

CAX 유전자를 이용한 calcium 강화
기능성 감자 개발

Development of Calcium-rich Potatoes by Expression
of CAX Gene

연구기관
상 주 대 학 교
(경북농업기술원)

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “CAX 유전자를 이용한 calcium 강화 기능성 감자 개발에 관한 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 10 월 일

주관연구기관명 : 상주대학교

총괄연구책임자 : 김 창 길

세부연구책임자 : 김 창 길

연 구 원 : 김 경 민

협동연구기관명 : 경북농업기술원

협동연구책임자 : 이 현 숙

요 약 문

I. 제 목

CAX 유전자를 이용한 calcium 강화 기능성 감자 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국가 경제 발전에 따른 국민 소득 수준의 향상으로 우리 국민들의 식생활은 점차 다양화·고급화 되고있고, 아울러 농산물의 안정성에 대한 소비자들의 요구도 또한 과거 어느 때보다 높아지고 있다. 식생활의 고급화에 부응하기 위해서는 농업 생산적인 측면에서도 농산물의 단순한 양적 증가보다는 질을 추구하는 품질고급화에 치중하여야 될 것이고, 농산물의 안정성을 향상시키기 위해서는 환경 친화적인 영농에 역점을 두어야 할 것이다. 더욱이 WTO 체제 하에서 농산물의 예외 없는 수입 개방으로 육류나 인스턴트 식품의 소비가 증가되면서 국가 전체의 식량자급도가 30% 수준으로 낮아지고 있다는 점에서도 국내 농산물의 품질 고급화 및 안정성 향상은 우리 농산물의 소비촉진과 국제 경쟁력 제고뿐만 아니라 국민 건강 향상에 크게 기여하게 될 것이다.

감자는 인체에 필요한 영양소와 비타민을 가장 고루 함유하고 있는 알칼리성 식품이며 건강, 자연식품이나 칼슘함량은 다른 채소와 과일 등과 같이 그 함량이 그리 높지 않다. 감자는 국내에서 뿐만 아니라 전 세계 130여 개국에서 재배되고 있고 그 생산량이 많아 전략적 가치가 높은 작물이다. 또한 감자는 생감자를 조리해 먹는 것 외에도 포테이토 칩, 후렌치 후라이, 후레이크, 포테이토 파우더 등 가공식품으로도 널리 쓰이고 있으므로 첨단 유전공학기술을 토대로 한 칼슘강화 감자의 생산이 가능해진다면 이러한 가공식품을 즐겨 찾는 어린이나 현대인에게 부족해지기 쉬운 칼슘섭취가 용이해져 칼슘부족으로 야기될 수 있는 각종 질병예방에도 기여할 수 있을 것이다.

한편, 식물은 biotic stress(병원균 및 해충), abiotic stress(온도, 수분, 중금속, 가스)들에 의해 체내에 다양한 pattern의 Ca^{2+} 농도를 증가 혹은 축적시킴으로서 이들 칼슘신호는 다시 새로운 신호전달물질인 reactive oxygen species(ROs), salicylic acid, nitric oxide, jasmonate, ethylene 등 다양한 2차 내지 3차 신호전달 물질들을 만들고 이들은 다시 MAP-kinase cascade를 포함한 다양한 하부 신호전달계를 통하

여 수신퍼종중의 생체방어 관련 유전자들(pathogenesis-related protein gene)의 발현을 증폭시켜 자체방어를 하게 된다. 따라서 생체내에서 Ca과 관련된 유전자에 대한 연구는 내재해성(내병성, 내충성, 내한성, 내염성, 중금속 저항성 등) 작물 개발을 위한 기초자료에도 유용하게 이용되어질 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

기능성 칼슘강화 감자를 개발하기 위해서 해결해야 할 문제점은 CAX1 발현 토마토의 경우 식물체내 칼슘축적을 통하여 과피의 경도를 탄력성 있게 유지시켜 수송과 운반은 손쉽게 함은 물론 저장기간을 연장시키는데 반해, 1) CAX 관련유전자 특히 CAX1 유전자가 발현된 담배 및 토마토의 잎과 과실에서 칼슘축적 외에 아연, 철, 구리 및 망간 등의 축적이 동시에 확인되고(Park 등, in press), 2) 35S::CAX1 유전자가 발현된 토마토의 경우 칼슘의 축적이 불안정한 환경요인 즉, 토양내 칼슘함량이 낮을 경우 세포질내에 있는 칼슘이 액포로 이동하여 정단부에 칼슘부족현상이 일어나는 등 재배환경요인에 매우 민감한 반응을 나타낸다는 것이다. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 이미 본 연구책임자가 연수기간 중 형질전환에 성공한 35S::CAX1 발현 감자를 이용하여 1) 포장재배기간 중 환경요인에 대한 CAX1 유전자의 발현정도, 토양내 칼슘 시비량에 따른 생육반응 및 체내 칼슘함량변화 등을 조사함으로써 감자에서도 토마토와 같은 발현양상을 나타내는지를 구명하여 CAX1 유전자의 농업형질로서의 이용 안정성에 대한 연구를 수행함과 동시에 2) CaMV35S 외에 cdc2a(cell division cycle) 및 patatinB33 프로모트에 대한 CAX1 유전자 발현양상을 조사함으로써 감자에서 CAX1유전자 발현에 가장 적합한 특이 프로모트를 구명한다. 또한, Texas A&M 대학교 VIC의 Hirchi 박사팀으로부터 Ca만 선택적으로 액포내로 이동·축적시킬 수 있는 CAX2V 유전자를 지속적으로 제공받아 2) CaMV35S 외에 cdc2a(cell division cycle) 및 patatinB33 프로모트를 이용하여 CaMV35S::CAXV, cdc2a::CAX2V, patatinB33::CAX2V 등 3가지 벡터를 만들고 이를 국내 재배종 감자에 형질전환시킴으로써 식용가능부위에 집중적으로 고 농도의 칼슘만을 축적시킬 수 있는 방안을 모색코자 하였다.

궁극적으로 칼슘함량이 증가된 감자는 그 영양적 가치와 수량성을 증가시킬 것이다. 따라서 본 연구개발의 목표는 Ca²⁺ transporter의 발현을 통한 칼슘강화 기능성 감자 개발에 있으며 세부과제별 연구목표 및 내용은 다음과 같다.

1) 세부과제: CAX관련 유전자를 이용한 형질전환 감자개발

○ 35S, cdc2a 및 patatinB33 tuber 특이 프로모트 재조합 CAX1과 CAX2V 벡터 제작

○ 형질전환 및 발현양상 구명

○ 형질전환체의 유전분석 및 Ca 함량분석

2) 협동과제: CAX 유전자발현 감자의 포장안정성 검정

○ CAX 발현 감자의 유지 및 대량 생산

○ 포장에서의 CAX 발현 감자의 안정성 및 수량성 검토

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구과제 ‘CAX 유전자를 이용한 calcium 강화 기능성 감자 개발’은 세부과제인 ‘CAX관련 유전자를 이용한 형질전환 감자개발’과 협동과제인 ‘CAX 유전자발현 감자의 포장안정성 검정’으로 구성되어 있으며 세부과제별 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의를 요약하면 다음과 같다.

- 세부과제별 연구 결과

세부과제; CAX관련 유전자를 이용한 형질전환 감자개발

○ CAX1 유전자의 발현을 최적화 시키기 위하여 특이 프로모터별(cdc2a, patatin 및 35S) 형질전환 감자를 획득하여 CAX유전자의 도입은 PCR 및 Southern 분석을 통하여 이들 유전자가 식물체의 genomic DNA상에 안정적으로 도입되었음을 확인하였다. 또한, 특이 프로모터별 CAX 유전자의 전사 여부를 Northern분석으로 확인한 결과 cdc2a 및 35S 프로모터에서 CAX유전자가 전사됨을 확인하였다. 한편, patatin 특이프로모터의 경우 RT-PCR분석에서만 CAX 유전자의 전사물이 발현되는 것을 확인하였다. 또한, CaMV 35S promoter-sCAX1 및 cdc promoter-sCAX1유전자가 도입된 형질전환 감자의 껍질 내 Ca 함량은 대조구에 비해 증가하였으나 patatin promoter-sCAX1

유전자가 도입된 감자에서는 Ca 함량이 증가되지 않았다.

○ 국내 재배품종 '대지' 및 '수미'에 cdc::CAX 및 35S::CAX 벡터를 형질전환하여 PCR과 Southern 분석으로 이들 유전자의 도입여부를 확인하였다. 또한, Northern 분석을 통하여 CAX 유전자가 전사됨을 확인하였다. 형질전환이 확인된 식물체를 온실에서 재배하여 수확 후 괴경의 생체중을 조사한 바, CDCCAX 및 35SCAX 형질전환 식물체 모두 대조구와 수량 차이가 없는 것으로 나타났다. 그리고 CDCCAX 및 35SCAX 형질전환 식물체간, 동일벡터의 형질전환 개체간 수량 차이도 없었다.

○ CDCCAX 및 35SCAX 형질전환 식물체의 세대별 칼슘함량을 조사한 결과, 제 1 세대의 형질전환 개체의 잎과 괴경에서 total Ca 함량은 대조구에 비해 약 1.2-1.7배 및 1.5-3.0배의 칼슘이 증가되었음을 확인하였다. 제 2세대에서도 CAX 유전자가 정상적으로 전사를 하는지 조사하기 위하여 Northern 분석한 결과, CDCCAX 및 35SCAX 형질전환 식물체 모두에서 CAX 유전자의 전사량이 확인되었으며, 수확된 괴경에서의 칼슘함량 역시 제 1세대에서와 같은 수준으로 축적되어 있는 것으로 확인되었다. 한편, 형질전환 3세대에서는 괴경내 어떤 부위에 Ca이 가장 많이 축적되는지를 조사한 결과, CDCCAX 및 35SCAX 형질전환 식물체의 괴경 바깥쪽에서 안쪽으로 들어갈수록 Ca 함량이 줄어드는 경향이었으며 외피와 피질부분에 가장 많은 양의 Ca이 축적되어 있음을 확인하였다.

○ CAX 유전자의 도입 및 발현이 확인된 형질전환 감자 품종 'Russet Norkotah'의 무름병 저항성 정도를 조사한 결과, 대조구에 비해 저항성 정도가 다소 증가함을 확인하였다.

협동과제; CAX 유전자발현 감자의 포장안정성 검토

○ 세부과제에서 형질전환에 이용할 '수미'와 '대지' 품종은 기내에서 계속 유지, 증식시켜 형질전환용 재료로 공급하였으며,

○ CAX 유전자의 도입 및 발현이 확인된 형질전환 감자의 기내 소괴경 형성 특성이 변하지 않고 그대로 유지되는지 알아보기 위하여 형질전환체와 대조구의 배양기간별 소괴경 형성 정도를 조사한 결과, '대지' 및 '수미' 2품종 모두 형질전환체와 대조구인 정상식물체에서 배양기간이 지날수록 소괴경 형성율이 높아졌으며 배양 5주까지는 소괴경 형성이 활발히 진행되었으나 배양 6주후 부터는 소괴경 형성율이 더 이상 높아지

지 않았다. '대지' 품종의 경우 배양 4주까지는 형질전환체의 소피경 형성율이 대조구에 비하여 월등히 높았으나 배양 5주후부터는 오히려 대조구의 소피경 형성율이 약간 더 높았고 8주후에는 형질전환체와 대조구와의 차이점은 특별히 나타나지 않았다.

○기내소피경 형성율이 품종간 차이는 있지만 형질전환체와 정상식물체간에는 별다른 차이가 없었다.

○기내 소피경의 크기별로 형질전환체와 대조구의 45일 육묘후 정식직전의 묘소질을 조사한 결과, 기내 소피경의 크기가 크고 대조구가 형질전환체에 비해 초장, 엽수와 경경 모두 차이가 없었다. 또한, 정식 30일과 60일 후 형질전환체와 대조구간 생육특성을 조사한 결과 육묘후 묘소질에서와 같이 초장, 엽수 및 경수에 차이가 없었다. 다만 소피경 크기에 따른 생육차이는 피경의 크기가 큰 것이 초장, 엽수 및 경경이 양호하였다.

○아울러 수확 후 수량을 보면 1주당 총피경 형성수, 형성된 감자크기별 피경수 및 10a당 총 수량 모두 형질전환체와 대조구간 큰 차이를 보이지 않았으며 통계적 유의성도 없었다. 정식 후 60일까지의 생육은 소피경의 크기에 따른 차이는 인정된 반면 형질전환체와 대조구간 차이는 없었는데 비해 수확 후 수량에서는 소피경 크기별로도 차이가 나타나지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 보면 CAX유전자의 도입으로 인한 대조구와 형질전환체간 생육차이가 인정되지 않았다.

○한편, 최초로 제 1세부과제가 확보하고 있던 35S::CAX 및 cdc2a::CAX 벡터를 이용한 형질전환체 'Russet Norkotah' 감자의 세대별 칼슘함량 및 수량성을 조사하기 위하여 피경무게가 약 45g 내외인 것 만을 재료로 사용하여 수확량을 조사한 결과, 형질전환체와 대조구 간에 수량 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서, CAX1 유전자의 도입에 따른 수량증가 효과는 포장재배에서도 없는 것으로 인정되었다.

- 연구결과 활용에 대한 건의

○ 본 연구에서 다양한 CAX 관련유전자의 확보 및 이들 유전자발현 감자의 개발 및 형질전환체와 대조구간 포장재배를 통한 재배기간중 농업적 형질 특성 비교는 향후 기능성 감자 품종 및 육종재료 확보 등의 연구에 유용하게 이용되어 되어 질수있도록 관련 유관기관에 분양할 예정이며 이미 관련 기술은 특허출원을 신청한 상태이다.

○ 본 연구결과를 통하여 생산된 칼슘함량이 증가된 칼슘강화 감자는 농산물의 고

품질화는 물론 이를 이용한 다양한 가공식품생산이 가능하여 관련 기술을 이용한 상품화 재료로 공급될 수 있도록 한다.

○ 식물은 체내에 다양한 pattern의 Ca^{2+} 농도의 증가 혹은 축적은 하부 신호전달계를 통하여 수십여종의 생체방어 관련 유전자들(pathogenesis-related protein gene)의 발현을 증폭시켜 자체방어를 가능하게 한다. 따라서 생체내에서 Ca과 관련된 유전자에 대한 연구는 내재해성(내병성, 내충성, 내한성, 내염성, 중금속 저항성 등) 작물 개발을 위한 기초자료로 활용하게 한다.

SUMMARY

This project, 'Development of calcium-rich potatoes by expression of calcium related gene' consists of a main subject and a joint subject. The former is on establishment of an efficient *Agrobacterium*-mediated gene transformation method for potato. The latter is on estimation of genetic stability in transgenic calcium-rich potatoes. The results are summarized as follows ;

1. *sCAX1* expression in potato

In potatoes, we have generated 8 35S*sCAX1*-expressing lines and 7 CDC*sCAX1*-expressing lines. We randomly selected and confirmed 5 transgenic potato lines by Southern blot analysis. A 35S*sCAX1* and CDC*sCAX1* lines contain various copy numbers of the *sCAX1* expression vector. The lines we have termed 35S*sCAX1*-7 and CDC*sCAX1*-3 appear to contain single insertions. RNA gel blot documents that *sCAX1* transcripts accumulated in all of the transgenic lines. The inability to detect a *sCAX1* homology in the control lines by Southern or Northern analysis may be due to the stringency of hybridization used in this study. Four primary transgenic lines showing single-copy from Southern analysis were selected and subjected to further analysis of Ca accumulation in *sCAX1*-expressing second-generation tubers.

2. Phenotypes and calcium accumulation in *sCAX1*-expressing potato plants

In both the 35S*sCAX1* and CDC*sCAX1* expressing plants, *sCAX1* expression did not alter the morphology or growth characteristics or the edible portion of the tubers. Occasionally, *sCAX1*-expressing potatoes demonstrate some weak necrotic lesions on the primary transformants grown on artificial medium and soil. However, this phenotype was not nearly as severe as the tobacco *sCAX1*-expressing lines and was apparent in less than 10% of the *sCAX1*-expressing transformants (Hirschi, 1999). The necrotic lesions appeared to

be evenly distributed between the 35S*sCAXI* and CDCs*CAXI* lines. Total yield (as measured by fresh weight of the potato tubers) of the primary *sCAXI*-expressing lines was indistinguishable from that of controls. The variation in yield within the *sCAXI*-expressing lines was not significantly different from within the control lines. Furthermore, the yields of all of the second-generation *sCAXI*-lines also did not differ from the control (data not shown). Total accumulation of Ca ion was measured in the edible (tubers) and aerial (leaves) portions of the potatoes. There was variability in the Ca content of the primary transgenic potatoes; however, most of the *sCAXI*-expressing potatoes contained significantly more Ca (1.5 to 3.0-fold in tubers and 1.2 to 1.7-fold in leaves) than controls.

We have analyzed how ectopic expression of an *Arabidopsis* Ca²⁺ transporter *sCAXI*-expressing in potato plants driven by the *cdc2a* promoter as well as the CaMV 35S promoter consistently increases Ca content. The control of *sCAXI* expression is crucial for proper modulation of Ca levels in the tuber. Promoters control the level of gene expression and where a particular gene is expressed. In plant studies, the CaMV 35S promoter is often used to give a high level expression of a given gene throughout the entire plant. In previous studies using tobacco, expression of *sCAXI* driven by the CaMV 35S promoter has been shown to dramatically increase the total Ca accumulation in the entire plants, but also causes tobacco plants some alterations in growth and altered morphology (Hirschi, 1999). However, expression of deregulated *sCAXI* in carrots does not appear to dramatically alter plant growth (Park et al., 2004).

