

작물의 생합성 칼슘 함량 증대 연구 현황

이정여 · 노일섭 · 김혜란

Current status in calcium biofortification of crops

Jeongyeo Lee · IlSup Nou · HyeRan Kim

Received: 2 March 2012 / Accepted: 12 March 2012
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Calcium is an essential nutrient for living organisms, with key structural and signaling roles. Its deficiency in plants can result in poor biotic and abiotic stress tolerance as well as reduced crop quality and yield. Calcium deficiency in humans causes various diseases such as osteoporosis and rickets. Biofortification of calcium in various food crops has been suggested as an economic and environmentally advantageous method to enhance human intake of calcium. Recent efforts to increase the levels of calcium in food crops have used calcium/proton antiporters (*CAXs*) and modified one to increase calcium transport into vacuoles through genetic engineering. It has been reported that overall calcium content of transgenic plants has been increased in their edible portions with some adverse effects. In conclusion, biofortification of calcium will add more value in crops as well as will be beneficial for animal and human. Therefore, more fundamental studies on the mechanisms of calcium ion storage and transporting are essential for more effective calcium biofortification.

Keywords Biofortification, calcium, nutrient, *CAXs*, *ACAs*, *Brassica*

J. Y. Lee · H. R. Kim (✉)
한국생명공학연구원 그린바이오연구센터
(Green Bio Research Center, Cabbage Genomics assisted
breeding supporting Center, Korea Research Institute of
Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806,
Korea)
e-mail: kimhr@kribb.re.kr

I. S. Nou
순천대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Suncheon National University,
Jeonnam, 540-742, Korea)

서론

세계 인구의 절반 이상이 칼슘 (Ca), 철 (Fe), 요오드 (I), 마그네슘 (Mg), 셀레늄 (Se), 아연 (Zn) 등의 미네랄과 비타민에 결핍되어 있다고 보고되고 있다 (Graham et al. 2007; White and Broadley 2009). 인체의 건강 증진에 필수적인 미네랄 영양소는 식물성 식품을 통해 직접적으로 섭취되고, 육류를 통해 2차적으로 사람에게 섭취된다. 따라서 식품 또는 가축의 사료로 쓰이는 작물의 영양소 함량은 인간의 필수 영양소 결핍과 매우 밀접한 관계를 가진다. 식습관과 인류 건강에 관한 연구는 활발히 진행되고 있으며, 식품의 구성 성분이 인체 생리 작용에 영향을 미치기 때문에 기능성 식품을 이용하여 질병을 치료하려는 시도에 관심이 집중되고 있다 (Mutch et al. 2005). 그러나 식물성 식품의 소비는 여전히 단순히 인체의 필수 영양소를 제공하는 영양원으로만 섭취되고 있는 실정이며 (Newell-McGloughlin 2008), 이러한 경향에 발맞추어 기본적으로 섭취 가능한 영양소 외에 건강 증진 효과가 있는 기능성 식품에 대한 수요가 증가하고 있다. 작물은 비타민, 당류, 지방산, 아미노산과 같은 다양한 유기화합물을 합성하는 능력이 있어 기능성 발굴 측면에서 무한한 가능성을 가지고 있다. 작물의 대사과정은 변형이 가능하여 영양 성분을 향상시킬 수 있으며, 식물체내에 흡수되는 각각의 무기원소들은 영양성분이기도 하지만, 식물체의 대사작용에 필수적인 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 전통 작물 육종법으로 농작물의 영양소 함량을 증대시키려는 노력이 보편적이었지만, 최근에는 유용 유전자를 암호화하는 DNA를 작물에 삽입하거나, 유용물질의 합성을 조작하는 생명공학 기법을 이용하여 인류의 건강 증진 향상을 위한 질적 형질 (quality traits)을 갖춘 작물이 개발되기 시작하고 있다.

인류의 비타민과 미네랄 등 필수 영양소 결핍 문제에

대한 해결책 중 하나로 쌀, 밀, 옥수수, 고구마, 콩 등과 같은 주식 작물의 생합성 영양소 함량 증대 (Biofortification) 를 들 수 있다. Biofortification이란 생명공학 기법을 이용하여 작물의 비타민과 미네랄 함량을 높이고 기능성 물질을 증가시키는 새로운 방법으로, 농산물을 수확한 후 가공하는 과정에서 비타민과 미네랄을 첨가하는 방법과는 대조된다 (Bouis 2000, 2005). 지금까지의 작물 육종법은 병충해 저항성을 갖는 계통을 확보하여 수확량을 늘리는 방향으로 초점이 맞춰져 있었지만, Biofortification은 주식에 의존해서 살아가는 사람들에게 결핍된 영양소를 충분히 공급하고 보다 건강한 식단을 마련하겠다는 목표를 갖는다. 한 예로, 재래종 벼는 잎 또는 줄기에서만 베타-카로틴을 합성하기 때문에 전통적인 식물 육종법으로는 쌀에 베타-카로틴 양을 증가시킬 수 없었지만, 생명공학 기법을 이용하여 쌀에서 베타-카로틴을 생산하도록 개발된 골든 라이스 (Golden Rice)는 섭취된 베타-카로틴을 인체 내에서 비타민 A로 전환시켜 체내 비타민 A 결핍 현상을 완화 시켰다 (Ye et al. 2000; Al-Babili and Beyer 2005). 또한, 생명공학을 이용하여 쌀의 철분 성분을 증가시키는 연구도 활발히 진행 중이다. 칼슘 (Ca)은 동식물에 있어 구조적, 기능적으로 필수적인 영양소이며, 인간에게 있어서도 각종 질병의 발생과 연관된 중요한 영양소이다. 따라서 인간의 식량이 되는 작물의 생합성 칼슘 함량 증대 또한 인간의 충분한 칼슘 섭취를 위해 효율적이고 친환경적인 방법으로 대두되고 있다. 본 논문에서

는 작물의 생합성 칼슘 함량과 관련하여 Biofortification의 분류, 식물에서 칼슘의 역할 및 칼슘 공급원으로서의 작물에 대한 최근 연구동향에 대해 서술하고자 한다.

