J Plant Biotechnol (2010) 37:549-555
DOI:10.5010/JPB.2010.37.4.549

Research Article

토마토에서 칼슘수송체와 칼슘결합단백질 공동발현에 의한 칼슘결핍유사증상의 완화

한증술 · 강호주 · 김창길

Restriction of Ca^{2+} deficiency-like symptoms by co-expressing a Ca^{2+} transporter and a Ca^{2+}-binding protein in tomato

Jeung-Sul Han · Hoju Kang · Chang-Kil Kim

Received: 1 November 2010 / Accepted: 15 November 2010
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Here we focused on tip-burn and blossom-end rot (BER) symptoms in the tomato plants expressing the constitutively active form of Ca^{2+}/H^{+} antiporter (s*CAX1*) and/or a Ca-binding protein (calreticulin, CRT) genes during their whole growth period. Conclusively we demonstrated that CRT is able to suppress the tip-burn and BER symptoms that were induced by s*CAX1*. Under poor nutrition condition, tomato plants overexpressing s*CAX1* showed severe necrotic collapses in both roots and shoot polar tissues, which are in accordance with Ca^{2+} deficient symptoms frequently observed in an agricultural cultivation of tomato. Reciprocal grafting trials using s*CAX1* and wild type plants revealed that the tip-burn symptom by s*CAX1* overexpression is not caused by hindrance of Ca^{2+} uptake from soil. We constructed CRT overexpressing transgenic tomatoes, and crossed them with s*CAX1* transgenic plants to investigate the effects of CRT on the symptoms of s*CAX1* transgenic plants. Co-expression of s*CAX1* and *CRT* significantly suppressed the Ca^{2+} deficient symptoms of s*CAX1* transgenic plants. Those results suggest the model that Ca^{2+} homeostasis disturbed by the overexpression of s*CAX1* may be suppressed by the co-expression of *CRT*.

J.-S. Han
경북대학교 생태환경대학 생태환경보전전공
(Department of Ecological Environment Conservation, College of Ecology & Environment Science, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea)

H. Kang
경상남도 함안군 농업기술센터
(Haman Agricultural Development & Technology Center, Gaya-up, Haman-gun 684-513, Korea)

C.-K. Kim (✉)
경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부
(School of Applied Biosciences, College of Agriculture & Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea)
e-mail: ckkim@knu.ac.kr

서 론

칼슘은 식물체를 구성하는 필수원소인 동시에 다양한 외부자극에 반응한 식물의 세포내 신호전달과정에도 중요한 역할을 담당한다 (Marschner 1995; Knight and Knight 2001; Sanders et al. 2002). 따라서 흡수되는 칼슘의 절대적 양이 적거나 특정 조직으로 칼슘이온의 이동이 어려워지면 그 식물체는 피해를 받게 되고 생산성은 감소된다 (Marschner 1995; Park et al. 2005). 또한 대부분의 채소는 사람이 흡수할 수 있는 유효칼슘 함량이 낮다는 점 (Morris et al. 2007)에서 풍부한 유효칼슘을 다량 보유한 채소를 개발하는 것은 의미 있는 일이라 할 수 있다.

칼슘결핍으로 인한 채소류의 장해현상은 비교적 손쉽게 관찰되는데, 특히 토마토 과실의 암술부착 부위 갈변 (배꼽썩음병: blossom-end rot, BER)과 엽채류의 잎 끝 또는 생장점 조직에서 나타나는 갈변 (tip-burn)이 대표적이다 (White and Broadley 2003). BER은 토마토 생산성에 큰 영향을 미치며 칼슘과 관련된 복잡한 원인에 의해 발생하지만 충분한 양의 칼슘이온이 식물체내로 흡수되더라도 급속히 비대중인 과실로 칼슘이온이 충분히 이동되지 않는 경우에도 발생할 수 있다 (Ho and White 2005).

토마토의 BER 발생을 줄이고 유효칼슘함량을 높여 영양가치를 향상하기 위한 분자유전학적 방법으로 칼슘수송체 (Hirschi et al. 1996) 또는 칼슘결합단백질 (Wyatt et al. 2002)의 발현 조절을 고려할 수 있다. 실제로 액포막에 소재하는 칼슘수송체의 하나인 H^{+}/Ca^{2+} antiporter (CAX1)