3. Calcium distribution analysis of the generated potato tubers

In order to analyze Ca distribution in *sCAXI*-expressing potato tubers, we bisected the tubers longitudinally and divided into three tissue types; 1) the periderm and cortical tissue region (O), 2) the central pith region (I), and 3) the middle region between the cortical tissue region and the central pith region (M) of the tubers. All of the *sCAXI*-expressing third-generation potato tubers contained

2-fold more total Ca in all of three tissue types compared to controls. Thus, the increased calcium appeared to be evenly distributed throughout the tuber.

Ca deficient potatoes are more susceptible to many secondary infections and storage diseases. Additionally, Ca deficient potatoes may have reduced storage life and poor quality.

Transgenic potatoes sequestering more Ca thus may be more robust than traditional varieties. In order to potentially increase the nutritional content and yield of potatoes, we have attempted to alter the Ca content of tubers through genetic engineering. Our working hypothesis was that increased activity of a plant Ca transporter would increase total Ca levels. Here we have confirmed our hypothesis by demonstrating that ectopic expression of a N-terminal truncated *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ transporter, sCAX1, increases the Ca content in potato. To our knowledge, an appropriate molecular tool to enhance high levels of Ca in potato tubers has not been used widely. Plants vary greatly in the amount of bioavailable Ca, meaning the amount of Ca that can be digested, absorbed and metabolized. However, to assess bioavailability we will need to attempt feeding studies and the potato tubers need to be labeled with Ca²⁺ or stable isotopes of Ca²⁺. Future studies will also need to demonstrate if these changes will decrease the incidence of pathogen infection and postharvest decay—two major problems worldwide.

CONTENTS

(영 문 목 차)

SUMMARY	00
Chapter I. Outline of the research project	00
Chapter II. Present status of domestic and foreign research	00
Chapter III. Research details and results	00
Section 1. Construction of CAX gene expression vectors	00
Section 2. Specific promoter assay in transformants	00
1. Materials and Methods	00
1-1. Plant materials	00
1-2. Strains and vectors	00
1-3. Genetic transformation and plant regeneration	00
1-4. PCR amplification and Southern blot analysis	00
1-5. Northern blot analysis and RT-PCR	00
1-6. Calcium analysis in transgenic potatoes	00
2. Results and Contents	00
2-1. Selection of transformants	00
2-2. Genetic analysis	00
2-3. Northern blot analysis and RT-PCR	00
2-4. Calcium analysis in transgenic potatoes	00
Section 3. Development of domestic CAX-expression potatoes	00
1. Materials and Methods	00
1-1. Plant materials	00
1-2. Strains and vectors	00
1-3. Genetic transformation and plant regeneration	00
1-4. Southern blot, Northern blot analysis and RT-PCR	00
1-5. Calcium distribution in transgenic potato tubers	00
2. Results and Contents	00

2-1. Increase of transformation efficiency -----	00
2-2. Expression of CAX gene in domestic potatoes cultivar -----	00
2-3. Yield measurements and calcium analysis -----	00
2-4. Expression of pCAX760B in domestic potatoes cultivar -----	00
Section 4. Genetic stability of CAX-expression potatoes in field -----	00
1. Materials and Methods -----	00
1-1. Propagation of transformants and Its production of microtubers -----	00
1-2. Agronomic characteristics of transformants with CAX gene -----	00
2. Results and Contents -----	00
2-1. Analysis of microtuberization ability in transformants -----	00
2-2. Agronomic characteristics of transformants with CAX gene -----	00
Chapter IV. Accomplishment of research	
and contribution to the related field -----	00
Section 1. Achievement degree of research and development -----	00
Section 2. Contribution to related field -----	00
Chapter V. Application plan of the research results -----	00
Chapter VI. Foreign research results related to this study -----	00
Chapter VII. References -----	00

목 차

요 약	00
제 1 장 연구개발과제의 개요	00
제 1 절 연구개발의목적 및 필요성	00
제 2 절 연구개발 범위	00
제 2 장 국내외 기술개발 현황	00
제 1 절 기술개발 현황	00
제 2 절 관련기술의 문제점	00
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	00
제 1 절 형질전환용 운반체 제작	00
제 2 절 특이 promoter에 따른 CAX1 유전자의 발현양상 구명	00
1. 재료 및 방법	00
가. 식물재료	00
나. 형질전환균주	00
다. 형질전환 및 식물체 재분화	00
라. 형질전환체의 PCR 및 Southern 분석	00
마. Northern 분석 및 RT-PCR	00
바. 형질전환 감자의 Ca함량 분석	00
2. 결과 및 고찰	00
가. 형질전환체 선발	00
나. 형질전환체의 유전분석	00
다. Northern 분석 및 RT-PCR	00
라. 형질전환체의 칼슘함량 분석	00
제 3 절 CAX 유전자를 이용한 질전환 감자 국내 재배품종 개발 및 유전분석	00
1. 재료 및 방법	00
가. 식물재료	00
나. 형질전환균주	00
다. 형질전환 및 식물체 재분화	00

라. Southern, Northern 분석 및 RT-PCR -----	00
마. 형질전환 감자의 Ca함량 분석 -----	00
2. 결과 및 고찰 -----	00
가. 감자 형질전환 효율향상 -----	00
나. 국내 재배종 감자로의 CAX유전자 형질전환 및 유전분석 -----	00
다. 형질전환 감자의 수량성 및 Ca함량 분석 -----	00
라. pCAX760B vector를 이용한 국내 재배종 감자 형질전환 -----	00
제 4 절 CAX유전자의 포장 안정성 검정 -----	00
1. 재료 및 방법 -----	00
가. 형질전환감자의 기내증식 및 소피경 생산 -----	00
나. 형질전환감자의 포장재배시 농업적 특성 -----	00
2. 결과 및 고찰 -----	00
가. 형질전환감자의 기내 소피경 생산능력 검정 -----	00
나. 형질전환감자의 포장재배시 농업적 특성 -----	00
제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도 -----	00
제 1 절 연구개발 목표의 달성도 -----	00
제 2 절 연구개발 관련분야에의 기여도 -----	00
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	00
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	00
제 7 장 참고문헌 -----	00

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

국가 경제 발전에 따른 국민 소득 수준의 향상으로 우리 국민들의 식생활은 점차 다양화·고급화 되고있고, 아울러 농산물의 안정성에 대한 소비자들의 요구도 또한 과거 어느 때보다 높아지고 있다. 식생활의 고급화에 부응하기 위해서는 농업 생산적인 측면에서도 농산물의 단순한 양적 증가보다는 질을 추구하는 품질고급화에 치중하여야 될 것이고, 농산물의 안정성을 향상시키기 위해서는 환경 친화적인 영농에 역점을 두어야 할 것이다. 더욱이 WTO 체제 하에서 농산물의 예외 없는 수입 개방으로 육류나 인스턴트 식품의 소비가 증가되면서 국가 전체의 식량자급도가 30% 수준으로 낮아지고 있다는 점에서도 국내 농산물의 품질 고급화 및 안정성 향상은 우리 농산물의 소비촉진과 국제 경쟁력 제고뿐만 아니라 국민 건강 향상에도 크게 기여하게 될 것이다.

인체에서 calcium(칼슘)의 약 99%는 뼈에 있으며 혈액 속에 있는 나머지 1%의 칼슘은 심장박동과 신경자극을 지속시키는 등의 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 적정량의 칼슘섭취가 이루어지지 않을 경우 혈액내의 칼슘수준을 유지하기 위해서 인체의 골격을 유지하고 있는 뼈로부터 칼슘이 빠져 나오게 됨으로서 골밀도가 낮아져 골다공증 증세를 유발하게 된다. 미국의 경우 1997에 이미 칼슘에 대한 DRI(Dietary Reference Intakes) 기준량을 설정하고 다양한 식품 특히 우유, 채소 혹은 과일 등으로부터 칼슘을 충분히 섭취할 것을 권고하고 있고, 섭취시기도 뼈의 발육이 왕성한 유년기인 9세부터 시작할 것을 권유하고 있다(FNB, 1997). 칼슘의 하루 필요량은 몸무게 1kg당 10mg, 몸무게 60kg인 사람은 하루 600mg이 필요한 셈이다. 그러나 한국인의 하루평균 섭취량은 약400mg에 불과하다. 많은 전문가들은 부족한 칼슘확보를 우유와 채소를 통해서 얻을 것을 권고하고 있다. 그러나 우유는 개인과 민족 그리고 연령별로 유당 과민성(Loctose Intolerance)에 차이가 있어 누구나 일정량의 칼슘을 안정적으로 공급받는 데는 어려움이 있다. 또한 대부분의 채소와 과일들이 적은 양의 칼슘을 함유하고 있고(Fleming and Heimback, 1994), 이들을 섭취함으로써 얻을 수 있는 칼슘의 양은 어린이의 경우 건강한 신체발육에 필요한 칼슘량과 중년 이후 칼슘부족현상으로 발생하는 골다공증과 같은 질병을 예방하기 위해 필요한 최소량에 불과하다(Weaver 등, 1999).

감자는 인체에 필요한 영양소와 비타민을 가장 고루 함유하고 있는 알칼리성 식품이

며 건강, 자연식품이나 칼슘함량은 다른 채소와 과일 등과 같이 그 함량이 그리 높지 않다. 감자는 국내에서 뿐만 아니라 전 세계 130여 개국에서 재배되고 있고 그 생산량이 많아 전략적 가치가 높은 작물이다. 또한 감자는 생감자를 조리해 먹는 것 외에도 포테이토 칩, 후렌치 후라이, 후레이크, 포테이토 파우더 등 가공식품으로도 널리 쓰이고 있으므로 첨단 유전공학기술을 토대로 한 칼슘강화 감자의 생산이 가능해진다면 이러한 가공식품을 즐겨 찾는 어린이나 현대인에게 부족해지기 쉬운 칼슘섭취가 용이해져 칼슘부족으로 야기될 수 있는 각종 질병예방에도 기여할 수 있을 것이다.

토양내 이온 불균형은 식물에 심한 스트레스를 제공하게 된다. 따라서 식물은 이들 이온 불균형에 대해 적응하기 위하여 일정량의 다양한 이온들을 세포액 혹은 세포기관이나 세포 외부에 함유하고 이들을 서로 이송 혹은 교환시킴으로서 토양내 이온 불균형에 대해 극복해 나가는 것으로 알려져 있다. 식물 액포는 이러한 다양한 이온들의 중요한 저장기관이다(Marty, 1999). 더욱이 액포로부터 cytosol로의 Ca^{2+} 이온의 이동은 다양한 생체신호전달과 밀접한 연관을 가진다(Allen 등, 1995; Sansers 등, 1999). 액포막에서의 이온 transporter, 특히 Ca^{2+} transporter는 세포질내에 존재하는 다양한 이온들의 농도조절 및 생체 신호전달 과정중이나 후 Ca^{2+} 이온의 cytosolic 수준을 조절하는 중요한 두 가지 기능을 가지게 된다.

토양내 칼슘시비를 통한 감자 구경내에 칼슘함량 증가는 현저한 수량증대와 수확 후 저장기간중 발생하는 부패나 갈색반점 등을 억제함으로써 저장성을 증가시킨다(Kleinhenz 등, 1999; Olsen 등, 1996). 뿐만 아니라, 세포막을 견고하게 함으로써 재배 기간중 저온내성을 증대시킨다(Vega 등, 2000). 그러나 토양내에 공급된 칼슘은 토양환경이나 재배조건 등에 따라 식물체가 항상 이용할 수 있는 것은 아니어서 시비만을 통하여 생산성 및 품질을 향상시킬 수 있는 것은 아니다.

따라서 본 연구에서는 이러한 문제점들에 착안하여 식물체내 액포막에서 Ca^{2+} 이온의 이송 및 축적에 관여함으로써 액포내 칼슘함량을 증가시키는 CAX(calcium exchanger) 관련 유전자를 이용한 칼슘강화 기능성 감자를 개발하기 위하여 1) CaMV35S 외에 cdc2a(cell division cycle) 및 patatinB33 프로모트에 대한 CAX1 유전자 발현양상을 조사함으로써 감자에서 CAX1 유전자 발현에 가장 적합한 특이 프로모트를 구명하고, 2) Ca 흡수량을 보다 증가시킬 수 있는 CAX2V 유전자의 형질전환 및 포장재배에서의 다양한 환경조건에 따른 이들 유전자의 안정성 검토 등

에 대한 연구를 수행하고자 한다. 이는 기능성이 강화된 고품질의 감자생산은 물론 소비만을 통하여 해결할 수 없었던 칼슘의 효과를 증대시킴으로서 농업생산성 향상에도 기여할 수 있을 것이다.

1. 기술적 측면

○ 식물체내에서 칼슘을 액포로 이송 저장하는 CAX관련 유전자를 이용한 감자의 형질전환 및 형질전환된 칼슘강화 기능성 감자의 포장재배시험을 통한 이들 유전자의 안정성검토 등이 체계적으로 이루어진다면 CAX관련 유전자의 개발 및 확보가 가능할 것이고, 이는 생체내 이용효율이 높으면서도 충분한 양의 칼슘을 손쉽게 공급받을 수 있는 기능성 식품 자원확보에 필요한 중요한 연구결과를 제공하게 될 것이다.

○ 또한, 본 연구결과는 우리나라에서 재배되는 다른 주요한 작물(배추, 고추, 참외 등)에서도 이들 유전자에 대한 농업형질로서의 이용 가능성을 제시하는 토대를 마련하게 될 것이다.

○ 식물은 biotic stress(병원균 및 해충), abiotic stress(온도, 수분, 중금속, 가스)들에 의해 체내에 다양한 pattern의 Ca^{2+} 농도를 증가 혹은 축적시킴으로서 이들 칼슘신호는 다시 새로운 신호전달물질인 reactive oxygen species(ROs), salicylic acid, nitric oxide, jasmonate, ethylene 등 다양한 2차 내지 3차 신호전달 물질들을 만들고 이들은 다시 MAP-kinase cascade를 포함한 다양한 하부 신호전달계를 통하여 수십여종의 생체방어 관련 유전자들(pathogenesis-related protein gene)의 발현을 증폭시켜 자체방어를 하게 된다. 따라서 생체내에서 Ca와 관련된 유전자에 대한 연구는 내재해성(내병성, 내충성, 내한성, 내염성, 중금속 저항성 등) 작물 개발을 위한 기초자료에도 유용하게 이용되어질 수 있을 것이다.

2. 경제·산업적 측면

○ 범위의 불분명함과 체계적인 자료 부족 등으로 기능성 식품의 시장 규모를 정확히 가늠하기는 어렵다. 그러나 Datamonitor의 자료에 따르면 1997년 현재 기능성 식품 시장 규모는 약 650억 달러에 이르는 것으로 추정되고 있으며, 연평균 10% 정도 성장하여 2006년에는 1,500억 달러를 넘어설 것으로 전망되고 있다.

○ 국가별로는 1997년 현재 미국이 약 232억 달러로 전체 시장의 36%를 차지하고

있으며, 유럽과 일본이 각각 199억 달러(31%)와 104억 달러(16%)로 그 뒤를 잇고 있는 것으로 나타났다. 즉 미국, 유럽, 일본이 세계 시장의 83%를 차지하고 있어 기능성 식품 시장은 산업화된 선진 국가를 중심으로 발달되어 있는 것을 알 수 있다.

○ 이러한 시장 분포는 각 국별 소득 수준이나 경제 성장 정도 등을 고려해 볼 때 당분간은 큰 변화 없이 유지될 것으로 보인다. 그러나 장기적으로는 경제 성장과 함께 아시아, 남미 등 지역에서 기능성 식품 시장의 성장이 두드러질 것으로 예측되는바 이에 대한 투자가 시급하다고 할 수 있다.

3. 사회·문화적 측면

○ 과거에는 식품이 가지고 있는 영양기능(1차기능)과 감각기능(2차기능)만을 생각하여 식품을 섭취했으나 최근 들어 식품의 생체조절기능이 밝혀지면서 식품의 3차기능에 관심이 집중되면서 생체조절기능을 효율적으로 발현할 수 있도록 개발된 기능성 작물에 대한 소비자의 관심이 높다. ○ 특히 칼슘과 관련하여 모든 가공식품에서 이미 칼슘을 첨가한 제품이나 아니냐의 문제를 떠나 얼마나 생체이용률이 높은 천연칼슘을, 그리고 영양적으로 우수한 칼슘을 첨가하였는가의 문제로 발전하였다. 또한 국민소득의 향상, 건강증진 식품에 대한 관심의 증가 및 젊은 세대들의 식습관 변화 등으로 식품 소비구조는 건강지향성과 편의성 위주로 전환되어 가고 있으므로 앞으로는 이에 대한 수요시장이 급증 할 것이므로 이를 충족시켜줄 수 있는 고품질의 농산물생산에 대한 연구와 투자가 필요하다.

제 2 절 연구개발 범위

칼슘함량이 증가된 감자는 그 영양적 가치와 수량성을 증가시킬 것이다. 따라서 본 연구개발의 궁극적 목표는 Ca²⁺ transporter의 발현을 통한 칼슘강화 기능성 감자 개발에 있다.