Biofortification의 분류

Biofortification은 주요 작물의 미량 영양소 함량을 증대시키는 방법으로, 비료 사용, 전통 육종 방법 및 유전자변형을 통한 작물 개량으로 분류할 수 있다. Biofortification은 10단계의 과정으로 진행되며 각 단계별 평가를 거쳐 완성된다 (Fig. 1). 비료는 질소, 인, 칼륨 등 작물을 재배하는데 필요한 영양분을 간단하고 빠른 시간에 작물에 직접 처리하여 사람들이 필요로 하는 영양분을 제공할 수 있도록 한다. 그러나 비료를 정기적으로 반복하여 시비해야 하기 때문에 추가 비용이 들며, 공중 보건 문제를 야기해 장기적인 전략으로는 한계가 있다. 작물의 Biofortification은 많은 사람에게 충분한 미량 영양소가 함유된 작물을 제공하는 것이므로, 추가적인 비용이 지불되는 기존의 전략보다는 보다 효율적인 방법이 요구된다 (Stein et al. 2006; Meenakshi et al. 2010).

하나의 작물에서도 영양소의 함량 또는 그 외 다른 특징을 보이는 다양한 계통이 존재한다. 1960년대부터 표현형이 다른 다양한 개체를 수집하여 유전자원을 확보하는 일이 가속화 되어 왔으며 종자 은행이 설립되어 이들

Discovery

1. Identify target populations
2. Set nutrient target levels
3. Screen germplasm and gene



Development

4. Breed biofortified crops
5. Test performance of new crop varieties
6. Measure nutrient retention in crops/food
7. Evaluate nutrient absorption and impact



Dissemination

8. Develop strategies to disseminate seeds
9. Promote marketing & consumption of biofortified food



Outcomes

10. Improve nutritional status of target populations

Fig. 1 Stages of biofortification. Biofortification is a ten-step process, with assessment at each stage.

을 평가함으로써 수집된 개체들을 자원으로 활용하여 전통적 육종 방법으로 새로운 영양학적 형질을 갖는 작물의 개발이 가능해졌다. 현재는 콩, 카사바, 옥수수, 쌀, 밀, 고구마 등 주요 작물에 철, 아연 및 비타민의 함량 증대에 초점이 맞춰져 전 세계적으로 연구가 진행되고 있다 (Winkler 2011). 하지만, 전통육종에 의한 형질 개량은 교배에 의존하기 때문에 근연관계가 먼 유전 자원으로부터의 형질 도입이나, 교차 (crossing over)가 잘 일어나지 않은 유전자좌의 형질 도입은 매우 어렵다. 또한 원하는 형질을 가진 유전자원이 존재하지 않는 한, 형질 개량이 어려운 단점을 가지고 있다.

생명공학 기법을 이용한 유전자 변형의 목표는 작물의 영양 성분을 개선하는 것으로, 소량으로 함유되어 있거나 결핍된 영양소를 인위적으로 추가하는 방법이다. 현재까지 필수지방산 함량이 증가된 유채, 단백질과 녹말의 함량이 증가된 감자, 미네랄 또는 단백질의 함량이 증가된 쌀, 미네랄이 함유된 원예 작물, 철 및 글루코시놀레이트 (glucosinolate)의 양이 증가된 배추과 작물, 베타카로틴 함량이 증가된 감자 및 토마토, 플라보노이드 (flavonoid)의 함량이 증가된 채소 등 영양분이 개선된 다양한 작물이 보고되었다 (Table 1). 또 다른 접근 방법으로 작물에서 영양소의 흡수를 억제하는 알레르기 유발 항원 (allergen), 글리코시드 (glycoside), 피티산 (phytate) 및 수산 (oxalate)과 같은 영양억제물질 (antinutrient)을 감소시켜 인체의 영양소 흡수율을 증가시킬 수도 있다 (Winkler 2011). 피티산은 아연, 칼슘, 마그네슘 및 철과 같은 미네랄과 불용성 복합체를 형성하는 영양억제물질로 인간이나 가축이 소화시킬 수 없지만 (Raboy 2001; Adams et al. 2002; Hambidge et al. 2005), 금속 이온들의 산화적인 반응에 의해서 일어나는 암이나 심혈관계 질환 등을 유발시키는 금속 이온들과 강한 킬레이트 (chelate)를 형성하여 항산화 활성을 나타낸다 (Grases et al. 2000). 칼슘 및 마그네슘 이온과 결합하여 형성된 불용성 수산 중 수산칼슘 (calcium oxalate)은 영양 흡수가 되지 않고 칼슘과 같은 무기질의 흡수를 방해할 뿐 아니라 신장 결석을 유도시킨다 (Heaney et al. 1988; Heaney and Weaver 1989; Weaver 1990; Weaver et al. 1997; Franceschi and Nakata 2005). 따라서 이러한 영양억제물질을 감소시키면 체내에서 칼슘 흡수율을 증가시킬 수 있을 것이다.

작물에서 칼슘의 역할 및 칼슘 결핍 증상

칼슘은 각종 생명체의 구성과 활동에 있어서 반드시 필요한 필수 미네랄 성분이다. 칼슘은 질소, 인, 칼륨과 더불어 식물체를 구성하는 필수 원소인 동시에 다양한 외부 자극에 반응하며 세포 내 신호전달과정의 중요한 역