의 자동조절영역 암호화 부위 (Shigaki et al. 2001)를 제거한 변형 유전자 (short CAX1: s*CAX1*)를 토마토에서 발현시켰을 때 과실의 칼슘함량이 약 2배 증가하였으며 (Park et al. 2005), 소포체와 원형질연락사에 주로 소재하는 칼슘결합단백질의 하나인 calreticulin을 암호화하는 유전자 (*CRT*)를 담배에 형질전환하였을 때 칼슘함량이 2배 이상 증가하였다 (Persson et al. 2001). 전자의 보고에서 흥미로운 점은 s*CAX1* 발현 토마토는 과실에서 칼슘의 함량이 뚜렷하게 증가되기는 하지만 오히려 심한 BER과 신초 정단부 tip-burn이 나타난다는 것이다. s*CAX1* 형질전환 토마토에서 나타나는 이러한 현상의 발생원인이 토양으로부터의 칼슘 흡수가 장애를 받아 빠르게 생육하는 과실의 암술 부착부 또는 신초의 정단으로 그 이동이 충분하지 못한 결과인지 세포 내부로 충분한 칼슘이온이 공급되기는 하지만 액포로의 지나친 수송으로 인해 세포질 칼슘이온항상성 또는 칼슘의존적 신호전달이 교란을 받은 결과인지는 분명하지 않다 (Hirschi 2004). 한편, CRT는 식물 세포의 주요 칼슘보존장치 중 하나이며 세포질 칼슘이온항상성에도 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다 (Pittman and Hirschi 2003; Hirschi 2004).

언급한 두 유전자의 보고된 기능을 염두에 두고 s*CAX1* 발현 토마토의 tip-burn과 BER 표현형을 종자가 발아하는 시점부터 관찰하는 한편, s*CAX1* 발현 토마토와 비형질전환체와의 접목을 통해 그 원인이 식물체 수준에서 토양으로부터 칼슘흡수에 제한을 받은 결과인지 또는 세포수준에 기인하는지를 간접적으로 확인하는 것과 *CRT* 형질전환 토마토를 획득한 후 s*CAX1* 형질전환체와 공동발현토록 교배를 통해 두 유전자를 집적함으로써 tip-burn과 BER이 억제될 수 있는지를 확인하는 것에 목적을 두고 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료와 형질전환

토마토 내혼계통 'FM9'에 s*CAX1* 유전자가 1 copy 삽입된 T_1 분리세대 종자를 미국 Kansas주립대학교 S. Park으로부터 분양받아 (Park et al. 2005) 고정 (T_2 세대)한 후 tip-burn과 BER 표현형 관찰 재료로 사용하였다. CRT 유전자 형질전환은 국립원예특작과학원에서 육성한 내혼계통 '탐나라 (Tamnara)' 종자를 기내파종하여 하배축을 절취한 후 Park 등 (2003, 2005)의 방법에 따라 아그로박테리움 공동배양법으로 수행하였다.

Agrobacterium 균주와 플라스미드

s*CAX1* 발현 'FM9'은 pBI121 벡터 (Chen et al. 2003)의 원 T-DNA 대신 s*CAX1* 유전자가 클로닝된 T-DNA (Fig. 1A; Doerner et al. 1996)로 재조합된 벡터를 *A. tumefaciens* LBA4404 균주에 도입한 후 형질전환함으로써 획득되었다 (Park et al. 2005). pE1775 벡터 (Lee et al. 2007)의 다중 클로닝 부위에 *CRT* 유전자가 삽입된 pE1775-*CRT* 벡터 (Fig. 1B)를 미국 Kansas주립대학교 S. Park으로부터 분양받아 freeze-thaw method (Holsters et al. 1978)를 통해 *A. tumefaciens* LBA4404 균주에 도입한 후 이를 토마토 내혼계통 '탐나라'의 형질전환에 사용하였다.

형질전환체의 핵산분석

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmBH, Hilden, German)을 이용하여 제조사의 안내에 따라 어린잎으로부터 DNA를 추출한 후 모든 시료를 10 ng/μL로 각각 희석한 후 중합효소연쇄반응 (PCR) 분석에 이용하였다. PCR은 PerfectShot Ex Tag Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) 25 μL에 희석한 시료 DNA 4 μL, 탈이온 멸균수 13 μL 및 forward primer와 reverse primer를 각각 4 μL씩 혼합하여 수행하였다. 각 primer 조합의 염기서열은 s*CAX1*: 5'-TGCCGCCATTATTTGCACCT-3'와 5'-TGTCATCCCAACCAACCATG-3' (640 bp 증폭), *NPTII*: 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3'와 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3' (700 bp 증폭), *CRT*: 5'-TGAGTTCAGCAACAAGGATA-3'와 5'-CTCATCCTCTAGGTCATCATCCTCAT-3' (910 bp 증폭), *HPTII*: 5'-AGTCAATGACCGCTGTTATG-3'와 5'-ACAGCGTCTCCGACCTGATG-3' (594 bp 증폭)로 설계하였다. 한편, *CRT* 형질전환체의 전사분석을 위해 RT-PCR 분석을 수행하였다. PCR 분석을 통해 *CRT* 유전자 단편이 증폭된 개체 중에서 생육에 이상이 없는 개체에서 무작위로 4개체를 선택하여 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 어린잎으로부터 총 RNA를 추출한 후 SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 전 각각의 RNA는 DNA 오염을 제거하기 위하여 DNase I (Invitrogen)으로 2회 처리하였으며 분광광도계 (NanoDrop 2000: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)로 정량한 후 cDNA 합성 최종혼합물 20 μL에 0.2 μg이 첨가되도록 하였다. 합성된 cDNA는 DNA PCR 분석에서와 동일한 primer를 사용하여 목표 유전자 단편을 증폭하였다.