1. 연구개발 목표와 내용

가. 세부과제: CAX관련 유전자를 이용한 형질전환 감자개발

○ 35S, cdc2a 및 patatinB33 tuber 특이 프로모트 재조합 CAX1과 CAX2V 벡터 제작

- 형질전환 및 발현양상 구명
- 형질전환체의 유전분석 및 Ca 함량분석

나. 협동과제: CAX 유전자발현 감자의 포장안정성 검정

- CAX 발현 감자의 유지 및 대량 생산
- 포장에서의 CAX 발현 감자의 안정성 및 수량성 검토

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002)	<p>▷CAX관련 유전자를 이용한 형질전환 감자 개발</p> <p>▷CAX 유전자발현 감자의 포장안정성 검정</p>	<p>○ cdc2a 및 patatinB33 tuber 특이 프로모트 재조합 CAX1과 CAX2V 벡터를 이용한 형질전환</p> <ul style="list-style-type: none"> - vinary vector 제작; cdc2a::CAX1 및 patatinB33::CAX1 - 감자형질전환 ; 기내 6주된 감자(대지, 수미)의 엽절편 및 줄기조직을 이용하여 <i>Agrobacterium</i>과 2일간 cocultivation 후 Zeatin 2mg/L, IAA 0.3 mg/L와 kanamycin 100mg/L가 첨가된 MS 배지를 이용하여 재분화 유도 -형질전환 효율향상; 형질전환 효율향상을 위해 기내배양 6주된 감자(대지, 수미)의 엽절편 및 줄기조직을 이용하여 다양한 성장조절제를 조합하여 국내 품종에 적합한 분화배지개발 및 배양 조건을 구명 <p>○ CAX1 발현 감자의 유지 및 대량생산</p> <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환용 무병주 생산; 수미, 대지 - 35S::CAX1 발현 감자의 증식; 포장실험용 transgenic 및 untransgenic 개체별 400주를 생산 - 시설재배시험 <p>경북농업기술원 유리온실에서 35S::CAX1 발현 감자와 대조구를 재배하여 재배기간중 생리적 특성 및 수량성, Ca 함량(Feagley 등, 1994) 등을 조사 분석코자 함</p>

<p>3차 년도 (2004)</p>	<p>▷CAX관련 유전자를 이용한 형질전환 감자 개발</p> <p>▷CAX2V 유전자발현 감자의 포장안정성 검정</p>	<p>○ 현재개발중인 CAX4-H4 유전자의 형질전환; 국내 재배 감자 품종(수미, 대지)에 적합한 분화배지 및 배양조건을 이용하여 CAX4-H4 유전자의 형질전환</p> <p>○ 형질전환체의 유전분석</p> <ul style="list-style-type: none"> -Southern과 Northern 분석법에 의하여 35S::CAX2V, cdc2a::CAX2V 및 patatinB33::CAX2V 유전자가 형질전환된 개체 확인. -DNA분리; Paterson 등(1993)의 방법 이용 -Southern 분석; Sambrook 등(1988)의 방법 이용 -Northern 분석; Hirschi (1999)의 방법 이용 - 시설재배시험 <p>상주대학교 유리온실에서 이들 CAX2V 발현 감자와 대조구를 재배하여 재배기간중 생리적 특성 및 수량성, Ca 함량(Feagley 등, 1994) 등을 조사 분석</p> <p>○ CAX2V 발현 감자의 포장안정성 검정</p> <ul style="list-style-type: none"> - CAX2V 발현 무병주 생산; 수미, 대지 - CAX2V 발현 감자의 증식; 포장실험용 Transgenic 및 untransgenic 개체별 12,000주를 생산 - 포장시험 .지역별; 영양, 대구(3반복/반복당 200개체) .재배형태; 봄감자 재배형태에 준하여 토양내 Ca 시비수준별 CAX2V발현 감자와 대조구를 재배하여 재배기간중 생리적 특성 및 수량성 등을 조사 분석코자 함 - Ca 함량분석은 Feagley 등(1994)의 방법에 준하여 지역별, 반복당 함량을 조사 - 통계처리; LSD 5%와 1% 수준에서 통계처리 함 - 년차별 CAX발현감자의 포장재배에서의 유전자 발현정도 및 안정성 검토
-------------------------	--	---

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 기술개발 현황

○ 국 외

토양내 이온 불균형은 식물에 심한 스트레스를 제공하게 된다. 따라서 식물은 이들 이온 불균형에 대해 적응하기 위하여 일정량의 다양한 이온들을 세포액 혹은 세포기관이나 세포 외부에 함유하고 이들을 서로 이송 혹은 교환시킴으로서 토양내 이온 불균형에 대해 극복해 나가는 것으로 알려져 있다. 식물 액포는 이러한 다양한 이온들의 중요한 저장기관이다(Marty, 1999). 더욱이 액포로부터 cytosol 로의 Ca^{2+} 이온의 이동은 다양한 생체신호전달과 밀접한 연관을 가진다(Allen 등, 1995; Sansers 등, 1999). 액포막에서의 이온 transporter, 특히 Ca^{2+} transporter 는 세포질내 다양한 이온들의 농도 조절 및 생체 신호전달 과정중이나 후 Ca^{2+} 이온의 cytosolic 수준을 조절하는 중요한 두 가지 기능을 가지게 된다.

*Arabidopsis*에서 분리된 CAX1(cation exchanger 1) 유전자에 의해 생체내에서 Ca^{2+}/H^{+} antiporter의 활성이 촉진됨으로서 액포내 칼슘이 축적된다. 이들 관련 유전자가 도입된 담배에서 Ca의 축적이 형질전환되지 않은 식물체에 비해 뿌리에서는 2배, 엽조직에서 30%이상 높아진다고 하였다(Hirsch, 1999). 더우기 CAX1 유전자가 발현된 토마토 과실과 당근뿌리에서도 각각 정상식물체 비해 150%와 60%의 칼슘증가가 확인되었다(Park 등, in press). 또한 GFP(green fluorescent protein)와 CAX 합성유전자의 발현에 의해서 외부의 Ca 이온이 식물체내 액포로 이송·저장됨을 확인하였다(Ueoka-Nakanish 등, 2000). 최근 CAX 관련 유전자들이 계속 clone되면서(Shigaki and Hirchi, 2000), CAX2V 유전자의 발현은 식물체의 액포내에 카드뮴과 망간의 축적을 유발하고, 분리된 액포에서 증가된 카드뮴과 망간의 이송을 초래함으로써 이들 transporter 단백질들이 망간에 대한 저항성에 관련이 있음이 밝혔다. 보다 최근에는 *Arabidopsis*에는 9개의 다른 CAX1과 CAX2V관련 유전자가 존재함이 밝혀졌고(Maser 등, 2001), 이들 CAX 변이 cDNA유전자들이 CAX1보다 칼슘의 이송에 보다 효과적으로 작용할 수 있도록 클론 되어져(Hirschi, 2001), 궁극적으로 식물체내에 존재하는 칼슘과 중금속 antiporter의 구조적인 결정요소를 함께 밝혀냄으로서 중금속의 흡수를 차단하고 Ca 만을 선택적으로 흡수하는 이들 유전자의 발현을 통하여 지속적으로 원하는

양의 칼슘을 식물체내의 액포에 안정하게 축적시킬 수 있음을 제시하고 있다.

○ 국 내

국내에서의 칼슘관련 유전자에 대한 연구는 아직 미미한 상태이다. 그러나 최근 국내에서도 식물체내 칼슘과 관련된 다양한 유전기구들의 존재여부를 확인하고 그 작용메카니즘을 구명하는 것에 대한 중요성을 인식하고 몇몇 연구팀에 의해 연구가 진행되고 있다. 특히 경상대학교 SRC 연구팀에서는 식물이 외부에서 병원균의 침입을 받으면 식물세포막에 존재하는 수용체에 의해 병원균 침입이 인지되고 그 수용체는 'G-단백질'이라는 특수 단백질을 매개체로 해서 면역체계가 작동하는 것이 아니라 '칼모듈린'이라 불리는 칼슘 결합 단백질에 의해 매개된다는 새로운 사실을 밝혔다.

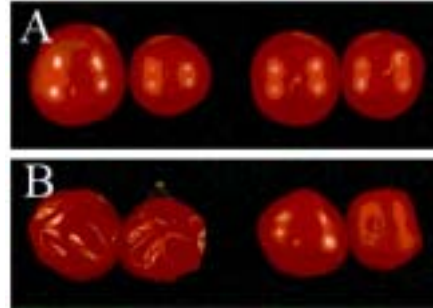


그림 1. (A) 수확직후 대조구(좌)와 CAX1 발현 토마토(우)의 과실상태. (B) 저장 40일후 대조구(좌)와 CAX1 발현 토마토(우)의 과실상태.

제 2 절 관련기술의 문제점

지금까지 기능성 칼슘강화 감자를 개발하기 위해서 미국 Texas A&M 대학교 VFIC팀과의 공동연구 과정 중 밝혀진 몇 가지 해결해야 할 문제점은 CAX1 발현 토마토의 경우 식물체내 칼슘축적을 통하여 과피의 경도를 탄력성 있게 유지시켜 수송과 운반은 손쉽게 함은 물론 저장기간을 연장(그림 1)시키는데 반해, 1) CAX 관련유전자 특히 CAX1 유전자가 발현된 담배 및 토마토의 잎과 과실에서 칼슘축적 외에 아연, 철, 구리 및 망간 등의 축적이 동시에 확인되고(Park 등, in press), 2) 35S::CAX1 유전자가 발현된 토마토의 경우 칼슘의 축적이 불안정한 환경요인 즉, 토양내 칼슘함량이 낮을 경우 세포질내에 있는 칼슘이 액포로 이동하여 정단부에 칼슘부족현상이 일어나는 등 재배환경요인에 매우 민감한 반응을 나타낸다는 것이다(그림 2).

따라서 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 이미 본 연구책임자가 연수 기간 중 형질전환에 성공한 35S::CAX1 발현 감자를 이용하여 1) 포장재배기간 중 환

경요인에 대한 CAX1 유전자의 발현정도, 토양내 칼슘 시비량에 따른 생육반응 및 체내 칼슘함량변화 등을 조사함으로써 감자에서도 토마토와 같은 발현양상을 나타내는지 를 구명하여 CAX1 유전자의 농업형질로서의 이용 안정성에 대한 연구를 수행함과 동 시에 2) CaMV35S 외에 cdc2a(cell division cycle) 및 patatinB33 프로모토에 대한 CAX1 유전자 발현양상을 조사함으로써 감자에서 CAX1유전자 발현에 가장 적합한 특 이 프로모트를 구명한다. 또한, Texas A&M 대학교 VIC의 Hirchi 박사팀으로부터 Ca 만 선택적으로 액포내로 이송·축적시킬 수 있는 CAX2V 유전자를 지속적으로 제공받 아 2) CaMV35S 외에 cdc2a(cell division cycle) 및 patatinB33 프로모트를 이용하여 CaMV35S::CAXV, cdc2a::CAX2V, patatinB33::CAX2V 등 3가지 벡터를 만들고 이를 국내 재배종 감자에 형질전환시킴으

로서 식용가능부위에 집중적으로 고 농도의 칼슘만을 축적시킬 수 있는 방안을 모색코자 한다. 앞서 언급한 바와 같이 국민소득의 향상, 건강증진 식품에 대한 관심의 증가에 따라 칼슘과 관련된 기능성 식품의 수요시장은 연평균 10% 정도 성장하여 2006년에는 1,500억 달러를 넘어설 것으로 전망되고 있으므로 이를 충족시켜줄 수 있는 고품질의 농산물 생산에 필

요한 연구투자는 시기 적절한 것이라 판단된다. 따라서 식물체내에서 칼슘

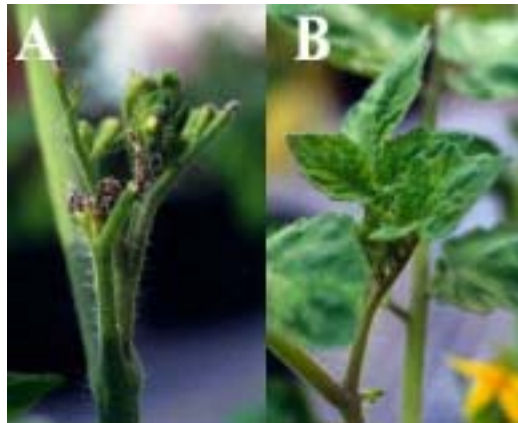


그림 2. 토양내 3개월간 칼슘공급이 없었 을 때의 CAX1 발현 토마토의 생육(A)과 칼슘공급이 주어졌을 때의 토마토 생육 (B).

을 액포에 저장하는 CAX(calcium exchanger)관련 유전자를 이용한 감자의 형질전환과 형질전환된 칼슘강화 기능성 감자의 포장재배시험을 통한 이들 유전자의 안정성검토 등이 체계적으로 이루어진다면 우수한 농업형질로서의 CAX관련 유전자의 개발 및 그 이용기술이 크게 향상될 것이며 이는 생체내에서 이용효율이 높으면서도 충분한 양의 칼슘을 손쉽게 다량으로 공급할 수 있는 기능성식품 자원의 확보차원에 필요한 중요한 연구결과를 제공하게 될 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 형질전환용 운반체 제작

사용된 기본적인 운반체는 CAX1 유전자를 포함하고 있는 pBluescript-KS와 *Agrobacterium* (strain LBA4404와 GV3101)이며 특히 프로모터인 *cdc2a* 프로모터는 미국 Texas A&M 대학의 Hirsch 박사팀으로부터, *patatinB33* 프로모터는 MAX-PLANCK -INSTITUT에서 각각 분양 받은 것을 사용하였다. pCAX-1은 35S 프로모터가, pBI-*cdc2a*-CAX1(=pK3-1)은 *cdc2a* 프로모터가 그리고 pCAXPtatin은 *patatinB33* 프로모터가 각각 삽입된 expression vector를 construction 하였다(그림 1-1, 1-2, 1-3). 또한, CAX2V와 CAX2B는 CAX1 coding region 중 B domain (ACCAATAACAAAGTCGCAGTGGTCAAATATTCG)과 C domain (ACTTCACTCTTCTGTGGAGGAATCGCTAAT) 부분의 mutants로 binary vector pBIN19 ("2489")의 *Xba*I-*Sac*I sites에 clone 되어졌다 (그림 1-4, 1-5).

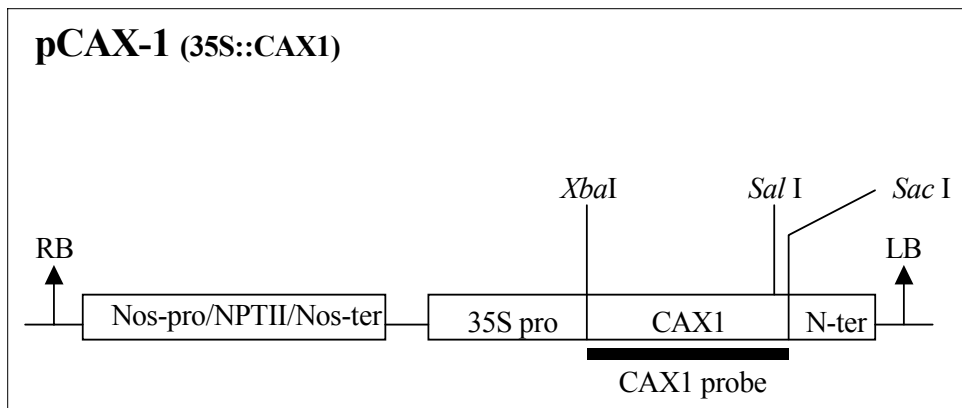


Figure 1-1. Restriction map of vector[pCAX1(35S::CAX1)] for CAX1 gene transformation in potatoes.

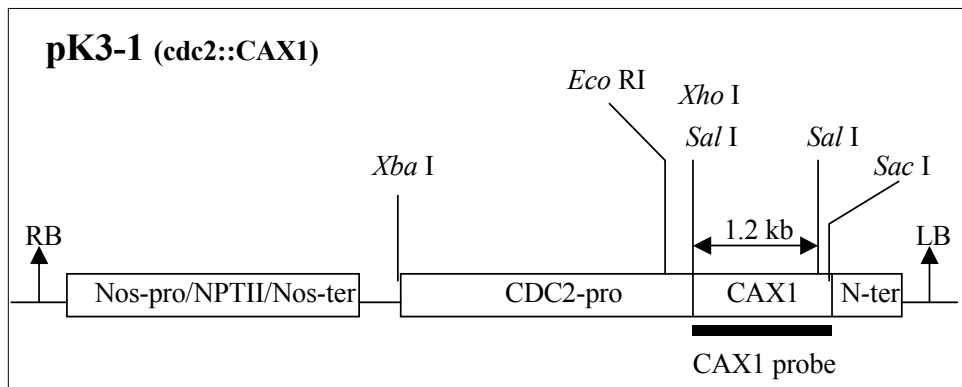


Figure 1-2. Restriction map of vector [pBI-cdc2a-CAX1(=pK3-1)] for CAX1 gene transformation in potatoes.

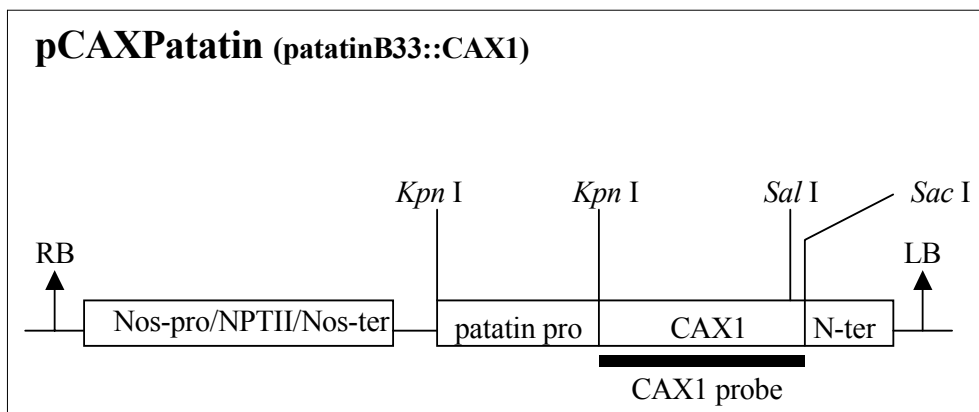


Figure 1-3. Restriction map of vector (pPatatin-CAX1) for CAX1 gene transformation in potatoes.