할을 담당하고, 식물이 자라기에 좋은 토양 구조를 만드는 데에도 중요한 요소이다 (Knight and Knight 2001; Sanders et al. 2002). 식물체 내의 칼슘은 대부분 액포에 보관되며 그 기능을 간략하게 정리하면 다음과 같다. 1) 칼슘이온은 펙틴과 결합하여 식물체의 골격을 형성하고 지지구조의 힘을 유지한다. 2) 탄수화물의 대사와 축적을 촉진하여 단백질 대사를 원활하게 함으로써 식물의 성장을 결정한다 (Sanders et al. 1999; White and Broadley 2005; McAinsh and Pittman 2009). 3) 세포막을 통한 양분의 흡수를 조절하고 질소대사에도 중요한 역할을 한다. 4) 세포 내 양이온 또는 음이온의 균형을 유지하고, 칼륨이온과 더불어 원형질막의 투과성 및 원형질교질의 수화성을 조절한다 (Conn and Gilliam 2010; Dodd et al. 2010). 5) 과잉산류나 유독한 산류를 중화하여 그것과 결합함으로써 용해하기 어려운 염을 가용태로 만들어 칼슘-옥살산염, 칼슘-인산염의 형태로 존재하며 종자에서는 피티산과 결합한다 (Heaney et al. 1988; Morris et al. 2008; Hirschi 2009). 이러한 중요한 역할을 하는 칼슘은 토양용액 중 칼륨보다 약 10배 정도 많지만, 흡수율은 다른 이온보다 현저히 낮으며 수동적으로 흡수된다. 토양내의 칼슘 이온은 뿌리를 통해 흡수되고, 목질부를 통해 각 기관으로 이동한 후 축적되는데, 주로 잎에 집중되어 분포하고 식물체 내의 펙틴이나 유기산과 결합하여 재 이동하기 어려운 상태로 존재한다. 그러므로 일찍 생겨나 노화된 잎에는 칼슘 축적이 많이 되고, 어린 잎의 경우 분열조직의 생장이 왕성한 성장점으로 칼슘 이온의 이동이 어려워 칼슘 함량이 낮아 결핍 증상이 발생한다고 보고되고 있다 (Morris et al. 2008).

채소류의 칼슘 결핍으로 인한 장애현상은 쉽게 관찰되는데, 식물체에서 칼슘이 결핍되면 세포막이 붕괴되고 조직이 괴사한다. 세포막에서 다른 종류의 이온의 선택적 흡수 (선택적 이온 흡수)가 높아져 생리장애 유발의 간접적인 요인이 될 수 있다. 칼슘이온이 결핍되면 생장이 왕성한 어린잎의 끝 부분이 희어지며 갈변 (tip-burn)하고 줄기에 줄무늬가 생기고 괴사한다. 뿌리는 표피의 코르크층이 생기고 짧고 굵어지며, 전체적인 발육이 불량하고 과실이 부패한다. 칼슘이 부족하여 나타나는 작물별 석회결핍 증상으로서 딸기는 성장점이 위축되고, 고추나 토마토의 경우 과실 꼭지부분이 암갈색으로 변하여 함몰된 후 그대로 부패한다. 결구된 배추나 양배추의 경우 정상적으로 결구된 것처럼 보이지만 속이 심하게 부패하여 비게 되는 경우와 초기부터 어린잎의 가장자리가 마르며 갈변 현상 (tip-burn)이 나타난다. 오이는 어린잎의 가장자리부터 황화되기 시작하여 안쪽으로 퍼져 나간다. 작물에서의 칼슘은 세포의 신장과 분열에 필요한 것으로 인정되나, 정확한 작용 메커니즘과 과정 및 작물 별 생육 단계에 따른 정확한 소요량은 아직 밝혀지지 않았다.

Table 1 Examples of crops with nutritionally improved traits intended to provide health benefits for consumers and animals

Crop	Trait	References
Rice	Increased in amino acid composition	Katsube et al. 1999
	Increased in α -linolenic acid	Anai et al. 2003
	Increased in β -carotene	Ye et al. 2000
	Increased in flavonoids	Stark-Lorenzen et al. 1997; Shin et al. 2006
	Increased in iron	Lucca et al. 2002
Soybean	Improved amino acid balance	Dinkins et al. 2001
	Increased in Lys and Trp	Falco et al. 1995; Galili et al. 2002
	Increased in oleic acid	Reddy et al. 1996
	Increased in flavonoids	Yu et al. 2003
	Increased in phytase	Denbow et al. 1998
Maize	Increased in amino acid composition	O'Quinn et al. 2000; Yang et al. 2002; Young et al. 2004
	Increased in Lys and Met	Lai and Messing 2002
	Increased in oil	Young et al. 2004
	Increased in fructan	Caimi et al. 1996
	Increased in vitamin E and vitamin C	Rochefford et al. 2002; Cahoon et al. 2003; Chen et al. 2003
	Increased in flavonoids	Yu et al. 2003
	Increased in phytase and ferritin	Drakakaki et al. 2005
Potato	Increased in amino acid composition	Li et al. 2001
	Increased in Met	Zeh et al. 2001
	Increased in fructan	Hellwege et al. 1997
	Increased in inulin	Hellwege et al. 2000
	Increased in β -carotene and lutein	Ducreux et al. 2005
	Decreased of anthocyanin, alkaloid glycoside and solanin	Lukaszewicz et al. 2004
	Increased in calcium	Park et al. 2005b; Kim et al. 2006
Sweet potato	Increased in protein	Egnin and Prakash 1997
Lettuce	Increased in iron	Goto et al. 2000
	Increased in calcium	Park et al. 2009
Mustard	Increased in β -carotene	Shewmaker et al. 1999
Carrot	Increased in calcium	Park et al. 2004; Morris et al. 2008
Wheat	Increased in phytase	Brinch-Pedersen et al. 2000
Strawberry	Increased in vitamin C	Aginus et al. 2003
Tomato	Increased in folate, phytoene, β -carotene, lycopene, and provitamin A	Rosati et al. 2000; Fraser et al. 2001; Mehta et al. 2002; Díaz dela Garza 2004; Enfissi et al. 2005; DellaPenna 2007
	Increased in flavonoids, chlorogenic, stilbene, and anthocyanins	Rosati et al. 2000; Muir et al. 2001; Niggeweg et al. 2004; Giovanazzo et al. 2005; Butelli et al. 2008
	Increased in calcium	Park et al. 2005a; Chung et al. 2010
Alfalfa	Increased in resveratrol	Hipskind et al. 2000
	Increased in phytase	Austin-Phillips et al. 1999

작물로부터의 칼슘 섭취

세계적으로 소비자들이 선호하는 감자, 당근 및 상추는 칼슘함량 증대가 매우 크게 요구되는 작물로 알려졌다. 미국인을 예로 1일 권장량의 야채와 과일을 제대로 섭취

하고 있는 인구는 전체 인구의 약 25% 미만이다. 이러한 통계는 작물에 칼슘과 같은 영양소 함량을 증대시킬 경우 인류 건강 증진 효과를 기대할 수 있게 한다.