s*CAX1* T_2 고정집단 선발, s*CAX1* 형질전환체 표현형 검정, 비형질전환체와의 접목

도입한 s*CAX1* 형질전환 'FM9' T_1 세대 각 개체를 대상으로한 PCR 분석을 통해 s*CAX1* 유전자의 삽입이 확인된 개체만을 대상으로 인공 자가수분을 실시하여 T_2세대를

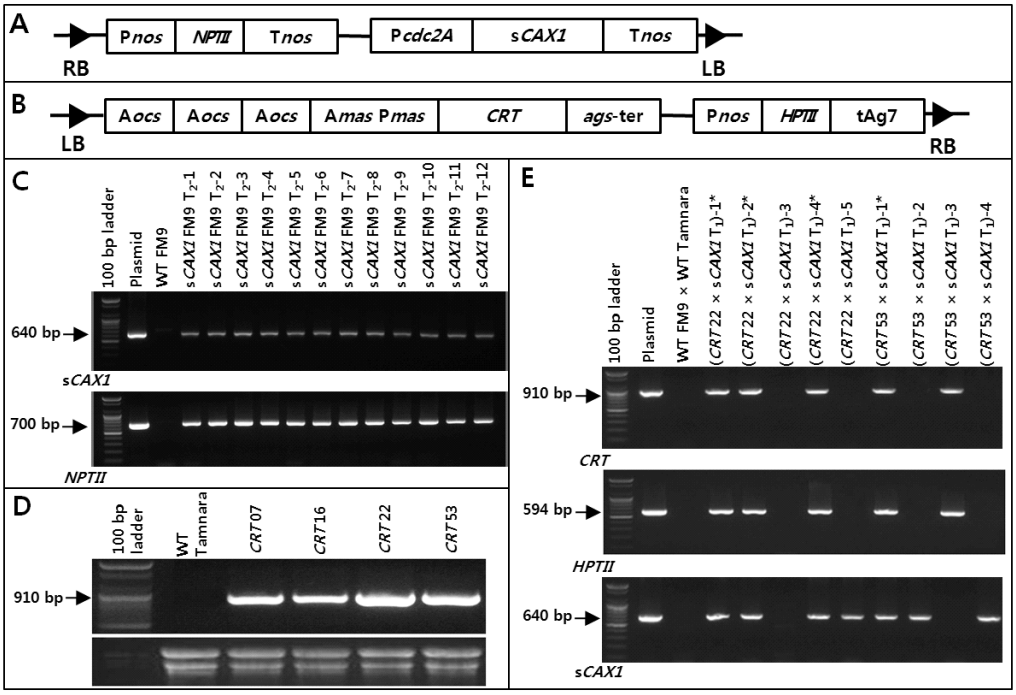

Fig. 1 Nucleic acid analyses of s*CAX1*- and *CRT*-expressing tomatoes. (A and B) T-DNA regions of s*CAX1*- and *CRT*-expressing vectors, respectively. RB: right border, LB: left border, P*nos*: nopaline synthase promoter, *NPTII*: neomycin phosphotransferase gene, T*nos*: nopaline synthase terminator, P*cdc2A*: cell division cycle promoter, A*ocs*: octopine synthase transcriptional activating element, A*mas* P*mas*: mannopine synthase 2' transcriptional activating and promoter elements, *CRT*: *Zea mays* calreticulin gene, *ags*-ter: polyA addition signal from the agropine synthase gene, *HPTII*: hygromycin phosphotransferase gene, tAg7: polyA addition signal for T-DNA gene. (C) PCR analyses of non-segregating s*CAX1* 'FM9' at T_2 generation. (D) RT-PCR analysis of *CRT* Tamnara plants at T_0 generation. The same amounts of RNAs (as an internal control showed at lower part) from each plant were used for first-strand cDNA synthesis. (E) PCR analyses of F1 hybrid between *CRT* (T_0 plant) and s*CAX1* (T_1 hemizygote plant) transformants. Asterisks upon lanes represent the F_1 plants containing both *CRT* and s*CAX1* genes

육성하고, 다시 집단별로 PCR 분석을 실시하여 T_2 집단의 고정여부를 판단하였다. 고정된 T_2 집단의 종자는 탈이온수를 공급한 여과지에 치상하여 발아양상을 관찰하였다. 최아된 종자는 상토 (Choroggy: Nongwoobio, Suwon, Korea)가 담긴 50공 plug tray에 파종한 후 육묘하여 본엽 2매 시점에 'FM9' WT와의 접목에 이용하였는데 대목과 접수는 형질전환체 여부에 따라 교호로 달리하였다. 무접목 s*CAX1* 형질전환체와 교호 접목묘는 본엽 5~6매 시점에 상토와 밭흙이 4:1로 혼합된 용토가 담긴 25×25 cm pot에 정식하여 재배하면서 생육특성을 검정하였다. 재배 중 각 pot는 동일한 방식으로 수돗물로 관수를 하였으며 어떠한 시비도 하지 않았다.