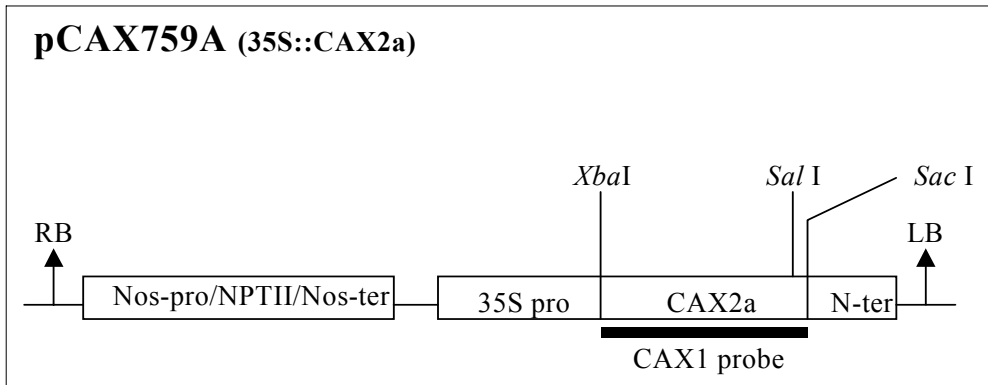


Figure 1-4. Restriction map of vector (pCAX759A) for CAX2a gene transformation in potatoes.

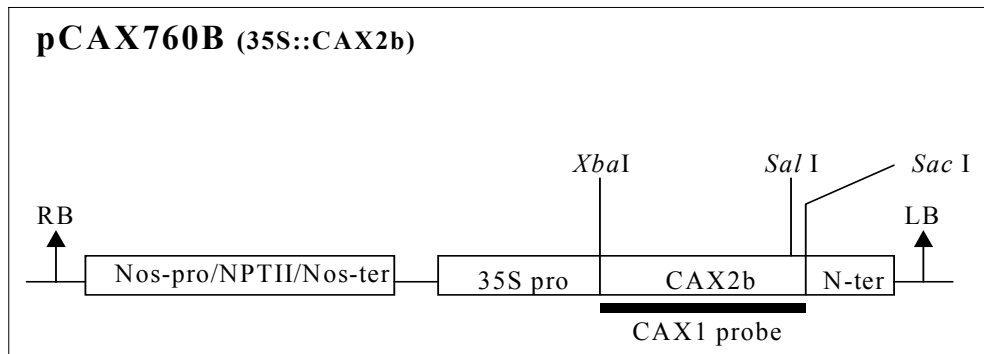


Figure 5. Restriction map of vector (pCAX760B) for CAX2b gene transformation in potatoes.

구축된 형질전환용 운반체의 pCAX-1 plasmid DNA를 분리하여 CAX1P1 (5'-cttgctgccattgttggtg) forward primer와 CAX1P2 (5'-gaaatttgtttcaacacat-3') reverse primer를 이용하여 PCR 증폭으로 확인한 결과 유전자의 삽입을 확인하였으며 (그림 1-6좌), cdc2a 프로모터 하류에 도입된 CAX1 유전자는 제한효소 *Sac* 과 *Xho* I

으로 절단하여 agarose gel 전기영동으로 확인하였다(그림 1-6우). PatatinB33 프로모터 하류에 도입된 CAX1과 CAX2유전자가 도입된 vector plasmid DNA로부터 DNA를 분리하여 PCR 증폭 및 제한효소로 절단하여 유전자가 정상적으로 삽입되었음을 확인하였다 (그림 1-7).

이렇게 구축된 vector는 *Agrobacterium* LBA 4404와 *Agrobacterium* GV3301에 freeze-thaw에 방법에 의해 형질전환하여 식물체의 형질전환용 strain을 제작하였다.

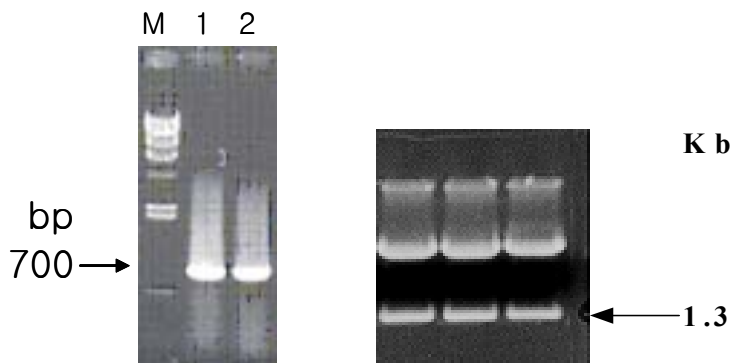


Figure 1-6. Identification of pCAX-1(left) and pK3-1(right). Lane 1 and 2 represent the PCR products with sense primer and antisense primer, Lane 3, 4 and 5 represent plasmid digested with *Sac* and *Xho* I.

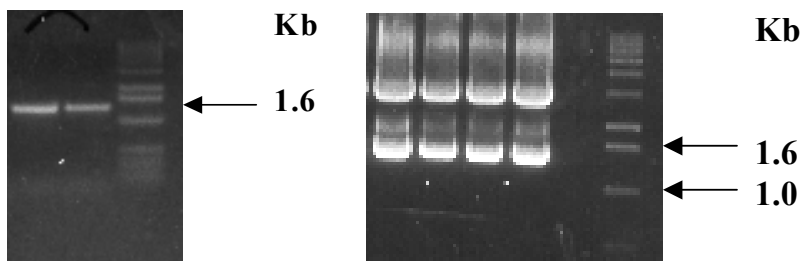


Figure 1-7. Identification of pCAXpatatin(left) and pCAX760B(right). Lane 1 and 2 represent the PCR products with sense primer and antisense primer, Lane 3,4,5 and 6 represent plasmid digested with *Sac* and *Xba* I.

제 2 절 특이 promoter에 따른 CAX1 유전자의 발현양상 구명

1. 재료 및 방법

가. 식물재료

마디배양을 통해 기내에 도입 및 증식한 감자(*Solanum tuberosum* L. cv Superior)의 신초를 계대배양한 4주 후 절간 조직을 채취하여 형질전환 재료로 사용하였다. 마디배양은 모본 감자에서 싹을 채취하여 10% sodium hypochlorite 용액에 10분간 멸균 처리한 다음 기내에 치상하였으며 무균 생장한 신초의 마디를 다시 채취하여 증식을 유도하였다. 배양조건은 MS(Murashige와 Skoog, 1962)배지에 sucrose를 3% 첨가하여 사용하였으며 배양조건은 16시간 일장, 광도 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 및 배양온도 25°C 를 유지하였다.

나. 형질전환 균주

Agrobacterium tumefaciens 균주는 pCaMV35S::sCAX1 유전자 또는 patatin::sCAX1 유전자가 삽입된 pBI121 벡터를 갖는 LBA4404를 사용하였다 (Hirschi, 1999). 감자의 절간조직과 공동배양하기 위하여 *A. tumefaciens* 는 kanamycin $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 가 첨가된 LB 고체배지(sodium hypochlorite 5 g/L, tryptone 5 g/L, bacto-yeast extract 10 g/L, bacto agar 1.5%)에 형성된 single colony를 취하여 kanamycin $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 가 첨가된 LB액체배지에 옮겨 28°C 에서 220 rpm으로 2일간 암 상태에서 진탕배양한 다음 공동배양에 사용하였다.

다. 형질전환 및 식물체 재분화

기내배양 4주 제인 절간조직을 사용하여 액아가 포함되지 않은 부위를 5 mm의 길이로 절단하여 *Agrobacterium* 균주(O.D.₆₀₀=0.6)와 10분간 접촉한 후 멸균 여과지로 흡습한 다음 절편을 항생제가 첨가되지 않은 공동배양배지(MS배지, zeatin $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA)에서 2일간 공동배양하고 carbenicillin $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 kanamycin $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 가 첨가된 공동배양배지와 동일조성의 MS배지로 옮겨 재분화를 유도하였

다. 재분화된 싌초는 kanamycin이 첨가된 선발배지(MS배지, zeatin $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ carbenicillin, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin)에 계대배양 후 왕성한 생육을 보이는 개체들만을 다시 선발하여 동일조성의 배지에서 증식시킨 다음 kanamycin $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 호르몬이 첨가되지 않은 MS고체배지에서 발근을 유도하였다. 발근된 개체들은 버미큘라이트와 펄라이트가 1:1 (v/v)로 혼합된 상토가 충전된 직경 10 cm 플라스틱 포트에 이식하여 온실에서 순화시켰다.

라. 형질전환체의 PCR 및 Southern 분석

감자 잎으로부터 total DNA의 분리는 Pterson 등(1993)의 방법을 다소 변형하여 수행하였다. 약 0.5 g의 어린 감자 엽 조직을 1.5 mL micro centrifuge tube에 넣고 -80°C 초저온 냉동고에서 동결시킨 다음 일회용 tissue grinder로 조직을 파쇄하였다. 이후 0.7 mL의 감자 DNA 추출용 완충용액[DNA exrtration buffer (0.35 M sorbitol, 0.1M Tris base, 5mM EDTA (pH 7.5): nuclei lysis buffer (0.2 M Tris base, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (w/v) CTAB: 5%(w/v) sarkosyl = 2.5 : 2.5 : 1)]을 가하여 잘 섞은 다음 65°C 수조에서 60분간 반응시켰다. 이후 0.7 mL의 chloroform : isoamyl alcohol (24:1)을 채워 vortex한 다음 10,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액의 투명한 부분을 2/3배의 isopropanol을 가하여 침전된 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA는 RNase를 처리하고 정량한 뒤 농도를 $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 로 맞춘 후 PCR 반응의 주형으로 이용하였다. 선발된 감자의 형질전환 여부를 확인하기 위하여 선발마커인 NPTII 유전자의 증폭을 위하여 primer (5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3')와 primer (5'-ATC GGGAGCGGCGATACCG TA-3')를 사용하였으며 CAX유전자의 증폭을 위해서는 primer (5'-GAATGTGACAGAGCTGATCA-3')와 primer (5'-GATCGAGGACCCAA TAGCCA-3')을 각각 사용하였다. PCR(Perkin Elmer Gene Amp PCR 7200) 조건은 95°C 에서 1분, 50°C 에서 1분, 72°C 에서 2분간 35회 실시하였다. 이후 1.2%(w/v) agarose gel에서 전기영동하고 사진으로 기록하였다.

Southern 분석은 Sambrook 등(1988)의 방법을 이용하였다. Genomic DNA를 각각의 제한효소로 절단한 다음, 0.8% agarose gel에서 전기영동하였다. Gel상의 DNA를 nylon membrane으로 transfer하기 위하여 vacuum transfer 장치에 멸균수로 적신 blotting paper와 membrane을 놓고, gel을 얹은 다음 기포를 제거하였다. 진공상태에서

gel 상에 depurination 용액(0.25M HCl)으로 10분간, transfer 하고(0.4M NaOH, 0.6M NaCl)으로 30분간 처리한 다음, membrane을 회수하여 2XSSC(0.3M NaCl, 30mM sodium citrate)에 1분간 세정하고 UV-crosslinker(UVP CL-1000, USA)를 이용하여 fixation을 실시하였다. Probe DNA의 방사능 표식을 위하여 multiprime labelling kit(Amersham, RPN1601)를 이용하였다. 10 μ l(25ng)의 template DNA를 5분간 끓인 후 다시 얼음에 5분간 정치하였다. 5 μ l의 5Xlabelling buffer, 2.5 μ l의 random primer/BSA 용액, 26.5 μ l의 nuclease-free water, 1 μ l의 Klenow enzyme 및 5 μ l의 [α -³²P]dCTP를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. Hybridization을 위하여 membrane당 10-15 μ l의 probe DNA를 5분간 끓여 변성시킨 다음, 얼음에 냉각하였다.

마. Northern 분석 및 RT-PCR

형질전환된 감자 괴경에서 total RNA를 Hirschi (1999)의 방법을 이용하여 분리하였다. Northern 분석은 15 μ g의 RNA를 1.2% formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane에 이동, 고정시켰다. Hybridization과 membrane의 세척은 기본적으로 Southern 분석과 동일한 방법(Paterson 등, 1993)으로 수행하였다. 또한, total RNA 500 ng을 template로 하여 RT-PCR을 수행하였다. Molony murine leukemia virus RNA dependent DNA polymerase(Mo-MLV RT, Promega Co., USA)를 이용하여 RT-PCR의 cDNA를 합성하였다. 합성조건은 10 mM DDT, 0.2 M dNTP, 2 nM random hexamer, 1/100 diluted RNA inhibitor, 4 unit/ μ L reverse transcriptase를 사용하여 위와 같은 조건에서 반응시켰다. PCR(Perkin Elmer Gene Amp PCR 7200) 반응 조건은 95°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분간 35회 실시하였다.

바. 형질전환 감자의 Ca함량 분석

유전분석 결과 형질전환이 확인된 감자를 3월에 온실에서 시설재배하였다. 퇴비를 10a 당 1,500 kg 경운전 전면살포하고 시비량은 N-P₂O₅-K₂O를 각각 10a당 10-10-10 kg 수준으로 사용하였으며 기타 재배법은 농촌진흥청 감자 표준 재배법에 준하였다. 식물체내 칼슘함량분석은 Feagley 등(1994)의 방법에 따라 실시하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 형질전환체 선발

sCAX1 유전자를 감자에 도입시키기 위하여 5mm 크기의 절간조직을 *A. tumefaciens* 균주와 2일간 공동배양 후 재분화 유도 및 선발을 위해 carbenicillin 500 mg · L⁻¹와 kanamycin 100 mg · L⁻¹가 첨가된 MS배지로 계대배양하였다. 배양 2주 후부터 절편체의 가장자리로부터 캘러스 형성이 관찰되기 시작하였으며 배양 8~9주 후부터 캘러스로부터 싹이 관찰되었다. 배양 14~17주 후에는 싹의 길이가 0.5~1 cm 크기로 성장하였다(Fig. 2-1A, 2-1B). 이들 싹은 하나씩 분리하여 선발제인 kanamycin만 첨가(50 mg · L⁻¹)되고 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지로 이식하여 발근을 유도하였다(Fig. 2-1C). 발근된 개체들은 포트에 이식하여 온실에서 순화하였다(Fig. 2-1D). 외래유전자의 도입에 의한 형질전환체의 표현형 이상은 관찰되지 않았다. 한편, pCaMV35S::*sCAX1* 형질전환에서는 320개의 절편체로부터 6.6%인 21개의 발근된 개체를, patatin::*sCAX1* 형질전환에서는 300개의 절편체로부터 11.7%인 35개의 발근된 개체를 각각 획득할 수 있었다(Table 2-1).

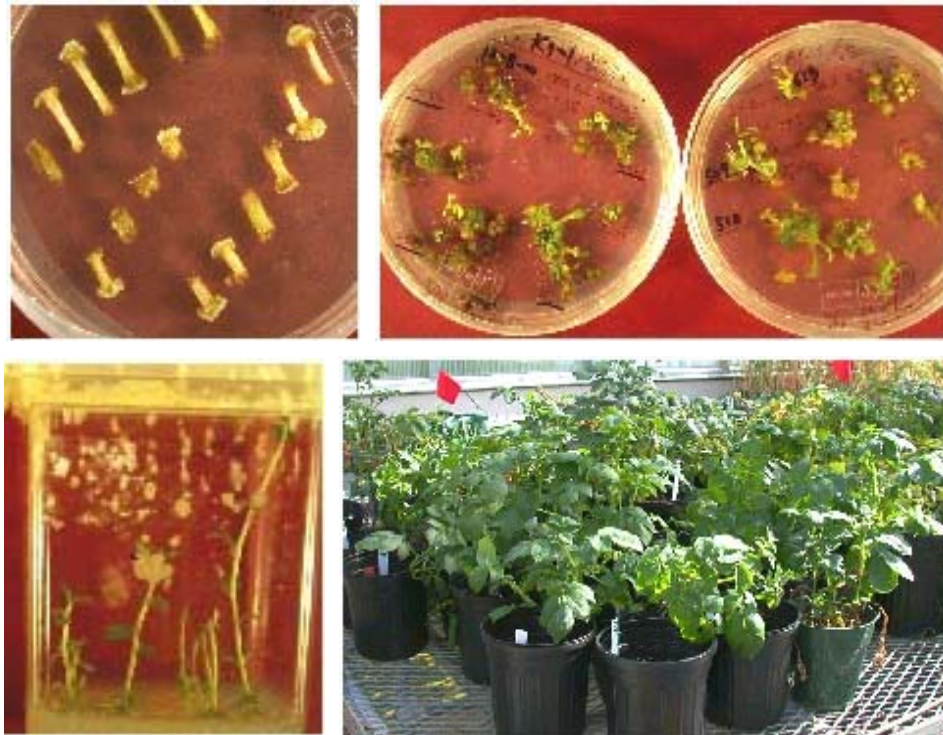


Figure 2-1. Shoot induction and plant regeneration from internodal explants of potato (*Solanum tuberosum* cv. Superior) transformed with *Agrobacterium* harboring pBI121-*sCAX1* fused vector. A and B, Shoot induction from internodal explants on MS medium containing $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zeatin, $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ carbenicillin, and $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin. C, Rooted explants on MS medium with $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin. D, Acclimatized putative transformants in greenhouse.

Table 2-1. Transformation frequency of potato cultivar Superior

Construct	No. of internodal explants used	No. of regenerated shoots (%; mean±S.E.)	No. of rooted shoots (%; mean±S.E.)	No. of acclimated plantlets in greenhouse (%; mean±S.E.)
CaMV35S::sCAX1	320	33 (10.3±2.5)	21 (6.6±1.3)	19 (5.9±0.9)
patatin::sCAX1	300	42 (14.0±3.2)	35 (11.7±2.1)	32 (10.7±1.9)

¹ Three transformation trials were conducted and standard deviation (S.E.) of means was calculated.