감자는 과거에 유럽과 북미에서 소비되었는데, 최근에는 아시아, 아프리카 및 라틴아메리카에서 생산 및 수요

가 급격히 증가하고 있다. 전 세계의 감자 생산량 절반을 아시아에서 소비하고 있지만, 사실 연간 소비량은 1인당 25 kg 정도다. 감자의 영양성분은 주로 탄수화물로 (19%) 그 대부분이 전분으로 구성되어 있어 좋은 에너지원이며, 티아민 (thiamine), 리보플라빈 (riboflavin), 엽산 (folate), 나이아신 (niacin), 철, 마그네슘, 칼슘, 인, 칼륨 등 무기질 및 비타민 B6와 C가 풍부하다. 그러나 평균 크기의 구운 감자의 경우 껍질을 포함하여 약 26 mg의 칼슘을 함유하고 있어 칼슘 섭취의 좋은 공급원이 되지 않는 못한다 (Tichenal and Dobbs 2007). 당근은 미국에서도 가장 인기 있는 채소 중의 하나로 소비자의 인종 및 연령에 따라 소비량이 다를 수 있지만, 평균적으로 연간 4.98 kg을 소비한다. 당근은 체내에서 베타-카로틴으로 전환되는 비타민 A의 함량이 높고, 비타민 C, 비타민 K, 식이섬유 및 칼륨을 흡수할 수 있는 좋은 공급원이다 (Simon and Goldman 2007). 상추도 당근과 마찬가지로 1960년대부터 소비량이 증가하여 유효 칼슘 섭취량을 높이는 데에 쓰일 수 있지만, 높은 비타민 K의 함량에 비해 칼슘 양이 현저히 낮아 좋은 공급원은 아니다. 현재까지 생명공학 기법을 통한 감자, 당근 및 상추의 개량에 대한 요구도는 매우 큰 것으로 알려져 있다. 이러한 내용은 토마토와 옥수수를 포함한 유전자변형 작물 개발을 통해 가능성이 입증되었다 (Park et al. 2005a). 감자, 당근 및 상추는 품종간의 차이가 크긴 하지만 유전공학 방법을 이용하여 형질을 용이하게 변화시킬 수 있으므로, 유전적 변이를 통한 작물의 영양분 이용률을 증가시킬 수 있도록 파이프라인을 구축하는 연구가 활발히 진행되고 있다 (Morris et al. 2008).

다른 작물에 비해 브로콜리 (1.8 mg/g), 청경채 (1.58 mg/g), 케일 (0.94 mg/g)과 같은 배추과의 진녹색 채소 (dark green vegetables)는 유효칼슘 함량이 높다. 그러나 소비량은 칼슘함량이 높지 않은 상추와 감자에 비해 현저히 떨어진다. 따라서 칼슘 함량이 높은 배추과 작물을 칼슘 함량 증대 및 기작 연구의 모델로 활용하고, 이를 통한 결과 산물을 소비량이 높은 작물로의 도입은 보다 효율적인 좋은 접근 방법이 될 수 있다. 이 밖에도 칼슘 함량이 높은 작물로는 시금치 (3 mg/g), 겨자 (1.04 mg/g), 순무 (1.25 mg/g) 등이 알려져 있다 (Weaver et al. 1997).

칼슘함량 증대를 위한 Biofortification의 연구와 전망

칼슘함량을 증가시키는 전략은 (1) 세포의 칼슘 공급량 증가; (2) 세포의 칼슘 흡수량 증가; 또는 (3) 세포 및 조직내의 칼슘 보유량 증가와 같이 요약 할 수 있다 (Dayod et al. 2010). 세포로 유입되는 칼슘 이온 양을 늘리기 위해서는 액포 또는 원형질막에 존재하는 칼슘수송체의 활성을 높여야 한다 (Conn and Gilliam 2010). 원형질막의

칼슘 채널 유전자는 세포 유형별로 보고되었으며, 대표적인 애기장대의 칼슘채널 유전자는 *MCA1*, *MCA2* 및 *TPC1*이 있다 (Very and Sentenac 2002). *MCA1*과 *MCA2* 유전자는 원형질막의 칼슘 채널 관련 유전자로서, 애기장대의 knock-out mutant를 이용해 칼슘의 축적과 관련이 없는 것으로 알려져 있다. *TPC1* 유전자는 액포 칼슘 채널 유전자로서 칼슘과 칼륨의 유출 기작과 관련 있어 마찬가지로 칼슘의 축적과는 관계 없는 것으로 보고 되어 있다 (Yamanaka et al. 2010; Peiter et al. 2005; Ranf et al. 2008). 액포의 칼슘수송체 유전자 (*CAXs*)를 과발현시킨 작물에서는 비록 칼슘 결핍 현상이 일부 나타나지만 전체 칼슘 축적량은 증가하였다 (Conn and Gilliam 2010). 이러한 결과는 궁극적으로 작물에서의 칼슘축적은 액포의 활성 조절을 통하여 증가시킬 수 있는 가능성을 의미한다 (Karley et al. 2000a, 2000 b; MacRobbie 2006a, 2006b; Conn and Gilliam 2010). 식물에서 가장 큰 볼륨을 차지하는 액포에 칼슘 이온을 축적시키기 위해서는 칼슘 이온 수송을 담당하는 유전자는 Ca^{2+} -ATPases (*ACAs*) 또는 Ca^{2+}/H^{+} antiporters (*CAXs*)가 널리 알려져 있다 (Leigh 1997; Rea et al. 1992; Conn and Gilliam 2010). *CAX*와 *ACA* 유전자는 N-말단에 autoinhibitory 도메인을 가지며, *CAX*는 인산화 또는 *CAX* interacting proteins (*CXIP*) (Pittman et al. 2002; Cheng and Hirschi 2003)에 의해 활성화 되고, *ACA*는 Ca^{2+} /Calmodulin에 의해 활성화 된다 (Baxter et al. 2003).

