층액을 e-tube로 옮긴 후 증류수로 3:1로 희석한 다음, 다시 vortex한 후 10분 침지로 전처리하였다.

결과 및 고찰

Table 1에서와 같이 일품벼를 모품종으로 하여 CAX1 유

Table 1. Frequency of expressed band of CAX1 transgenic lines from each generation.

TC	T ₀ (A ₀)*			T ₁ (A ₁)*			T ₂			T ₃			T ₄			T ₅		
	PP	EB	PB	PP	EB	PB	PP	EB	PB	PP	EB	PB	PP	EB	PB	PP	EB	PB
14	1	1	100	2	2	100	4	4	100.0	24	21	87.5	24	19	79.2	111	54	48.6
15	1	1	100	1	1	100	4	4	100.0	24	18	75.0	24	17	70.8	116	57	49.1
16	1	1	100	1	1	100	1	1	100.0	24	18	75.0	24	11	45.8	120	0	0.0
17	1	1	100	3	3	100	2	2	100.0	24	12	50.0	24	12	50.0	119	56	47.1
18	1	1	100	1	1	100	7	6	85.7	24	17	70.8	24	3	12.5	106	6	5.7
19	1	1	100	9	7	77.8	4	3	75.0	24	18	75.0	24	2	8.3	75	12	16.0
20	1	1	100	4	4	100	4	4	100.0	24	20	83.3	24	8	33.3	119	18	15.1
21	1	1	100	5	5	100	1	1	100.0	24	12	50.0	24	8	33.3	120	0	0.0
22	1	1	100	5	5	100	15	12	80.0	24	15	62.5	24	12	50.0	120	0	0.0
23	1	1	100	1	1	100	1	1	100.0	24	17	70.8	24	12	50.0	120	0	0.0
24	1	1	100	11	11	100	1	1	100.0	24	14	58.3	24	9	37.5	116	4	3.4
25	1	1	100	12	12	100	1	1	100.0	24	17	70.8	24	12	50.0	120	0	0.0
Iipum-Anther	5	5	100	42	42	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Backjinju	1	1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Generation of anther culture. TC : Transgenic lines and cultivars. PP : No. of putative plant. EB : Expressed band by PCR. PB : Percentage of expressed band. - : Data not shown. Iipum - Anther : Putative plants from anther culture. A₀ : generation from anther culture. T₀ : generation from seed culture.

전자로 형질전환된 개체와 조기세대 고정을 확인하기 위하여 분자marker로 유전자가 삽입됨을 확인하였다(Kim et al., 2004). 그 개체를 약배양하여 얻어진 형질전환 식물체 및 현미의 칼슘함량 비교를 위하여 백진주벼를 이용하여 형질전환체 얻어 PCR로 얻어진 분석결과이다. 현미에서 캘러스를 유도하여 *CAX1* 유전자를 형질전환 한 세대들은 T₆ 세대까지 PCR 밴드가 0.0~47.5% 정도로 나타났으며, 약배양은 A₁ 세대에서 100% 나타났다. 따라서 앞으로 형질전환 후 고정된 형질전환개체를 조기 선발에는 약배양을 통한 방법이 가장 효율적이라고 생각된다. Won et al.(2004)도 약배양에 의한 형질전환체 고정으로 목적하는 계통을 조기에 육성할 수 있는 생력육종체계가 확립되었다고 보고하였다.

형질전환체 T₄~T₆세대를 3년간 농업적 특성비교를 하여 주요 농업형질이 우량한 7계통을 선발하여 주요 농업적 특성을 조사하였다(Table 2). *CAX1* 형질전환체 15, 17, 18, 24 계통들은 출수기가 모품종인 일품벼와 비슷한 경향이있