나. 형질전환체의 유전분석

항생제 배지에서 1차 선발한 각 벡터별로 재분화 개체들에서 DNA를 추출하여 NPTII 유전자의 PCR 검정을 수행하였다. 그 결과 35S 프로모터가 부착된 vector에서는 3개체에서, cdc2a와 patatin33b 프로모터가 부착된 vector에서도 각각 3개체들로부터 약 670 bp의 CAXI 유전자와 700bp의 NPT-II 유전자의 증폭을 확인하였다.

또한, CAX1 유전자가 식물체 genomic DNA에 안정적으로 삽입되어있는지를 확인하기 위하여 PCR 분석으로 확인된 특이 프로모터별 형질전환개체들을 대상으로 Southern blot 분석을 실시한 결과, CAX1 유전자가 안정적으로 도입되어있음을 확인하였다(그림 2-2).

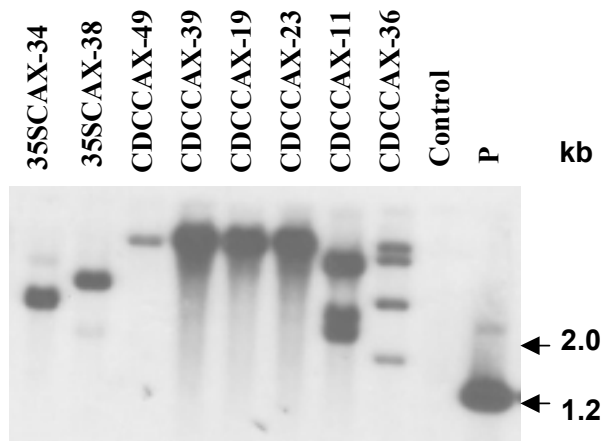


Figure 2-2. Southern blot analysis of transgenic potatoes. 10 μ g of potato genomic DNA was digested with Xba I (for transformation with p35S::CAX1) and with EcoRI (for transformation with pcdc2a::CAX1), and hybridized with the CAX1 cDNA probe. Lane SPVC, control potato, lanes SPCX-38 and 35, transgenic potatoes with p35S::CAX1, Lane APCX1-49, transgenic potatoes with pcdc2a::CAX1, P; positive control of CAX1.

다. Northern 분석 및 RT-PCR

Southern 분석결과, 식물체내의 염색체 내에 안정된 구조로 도입된 *sCAXI* 유전자가 식물체내에서 정상적으로 CaMV 35S promoter와 괴경 특이적인 patatin promoter에 의해 전사되는지 여부를 확인하기 위하여 형질전환체 중 copy 수가 1인 형질전환체의 괴경으로부터 total RNA를 추출하여 Northern 분석을 실시하였다(Fig. 2-2). 비형질전환 개체에서는 *sCAXI* 유전자 유래의 전사물이 검출되지 않은 반면, CaMV 35S promoter에 의해 형질전환된 식물체에서는 전사물의 강한 발현이 확인되었으며 괴경 특이적인 patatin promoter에 의해 형질전환된 개체에서는 *sCAXI* 유전자 유래의 전사물질이 거의 검출되지 않아 그림으로는 비형질전환개체와의 구별이 곤란하였다. 따라서 보다 정확하게 patatin promoter에 의한 *sCAXI* 유전자의 전사량을 조사하기 위하여 RT-PCR 분석을 실시한 결과(Fig. 2-3), Northern분석 결과에서와 같이 비형질전환 개체에서는 *sCAXI* 유전자의 전사물질이 검출되지 않았으며 Northern분석에서 전사여부를 확인하기 어려웠던 patatin promoter에 의한 *sCAXI* 유전자의 전사물질이 확인되어 발현량의 차이는 있으나 patatin promoter에 의해서도 *sCAXI* 유전자의 전사가 정상적으로 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. Patatin 단백질은 감자 괴경의 특이적인 저장 단백질의 하나로 전체 가용성 단백질 중 40%를 차지하는 중요한 물질로서 발현양상에서 유전자 발현까지 이미 많은 연구가 수행되어 왔으며, 잎이나 줄기, 뿌리 등 기타 조직에서도 발현은 되지만 그 양이 매우 적고 식물체의 배양조건에 따라 발현 정도가 달라지는 경향을 보인다. 이 단백질의 promoter는 괴경 특이적인 발현양상으로 인하여 유용유전자의 감자 괴경 내 발현을 유도하고자 할 때 주로 이용되어 왔으며 지금까지 patatin 프로모터를 이용하여 다양한 유용유전자를 감자에 도입한 후 성공적으로 발현됨을 확인하였다. Herman 등(1989)은 patatin promoter clone PS20에 *gus* 유전자의 coding region을 연결한 다음 형질전환을 수행하고 얻어진 형질전환체의 괴경 형성 전과 후의 GUS 발현율을 조사한 결과 괴경 형성 전 아주 약한 정도의 GUS발현과는 달리 괴경 형성 후에는 저장줄기와 괴경에서 강한 GUS 발현을 보였다고 하였다. 한편, Youm 등(2003)은 형질전환 감자 소괴경의 발달단계에 따른 patatin promoter-GUS유전자의 발현분석을 통하여 기내 소괴경의 발달단계에 따른 GUS 발현율의 차이가 CaMV 35S promoter에 비해 크다고 하였다. 아울러 patatin promoter에 의한 GUS 발현량은 소괴경 형성 후 5주째까지는 점점 증가하다가 그 이후

부터는 급격히 감소한다고 하여 patatin promoter가 기관특이적일 뿐만아니라 발달단계 특이적인 promoter임을 시사하였다.

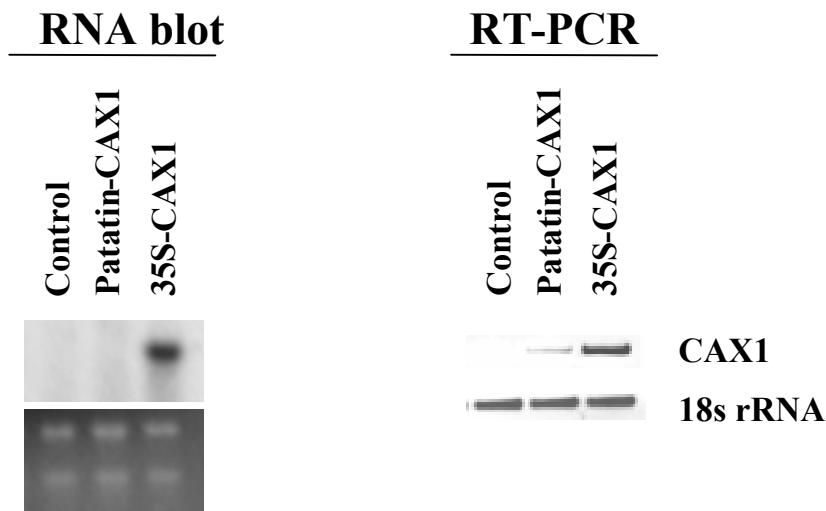


Figure 2-3. Northern blot (left) and RT-PCR (right) analyses of transgenic potatoes. Ten micrograms of total RNA from potato tubers were hybridized with the *sCAX1* cDNA probe. Ethidium bromide stained rRNA (bottom) is shown as a loading control. Control; non-transgenic potato; Patatin-CAX1, transgenic potatoes with patatin::*sCAX1*; 35S-CAX1, transgenic potatoes with pCaMV35S::*sCAX1*.

라. 형질전환체의 칼슘함량

형질전환 개체에서 형성된 괴경내 Ca 함량을 조사한 결과(Fig. 2-4), 비형질전환 개체와 patatin promoter-*sCAX1* 유전자가 도입된 형질전환개체 간에는 괴경내 Ca 함량 차이가 없었으나 CaMV 35S promoter-*sCAX1* 유전자가 도입된 개체에서는 형질전환되지 않은 개체에서 형성된 괴경에서의 Ca 함량이 보다 높은 것으로 나타났다. 이는 CaMV 35S promoter가 *sCAX1*의 발현을 강하게 유도한 결과라 판단되며 담배에서의 결과(Hirsch, 1999)와 일치하였다. 그러나 CaMV 35S promoter-*sCAX1* 유전자가 발현된 담배의 경우 칼슘의 축적이 불안정한 환경요인 즉, 토양내 칼슘함량이 낮을 경우 세포질내에 있는 칼슘이 액포로 이동하여 정단부에 칼슘부족현상이 일어나는 등 재배환경요인에 매우 민감한 반응을 나타낸다고도 하였다. 한편, Park 등(2004)은 당근에서 CaMV 35S promoter에 의해 조절되는 *sCAX1* 유전자가 Ca 함량을 증가시키는 물론 담배에서와 같은 칼슘부족현상은 관찰되지 않았다고 하여 동일유전자가 사용되었음에도 불구하고 CaMV 35S promoter의 발현 조절능력이 작물에 따라 다를 수 있음을 시사하였다. 특히 promoter에 의한 특정 유전자의 발현시기와 발현양을 조절한다는 것은 형질전환을 이용한 분자육종의 실용화를 위해 대단히 중요한 문제이다. 본 실험 결과, *Arabidopsis*에서 분리되고 조작된 *sCAX1* 유전자를 감자에 도입하여 형질전환된 감자의 괴경에서 칼슘량이 대조구에 비해 약 1.5배 증가함을 확인하였다. 그러나 patatin promoter에 의한 괴경내 조직특이적인 CAX유전자의 발현량의 증가는 확인하지 못하였다. 이는 괴경발달단계에 따른 차이에서 기인한것이라고 판단되나 금후 포장에서 다음세대의 괴경형성 단계별로 보다 체계적인 발현분석 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

또한, 재배기간중 식물체의 35S::CAX1 유전자가 발현된 감자에서는 토마토 (Park 등, submitted)의 경우와 마찬가지로 칼슘의 축적이 불안정한 환경요인 즉, 토양내 칼슘함량이 낮을 경우 세포질내에 있는 칼슘이 액포로 이동하여 정단부에 칼슘부족현상이 일어나는 등 재배환경요인에 매우 민감한 반응을 나타낸다는 것으로 나타났다. 그러나 *cdc2a*::CAX1 유전자가 발현된 감자에서는 이러한 현상을 거의 찾아볼 수 없었다 (그림 2-5).

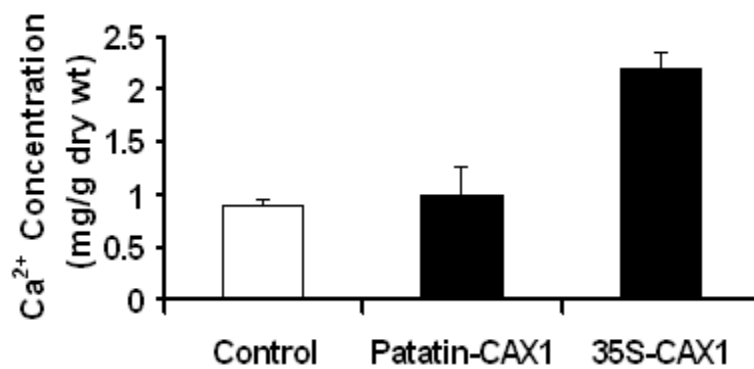


Figure 2-4. Total Ca content in tubers of transformed potatoes cultivar Superior. Patatin-CAX1, transgenic potatoes with *patatin::sCAX1*; 35S-CAX1, transgenic potatoes with *pCaMV35S::sCAX1*. Data are expressed as means \pm SD of five, single-tuber replications per line.



Figure 2-5. Morphology characteristic of the *sCAX1*-expressing primary plants

아울러, CAX1유전자 도입 및 발현이 확인된 감자 “Russet Norkotah”의 무름병 저항성 정도를 조사하기 위하여 De Boer와 Kelman (1975)의 방법을 변형하여 조사하였다. 무름병 균주는 Xu와 Gross(1986)의 방법에 준하였다. 그 결과, 형질전환 감자가 형질전환 되지 않은 감자에 비해 무름병에 대한 저항성이 높은 것(그림 2-6)으로 나타났는데 이는 일반적으로 포장재배시 칼슘시비량을 증가시킴으로서 품질과 저장성을 증가시켰다는 보고(Olsen 등, 1996, Vega 등 2000)와 일치하였다. 앞서 결과에서 형질전환된 감자에서의 칼슘함량이 대조구에 비해 증가되었음을 볼 때, CAX1유전자의 발현에 따른 괴경내 칼슘함량 증가가 무름병에 대한 저항성을 증가시켰던 것으로 판단된다.

Control

CAX1-expressing



그림 2-6. CAX1유전자 발현 감자 “Russet Norkotah”의 무름병 저항성 정도.
control;형질전환되지 않은 감자 괴경, CAX1-expressing; 형질전환된 감자 괴경.
무름병 균주를 표면 도포하여 20℃에서 4일간 저항 후 조사.

제 3 절 CAX 유전자를 이용한 형질전환 감자 국내 재배품종 개발 및 유전분석

1. 재료 및 방법

가. 식물재료

마디배양을 통해 기내에 도입 및 증식한 감자(*Solanum tuberosum* L.)의 신초를 계대배양한 4주 후 절간 조직을 채취하여 형질전환 재료로 사용하였다. 마디배양은 모본 감자에서 싹을 채취하여 10% sodium hypochlorite 용액에 10분간 멸균 처리한 다음 기내에 치상하였으며 무균 생장한 신초의 마디를 다시 채취하여 증식을 유도하였다. 배양조건은 MS(Murashige와 Skoog, 1962)배지에 sucrose를 3% 첨가하여 사용하였으며 배양조건은 16시간 일장, 광도 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 및 배양온도 25°C 를 유지하였다.

나. 형질전환 균주

Agrobacterium tumefaciens 균주는 pCaMV35S::sCAX1 유전자 또는 cdc2a::sCAX1 유전자가 삽입된 pBI121 벡터를 갖는 LBA4404를 사용하였다 (Hirschi, 1999; Figure 1). 감자의 절간조직과 공동배양하기 위하여 *A. tumefaciens* 는 kanamycin $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 가 첨가된 LB 고체배지(sodium hypochlorite 5 g/L, tryptone 5 g/L, bacto-yeast extract 10 g/L, bacto agar 1.5%)에 형성된 single colony를 취하여 kanamycin $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 가 첨가된 LB액체배지에 옮겨 28°C 에서 220 rpm으로 2일간 암상태에서 진탕배양한 다음 공동배양에 사용하였다.

다. 형질전환 및 식물체 재분화

기내배양 4주 제인 절간조직을 사용하여 액아가 포함되지 않은 부위를 5 mm의 길이로 절단하여 *Agrobacterium* 균주(O.D.₆₀₀=0.6)와 10분간 접촉한 후 멸균 여과지로 흡습한 다음 절편을 항생제가 첨가되지 않은 공동배양배지(MS배지, zeatin $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA)에서 2일간 공동배양하고 carbenicillin $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 kanamycin $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 가 첨가된 공동배양배지와 동일조성의 MS배지로 옮겨 재분화를 유도하였다. 재분화된 신초는 kanamycin이 첨가된 선발배지(MS배지, zeatin $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.3 m

$g \cdot L^{-1}$ IAA, $500 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ carbenicillin, $100 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ kanamycin)에 계대배양 후 왕성한 생육을 보이는 개체들만을 다시 선발하여 동일조성의 배지에서 증식시킨 다음 kanamycin $50 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 와 호르몬이 첨가되지 않은 MS고체배지에서 발근을 유도하였다. 발근된 개체들은 버미큘라이트와 펠라이트가 1:1 (v/v)로 혼합된 상토가 충전된 직경 10 cm 플라스틱 포트에 이식하여 온실에서 순화시켰다.

기내에서 6~8주된 감자 식물체의 잎과 절간조직을 이용하여 배지별로 plate 당 12~15절편의 조직을 치상하여 재분화율을 조사하였다. 품종간 신초형성율은 상당한 차이를 나타내었는데 줄기조직의 경우 '조풍'이 가장 높은 신초형성율을 나타내었으며 배지별로는 MS기본배지에 zeatin 2 mg/L와 NAA 0.1 mg/L가 첨가된 배지에서 가장 높았다 (표 1). 반면에 엽조직의 경우에는 대지품종에서 신초형성율이 가장 양호한 것으로 나타나 배양재료에 따른 신초형성율도 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다.

감자 형질전환시 식물체 재분화를 위하여 캘러스 유기배지와 신초형성 배지를 달리한 경우(two-step 방법; De Block, 1988; Visser, 1991)와 *Agrobacterium*과 공동배양후 동일배지에서 계속 계대배양하는 경우(one-step 방법; Rodriguez 등, 2000)를 비교 검토하였다.