작물의 칼슘함량 증가를 위한 액포막에 위치하는 칼슘수송체 유전자변형 식물체가 만들어져 보고되고 있다 (Table 2). Hirschi 그룹은 *sCAX1*, *CAX4* 및 *sCAX2A/B*를 과발현시켜 중요 경제 작물 (토마토, 감자, 상추 및 당근)의 칼슘함량을 증가시키는데 성공하였다 (Park et al. 2004; 2005a; Kim et al. 2006; Morris et al. 2008; Han et al. 2009; Chung et al. 2010). 토마토에 *sCAX1*을 발현시켰을 때 칼슘 함량이 잎에서는 20%, 과실에서는 2배 증가하였다. 또한 구리, 철, 마그네슘, 망간 및 아연의 함량도 같이 증가하였다 (Park et al. 2005a). 식용 가능한 뿌리의 칼슘함량을 증가시키기 위해 당근에 *sCAX1* 유전자를 과발현시키면 칼슘함량이 약 2.6배 증가하였고, 이는 유전자변형 전과 동일 질량으로 비교했을 때 41%의 칼슘함량 증가 효과가 있었다 (Park et al. 2004; Morris et al. 2008). 칼슘수송체 유전자를 과발현시킨 당근을 쥐와 사람에게 제공하였을 때 칼슘의 흡수량도 증가하였다. 체내에서 이용 가능한 유효칼슘의 함량이 증가하였는데, 이것은 여분의 칼슘 중 일부가 영양억제물질과 결합하였기 때문으로 해석되었다 (Morris et al. 2008). *CAX* 유전자가 과발현된 당근, 감자 및 토마토의 체관에서 칼슘양이 증가하는 수확 후 저장과 병 저항성 향상을 나타내었다 (Park et al. 2005b). 그러나 액포의 칼슘수송체가 과발현된 작물은 칼슘함량이 뚜렷하게 증가되기는 하지만 오히려 식물체의 잎 가장자

Table 2 Transgenic approaches to increasing calcium content in crops

Crop	Target	Calcium content	References
Potato	Overexpressed <i>AtsCAX1</i>	300% increase in Ca of tubers No other elements mentioned	Park et al. 2005b
	Overexpressed <i>AtsCAX2B</i>	50–60% increase in Ca of tubers No Ca increase in leaves	Kim et al. 2006
Lettuce	Overexpressed <i>AtsCAX1</i>	25–32% increase in Ca No increase in other elements	Park et al. 2009
Carrot	Overexpressed <i>AtsCAX1</i>	160% increase in Ca	Park et al. 2004; Morris et al. 2008
Tomato	Overexpressed <i>AtsCAX1</i>	20% increase in Ca of leaves 100% increase in Ca of fruit Increase in Cu, Fe, Mg, Mn, and Zn	Park et al. 2005a
	Overexpressed <i>AtCAX4</i>	50% increase in Ca of fruit No change in other elements	Park et al. 2005a
	Overexpressed <i>AtsCAX2A</i>	100% increase in Ca of fruit	Chung et al. 2010

리에서 갈변 (tip-burn)이 나타나고 과실이 부패하는 등 칼슘 결핍현상과 비슷한 증상이 관찰되었다 (Hirschi 1999; Park et al. 2005a, 2005b). 이러한 현상의 발생 원인은 토양으로부터의 칼슘 흡수가 장애를 받아 빠르게 생육하는 조직으로 이동이 충분하지 못하였거나 또는 세포 내부로 충분한 칼슘이온이 공급되기는 하지만 액포로의 지나친 수송으로 인해 세포질 칼슘이온농도 상승 또는 칼슘의존적 신호전달이 교란을 받은 결과인지 분명하지 않은 것으로 보고되었다 (Hirschi 2004). 칼슘결합단백질 (calcium binding protein)을 이용하면 *sCAX1* 과발현체에서 나타났던 대량의 칼슘 증가로 인한 결핍증상이 나타나는 부정적인 효과를 줄일 수 있다고 보고된 바 있다. *sCAX1*을 과발현시킨 담배 잎의 끝 부분이 괴사하고 성장이 지체되었지만 (Hirschi 1999), *sCAX1*과 소포체에 위치하는 칼슘결합단백질 *calreticulin*을 과발현시키면 칼슘함량이 증가함에도 불구하고 칼슘 결핍 증상을 보이지 않았다 (Wu et al. 2009). 또한 *calreticulin*이 과발현된 애기장대의 경우 칼슘을 액포나 소포체로 분산시켜 유효칼슘이 증가함이 보고되었다 (Wyatt et al. 2002).

*CAX1*과 *CAX3*은 (아미노산 수준에서 77% 동일 단백질) 비생물적 스트레스 저항성을 갖거나 특정 생리적 현상의 중요한 역할을 담당한다. *CAX2*는 망간이나 카드뮴 이온을 수송하는 기능을 하는데, *sCAX2A/B* 유전자의 기능을 상실한 돌연변이 식물체는 망간이온 수송 능력은 상실하지만 카드뮴 수송 능력은 보유한다 (Shigaki et al. 2003). 뿌리에서 발현량이 많은 *CAX2*와 *CAX4*를 담배에 과발현시켰을 때 형질전환체의 카드뮴 축적이 뿌리에서 증가함에 따라 오히려 줄기의 카드뮴 축적은 감소하였다 (Korenkov et al. 2009). *CAX*가 작물의 칼슘 및 이온함량을 조절하는데 좋은 후보이지만, 민감한 조직에서의 결핍 증상이 유발되지 않도록 하는 접근 방법이 필요하다. 또한 위에서