고 14, 19, 20 계통들은 일품벼보다 6~11일까지 늦어지는 경향이였다. 형질전환체 7계통의 간장을 조사한 결과 14 계통을 제외하고는 대부분 모품종인 일품벼와 유사하게 나타났다. Bashir et al.(2004)은 벼 포장시험에서 형질전환체 출수기는 원품종보다 10~22일까지 늦어지는 경향이 있다고 보고하였고, Park et al.(2007)은 낙동벼 형질전환체는 출수기가 낙동벼와 비슷한 경향이였고, 일품벼 형질전환체들은 일품벼보다 출수기가 3~6일정도 빨라지는 경향을 보였다 하였고. 형질전환체 계통의 수장과 수수도 3년간 자료에서 차이가 있어 보이나 일품벼와 유사하였다. 따라서 형질전환 세대별 간장, 수장, 수수를 조사하여 모품종과 유사한 17, 18, 19, 20, 24를 선발하였으며, 14 계통은 잎이 좁고, 15 계통은 영양생장기 동안 엽록체 부족현상을 보이다가 생식생장기에는 정상적으로 생육하는 특성이 있어 앞으로 분자생물학적인 연구 또는 생리화적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 2. Agronomic traits between *CAX1* transgenic rice plants and Ilpum.

Transgenic lines & cultivars	Culm length(cm)			Panicle length(cm)			Panicle number			Heading data(day/Month)	
	T ₄	T ₅	T ₆	T ₄	T ₅	T ₆	T ₄	T ₅	T ₆	T ₅	T ₆
14	48.8±7.4 ^{a)}	50.5±7.9 ^{a)}	45.25±2.2 ^{a)}	19.3±2.2 ^{a)}	17.8±1.9 ^{a)}	16.6±1.4 ^{a)}	12.3±2.1 ^{a)}	8.0±2.7 ^{a)}	5.4±1.6 ^{a)}	12 Aug.	12 Aug.
15	44.1±8.3	46.9±6.0	42.0±4.1	16.9±2.4	18.1±1.3	17.4±1.2	10.9±2.4	5.1±3.7	6.75±1.7	1 Aug.	1 Aug.
17	54.1±4.2	61.5±7.4	63.6±2.1	19.6±2.1	16.2±1.8	21.8±0.8	13.9±2.3	6.4±2.5	8.9±1.3	4 Aug.	3 Aug.
18	54.5±3.3	52.7±3.2	63.3±1.6	19.2±1.3	14.7±0.8	21.1±0.5	11.7±1.9	7.0±3.3	7.3±0.5	3 Aug.	2 Aug.
19	50.8±9.0	71.2±8.5	63.5±1.9	17.1±1.3	18.3±1.8	17.7±0.8	13.5±4.0	7.3±2.7	9.08±1.3	3 Aug.	9 Aug.
20	54.8±6.8	68.2±5.0	58.7±2.1	18.1±1.8	17.4±1.4	20.0±1.1	13.1±2.6	8.3±2.9	8.3±1.2	14 Aug.	15 Aug.
24	57.9±3.9	67.1±4.7	59.9±1.6	18.2±1.4	18.2±1.8	18.2±0.3	13.7±1.6	7.3±2.0	9.7±1.0	3 Aug.	1 Aug.
Ilpum	62.2±4.1	70.0±4.5	61.9±1.9	19.1±1.4	18.1±1.3	20.1±2.8	15.3±2.4	8.0±2.8	10.5±3.4	3 Aug.	1 Aug.

^{a)} Mean ± SD.

Table 3. Resistance value of disease between *CAX1* transgenic plants and Ilpum.

Transgenic lines	Resistance value		
	Blast		Sheath blight
	T ₅	T ₆	T ₆
14	12.9	82.92	33.80
15	-348.6	-936.45	-45.69
17	3.36	20.27	-10.14
18	27.9	60.14	-36.71
19	23.5	25.97	21.45
20	58.5	65.83	46.74
24	11.51	-30.98	82.98