라. Southern, Northern 분석 및 RT-PCR

감자 잎으로부터 total DNA의 분리는 Pterson 등(1993)의 방법을 다소 변형하여 수행하였다. 약 0.5 g의 어린 감자 엽 조직을 1.5 mL micro centrifuge tube에 넣고 -80°C 초저온 냉동고에서 동결시킨 다음 일회용 tissue grinder로 조직을 파쇄하였다. 이후 0.7 mL의 감자 DNA 추출용 완충용액[DNA extraction buffer (0.35 M sorbitol, 0.1M Tris base, 5mM EDTA (pH 7.5): nuclei lysis buffer (0.2 M Tris base, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (w/v) CTAB; 5%(w/v) sarkosyl = 2.5 : 2.5 : 1)]을 가하여 잘 섞은 다음 65°C 수조에서 60분간 반응시켰다. 이후 0.7 mL의 chloroform : isoamyl alcohol (24:1)을 채워 vortex한 다음 10,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액의 투명한 부분을 2/3배의 isopropanol을 가하여 침전된 DNA를 회수하였다. 형질전환된 감자 괴경에서 total RNA를 Hirschi (1999)의 방법을 이용하여 분리하였다. Northern 분석은 15 μg 의 RNA를 1.2% formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane에 이동, 고정시켰다. Hybridization과 membrane의 세척은 기본적으로

Southern 분석과 동일한 방법(Paterson 등, 1993)으로 수행하였다. 또한, total RNA 500 ng을 template로 하여 RT-PCR을 수행하였다. Molony murine leukemia virus RNA dependent DNA polymerase(Mo-MLV RT, Promega Co., USA)를 이용하여 RT-PCR의 cDNA를 합성하였다. 합성조건은 10 mM DDT, 0.2 M dNTP, 2 nM random hexamer, 1/100 diluted RNA inhibitor, 4 unit/ μ L reverse transcriptase를 사용하여 위와 같은 조건에서 반응시켰다. PCR(Perkin Elmer Gene Amp PCR 7200) 반응 조건은 95°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분간 35회 실시하였다.

마. 형질전환 감자의 Ca함량 분석

기내에서 증식 순화된 35S::CAX과 cdc::CAX1 유전자발현 감자의 재배기간중 생리적 특성, Ca 함량변화 및 수량성을 조사하였다. 유전분석 결과, 형질전환이 확인된 감자를 3월에 온실로 옮겨 시설재배하였다. 퇴비는 10a 당 1,500 kg 경운전 전면살포하고 시비량은 N-P₂O₅-K₂O를 각각 10a당 10-10-10 kg 수준으로 사용하였으며 기타 재배법은 농촌진흥청 감자 표준 재배법에 준하였다. 식물체내 칼슘함량분석은 Feagley 등(1994)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 형질전환 여부가 확인된 개체와 대조구에 대한 잎과 괴경의 Ca 함량조사를 위하여 수확후 4일간 70°C에서 건조된 각각의 건물중 0.25g을 Feagley 등(1994)의 방법에 준하여 digestion시킨 다음, ICP emission spectrophotometer(Spectro, Kleve, Germany)를 이용하여 total 칼슘함량을 측정하였다.

또한, 형질전환된 감자의 세대별 칼슘함량 및 수량성을 조사하기 위하여 괴경무게가 약 45g 내외인 것 만을 재료로 사용하였다. 제 3세대에서는 괴경중에 부위별 칼슘함량을 조사하기 위하여 괴경중심으로부터 바깥쪽으로 3부분으로 나누어 조사하였는데, 1) 외피와 피질부분, 2)중앙의 수분과 바깥사이의 중간부분 및 3)괴경중심의 수부분 등 3가지로 구분하여 각각의 칼슘함량을 조사하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 감자 형질전환 효율향상

기내에서 6~8주된 감자 식물체의 잎과 절간조직을 이용하여 배지별로 plate 당 1~15절편의 조직을 치상하여 재분화율을 조사하였다. 품종간 신초형성율은 상당한 차

이를 나타내었는데 줄기조직의 경우 '조종'이 가장 높은 신초형성율을 나타내었으며 배지별로는 MS기본배지에 zeatin 2 mg/L와 NAA 0.1 mg/L가 첨가된 배지에서 가장 높았다(표 3-1). 반면에 엽조직의 경우에는 대지품종에서 신초형성율이 가장 양호한 것으로 나타나 배양재료에 따른 신초형성율도 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다.

감자 형질전환시 식물체 재분화를 위하여 캘러스 유기배지와 신초형성 배지를 달리 한 경우(two-step 방법; De Block, 1988; Visser, 1991)와 *Agrobacterium*과 공동배양후 동일배지에서 계속 계대배양하는 경우(one-step 방법; Rodriguez 등, 2000)를 비교 검토하기 위하여 '대지' 품종의 엽조직을 이용하여 실험한 결과 one-step 방법이 two-step 방법에 비하여 재분화율이 증가하였다(표. 3-2).

국내 재배종 감자 '고구벨리'와 '쥬스벨리'의 재분화 조건을 구명하기 위하여 표 3-3과 같은 3가지의 배지를 사용하였다. 이들 배지의 기본은 MS배지(Murashige and Skoog, 1962)이며, 캘러스 형성 과정없이 직접 신초를 유기시키기 위하여 이용한 것으로 배양단계를 구분하지 않고 동일배지에서 연속적으로 4주마다 계대배양하였다. 기내에서 4주 동안 자란 감자 식물체에서 잘라낸 잎으로부터 1 cm² 크기의 조직을 잘라내어 사용하였으며 줄기는 결눈을 포함하지 않은 절간부위를 약 0.5 cm의 길이로 잘라 호르몬 조성을 달리한 배지에 각각 치상 한 다음 신초형성 정도를 조사하였다 (표 3-4). '고구벨리'와 '쥬스벨리' 품종 모두 절간조직이 엽조직에 비해 신초형성율이 양호하였으며 SI2번 배지에서 '쥬스벨리'의 절간조직이 약 52.8%의 신초형성율을 나타내어 가장 양호하였다. 또한, '고구벨리'의 경우 배지종류에 상관없이 엽조직에서는 신초형성이 이루어지지 않았으며 SI2번 배지에서 10%의 신초형성율을 나타내어 품종간 재분화율에 큰 차이를 나타내었다. 감자는 잎조직(De Block, 1988)이나 껍경(Sheerman과 Bevan, 1988) 혹은, 절간조직(Yi 등, 2003) 등을 재료로 이용하여 형질전환에 성공한 바 있으나 사용되는 조직에 따라 형질전환의 재현성과 효율 등이 다를 뿐만 아니라 품종에 따라서도 많은 차이를 보이고 있다. 본 연구에서도 사용한 유전자의 구성에 따라 형질전환율에 차이를 나타내었다.

Table 3-1. Shoot formation from in vitro grown leaf and inter-node explants of potatoes

Tissue	Plant growth regulator(mg/L)	Rates of shoot formation (%)		
		Superior	Desiree	Jopung
Inter node	Zeatin 1 + NAA 0.1	0	0	73.4
	Zeatin 2 + IAA 0.1	52.3	12.6	62.3
	Zeatin 2 + IAA 0.3	0	0	57.8
	Zeatin 2 + IAA 0.1 + GA 5	0	0	38.2
	BA 2.25 + NAA 0.2 + GA 10	0	0	40.5
Leaf	Zeatin 1 + NAA 0.1	0	23.2	0
	Zeatin 2 + IAA 0.1	14.2	35.7	0
	Zeatin 2 + IAA 0.3	0	12.1	4.5
	Zeatin 2 + IAA 0.1 + GA 5	0	0	0
	BA 2.25 + NAA 0.2 + GA 10	0	0	0

Table 3-2. Comparison of the shoot regeneration frequencies and percentage of kanamycin positive plants obtained with different transformation methods

Method	No. of inoculated explants	No. of explant with induced callus (%)	No. of explants with regenerated shoots (%)
One-step	320	78(24.4)	14 (17.9)
Two-step	300	14(4.7)	5 (35.7)

* Culture medium; MS basal medium with 2 mg/L zeatin, 0.1 mg/L IAA and 100 mg/L kanamycin

Table 3-3. Plant growth regulots composition of media for potato shoot regeneration

Medium	Plant growth regulators (mg/L)			
	Zeatin	BA	NAA	GA ₃
SI1	2	-	0.01	-
SI2	3	-	0.03	-
SI3	2.24	0.01	-	10

Table 3-4. Shoot formation efficiency of the leaf discs and internodal tissues.

Material	Variety	Shoot formation (%)		
		SI1	SI2	SI3
Leaf	Gogoo-valley	0	0	0
	Juice-valley	10.3	5.4	0
Inter-node	Gogoo-valley	0	10.0	6.3
	Juice-valley	45.8	52.8	15.0

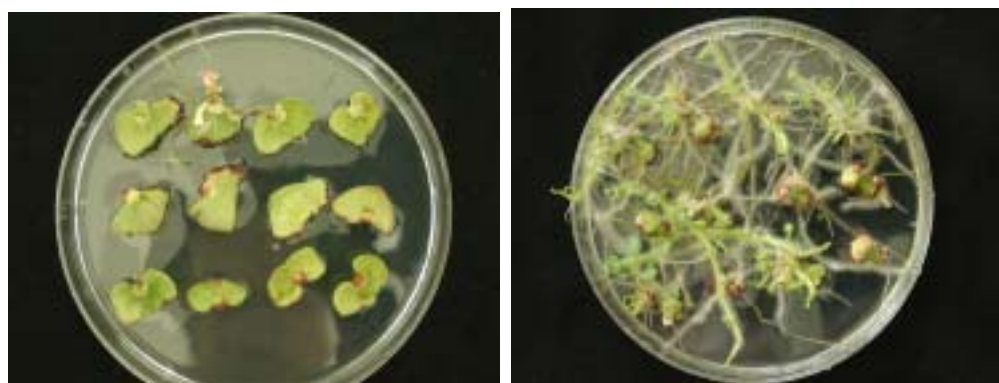


Figure 3-1. regenerated shoot from laef (left) and inter-node (right) of 'Juice-valley'

나. 국내 재배종 감자로의 CAX1유전자 형질전환 및 유전분석

35S::CAX1 및 cdc2a::CAX1 유전자를 국내 재배종 감자 '대지'에 형질전환 시키기 위하여 기내배양 4~6주 짜인 잎과 절간조직을 사용하여 잎은 5×5mm 크기로, 줄기는 액아가 포함되지 않은 절간부위를 5mm의 길이로 절단하여 *Agrobacterium* 균주 (O.D₆₀₀=0.6)와 10분간 공동배양 후 멸균지 위에서 건조된 절편들을 항생제가 첨가되지 않은 공동배양배지에서 2-3일간 배양한 다음 carbenicillin 500 mg/L와 kanamycin 100 mg/L가 첨가된 선발배지로 옮겨 재분화 개체를 유도하였다. 공동배양 2주 후부터 엽절편체의 가장자리로부터 캘러스 형성이 관찰되기 시작하여(그림 3-2A) 배양 8~9주 후부터 선발배지에서 아주 작은 크기의 신초가 관찰되기 시작하여 배양 14~17주 후에는 신초의 길이가 0.5~1 cm 크기로 성장하였다(그림 3-2B). 이들 신초는 항생제인 kanamycin만 첨가(100 mg/L)되고 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지로 하나씩 분리하여 이식하여 발근을 유도하였다(그림 3-2C). 완전히 성장한 개체에 대한 kanamycin (100 mg/L) 내성을 확인한 바 성장에 아무런 피해를 받지 않았음으로써 항생제 내성 유전자 (NPTII)의 도입에 따른 형질전환체의 1차 선발효과가 있었다(그림 3-2D).

국내 재배품종 '수미' 역시 동일한 방법을 이용하여 형질전환하여 얻은 개체에 대한 kanamycin (100 mg/L) 내성을 확인한 바, 성장에 아무런 피해를 받지 않았음으로써 항생제 내성유전자 (NPTII)의 도입에 따른 형질전환체의 1차 선발효과가 있었다(그림 3-3).

항생제 배지에서 1차 선발한 각 벡터별 형질전환 감자 '대지'와 '수미' 개체들에서 DNA를 추출하여 CAX1 유전자의 PCR 검정을 수행하였다. 그 결과 대부분의 형질전환 개체들에서 약 650 bp의 CAX1 유전자의 증폭을 확인하였다(그림 3-4).

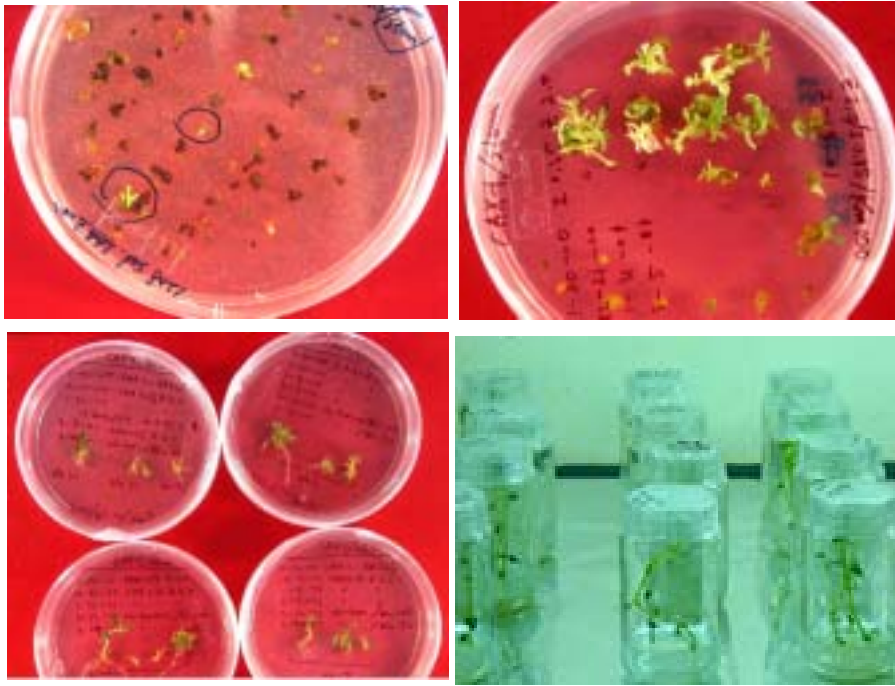


그림 3-2. pCAX-1 vector를 이용한 감자의 형질전환. A: *Agrobacterium*과 공동배양후 선발배지에서의 감자 줄기, B: 선발배지(MS + zeatin 2 mg/L + 0.3 mg/L IAA + cabenicillin 500 mg/L + kanamycin 100 mg/L)에서의 감자 절간조직 재분화. C: 재분화 개체로부터 발근유도, D: 기외이식된 감자.



그림 3-3. 재분화된 형질전환 감자 ‘수미’의 kanamycin (100mg/L)내성 검정. 좌;형질전환된 개체, 우:형질전환되지 않은 개체

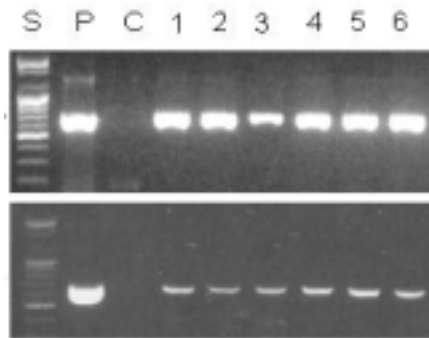


Figure 3-4. Genomic DNA PCR analysis of transgenic potatoes plants. M; size marker, NC; non-transgenic plant, PC; vector pCAX-1 as a positive control, Lane 1~6; transgenic potatoes with p35S::CAX1, C; non-transgenic potato, P; positive control of CAX1. above; potato cultivar desiree, bottom; potato cultivar superior

PCR분석으로 형질전환이 확인된 식물체를 벡터별로 3-4개체씩 무작위로 선발하여 *cdc2a*::CAX 벡터는 제한효소 *EcoRI*을, 35S::CAX1 벡터는 *XbaI*을 각각 처리한 다음 Southern 분석을 실시하였다. 그 결과 35S::CAX1 형질전환체는 1-3 copy, *cdc2a*::CAX 형질전환체는 1-2 copy가 도입되어있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3-5A). 그러나 형질 전환시키지 않은 대조구 식물체에서는 어떤 밴드도 나타나지 않았다. 이로써 다양한 copy의 외래유전자가 안정적으로 도입된 형질전환 감자 식물체를 개발하였으며, 이들 식물체 중 35S::CAX1이 도입된 식물체는 35SCAX식물체, *cdc2a*::CAX1이 도입된 식물체를 CDCCAX식물체로 명명하였다. 한편, 이들 벡터가 도입된 식물체에서 정상적으로 도입된 외래유전자의 전사가 일어나는지를 구명하기 위하여 Northern 분석한 결과, 모든 형질전환체에서 CAX유전자의 전사가 확인되었다(Fig. 3-5B). 따라서 이를 유전자의 세대별 유전적 안정성 및 칼슘함량을 지속적인 증가여부를 검정하기 위하여 copy 수가 1인 35SCAX 및 CDCCAX를 선발하여 세대별 칼슘함량증가 여부를 조사하였다.

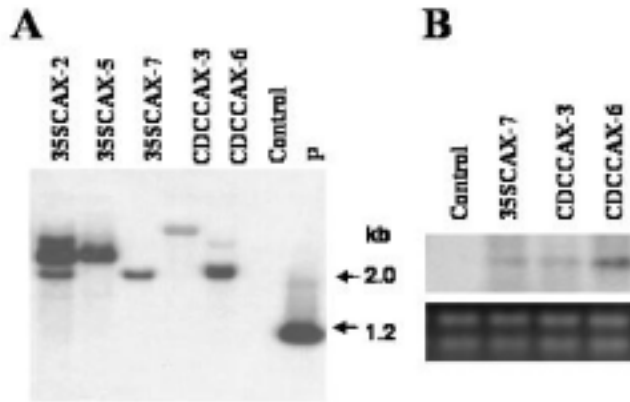


Figure 3-5. Molecular analyses of primary transgenic potato plants. A, Southern blot analysis of transgenic potatoes. Ten micrograms of potato genomic DNA were digested with *Xba* I (for 35SsCAX1) and with *Eco*R I (for CDCsCAX1), and hybridized with the sCAX1 cDNA probe. Lanes 35SsCAX1-2, -5 and -7, transgenic potatoes with pCaMV35S::sCAX1; lanes CDCsCAX1-3 and -6, transgenic potatoes with pcdc2A::sCAX1 lane Control, wild-type potato; lane P, positive control of sCAX1. B, Northern blot analysis of transgenic potatoes. Ten micrograms of total RNA from potato tubers were hybridized with the sCAX1 cDNA probe. Ethidium bromide stained rRNA (bottom) is shown as a loading control.