언급되었듯이 식물체 내의 영양억제물질 (e.g. oxalate, phytate)의 함량을 낮추는 연구 또한 식물의 칼슘 이용 가능성을 높이는 또 다른 방법으로 대두되고 있다. 세계적으로 인간의 영양문제는 영양소 섭취와 질환의 밀접한 관계로부터 야기되었는데, Biofortification을 통한 주요 식용작물의 유효칼슘 양을 증가시키면 식습관을 바꾸지 않고도 전체 칼슘 흡수량을 증가시킬 수 있고, 생합성 칼슘 함량이 증대된 작물을 개발하고 재배법을 개선하면 약 10배 이상의 칼슘 축적도 가능할 것으로 전망된다. 또한 Biofortification을 통한 작물의 칼슘 함량 증가는 인간뿐만 아니라 동물의 사료로써도 유용하게 이용될 것이며, 이렇게 개발된 작물은 고부가가치의 실용작물로서 인류에 기여할 것으로 예상된다.

결론

영양성분과 함량이 증가된 작물은 전 세계적으로 인간의 영양소 섭취와 관련된 질환 해결에 있어 매우 중요한 역할을 한다. 작물의 Biofortification을 통한 칼슘 함량의 증대는 작물 자체의 유용 형질 개량뿐 아니라 인간의 칼슘 섭취에 크게 기여하여 식생활 개선의 기회를 제공한다. 최근 작물을 이용한 칼슘 수송과 저장에 대한 연구가 시작되었고, 칼슘수송체의 발현이나 활성의 변형으로 작물의 칼슘 생합성 영양 증대에 유익하게 접근할 수 있게 되었다. 그러나 현시점에서의 칼슘 함량의 증대 연구는 아직은 칼슘 증대 후 잎 또는 과실에서 보이는 칼슘결핍 현상과 같은 부수적인 부정적 기능을 해결하지 못하는 수준에 있다. 이는 작물의 칼슘의 흡수와 이동 관련 기작에 대한 근본적인 연구를 통해 보완될 것으로 전망된다.

사 사

본 논문은 농림수산식품부 양배추류 유전체 육종 통합지원 시스템 개발사업의 지원에 의하여 수행되었다.

인용문헌

- Adams CL, Hambidge M, Raboy V, Dorsch JA, Sian L, Westcott JL, Krebs NF (2002) Zinc absorption from a low-phytic acid maize. *Am J Clin Nutr* 76:556-559
- Agius F, Gonzalez-Lamothe R, Caballero JL, Munoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol* 21:177-81
- Al-Babili S, Beyer P (2005) Golden rice - five years on the road - five years to go? *Trends Plant Sci* 10, 565-573
- Anai T, Koga M, Tanaka H, Kinoshita T, Rahman SM, Takagi Y (2003) Improvement of rice (*Oryza sativa* L.) seed oil quality through introduction of a soybean microsomal omega-3 fatty acid desaturase gene. *Plant Cell Rep* 21:988-992
- Austin-Phillips S, Bingham ET, Koegel RG, Rausch J, Straub RJ, Will J, Zeigelhoffer T, Zeigelhoffer P, Burgess RR (1999) Production of industrial and animal feed enzymes in transgenic alfalfa. <http://www.molecularfarming.com/nonmedical.html> (April 15, 2008)
- Baxter I, Tchieu J, Sussman MR., Boutry M, Palmgren MG, Gribskov M, Harper JF, Axelesen KB (2003) Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* 132: 618-628
- Bouis HE (2000) Enrichment of food staples through plant breeding: a new strategy for fighting micronutrient malnutrition. *Nutrition* 16:701-704
- Bouis HE (2005) Micronutrient fortification of plants through plant breeding: Can it improve nutrition in man at low cost? *Proc Natl Acad Sci USA* 62:403-411
- Brinch-Pedersen H, Olesen A, Rasmussen SK, Holm PB (2000) Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase. *Mol Breed* 6:195-206
- Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock H-P, Matros A, Peterek S, Schijlen EGWM, Hall RD, Bovy AG, Luo J, Martin C (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat Biotech* 26:1301-1308
- Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, HitzWD, Coughlan SJ (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat Biotechnol* 21:1082-1087
- Caimi PG, McCole LM, Klein TM, Kerr PS (1996) Fructan accumulation and sucrose metabolism in transgenic maize endosperm expressing a *Bacillus amyloliquefaciens SacB* gene. *Plant Physiol* 110:355-363
- Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR (2003) Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3525-3530
- Cheng N, Pittman JK, Barkla B, Shigaki T, Hirschi K (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 Biotech Rep* 4:15-21
- Conn SJ, Gilliam M (2010) Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Ann Bot* 105, 1081-1102
- Dayod M, Tyerman SD, Leigh RA, Gilliam M (2010) Calcium storage in plants and the implications for calcium biofortification. *Protoplasma* 247:215-231
- DellaPenna D (2007) Biofortification of plant-based food: enhancing folate levels by metabolic engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3675-3676
- Denbow DM, Grabau EA, Lacy GH, Kornegay ET, Russell DR, Umbeck PF (1998) Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poult Sci* 77:878-881
- Díaz dela Garza RI, Quinlivan EP, Klaus SM, Basset GJ, Gregory JF, Hanson AD (2004) Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13720-13725
- Dinkins RD, Reddy MSS, Meurer CA, Yan B, Trick H, Thibaud-Nissen FO (2001) Increased sulfur amino acids in soybean plants overexpressing the maize 15 kDa zein protein. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:742-747
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010) The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol* 61: 593-620
- Drakakaki G, Marcel S, Glahn RP, Lund EK, Pariagh S, Fischer R, Christou P, Stoger E (2005) Endosperm-specific coexpression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. *Plant Mol Biol* 59:869-880
- Ducreux LJM, Morris WL, Hedley PE, Shepherd T, Davies HV, Millam S, Taylor MA (2005) Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of β -carotene and lutein. *J Exp Bot* 56:81-89
- Egnin M, Prakash CS (1997) Transgenic sweetpotato expressing a synthetic storage protein gene exhibits high level of total protein and essential amino acids. *In Vitro Cell Dev Biol* 33:52A
- Enfissi EMA, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schuch W, Bramley PM (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and nonmevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol J* 3:17-27
- Falco SC, Guida T, Locke M, Mauvais J, Sanders C, Ward RT, Webber P (1995) Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Biotechnology* 13:577-582
- Franceschi VR, Nakata PA (2005) Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol* 56:41-71