CRT 형질전환 '탐나라'와 s*CAX1* 형질전환 'FM9'간 교배조합 작성 및 표현형 검정

s*CAX1*의 발현이 토마토 과실에 심한 BER을 유발함으로써 종자 수확량이 낮다는 점을 고려하여 종자친과 화분친을 선정하였다. PCR 분석을 통해 *CRT* 유전자 단편의 증폭이 확인되고 RT-PCR 분석을 통해 *CRT*의 전사가 상대적으로 강한 형질전환 T_0세대 '탐나라' 2개체를 선택하여 종자친으로 사용하였고 도입 당시의 s*CAX1* 형질전환 T_1 세대인 'FM9' (hemizygote)을 화분친으로 사용하여 인공교배 하는 한편 대조구로 비형질전환체간 교배도 동시에 수행하였다. *CRT* 형질전환 종자친으로부터 F_1 종자를 수확하여 전술한 s*CAX1* 형질전환체의 표현형 검정에서와 동일한 방법으로 최아, 파종 및 재배하면서 tip burn과 BER 발생양상 등의 표현형을 관찰하였다. 한편, 생육중인 F_1 식물체의 어린잎으로부터 DNA를 추출하고 PCR에 의한 *CRT*, *HPTII* 및 s*CAX1* 유전자 단편의 증폭 여부를 확인한 후 역추적하여 최아 당시와 생육 중인 각 개체에 도입된 유전자의 종류를 판정하고 그에 따른 식물체의 표현형을 구분하였다.

결과 및 고찰

s*CAX1* 형질전환 고정집단 선발과 형질전환체의 표현형

s*CAX1* 형질전환 T_2 집단 각 개체를 대상으로한 목표 유전

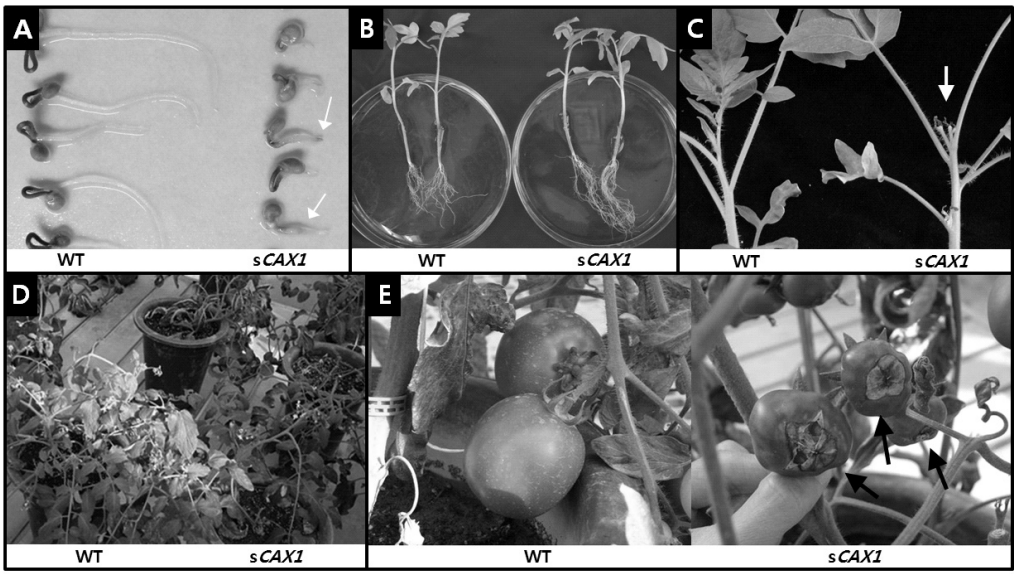

Fig. 2 Phenotypic characteristics of s*CAX1*-expressing 'FM9' tomatoes at T_2 generation. (A) Germinated seedlings of s*CAX1*-expressing plants and wild type (WT) ones. Arrows indicate tip-burning and poor growth of primary roots. (B) Young plants showing distinguishable root development. (C) Main shoots of adult plants. Arrow indicates severe tip-burn symptom. (D) Plant shapes of WT and s*CAX1*-expressing genotypes. (E) Set fruits of each plant. Pay attention to arrows indicating severe blossom-end rot symptom