CAX1 형질전환체인 T₅~T₆세대에서 일품 모품종보다 벼도열병(blast)과 벼잎집무늬마름병(sheath blight)의 방제가가 낮게 나왔으며, 벼도열병은 2년간 모두 모품종에 대비해 14, 17, 18, 19, 20은 방제가가 높게 나타나 병저항성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 벼잎집무늬마름병은 14, 19, 20, 24 계통이 방제가가 높게 나타났으며, 벼도열병과 벼잎집무늬마름병 모두 방제가가 높은 계통은 14, 19, 20 으로 조사되었다. T₆-18 계통은 우수형성기전 벼잎벌레에 의한 식흔이 모든 포기에서 발견되었고, T₆-20 계통은 벼키다리 병 등에 의해 생육초기 7~8월부터 고사한 것이 다소 있었다. Hirschi(1999)는 식물체가 특정 스트레스 하에 놓였을 때 세포질 내의 칼슘 농도는 일시적으로 증가함으로써 병원균 침입에 대한 식물의 저항성 증진에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 결과와 유사한 경향을 나타냈다.

형질전환체의 abiotic stress 구명을 위하여 형질전환체와 일품벼를 Yoshida 수경액(Yoshida et al., 1976)에 Ca²⁺를 제거한 용액을 이용하여 파종부터 종자 수확기 때까지 재배하였다. 모품종인 일품벼와 T₆ 세대 4계통(T₆-17, T₆-18, T₆-19, T₆-24)과 모품종인 일품벼를 대상으로 4주 간격으로 3반복으로 초장의 증가율을 보았다(Fig. 1). CAX1 형질전환체를 모품종인 일품벼와 비교해 볼 때 본엽이 5~8엽, 분얼속도, 개화시기는 모품종과 일치하는 경향으로 생육상의 차이가 없었으며, 엽색의 진하기, 활력 등 생육상은 CAX1 형질전환체가 모품종 보다는 건전한 증가세를 보였다. 수확기 때 간장, 수수, 뿌리길이, 뿌리 전체중의 측정된 결과는 다음과 같다 (Table 4). T₆-17, T₆-19, T₆-20은 모품종인 일품벼보다 간장, 수수, 뿌리의 전체중이 높게 나타났으며 T₆-24은 모품종인 일품벼에 비해 뿌리길이는 비슷하지만 뿌리전체중은 2배로 나타났다. 생육상의 양상은 Fig. 2와 3에서 나타내었다. Allen et al.(1995) 와 Bashir et al. (2004)은 토양 내 이온 불균형은 식물에 심한 스트레스를

제공하게 된다. 따라서 식물은 이들 이온 불균형에 대해 적응하기 위하여 일정량의 다양한 이온들을 세포액 혹은 세포 소기관이나 세포 외부에 축적하고 있다가 이들을 서로 이송 혹은 교환시킴으로서 토양 내 이온 불균형에 대해 극복해 나가는 것으로 알려져 있다. 식물액포는 이런 다양한 이온들의 중요한 저장기관이다. 더욱이 액포로부터 cytosol로의 Ca²⁺의 이동은 다양한 생체신호전달과 밀접한 연관을 가진다고 하였다. 본 실험의 결과로 CAX1 형질전환체는 저비료, 바이오메스가 증대된 벼 품종을 개발 가능성을 보여준다고 생각되어진다.

T₆ 세대의 종자를 육묘상자에 파종하여 정상적인 조건에서 4~5엽기까지 성장시킨 후 온실과 저온상태(17°C)의 growth chamber에서 3주간 생육시킨 결과, 저온처리 된 벼의 초장 조사에서 각각 온실과 17°C의 두 조건에 있어서 온실에서의 초장 조사와 생존 개체수를 대비해 볼 때 일품벼와 형질전환체 모두 정상적인 발육상태를 보였으나, 저온조건에서 초장 조사는 일품벼에 비해 T₆-19를 제외한 형질전환 계통들이 양호하였으며 T₆-18, 24 계통은 내한성 품

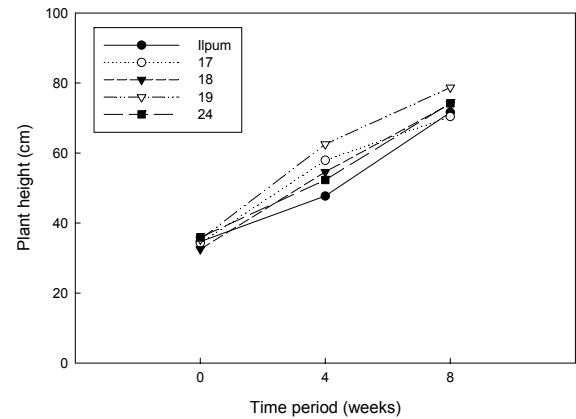


Fig. 1. Growth rate of water solution at CAX1 transgenic plants.