- Fraser PD, Römer S, Kiano JW, Shipton CA, Mills PB, Drake R, Schuch W, Bramley PM (2001) Elevation of carotenoids in tomato by genetic manipulation. *J Sci Food Agric* 81:822–827
- Galili G, Galili S, Lewinsohn E, Tadmor Y (2002) Genetic, molecular, and genomic approaches to improve the value of plant foods and feeds. *Crit Rev Plant Sci* 21:167–204
- Giovinazzo G, d'Amico L, Paradiso A, Bollini R, Sparvoli F, DeGara L (2005) Antioxidant metabolite profiles in tomato fruit constitutively expressing the grapevine stilbene synthase gene. *Plant Biotechnol J* 3:57–69
- Goto F, Yoshihara T, Saiki H (2000) Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin. *Theor Appl Genet* 100:658–664
- Graham RM, Thompson JW, Wei J, Bishopric NH, Webster KA (2007) Regulation of *Bnip3* death pathways by calcium, phosphorylation, and hypoxia-reoxygenation. *Antioxid Redox Signal* 9:1309–1315
- Grases F, Ramis M, Costa-Bauza A (2000) Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res* 28: 136–140
- Hambidge KM, Krebs NF, Westcott JL, Sian L, Miller LV, Peterson KL, Raboy (2005) Absorption of calcium from tortilla meals prepared from low-phytate maize. *Am J Clin Nutr* 82:84–87
- Han JC, Yang XD, Zhang T, Li H, Li WL, Zhang ZY, Yao JH (2009) Effects of 1 α -hydroxycholecalciferol on growth performance, parameters of tibia and plasma, meat quality, and type IIb sodium phosphate cotransporter gene expression of one- to twenty-one-day-old broilers. *Poult Sci* 88:323–329
- Heaney RP, Weaver CM, Recker RR (1988) Calcium absorbability from spinach. *Am J Clin Nutr* 47:707–709
- Heaney RP, Weaver CM (1989) Oxalate: effect on calcium absorbability. *Am J Clin Nutr* 50:830–832
- Hellwege EM, Czaplá S, Jahnke A, Willmitzer L, Heyer AG (2000) Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8699–8704
- Hellwege EM, Gritscher D, Willmitzer L, Heyer AG (1997) Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs. *Plant J* 12:1057–1065
- Hipskind JD, Paiva NL (2000) Constitutive accumulation of a resveratrol glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 551–562
- Hirschi KD (1999) Expression of *Arabidopsis CAX1* in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. *Plant Cell* 11: 2113–2122
- Hirschi KD (2004) The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiol* 136: 2438–2442
- Karley AJ, Leigh RA, Sanders D (2000a) Differential ion accumulation and ion fluxes in the mesophyll and epidermis of barley. *Plant Physiol* 122:835–844
- Karley AJ, Leigh RA, Sanders D (2000b) Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends Plant Sci* 5:465–470
- Katsube T, Kurisaka N, Ogawa M, Maruyama N, Ohtsuka R, Utsumi S, Takaiwa F (1999) Accumulation of soybean glycinin and its assembly with the glutelins in rice. *Plant Physiol* 120:1063–1074
- Kim CK, Han JS, Lee HS, Oh JY, Shigaki T, Park SH, Hirschi K (2006) Expression of an *Arabidopsis CAX2* variant in potato tubers increases calcium levels with no accumulation of manganese. *Plant Cell Rep* 25:1226–1232
- Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: Specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* 6:262–267
- Korenkov V, King B, Hirschi K, Wagner GJ (2009) Root-selective expression of *AtCAX4* and *AtCAX2* results in reduced lamina cadmium in field-grown *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnol J* 7:219–226
- Lai JS, Messing J (2002) Increasing maize seed methionine by mRNA stability. *Plant J* 30:395–402
- Li L, Liu SM, Hu YL, Zhao WP, Lin ZP (2001) Increase of sulphur-containing amino acids in transgenic potato with 10 ku zein gene from maize. *Chin Sci Bull* 46:482–484
- Lucca P, Hurrell R, Potrykus I (2002) Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J Am Coll Nutr* 21:184–190S
- Lukaszewicz M, Matysiak-Kata I, Skala J, Fecka I, Cisowski W, Szopa J (2004) Antioxidant capacity manipulation in transgenic potato tuber by changes in phenolic compounds content. *J Agric Food Chem* 52:1526–1533
- MacRobbie EAC (2006a) Control of volume and turgor in stomatal guard cells. *J Membr Biol* 210:131–142
- MacRobbie EAC (2006b) Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1135–1140
- McAinsh MR, Pittman JL (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytol* 181:275–294
- Meenakshi J, Johnson N, Manyong V, Degroote H, Javelosa J, Yanggen D, Naher F, Gonzalez C, Garcia J, Meng E (2010) How cost-effective is biofortification in combating micronutrient malnutrition? an Ex ante assessment. *World Development* 38:64–75
- Mehta RA, Cassol T, Li N, Ali N, Handa AK, Mattoo AK (2002) Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nat Biotechnol* 20:613–618
- Morris J, Hawthorne KM, Hotze T, Abrams SA, Hirschi KD (2008) Nutritional impact of elevated calcium transport activity in carrots. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1431–1435
- Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, Ric De Vos CH, van Tunen AJ, Verhoeven ME (2001) Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature* 19:470–474
- Mutch DM, Wahli W, Williamson G (2005) Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J* 19: 1602–1616
- Newell-McGloughlin M (2008) Nutritionally improved agricultural