자 s*CAX1*과 선발마커 유전자 *NPTII*에 대한 *PCR* 분석 수행하여 외래 유전자가 분리하지 않는 고정집단을 선발하였다 (Fig. 1C). 종자를 치상하여 최아시켰을 때 s*CAX1* 형질전환체는 발아 직후 1차근의 생장점 부위가 갈변하였으며 비형질전환체에 비해 그 신장도 불량하였다 (Fig. 2A). 그러나 plug tray 육묘중에는 오히려 역전되어 형질전환 유식물체의 뿌리 발달이 대조구에 비해 양호하였다 (Fig. 2B). 이러한 결과는 종자가 흡습하여 발아할 때부터 이미 s*CAX1* 유전자가 강하게 발현하고 있으며 형질전환 식물체의 정상생육을 위해서는 특별한 환경이 필요하다는 것을 시사한다고 할 수 있다. Cheng 등 (2003)은 H^+/Ca^{2+} antiporter (CAX1) 기능을 상실한 돌연변이 애기장대 유식물체가 대조구에 비해 칼슘결핍에 더 내성을 보인다고 보고한 바 있다. 따라서 s*CAX1* 과발현 토마토는 발아 당시부터 칼슘에 관한 한 소요량이 더 많다고 추정할 수 있다. Pot 정식 직전인 본엽 5~6매 시점까지 s*CAX1* 형질전환 식물체는 대조구와 비교하여 tip-burn 발생에 차이를 보이지 않고 생육하였으나 그 이 후에는 주지 정단부에 심한 tip-burn 현상을 보였다 (Fig. 2C). 주지의 tip-burn은 액아로부터의 신초형성을 촉진하였고, 액아유래 신초는 2~3 마디까지 정상생장을 하다가 그 후 정단부에 심한 tip-burn을 동반하기를 반복하여 최종적으로는 식물체는 관목형 초형 (bush type)을 나타내었다 (Fig. 1D). 또한 s*CAX1* 형질전환체의 과실은 Park 등 (2005)이 보고한 바와 같이 심한 BER 병징을 나타내었다 (Fig. 2E). 본 연구에서 관찰된 s*CAX1* 형질전환체에서의 일련의 tip-burn과 BER 발생은 세포분열이 활발한 정단 및 근단 생장점 부근과 조직의 팽창이 급속히 이루어지는 과실의 blossom-end 부근에서 주로 나타났다는 점에서 다양한 작물의 비형질전환체에서 나타나는 일반적 칼슘결핍 증상과 일치한다 (White and Broadley 2003). 주목할 만한 결과는 외부양분 공급이 없이 최아된 s*CAX1* 형질전환 유식물체의 근단에서 비록 심한 tip-burn이 나타나지만 토양 재식 후의 유식물체, 측지신장 초기 및 과실 발육초기 등에 일시적 정상생육을 한다는 점이다. 따라서 s*CAX1* 수송체가 토양으로부터의 칼슘흡수 또는 식물체내 장거리 이동에는 영향을 미치지 않는다는 것에 대한 확인이 필요하다고 하겠다.

s*CAX1* 형질전환체와 비형질전환체간 접목묘에서 tip-burn 발생 양상

s*CAX1* 형질전환체 (s*CAX1*)와 비형질전환체 (wild type: WT)를 각각 접수 또는 대목으로 이용하여 교호로 접목 (Fig. 3A)한 후 접수에서 나타나는 tip-burn 발생 양상을 비교하였다. s*CAX1*/WT (접수/대목) 조합과 s*CAX1*/s*CAX1* 조합의 경우 접수에서 심한 tip-burn 증상이 관찰된 반면 WT/s*CAX1* 조합에서는 주지와 측지를 막론하고 tip-burn이 전혀 관찰되지 않았다 (Fig. 3B). 대목으로 s*CAX1*을 사용하였음에도 불구하고 접수인 WT에서 tip-burn이 발생하지 않았다는 점은 s*CAX1* 형질전환 대목이 정상적으로 칼슘이온을 토양으로부터 흡수하고 접수로 수송할 수 있다는 것으로 해석할 수 있다. 또한 대목으로 WT를 사용하였을 때 접수인 s*CAX1* 형질전환체에서 여전히 무접목 s*CAX1* 형질전환 식물체와 비등한 수준의 tip-burn이 발생

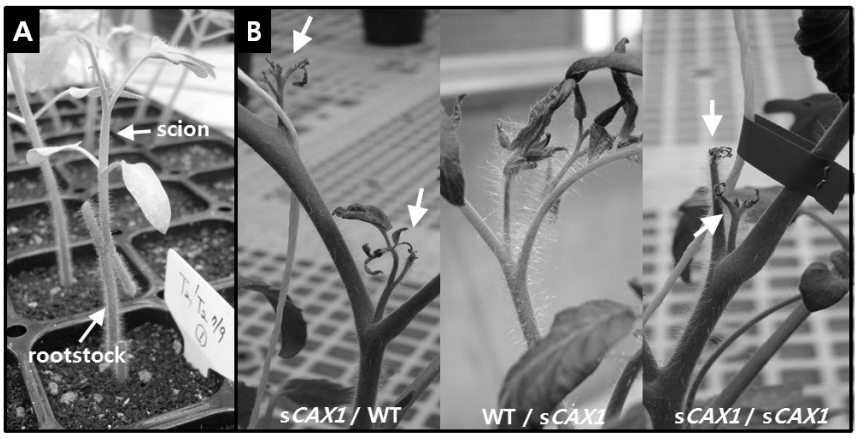

Fig. 3 Tip-burn symptoms on the scions of grafted seedlings using both genotypes. (A) One of grafted young seedlings. Each arrow indicates scion and rootstock, respectively. (B) Tip-burning aspect in adult plants depending on grafting combination (scion/rootstock). Arrows indicate severe tip-burn symptoms