Table 4. Growth rate of water solution(minus Ca⁺⁺) between CAX1 transgenic plants and Ilpum.

Transgenic lines & cultivars	Plant length (cm)	Panicles (No.)	Root length (cm)	Dry weight of root (mg)
T ₆ -14	15.2±2.9	6.3	24.0±2.5	462.8±193.3
T ₆ -15	14.9±4.1	5.7	28.8±2.8	424.5±100.3
T ₆ -17	16.6±1.9	7.8	27.0±2.5	617.8±193.3
T ₆ -18	17.3±0.6	7.3	24.6±3.5	410.0±858.2
T ₆ -19	19.6±1.7	8.4	28.9±2.1	570.2±220.0
T ₆ -20	17.1±2.7	10.4	25.9±2.0	541.2±190.0
T ₆ -24	16.9±2.2	7.0	26.6±2.0	944.5±241.0
Ilpum	15.6±3.9	6.7	20.6±3.5	475.8±176.5

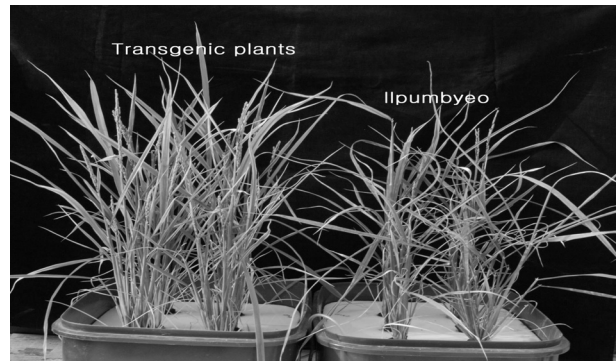
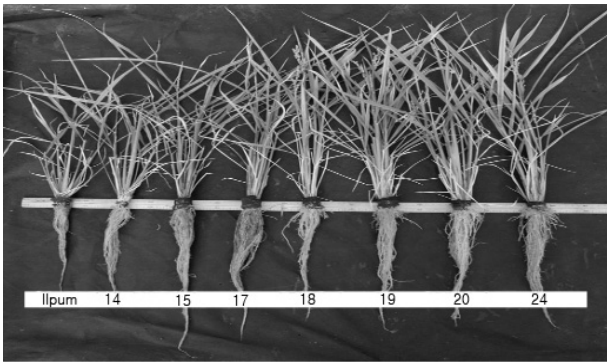


Fig. 2. Difference of micro elements between *CAX1* transgenic plants and wild type except Ca^{2+} in water solution. **Fig. 3.** Difference of phenotype between *CAX1* transgenic plants and wild type in water solution.

Table 5. Difference of growth in cold resistance between *CAX1* transgenic plants and cultivars.

Lines & cultivars	Greenhouse			17°C			% of plant
	1week	2Weeks	3weeks	1week	2weeks	3weeks	
T ₆ -17	20.8±6.5	29.8±2.2	33.5±4.2	9.5±3.2	9.9±3.3	11.6±2.0	100
T ₆ -18	18.5±9.9	34.2±6.0	35.8±13.5	12.85±2.7	13.5±2.5	14.1±2.7	100
T ₆ -19	21.3±7.2	27.2±7.1	34.0±5.3	7.7±1.9	7.95±1.6	8.8±3.2	100
T ₆ -20	21.3±7.6	28.5±5.6	34.0±4.9	8.6±2.4	8.9±2.3	9.3±2.5	100
T ₆ -24	23.8±5.1	30.9±5.5	35.4±7.8	10.7±2.0	10.9±2.1	11.5±1.0	100
Ilpum	19.6±6.9	28.0±7.9	32.9±6.8	15.1±2.2	15.3±2.8	15.6±2.9	40
Sangju	27.9±4.6	39.8±7.6	46.8±8.0	13.4±3.3	17.0±2.3	17.0±2.8	70
IR36	22.7±7.3	37.8±4.3	45.3±2.6	15.9±2.5	15.0±3.7	0.0	0