다. 형질전환 감자의 수량성 및 Ca함량 분석

CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체 모두 온실에서 재배과정중 대조구와 형태적 비교에서 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다. 가끔 일부 형질전환개체(10%미만)에서 잎이 약간 말려들어가는 형태적인 차이를 나타내었으나 이는 이미 담배 등(Hirsch, 1999)에서 보고된 바와 같이 심하지 않았다. 이러한 현상은 CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체 모두에서 관찰되었다. 수확 후 괴경의 생체중을 조사한 바, CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체 모두 대조구와 수량차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 3-6).

뿐만아니라 CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체간에도 그리고 동일백터의 형질전환 개체간에도 수량차이가 없었다. 토양내 칼슘시비를 통한 감자 구경내에 칼슘함량 증가는 현저한 수량증대와 수확 후 저장기간중 발생하는 부패나 갈색반점 등을 억제함으로써 저장성을 증가시킨다(Kleinhenz 등, 1999; Olsen 등, 1996). 뿐만 아니라, 세포막을 견고하게 함으로서 재배기간중 저온내성을 증대시킨다(Vega 등, 2000). 그러나 본 실험에서는 CAX1 유전자의 형질전환에 의한 수량증대 효과는 없는 것으로 나타났다.

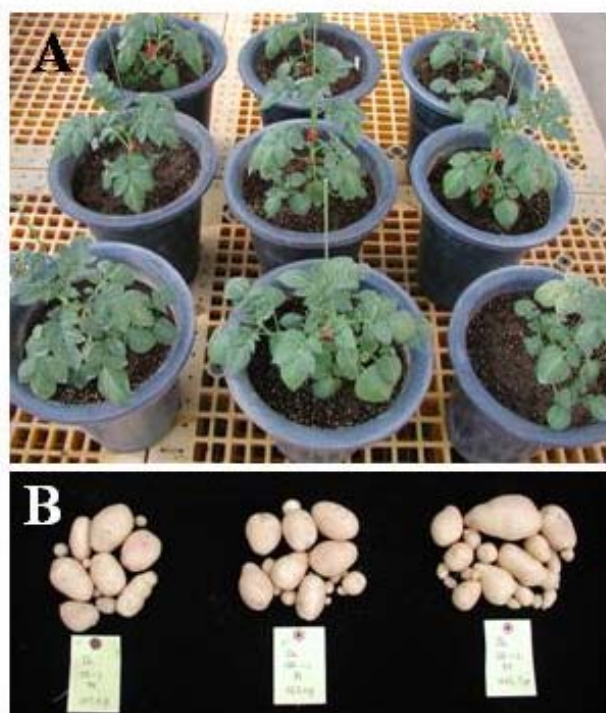


Fig. 3-6. A, Phenotype of transgenic potatoes with pCaMV35S::sCAX1(left), pcdc::sCAX1 (middle) and wild-type controls(right). B, The yield and size distribution of edible potato tubers from pCaMV35S::sCAX1(left), pcdc::sCAX1(middle) and wild-type controls(right).

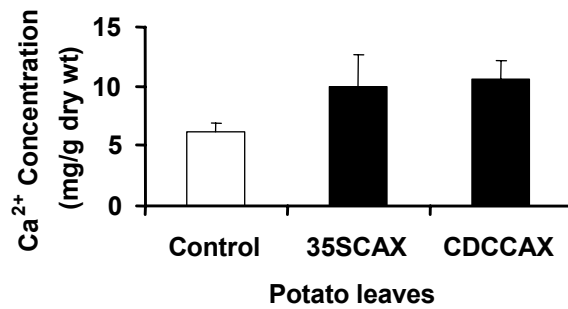
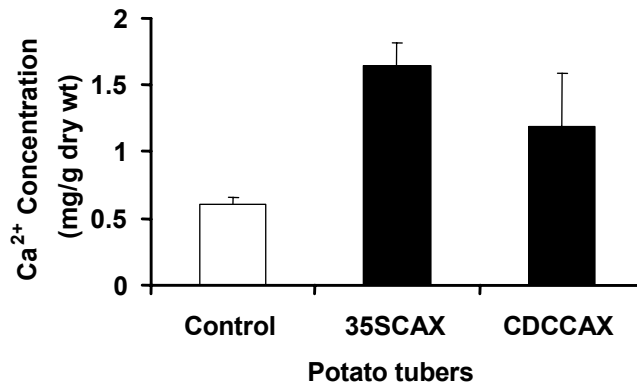
A**B**

Figure 3-7. Ca accumulation in transgenic *sCAX1*-expressing primary potato leaves and tubers. Total Ca content of potato leaves (A) and tubers (B) was determined by inductively coupled plasma emission spectrophotometer. Data are presented as means \pm SD of 8 35SCAX, 8 CDCCAX and 4 control lines (five individual replications per line).

또한, CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체의 세대별 칼슘함량을 조사하기 위하여 괴경무게가 약 45g 내외인 것만을 재료로 사용하여 재배하여 잎과 괴경에서의 total Ca 함량을 측정된 결과, 잎과 괴경에서 대조구에 비해 약 1.2-1.7배 및 1.5-3.0배의

칼슘이 증가되었음을 확인하였다(Fig. 3-7). 이는 담배(Hirsch, 1999) 및 당근(Park 등, 2004)에서와 같이 *Arabidopsis* Ca antiporter (CAX1)에 의해서 칼슘함량을 증가시킬수있는 것으로 확인되었다. 한편, 제 2세대에서도 CAX유전자가 정상적으로 전사하는지 조사하기 위하여 Northern 분석한 결과, CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체 모두에서 CAX유전자의 전사량이 확인되었으며(Fig. 3-8A), 수확된 괴경에서의 칼슘함량 역시 제 1세대에서와 같은 수준으로 축적되어 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 3-8B). 세대별 CAX유전자의 발현 및 이들 유전자가 정상적으로 감자 괴경내에 Ca 함량을 증가시키음을 확인한 다음, 제 3세대에서는 괴경내 어떤 부위에 Ca이 가장 많이 축적되는지를 확인하기 위하여 수확된 괴경의 중심부분으로부터 바깥쪽으로 3부분으로 나누어 조사하였는데, 1)외피와 피질부분, 2)중앙의 수분과 바깥사이의 중간부분 및 3)괴경중심의 수부분 등 3가지로 구분하여 각각의 칼슘함량을 조사하였다. 그 결과, CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체의 괴경 바깥쪽에서 안쪽으로 들어갈수록 Ca 함량이 줄어드는 경향이였으며 외피와 피질부분에 가장 많은 양의 Ca이 축적되어 있음을 확인하였다(Fig. 3-9).

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. 또한 식물체가 특정 스트레스 하에 놓였을 때 세포질내의 칼슘 농도는 일시적으로 증가함으로써 병원균 침입에 대한 식물의 저항성 증진에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 칼슘이 부족할 경우 식물은 생장이 억제되며 잎이 타거나 생장점이 죽기도 하며 잎의 색깔이 퇴화되기도 한다.

본 실험 결과, *Arabidopsis*에서 분리한 Ca antiporter, CAX 유전자를 이용하여 감자에서 대조구에 비해 잎과 괴경 모두에서 1.5-3.0배의 칼슘함량 증가를 확인하였을 뿐만 아니라 이들 유전자의 발현이 후대에서도 지속적으로 발현되어 매우 안정적으로 발현됨을 확인하였다. 이는 국내 감자 품종에서 Ca^{2+} 농도를 조절할 수 있는 분자유전학적 접근을 가능하게 할 것으로 판단 된다.

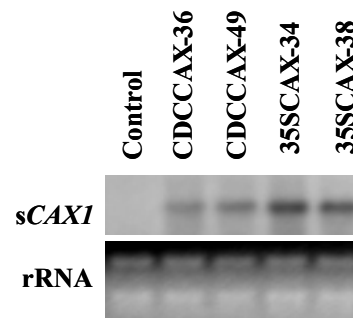
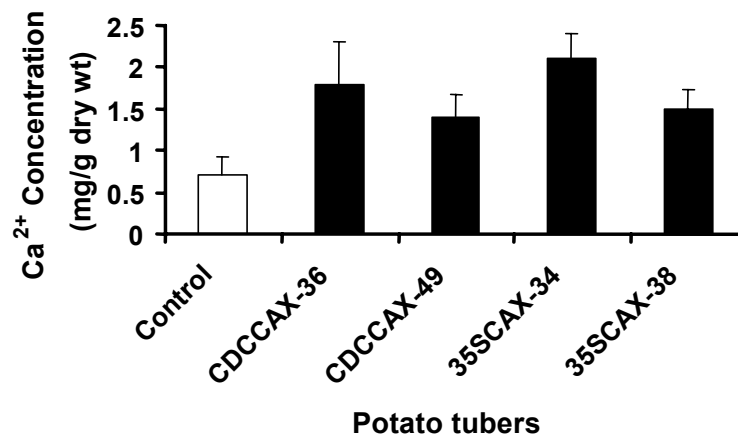
A**B**

Figure 3-8. Northern blot analysis and Ca accumulation in transgenic *sCAX1*-expressing second-generation potato tubers. (A) Northern blot analysis of transgenic potatoes. Ten micrograms of total RNA from potato tubers were hybridized with the *sCAX1*cDNA probe. Lane Control, wild-type potato; lanes CDCCAX-36 and -49, transgenic potatoes with *pcdc2A::sCAX1*; lanes 35SCAX-34 and -38, transgenic potatoes with *pCaMV35S::sCAX1*. Ethidium bromide stained rRNA (bottom) is shown as a loading control. (B) Ca accumulation in *sCAX1*-expressing second-generation potato tubers. Data are presented as the means \pm SD of five, single-tuber replications per line.

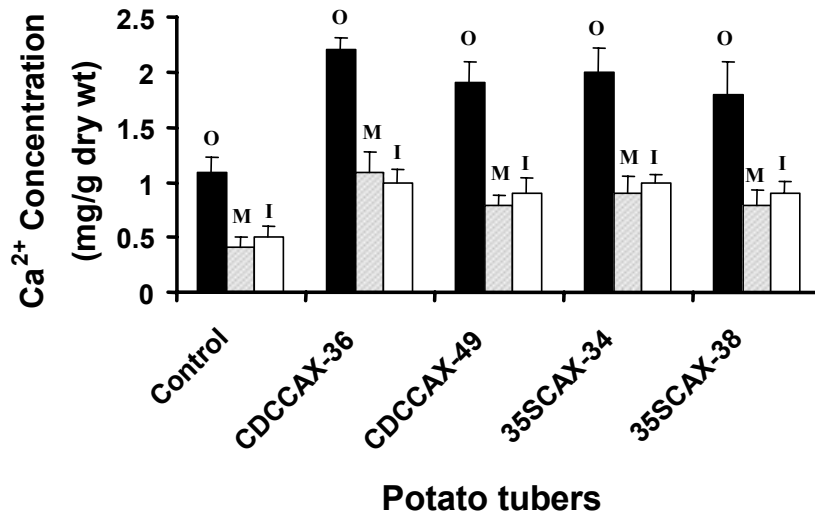


Figure 3-9. Ca distribution analysis of the third-generation tubers. (A) Potato longitudinal section. The tubers were bisected longitudinally and divided tubers into three tissue types; the periderm and cortical tissue region (O), the central pith region (I), and the middle region between the cortical tissue region and the central pith region (M). (B) Ca accumulation *sCAX1*-expressing third-generation potato tubers in all three tissue types. Data are presented as means \pm SD of five, single-tuber replications per line.

라. pCAX760B vector를 이용한 국내 재배종 감자 형질전환

CAX1 유전자에 비해 칼슘함량은 증가시키고 다른 양이온들의 흡수는 상대적으로 적게하는 CAX2V 유전자를 국내 재배종 감자 '대지'와 '수미'에 형질전환 시키기 위하여 기내배양 4~6주 짜인 잎과 절간조직을 사용하여 잎은 5×5mm 크기로, 줄기는 액아가 포함되지 않은 절간부위를 5mm의 길이로 절단하여 *Agrobacterium* 균주 (O.D₆₀₀=0.6)와 10분간 공동배양 후 멸균지 위에서 건조된 절편들을 항생제가 첨가되지 않은 공동배양배지에서 2-3일간 배양한 다음 carbenicillin 500 mg/L와 kanamycin 100 mg/L가 첨가된 선발배지로 옮겨 재분화 개체를 유도하였다. 공동배양 2주 후부터 엽절편체의 가장자리로부터 캘러스 형성이 관찰되기 시작하여 배양 8~9주 후부터 선발배지에서 아주 작은 크기의 신초가 관찰되기 시작하여 '대지'의 경우 배양 14~17주 후에는 신초의 길이가 0.5~1 cm 크기로 성장하였으며(그림 3-10A), 수미의 경우에는 다소 늦은 16~18주 후에 신초가 발생하였다 (그림 3-10B). 이들 신초는 항생제인 kanamycin만 첨가(100 mg/L)되고 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지로 하나씩 분리하여 이식하여 발근을 유도하였다(그림 3-10C). 또한, PCR 및 Southern 분석 결과 형질전환체로 확인된 개체들로부터 감자 소피경을 유도하기 위하여 2주일 가량 자란 줄기의 아래부분을 MS배지에 sucrose를 9% 첨가하고 18℃암상태에서 배양하여 감자 소피경을 형성시켰다 (그림 3-10D).

항생제 배지에서 1차 선발한 각 벡터별로 재분화 개체들에서 DNA를 추출하여 CAX2V 유전자의 PCR 검정을 수행하였다. 그 결과 '대지'와 '수미' 품종에서 각각 약 670 bp의 CAX2V 유전자의 증폭을 확인하였다(그림 3-11). 또한, CAX2V 유전자가 식물체 genomic DNA에 안정적으로 삽입되어있는지를 확인하기 위하여 PCR 분석으로 확인된 특이 프로모터별 형질전환개체들을 대상으로 Southern blot 분석을 실시한 결과, CAX2V 유전자가 안정적으로 도입되어 있음을 확인하였다(그림 3-12).

한편, 형질전환이 확인된 식물체는 순화 이식 후 식물체내 칼슘함량분석은 Feagley 등(1994)의 방법에 따라 재배기간중 시기별로 기관별 칼슘함량을 측정하고 재배기간중 형질전환되지 않은 감자와 달리 특이한 생육반응 나타내는지에 대하여 현재 분석중에 있다.

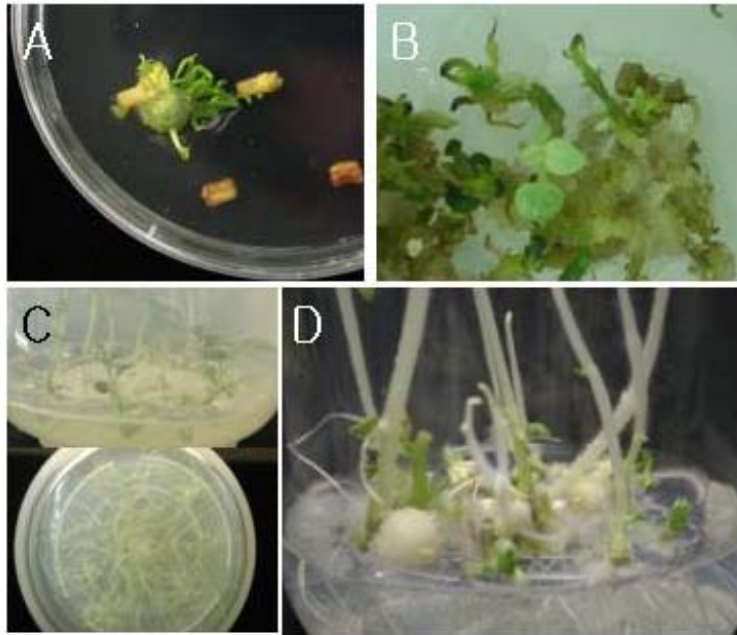


그림 3-10. pCAX760B vector를 이용한 감자의 형질전환. A: *Agrobacterium*과 공동배양후 선발배지에서의 감자 ‘대지’의 신초, B: 선발배지(MS + zeatin 2 mg/L + 0.3 mg/L IAA + cabenicillin 500 mg/L + kanamycin 100 mg/L)에서의 감자 ‘수미’의 재분화. C: 재분화 개체로부터 발근유도, D: 괴경이 형성된 형질전환 감자 ‘대지’.

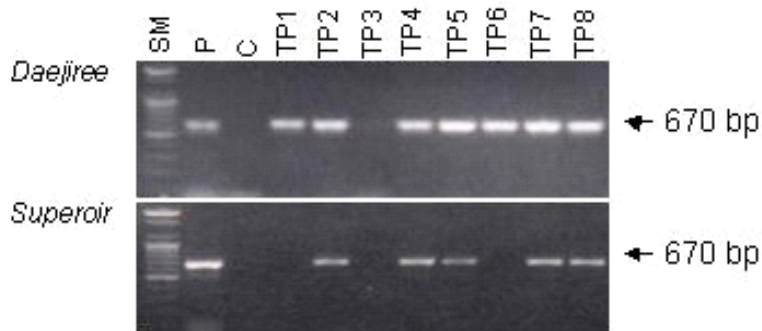


Figure 3-11. Genomic DNA PCR analysis of transgenic potatoes plants transformed with pCAX760B vector constructs. SM; size marker, P positive control C; non-transgenic plant, lane TP1~8; independent transgenic potatoes.