하였다는 점은 토양으로부터 흡수된 칼슘이온이 s*CAX1* 형질전환 식물체에 도달하면서부터 이동이 어려워졌거나 세포수준에서 칼슘의 질적 또는 양적 이용성에 문제가 있기 때문으로 해석할 수 있을 것이다.

CRT 형질전환체 획득, *CRT*와 s*CAX1* 형질전환체간 교배조합 작성 및 표현형 검정

기내파종한 '탐나라'의 하배축 절편을 재료로 *CRT* 형질전환을 수행하여 총 54개 재분화 식물체를 획득하고 이들에 대한 목표유전자 PCR 분석을 수행하였다. PCR 분석결과 54개체 중 53개체에서 *ZmCRT* 유전자 단편의 증폭을 확인하였고 (자료 미제시) 53개체 중 무작위로 4개체를 선택하여 RT-PCR 분석을 수행함으로써 전사량이 상대적으로 많은 2개체 (T_0 세대: *CRT* 22, *CRT* 53)를 최종적으로 선발하였다 (Fig. 1D). 최종선발된 2개체를 종자친으로 사용하여 s*CAX1* 형질전환 '탐나라' T_1 식물체와 각각 교배함으로써 F_1을 채종하였다. 언급한 표현형 검정과 동일한 방법으로 최아, 육묘 및 재배하는 한편 각 목표 유전자와 선발마커 유전자 *HPTII*에 대한 PCR 분석을 수행하여 각 개체의 외래유전자 구성을 결정한 결과 외래유전자가 탐지되지 않은 개체, s*CAX1* 유전자만 탐지된 개체, *CRT*::*HPTII*만 탐지된 개체 및 *CRT*::*HPTII*와 s*CAX1*이 모두 탐지된 개체로 분리하였다 (Fig. 1E). 각각의 외래유전자 구성을 기준으로 발아한 유묘, 성숙식물체 및 과실의 tip-burn과 BER의 양상을 관찰하였다. WT간 F1, 분리하여 두 목표유전자가 모두 없는 F_1 및 *CRT*만 삽입된 F_1 식물체는 세가지 경우 모도 유묘와 성숙식물의 근단과 정단 tip-burn을 관찰할 수 없었고 BER이 발생한 과실도 비슷한 정도로 희박하였다 (Fig. 4). 반면, s*CAX1*만 삽입된 F_1 식물체는 s*CAX1* 형질전환 'FM9' 계통과 비견될 정도로 근단과 정단에서의 심한 tip-burn 그리고 과실에서의 심한 BER을 수반하였다 (Fig. 1E; Fig. 4). 흥미로운 결과는 *CRT*와 s*CAX1*이 모두 삽입된 F_1 식물체의 경우는 유묘의 근단과 성숙식물체의 정단 tip-burn 뿐 아니라 과실의 BER도 매우 경미하다는 것이다 (Fig. 4). 이러한 결과는 세포소기관 막소재 칼슘수송체 단백질 s*CAX1* (Shigaki et al. 2001)과 소포체 및 원형질연락사 등에 주로 소재하는 칼슘결합단백질인 *CRT* (Baluska et al. 1999)가 직간접적으로 상호작용을 하며 *CRT*는 s*CAX1* 발현에 따른 심한 tip-burn과 BER 발생을 경감시킬 수 있음을 시사한다고 할 수 있다. 세포질 칼슘항상성 뿐 만 아니라 다양한 기작이 관여할 수 있지만, 외부로부터의 칼슘공급이 충분하지 않고 특히 세포분열이 왕성한 조직에서는 s*CAX1*에 의한 세포질 칼슘이온의 지속적 액포 축적에 의해 세포질의 칼슘이온항상성 조절 또는 칼슘 의존적 신호전달기구가 교란되고 따라서 tip-burn 또는 BER이 발생하지만, *CRT*가 공동발현 할 경우에는 세포질 칼슘이온항상성 또는 신호전달기구를 복원시켜 줄 수 있다는 것을 하나의 모델로 제시할 수 있을 것이다. 지상부 생물량이 상대적으로 적은 당근에서 s*CAX1*을 발현시키면 T_0 세대 일부 개체에서만 그것도 약하게 tip-burn이 생긴다는 보고 (Park et al. 2004)와 *CRT*의 세포내 소재 및 보고된 다양한 기능 (Krause and Michalak 1997; Baluska et al. 1999)을 고려하면 상기 모델의 제시는 설득력이 있다고 하겠다.