종인 상주벼와 유사하거나 조금 차이가 났다. 그리고 저온 처리 후의 생존개체 수 조사에서 일품벼의 생존개체 수는 처리 전의 40%정도 유지되었으나, 형질전환계통들의 경우 생육상태는 온실조건에서 자란 것에 비해 다소 불량하였지만 100%의 생존율을 보였다. 17°C의 저온조건에서 IR36은 생존개체 수가 없었다(Table 5).

CAX1 형질전환체의 생리적 특성을 조사하기 위하여 식물체 내의 엽록소 함량 변화를 SPAD(soil plant analysis development)를 사용하여 조사하였다. 엽록소 함량 측정은 형질전환체를 각각 값이 높을수록 광합성과 연관성이 있다고 한 바(Plieth et al., 1999), 엽육의 클로로필 양을 비파괴적인 상태로 측정하는 SPAD-502를 이용하여 모품종인 일품벼를 포함한 형질전환계통의 chlorophyll 함량을 측정하였다. 엽색도에서 저온처리시 일품벼는 잎 끝이 마르고 연한 녹색을 띠는 부분이 많았다. 그에 비해 형질전환계통은 대부분 진한 녹색을 나타내면서 정상에 가까운 생육양상을 보였다. 저온 처리구에서 chlorophyll 함량은 엽색도와 같이 모품종인 일품벼에 비해 모두 일품벼보다 높게 측정되었으며 T₅-18,

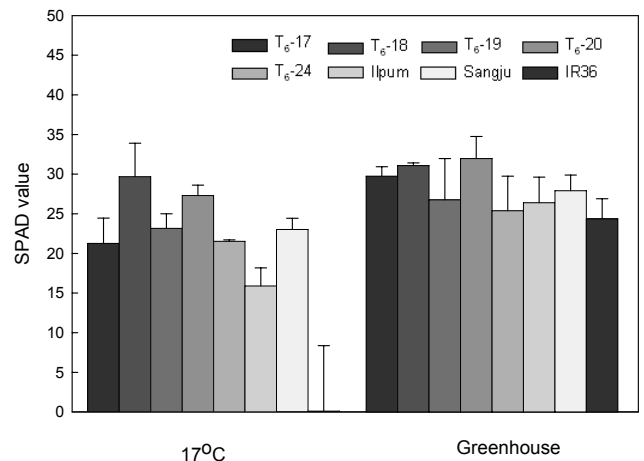


Fig. 4. Comparison of SPAD value after cold treatment (17°C) in *CAX1* transgenic plants.

T₅-20 계통은 높게 나타났다(Fig. 4). Park et al.(2005)은 식물에서 biotic stress(병원균 및 해충), abiotic stress(온도, 수분, 중금속)들에 의해 체내에 다양한 형태의 Ca^{2+} 농도를 증가 또는 축적시킴으로서 이들 칼슘신호는 다시 새로운

Table 6. Comparison of Ca²⁺ analysis between CAX1 transgenic plants and Ilpum.

Transgenic lines & cultivars	Seed generation						
	T ₇		T ₆		T ₅	T ₄	T ₃
	Mg ²⁺	K	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺
T-17	37.2*	161.3	219.6 (63.2)**	154.0 (52.5)	98.7 (-18.4)	87.0 (22.2)	548.6 (469.1)
T-18	50.7	155.2	226.1 (68.0)	388.0 (284.2)	124.1 (2.7)	273.6 (284.3)	1423.1 (1,376.2)
T-19	32.6	155.8	205.9 (53.0)	154.5 (53.0)	112.1 (-7.3)	91.0 (27.8)	532.3 (452.2)
T-20	58.1	175.3	152.6 (13.4)	154.0 (52.5)	-	-	-
T-24	29.4	153.8	202.1 (50.1)	350.0 (246.5)	106.3 (-12.1)	260.0 (265.2)	665.4 (590.2)
Ilpum	64.8	136.0	134.6 (0.0)	101.0 (0.0)	120.9 (0.0)	71.2 (0.0)	96.4 (0.0)

*part per million (ppm).