- crops. *Plant Physiol* 147:939-953
- Niggeweg R, Michael AJ, Martin C (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat Biotechnol* 22:746-754
- O'Quinn PR, Nelssen JL, Goodband RD, Knabe DA, Woodworth JC, Woodworth MD, Lohrmann TT (2000) Nutritional value of a genetically improved high-lysine, high-oil corn for young pigs. *J Anim Sci* 78:2144-2149
- Park S, Cheng NH, Pittman JK, Yoo KS, Park J, Smith RH, Hirschi KD (2005a) Increased calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing *Arabidopsis* H^+/Ca^{2+} transporters. *Plant Physiol* 139:1194-1206
- Park S, Elless MP, Park J, Jenkins A, Lim W, Chambers E, Hirschi KD (2009) Sensory analysis of calcium-biofortified lettuce. *Plant Biotechnol J* 7:106-117
- Park S, Kang TS, Kim CK, Han JS, Kim S, Smith RH, Pike LM, Hirschi KD (2005b) Genetic manipulation for enhancing calcium content in potato tuber. *J Agric Food Chem* 53:5598-5603
- Park S, Kim C-K, 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
- Peiter E, Maathuis FJM, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D (2005) The vacuolar Ca^{2+} -activated channel *TPC1* regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434:404-408
- Pittman JK, Shigaki T, Cheng NH, Hirschi KD (2002) Mechanism of N-terminal autoinhibition in the *Arabidopsis* Ca^{2+}/H^+ antiporter *CAX1*. *J Biol Chem* 277:26452-26459
- Raboy V (2001) Seeds for a better future: "low phytate" grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends Plant Sci* 6:458-462
- Ranf S, Wünnenberg P, Lee J, Becker D, Dunkel M, Hedrich R, Scheel D, Dietrich P (2008) Loss of the vacuolar cation channel, *AtTPC1*, does not impair Ca^{2+} signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant J* 53:287-299
- Rea PA, Britten CJ, Jennings IR, Calvert CM, Skiera LA, Leigh RA (1992) Regulation of the vacuolar H^+ -pyrophosphatase by free calcium. *Plant Physiol* 100:1706-1715
- Reddy AS, Thomas TL (1996) Expression of a cyanobacterial DELTA 6-desaturase gene results in gamma-linolenic acid production in transgenic plants. *Nat Biotechnol* 14:639-642
- Rocheford TR, Wong JC, Egesel CO, Lambert RJ (2002) Enhancement of vitamin E levels in corn. *J Am Coll Nutr* 21:191-198
- Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G (2000) Metabolic engineering of β -carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J* 24:413-419
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11:691-706
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14: S401-S417
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY (1999) Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* 20:401-412
- Shigaki T, Pittman JK, Hirschi KD (2003) Manganese specificity determinants in the *Arabidopsis* metal/ H^+ antiporter *CAX2*. *J Biol Chem* 278:6610-6617
- Shin YM, Park HJ, Yim SD, Baek NI, Lee CH, AN G, W YM (2006) Transgenic rice lines expressing maize C1 and R-S regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm. *Plant Biotechnol J* 4:303-315
- Simon PW, Goldman IL (2007) Carrot. In R. J. Singh, ed., *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Vegetable Crops*, pp. 497-517. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group
- Stark-Lorenzen P, Nelke B, Hanssler G, Muhlbach HP, Thomzik JE (1997) Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep* 16:668-673
- Stein A, Sachdev H, Qaim M (2006) Potential impact and cost-effectiveness of Golden Rice. *Nature Biotechnol* 24:1200-1201
- Tichenal CA, Dobbs J (2007) A system to assess the quality of food sources of calcium. *J Food Compos Anal* 20:717-724
- Very AA, Sentenac H (2002) Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends Plant Sci* 7:168-175
- Weaver CM (1990) Assessing calcium status and metabolism. *J Nutr* 120:1470-1473
- Weaver CM, Heaney RP, Nickel KP, Packard PL (1997) Calcium bioavailability from high oxalate vegetables: Chinese vegetables, sweet potatoes and rhubarb. *J Food Sci* 62:524-525
- White PJ, Broadley MR (2005) Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci* 10:586-593
- White PJ, Broadley MR (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol* 182:49-84
- Winkler JT (2011) Biofortification: improving the nutritional quality of staple crops. Access Not Excess ed Charles Pasternak. Chapter 10, pp 100-112
- Wu XS, McNeil BD, Xu J, Fan J, Xue L, Melicoff E, Adachi R, Bai L, Wu LG (2009) Ca^{2+} and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal. *Nat Neurosci* 12:1003-1010
- 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
- Yamanaka T, Nakagawa Y, Mori K, Nakano M, Imamura T, Kataoka H, Terashima A, Iida K, Kojima I, Katagiri T, Shinozaki, K., Iida, H (2010) *MCA1* and *MCA2* that mediate Ca^{2+} uptake have distinct and overlapping roles in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 152:1284-1296
- Yang SH, Moran DL, Jia HW, Bicar EH, Lee M, Scott MP (2002) Expression of a synthetic porcine alpha-lactalbumin gene in the kernels of transgenic maize. *Transgenic Res* 11:11-20
- Ye X, Al-Babili S, Klott A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoids-free) rice endosperm. *Science* 287:303-305

- Young TE, Giesler-Lee J, Gallie DR (2004) Senescence-induced expression of cytokinin reverses pistil abortion during maize flower development. *Plant J* 38:910-922
- Yu O, Shi J, Hession AO, Maxwell CA, McGonigle B, Odell JT (2003) Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. *Phytochemistry* 63:753-763
- Zeh M, Casazza AP, Kreft O, Roessner U, Bieberich K, Willmitzer L, Hoefgen R, Hesse H (2001) Antisense inhibition of threonine synthase leads to high methionine content in transgenic potato plants. *Plant Physiol* 127:792-802