본 연구의 결과를 종합하면 첫째, 토마토에서 s*CAX1* 발현은 알려진 바와 같이 정단부의 tip-burn과 과실의 BER을 유발시킬 수 있는 데 이는 토양으로부터의 칼슘흡수 이상에 기인한 것이 아니고 둘째, 외부로부터의 칼슘공급이 부족해질 경우 s*CAX1* 형질전환 토마토는 비형질전환체에 비해 더 심하게 tip-burn과 BER을 표현하며 셋째, *CRT*의 공동발현에 의해 s*CAX1* 발현의 결과물인 tip-burn

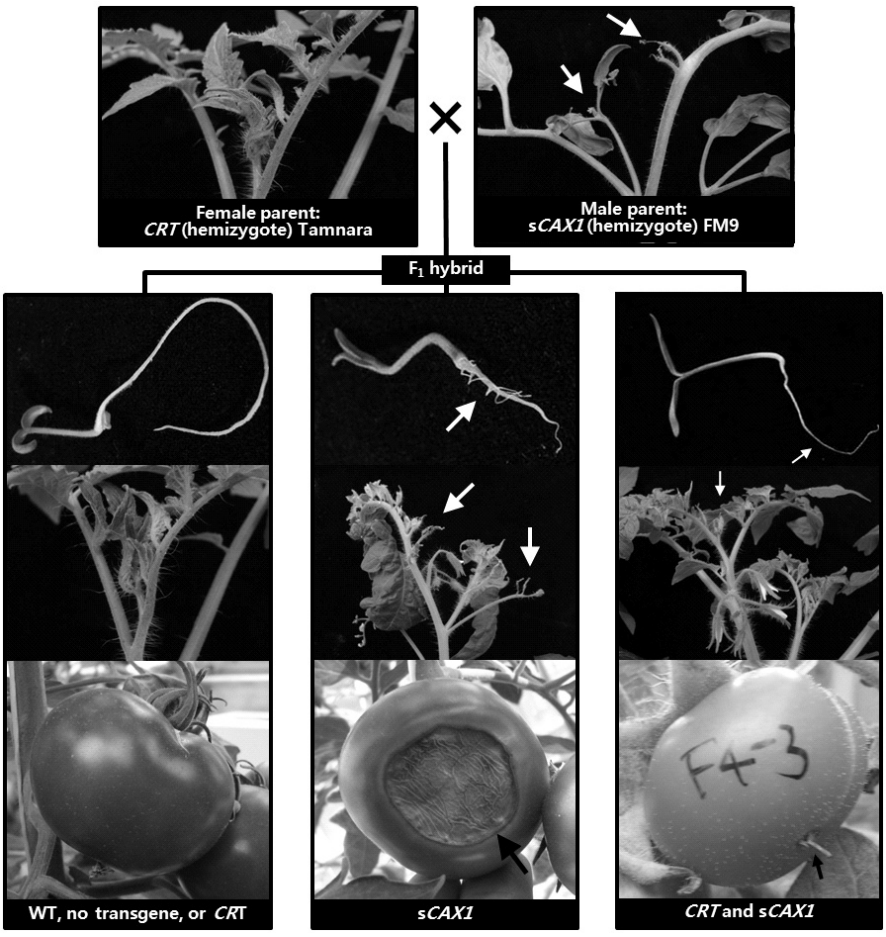

Fig. 4 Photographic pedigree of F_1 hybrid combined with different genetic backgrounds (*CRT*-expessing Tamnara T_0 plant as female parent and s*CAX1*-expressing 'FM9' T_1 plant as male parent). Arrows with different thickness in frames reflect the severities of tip-burn or blossom-end rot incidence

과 BER이 경감될 수 있다는 것으로 요약할 수 있다. 고칼슘 토마토는 식품적 측면에서 상당히 매력적인 대상이며 칼슘결핍으로 인한 BER은 토마토 생산성을 떨어뜨리는 주범인 동시에 그 내성은 육종목표 중 하나이다. 다른 종류의 세포소기관 칼슘수송체를 발현시키거나 s*CAX1*의 발현량을 조절할 수 있는 인자 (promoter)를 달리함으로써 풍부한 칼슘을 가진 토마토를 개발 할 수 있다는 보고 (Park et al. 2005; Chung et al. 2010)가 있지만 토마토의 tip-burn과 BER 발생의 기작을 충분히 이해하는 것도 기존 품종의 안정생산과 교배육종 측면에서 중요하다고 하겠다.