**rate of increase.

신호전달물질인 reactive oxygen species(ROs), salicylic acid, nitric oxide, jasmonate, ethylene 등 다양한 2차 내지 3차 신호전달 물질들을 만들고 이들은 다시 MAP-kinase cascade 를 포함한 다양한 하부 신호전달계를 통하여 수십여종의 생체방어 관련 유전자들(pathogenesis-related protein gene)의 발현을 증폭시켜 자체방어를 하게 된다고 하였다. 식물체 내 Ca²⁺함량의 증가는 저온스트레스에 대한 저항성과 밀접한 관계가 있는 것으로 Monroy와 Dhindsa(1995)과 Bjorn *et al.*(2000)은 Alfalfa에서 4°C로 저온처리 했을 시 세포 외부에 존재하는 Ca²⁺의 유입이 증가되어 저온저항성이 증가된다는 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 저온처리 시 공변 세포에서 Ca²⁺의 증가로 세포막을 견고하게 함으로서 재배 기간 중 저온내성을 증가시킨다고 했으며(Schiott & Palmgren, 2005), 절대적인 온도보다는 냉각속도(cooling rate)에 영향을 받는다는 연구결과도 있지만(Vega *et al.*, 2000), 본 연구의 결과만으로는 알 수 없으므로 이에 대한 깊이 있는 연구가 필요할 것으로 사료되어진다.

3년간 연구기관 내에 종자내의 칼슘함량을 분석하기 위하여 T₃~T₇ 종자를 이용하여 얻어진 결과는 다음과 같다 (Table 6). T₃ 종자에서 일품 모식물에 비해서 452.2~1,376.2%로 칼슘함량이 증가되어 분자 marker에 의해 선발하여 T₇ 종자까지 분석한 바 13.4~68.0%가 증가된 것으로 조사되었다. 이는 앞으로 유용유전자와 재배환경과의 관계를 더욱 더 분석할 필요가 있을 것으로 사료된다.

CAX1 형질전환체 식물에서 종자 내의 증가된 칼슘함량

이 쌀에 부족한 무기질 공급으로 영양적인 가치를 증대시킬 수 있는 미래식량으로 도움을 줄 것이다. 뿐만 아니라 H⁺/Ca²⁺ 수송체의 유전자 발현은 세포막의 integrity의 유지로 병저항성 작물인 친환경작물로 인식될 수 있으며 저온 저항성, 토양의 불균형과 같은 불량환경에 대한 내재해성인 작물로 대체될 수 있다.

적 요

CAX1 유전자가 도입된 형질전환 벼는 T₃ 세대까지 34계통을 모식물인 일품벼와 공시하였고, 그 외 종자 내 칼슘함량 조사를 비롯한 5가지 실험에서 이전에 실시한 Southern 분석 결과 CAX1 prove의 band 양상이 뚜렷이 나타난 7계통(T-14, T-15, T-17, T-18, T-19, T-20, T-24)을 T₄~T₆ 계통에서 공시하였다. 앞으로 T₇ 세대에 대한 특성조사를 거쳐 Ca²⁺함량이 안정적으로 높게 유지되는 계통을 선발하여 세대육성하면 칼슘과 관련된 유전자의 내재해성 작물의 기초자료 이용뿐만 아니라 농산물의 품질 고급화 및 안정성 향상 그리고 병충해에 의한 농작물 피해를 줄일 수 있는 효과를 가져 오고자 수행한 결과는 다음과 같다. T₄ 세대에서 형질이 안정적으로 발현되면서 모품종과 유사하고 농업적 형질이 우수한 5 계통을 선발하여 T₆세대까지 농업적인 생육 안정성(수장, 수수, 간장)은 15, 17, 18, 24 계통들은 출수기가 모품종인 일품벼와 비슷한 경향이었고 14, 19, 20 계통들은 일품벼보다 6~11일까지 늦어지는 경향이였다.