적 요

본 연구는 칼슘 수송체의 하나인 s*CAX1*과 칼슘결합단백질의 하나인 *CRT*가 토마토에서 발현했을 때 tip-burn과 배꼽썩음병 (BER)이 토마토의 전 생육기간에 걸쳐 어떠한 양상으로 나타나는지를 관찰하는 것에 초점을 맞추어 수행하였고, 최종 연구 결과는 *CRT* 공동발현이 s*CAX1* 발현에 의해 야기된 병징을 억제시킬 수 있음을 확인시켰다. 양분공급이 불량한 환경하에 놓인 s*CAX1* 단독 발현 토마토 식물체는 그 근단 조직, 정단 조직 및 과실의 암술부착부위 조직에 토마토 재배 농가포장에서 빈번하게 관찰되는 칼슘결핍 증상과 일치하는 괴사현상을 나타내었다. s*CAX1* 형질전환체와 비형질전화체를 각각 대목과 접수로 달리 사용한 교호접목 실험을 통해 s*CAX1* 발현에 따른 tip-burn 병징이 토양으로부터의 칼슘이온 흡수에 장애를 받아 생긴 결과가 아님을 확인하였다. 형질전환을 통해 *CRT* 발현 토마토를 획득한 후 *CRT*가 s*CAX1*에 의한 불량한 특성 발현을 제어할 수 있는지 확인하기 위하여 양자간 교배조합을 작성하였다. s*CAX1*과 *CRT*를 토마토에서 공동발현 시켰을 때 완벽하지는 않지만 양극 조직의 괴사와 BER이 뚜렷하게 감소되었다. 본 연구의 결과를 바탕으로 s*CAX1* 발현에 의해 방해 받은 세포 내 칼슘이온 관련 어떤 기구는 *CRT* 공동발현을 통해 복구될 수 있다는 하나의 모델을 제시할 수 있을 것이다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호: 200705 01080010)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이 논문의 일부는 2010년도 경북대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

인용문헌

Baluska F, Samaj J, Napier R, Volkmann D (1999) Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. Plant J 19:481-488

Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY (2003) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Mol Breeding 11: 287-293

Cheng NH, Pittman JK, Barkla BJ, Shigaki T, Hirschi KD (2003) The Arabidopsis cax1 mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. Plant Cell 15:347-364

Chung MY, Han JS, Giovannoni J, Liu Y, Kim CK, Lim KB, Chung JD (2010) Modest calcium increase in tomatoes expressing a variant of *Arabidopsis* cation/H^+ antiporter. Plant Biotechnol Rep 4:15-21

Doerner P, Jorgensen JE, You R, Steppuhn J, Lamb C (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. Nature 380:520-523

Hirschi KD (2004) The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. Plant Physiol 136:2438-2442

Hirschi KD, Zhen RG, Cunningham KW, Rea PA, Fink GR (1996) CAX1, an H^+/Ca^{2+} antiporter from *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 93:8782-8786

Ho LC, White PJ (2005) A cellular hypothesis for the induction of blossom-end rot in tomato fruit. Ann Bot 95:571-581

Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. Trends Plant Sci 6:262-267

Krause KH, Michalak M (1997) Calreticulin. Cell 88:439-443

Lee LY, Kononov ME, Bassuner B, Frame BR, Wang K, Gelvin SB (2007) Novel plant transformation vectors containing the Superpromoter. Plant Physiol 145:1294-1300

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, New York

Morris J, Nakata PA, McConn M, Brock A, Hirschi KD (2007) Increased calcium bioavailability in mice fed genetically engineered plants lacking calcium oxalate. Plant Mol Biol 64:613-618

Park S, Cheng NH, Pittman JK, Yoo KS, Park J, Smith RH, Hirschi KD (2005) Increased calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing *Arabidopsis* H^+/Ca^{2+} transporters. Plant Physiol 139:1194-1206

Park SH, Kim CK, Pike LM, Smith RH, Hirschi KD (2004) Increased calcium in carrots by expression of an *Arabidopsis* H^+/Ca^{2+} transporter. Mol Breeding 14:275-282

Park SH, Morris JL, Park JE, Hirschi KD, Smith RH (2003) Effiecient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. J Plant Physiol 160:1253-1257

Persson S, Wyatt SE, Love J, Thompson WF, Robertson D, Boss WF (2001) The Ca^{2+} status of the endoplasmic reticulum is altered by induction of calreticulin expression in transgenic plants. Plant Physiol 126:1092-1104

Pittman JK, Hirschi K (2003) Don't shoot the (second) messenger: endomembrane transporters and binding proteins modulate cytosolic Ca^{2+} levels. Curr Opin Plant Biol 6:257-262

Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of signaling. Plant Cell 14:s401-s417

Shigaki T, Cheng NH, Pittman K, Hirschi K (2001) Structural determinants of Ca^{2+} transport in the Arabidopsis H^+/Ca^{2+} antiporter CAX1. J Biol Chem 46:43152-43159

White PJ, Broadley MR (2003) Calcium in plants. Ann Bot 92: 487-511

Wyatt SE, Tsou PL, Robertson D (2002) Expression of the high capacity calcium-binding domain of calreticulin increases bioavailable calcium stores in plants. Transgenic Res 11:1-10