형질전환체 7 계통의 간장을 조사한 결과 14 계통을 제외하고는 대부분 모품종인 일품벼와 유사하게 나타났다. CAX1 형질전환체인 T₅~T₆세대에서 병저항성은 일품 모품종보다 벼도열병(blast)과 벼잎집무늬마름병(sheath blight)의 방제가가 낮게 나왔으며, 벼도열병은 2 년간 모두 모품종에 대비해 T-14, 17, 18, 19, 20은 방제가가 높게 나타나 병저항성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 벼잎집무늬마름병은 T-14, 19, 20, 24 계통이 방제가가 높게 나타났으며, 벼도열병과 벼잎집무늬마름병 모두 방제가가 높은 계통은 T-14, 19, 20 으로 조사되었다. 저온처리 된 벼의 초장 조사에서 각각 온실과 17°C의 두 조건에 있어서 온실에서 초장 조사와 생존 개체수를 대비해 볼 때 일품벼와 형질전환체 모두 정상적인 발육상태를 보였으나, 저온조건에서 초장 조사는 일품벼에 비해 T₆-19을 제외한 형질전환 계통들이 양호하였으며 T₆-18, 24 계통은 내한성 품종인 상주벼와 유사하거나 조금 차이가 났다. 종자내의 칼슘함량을 분석하기 위하여 T₃~T₇ 종자를 이용하여 얻어진 결과는 T₃ 종자에서 452.2~1,376.2%로 칼슘함량이 증가되었고 분자 marker에 의해 선발하여 된 T₇종자까지 분석한바 13.4~68.0%로 나타남을 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 현장협력기술개발사업(과제번호 : 20070501-080-004-001-01-00) 및 어젠다사업(과제번호: 200901 FHT020815342)의 일부 지원에 의해 이루어진 것 임.

인용문헌

Allen, G. J., S. R. Muir and D. Sander. 1995. Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both inositol (3) and cyclic ADP-ribose. *Science* 286 : 735-737.

Bashir K., T. Husnain, T. Fatima, Z. Latif, S.A.Mhdi, S. Riazuddin. 2004. Field evaluation and risk assessment of transgenic indica basmati rice. *Molecular Breeding* 13 : 301-312.

Barkla, B. J. and O. Pantoja. 1996. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants, *Annu. Rev. Plant Sci* 47 : 159-184.

Bjorn L. O., V. Sangwan, F. Oman and R.S. Dhindsa. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the roles of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal* 23(6): 785-794.

Bush, D. S., 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46

: 95-122.

Cheng, N. H., J. Z. Liu, R. S. Nelson and K. D. Hirschi. 2004. Characterization of CXIP4, a novel *Arabidopsis* protein that activates the H⁺/Ca²⁺ antiporter, CAX1. *FEBS Letters* 559 : 99-106.

Hirschi, K. D. 1999. Expression of *Arabidopsis* CAX1 in tobacco : altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. *Plant Cell* 11 : 2113-2122.

Hirschi, K. D., R. G. Zhen, K. W. Cunningham, P. A. Rea and G. Fink. 1996. CAX1, and H⁺/Ca²⁺ antiporter from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 8782-8786.

Jang, S. W., P. G. Shin and Y. I. Hahn. 2003. Agronomic characteristics of transgenic tomatoes resistant to TMV in field. *J. Kor. Hort. Sci* 44 : 35-39.

Jeon, Y. H., K. H. Kang, J. P. Suh, J. U. Jeung, Y. J. Won, K. S. Lee and Y. T. Lee. 2007. Comparison of agronomic traits on herbicide resistant transgenic rice in korea mid-region. *Treat. of Crop Res.* 8 : 195-201.

Kiegle, E., C. A. Moor, J. Haseloff, M. A. Tester and M. R. Knight. 2000. Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell J.* 23 : 267-278.

Kim, K. M., C. K. Kim, K. D. and B. O. Kim. 2008. Safety test of brown rice expressing *Arabidopsis* calcium transporter by feeding trial in mice. *J. of Life Science* 18(10) : 1390-1394.

Kim, K. M., Y. H. Park, C. K. Kim, K. D. Hirschi and J. K. Sohn. 2004. Development of transgenic rice plants overexpressing the *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 gene. *Plant Cell Rep* 23 : 678-682.

Kitigawa, Y and K. Yoshizaki. 1998. Water stress-induced chilling tolerance in rice : putative relationship between chilling tolerance and Ca²⁺ flux. *Plant Sci* 137 : 73-85.

Knight, H., A. J. Trewavas and M. R. Knight. 1997. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 12 : 1067-1078.

Marty F. 1999. Plant vacuoles. *Plant Cell.* 11 : 587-600.

Monroy, A. F and R. S. Dhindsa. 1995. Low-temperature signal transduction : induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C. *Plant Cell* 7 : 321-331.

Oh, J. Y., M. Y. Chung., H. S. Lee., H. R. Kim., S. O. Jee., J. S. Han., J. H. Kim and C. K. Kim. 2005. Selection of transgenic calcium - rich potato (*Solanum tuberosum* cv. Superior) tuber overexpressing *Arabidopsis* sCAX1, *Kor. J. Hort. Sci. Technol* 23 : 170-174.

Park. H. M., Y. H. Kim, J. P. Suh, M. S. Choi, K. J. Kim, D. B. shin, C. H. Park, J. Y. Lee. 2007. Evaluation of agronomic and molecular biological characteristics of the herbicide resistant transgenic rice. *K. J. Breed. Sci.* 39(2) : 148-154.

Park, S. H., C. K. Kim., L. M. Pike., R. H. Smith and K. D. Hirschi. 2004. Increased calcium in carrots by expression

- of *Arabidopsis* H^+/Ca^{2+} transporter. Mol. Breed 14 : 275-282.
- Park, S. H., T. S. Kang, C. K. Kim, J. S. Han, S. G. Kim, R.H. Smith, L.M. Pike, and K. D. Hirschi. 2005. Genetic manipulation for enhancing calcium content in potato tuber. J. Agri Food Chem 53 : 5598-5603.
- Plieth, C., U. P. Hanson., H. Knight and M. R. Knight. 1999. Temperature sensing by plants : the primary characteristics of signal perception and calcium response. The Plant J 18 : 491-497.
- Saijo, Y., S. Hata., J. Kyojuka ., K. Shimamoto and K. Izui. 2002. Over - expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confer both cold and salt/drought tolerance on rice plants. The Plant J. 23 : 319-327.
- Sanders D., C. Brownlee and J.F. Harper. 1999. Communicating with calcium. The Plant Cell. 11: 691-706.
- Schiott, M and M. G. Palmgren. 2005. Two plant Ca^{2+} pumps expressed in stomatal guard cells show opposite expression patterns during cold stress. Physiologia Plantarum 124 : 278-283.
- Tahtiharju, S. V., Sangwan., A. F. Monroy., R. S. Dhindsa and M. Borg. 1997. The induction of kin genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. Planta 203 : 442-447.
- Vega, C. M., J. P. Palta and J. B. Heaney. 2000. Variability in the rate of cold acclimation and deacclimation among tuber-bearing *Solanum*(potato) species. J. Am. Soc. hort. Sci.125 : 205-211.
- Won, J. W., G. H. Yi, J. H. Cho, J. M. Ko, H. M. Park, C. D. Han, S. J. Yang, S. C. Kim, M. H. Nam. 2004. Establishment of a new breeding scheme for rapid release of variety using bar gene transformed rice. Korean J. plant Biotechnol. 31(1) 7-11.
- Waterer, D. S., S. Lee and G. Scoles. 2000. Field evaluation of herbicide-resistant transgenic broccoli.. Hort Science 35 : 930-932.
- Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock and K.A. Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. Los Banos, Laguna, Philippines.