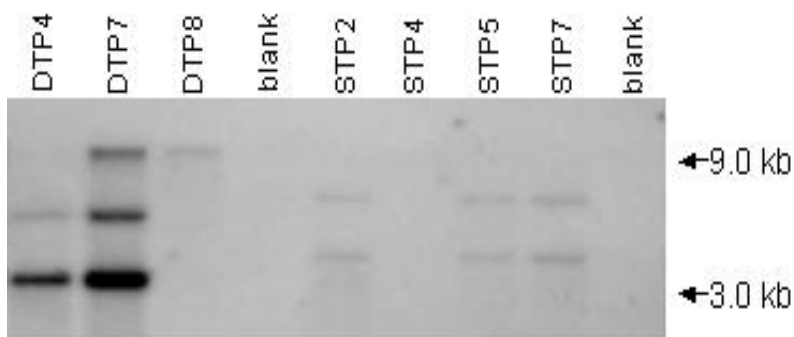


Figure 3-12. Southern blot analysis of transgenic potatoes. 10 μ g of potato genomic DNA was digested with Xba I and hybridized with the CAX2V cDNA probe. Lane DTP1-8, Transformed potatoes cultivar 'Daejiree', lanes STP1-7, transgenic potatoes cultivar 'Superior'.

제 1 세부과제인 'CAX관련 유전자를 이용한 형질전환 감자개발'의 연구결과를 종합하면 다음과 같다.

CAX1 유전자의 발현을 최적화 시키기 위하여 특이 프로모터별(cdc2a, patatin 및 35S) 형질전환 감자를 획득하여 CAX유전자의 도입은 PCR 및 Southern 분석을 통하여 이들 유전자가 식물체의 genomic DNA상에 안정적으로 도입되었음을 확인하였다. 또한, 특이 프로모터별 CAX 유전자의 전사 여부를 Northern분석으로 확인한 결과 cdc2a 및 35S 프로모터에서 CAX유전자가 전사됨을 확인하였다. 한편, patatin 특이프로모터의 경우 RT-PCR분석에서만 CAX 유전자의 전사물이 발현되는 것을 확인하였다. 또한, CaMV 35S promoter-*sCAX1* 및 cdc promoter-*sCAX1* 유전자가 도입된 형질전환 감자의 피경 내 Ca 함량은 대조구에 비해 증가하였으나 patatin promoter-*sCAX1* 유전자가 도입된 감자에서는 Ca 함량이 증가되지 않았다.

국내 재배품종 '대지' 및 '수미'에 형질전환 protocol을 작성하였으며, cdc::CAX 및 35S::CAX 벡터를 형질전환하여 PCR과 Southern 분석으로 이들 유전자의 도입여부를 확인하였다. 또한, Northern분석을 통하여 CAX유전자가 전사됨을 확인하였다. 형질전환이 확인된 식물체를 온실에서 재배하여 수확 후 피경의 생체중을 조사한 바, CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체 모두 대조구와 수량차이가 없는 것으로 나타났다. 그리고 CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체간, 동일벡터의 형질전환 개체간 수량 차이도 없었다.

CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체의 세대별 칼슘함량을 조사한 결과, 제 1세대의 형질전환 개체의 잎과 피경에서 total Ca 함량은 대조구에 비해 약 1.2-1.7배 및 1.5-3.0배의 칼슘이 증가되었음을 확인하였다. 제 2세대에서도 CAX유전자가 정상적으로 전사를 하는지 조사하기 위하여 Northern 분석한 결과, CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체 모두에서 CAX유전자의 전사량이 확인되었으며, 수확된 피경에서의 칼슘함량 역시 제 1세대에서와 같은 수준으로 축적되어 있는 것으로 확인되었다. 한편, 형질전환 3세대에서는 피경내 어떤 부위에 Ca이 가장 많이 축적되는지를 조사한 결과, CDCCAX 및 35SCAX형질전환 식물체의 피경 바깥쪽에서 안쪽으로 들어갈수록 Ca 함량이 줄어드는 경향이었으며 외피와 피질부분에 가장 많은 양의 Ca이 축적되어 있음을 확인하였다.

CAX유전자의 도입 및 발현이 확인된 형질전환 감자 품종 'Russet Norkotah'의 무

곰팡이 저항성 정도를 조사한 결과, 대조구에 비해 저항성 정도가 다소 증가함을 확인하였다.

감자 유전자전환 protocol

마디배양: 4(~6)주간, MS+sucrose 30 g/L+plant agar 8 g/L, pH 5.8



절편조제: 절간 (inter node)을 0.5~1 cm 길이로 절단



전배양 (pre-culture): 1일간, 절간 절편을 높혀서 배지위에 얹어줌

- ① 수미 (재분화배지): MS+sucrose 30 g/L+IAA 0.01 mg/L+zeatin 3 mg/L+ plant agar 8 g/L, pH 5.8
- ② 대지 (재분화배지): MS+sucrose 30 g/L+IAA 0.01 mg/L+zeatin 2 mg/L+ plant agar 8 g/L, pH 5.8
- ③ 대지 (캘루스유도배지): MS+sucrose 15 g/L+IAA 0.015 mg/L+BAP 2.25 mg/L+ plant agar 8 g/L, pH 5.8



공동배양 (co-culture): 3일간

<액체 배지 floating법> 균 현탁액 : 공동배양배지 = 1 : 10의 비율로 희석한 배지에 전배양한 절간 절편을 가라앉기 직전까지 띄워서 배양

<고체 배지 법> 균 현탁 원액에 10분간 침지 후 건조된 filter paper에서 절편을 blot dry 한 후 공동배양 배지에 치상하여 배양

- ① 수미 (재분화배지): MS+sucrose 30 g/L+IAA 0.01 mg/L+zeatin 3 mg/L (+plant agar 8g/L), pH 5.8
- ② 대지 (재분화배지): MS+sucrose 30 g/L+IAA 0.01 mg/L+zeatin 2 mg/L (+plant agar 8g/L), pH 5.8



유전자전환 신초 및 발근: 2주마다 계대배양하면서 육안으로 신초 발생시까지

- ① 수미 (재분화배지): MS+sucrose 30 g/L+IAA 0.01 mg/L+zeatin 3 mg/L+carbenicillin (cefotaxime) 500 mg/L+kanamycin 50 (~100) mg/L+plant agar 8g/L, pH 5.8
- ② 대지 (재분화배지): MS+sucrose 30 g/L+IAA 0.01 mg/L+zeatin 2 mg/L+carbenicillin (cefotaxime) 500 mg/L+kanamycin 50 (~100) mg/L+plant agar 8g/L, pH 5.8

※ **Schedule:** D-28일(마디배양) → D-3일(균배양 배지조제) → D-2일(전배양배지 조제, 균배양) → D-1일(절편조제, 전배양, 공동배양배지 조제) → D일(공동배양) → D+2일(선발배지 조제) → D+3일(선발배지 치상) → D+16일(선발배지 조제) → D+17일(선발배지 계대배양) → D+30일(선발배지 조제) → D+31일(선발배지 계대배양) → ... → D+X일(발근배지 이식)

제 4 절 CAX유전자의 포장 안정성 검정

1. 재료 및 방법

가. 형질전환감자의 기내증식 및 소피경 생산

CAX 유전자를 형질전환하여 유전자의 도입여부와 온실에서 그 수량이 증가됨을 확인한 형질전환체의 포장 안정성 검정을 위하여 기내 인공씨감자 생산시스템을 이용하였다. 인공씨감자를 생산하기 위하여 식물재료의 증식은 MS 무기염에 kinetin $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 고체배지에서 증식 배양한 multi-shoot를 shoot tip을 포함하여 3~4마디 정도로 잘라 2주일 동안 위와 동일한 조성의 액체배지에서 shoot를 비대시킨 후 인공씨감자 생산을 위한 재료로 사용하였다.

인공씨감자 생산에 사용된 배지는 MS 무기염에 CCC $250 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 sucrose $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가하였다. 액체배양에서 양성한 기내 shoot는 shoot tip과 잎을 제거하고 배지위에 가로로 놓혀 절반정도 배지에 묻히도록 치상하였고 $18 \pm 2^\circ \text{C}$ 의 암실에서 60일 동안 배양하여 인공씨감자를 생산하였다. 또한, CAX 유전자가 삽입되어 발현된 형질전환식물체의 인공씨감자 형성이 정상적인 감자식물체와 같은지 알아보기 위하여 배양기간별 인공씨감자 형성능을 정상식물체와 비교하고 형성된 괴경의 크기와 무게 등을 비교, 분석하였다. 대조구와 형질전환체 모두 배양 8주후에 인공씨감자를 수확하여 형성수와 생체중을 조사하였고 크기별로 대(150 mg 이상), 중($100 \sim 150 \text{ mg}$), 소(100 mg 이하)로 나누어 분포를 비교생산하였다. 생산한 인공씨감자는 $4,000 \text{ lux}$ 정도의 실내에서 녹화를 시키고 25°C 의 향온실에서 맹아시킨 후 본포에 파종하여 수량성 및 생육조사에 이용하였다.

나. 형질전환감자의 포장재배시 농업적 특성

본 시험은 주관연구기관인 상주대학교에서 형질전환으로 육성한 칼슘강화 감자와 형질전환 모품종인 '대지'와 '수미'를 대비품종으로 공시하였다. 생산된 인공씨감자 GM (Genetically Modified) 감자와 Non-GM 감자의 농업적 특성은 경북농업기술원(대구)과 상주대학교(상주)의 격리포장에서 조사하였다. 녹화가 끝난 기내 소피경은 직경이 3-4mm와 5-7mm인 크기로 구분하여 각각 300개씩을 온도 25°C , 광동 $4,000 \text{ lux}$ 정도의 향온실에서 맹아시키고 10일 후에 맹아율과 부패율을 조사하였다. 맹아율은 3mm 이상 자란 것을 맹아된 것으로 하였고 부패율은 쪼구라들거나 괴사한 기내 소피경을 전체

소피경에 대한 비율로 계산하였다. 맹아된 개체들만을 선별하여 육묘하우스에서 128공 플러그트레이에 공정육묘용 상토 TKS-2(Flora gard, Germany)를 사용하여 45일간 육묘하였다. 입모율은 2일간격으로 조사하였다. 정식은 4월 24일에 재식거리 45X30cm로 하여 투명 PE멀칭 후 망실재배하였다. Ca 함량조사를 위하여 형질전환개체와 대조구에 대한 잎과 괴경을 수확후 4일간 70℃에서 건조된 각각의 건물중 0.25g을 Feagley 등(1994)의 방법에 준하여 digestion시킨 다음, ICP emission spectrophotometer (Spectro, Kleve, Germany)를 이용하여 total 칼슘함량을 측정하였다.

이식전 시험포장에 퇴비를 10a 당 1,500kg 경운전 전면살포하고 시비량은 N-P₂O₅-K₂O를 각각 10a당 10-10-10 kg 수준으로 시용하고, 생육특성 조사 및 기타 재배법은 농촌진흥청 감자 표준 재배법에 준하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 형질전환감자의 기내 소피경 생산능력 검증

CAX유전자가 감자식물체의 genome에 정상적으로 삽입되어 안정적으로 발현하였다 할지라도 기내 소피경 형성 특성이 변하지 않고 그대로 유지되는지 알아보기 위하여 형질전환체와 대조구의 배양기간별 소피경 형성 정도를 조사하였다(그림 4-1). '대지' 및 '수미' 2품종 모두 형질전환체와 대조구인 정상식물체에서 배양기간이 지날수록 소피경 형성율이 높아졌으며 배양 5주까지는 소피경 형성이 활발히 진행되었으나 배양 6주후 부터는 소피경 형성율이 더 이상 높아지지 않았다. '대지' 품종의 경우 배양 4주까지는 형질전환체의 소피경 형성율이 대조구에 비하여 월등히 높았으나 배양 5주후부터는 오히려 대조구의 소피경 형성율이 약간 더 높았고 8주후에는 형질전환체와 대조구와의 차이점은 특별히 나타나지 않았다. 낮의 고온과 밤의 저온조건에서 초기 괴경유도가 활성화된다는 보고(Kim 등, 1992)와, 감자 시료의 마디 위치에 따른 소피경 형성시 오래된 기저부에서 소피경 개시가 빨리 나타난다는 사실에 근거해볼 때 '대지'의 괴경형성양상은 유전자 삽입에 의한 형질전환체의 특징이 나타나는 것이라기보다 감자줄기의 생리적 조건과 배양조건 때문인 것으로 사료된다. 더욱이 '대지'품종의 형질전환체에서 배양초기의 높은 소피경 형성율이 전배양기간동안 계속 높아지지 않고 배양후기에는 대조구와 비슷한 경향을 나타내는 것으로 보아 이러한 추측이 가능하였다.

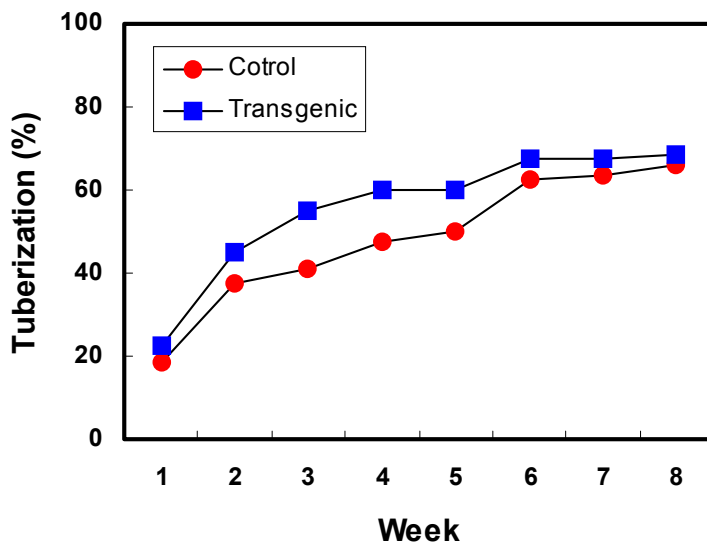
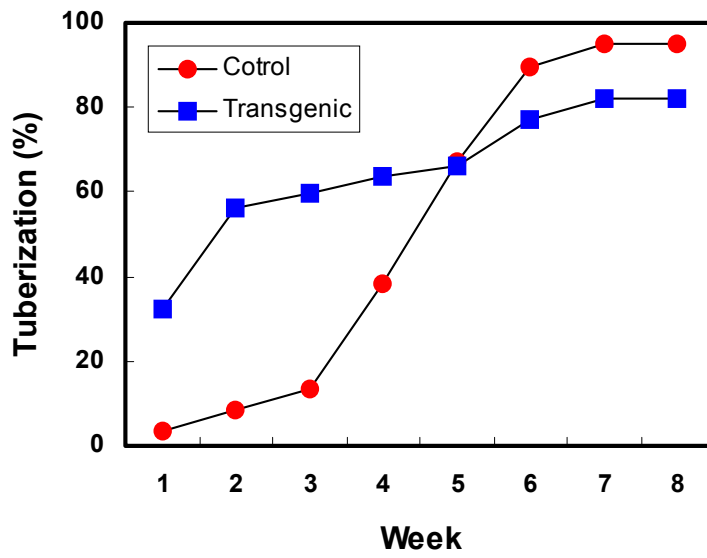


Figure 4-1. Comparison of in vitro tuberization between transgenic and non-transgenic potatoes of 2 cultivars. upper, 'Dejiree'; lower, 'superior'

‘수미’품종은 대조구와 형질전환체 모두 배양초기부터 8주까지 소괴경 형성율이 점차 증가하는 양상을 나타냈다. 이들 중 수미품종은 형질전환체와 정상식물체 모두 다른 품종에 비하여 배양초기의 소괴경 형성율은 높았다. 이것은 괴경형성을 위하여 배양기간 동안 낮과 밤의 배양온도를 23℃에서 17℃로 변온시켰을 때 수미품종의 소괴경이 배양 1주일 후부터 빠르게 형성되었다는 보고와 일치되었다(Kim 등, 1992). 이러한 특성이 정상식물체와 형질전환체에서 똑같이 나타나는 것으로 보아 형질전환체에서도 수미품종의 소괴경 형성과 관련된 특징이 그대로 유지되는 것으로 볼 수 있었다. 소괴경 형성 과정은 배양시 온도나 광도와 같은 환경적요인 뿐만 아니라 gibberellin과 cytokinin-likesubstance와 같은 내생 성장조절물질에 의해서도 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Chapman, 1958; Davis 등, 1986; Ewing, 1978).

배양 8주후에 형성된 인공씨감자를 모두 수확하여 대, 중, 소 크기별로 분류하여 조사한 결과(그림 4-2), ‘대지’ 품종의 형질전환체는 100mg 이하인 작은 크기의 인공씨감자 형성비율이 높았으며 ‘수미’품종에서는 100mg-150mg인 중간 크기의 인공씨감자의 형성비율이 높았다. ‘대지’ 품종의 형질전환체가 정상식물체보다 작은 크기의 인공씨감자 형성율이 높은 것은 8주 동안의 인공씨감자 형성율이 비슷한 것으로 보아 형질전환체의 특징이라기 보다 감자줄기의 배양조건 때문인 것으로 생각된다. ‘수미’품종은 ‘대지’ 품종에 비하여 200mg 이상의 큰 인공씨감자 형성비율이 높았는데 이처럼 인공씨감자의 크기가 크다는 것은 배지로부터 영양분 흡수와 인공씨감자 형성물질의 이동이 효과적으로 일어나는 것을 의미한다. 인공씨감자 형성과정중에 단일과 저온처리를 한 후 형성된 인공씨감자의 수와 크기를 조사했을 때 ‘수미’품종에서는 큰 크기의 인공씨감자가 가장 많이 형성된 반면 ‘대지’품종에서는 중간 크기의 인공씨감자가 가장 많이 형성된 것은 품종간의 대사효율 차이 때문이라고 판단된다.

이상의 결과를 종합해볼때 기내소괴경 형성율이 품종간 차이는 있지만 형질전환체와 정상식물체간에는 별다른 차이가 없었다.

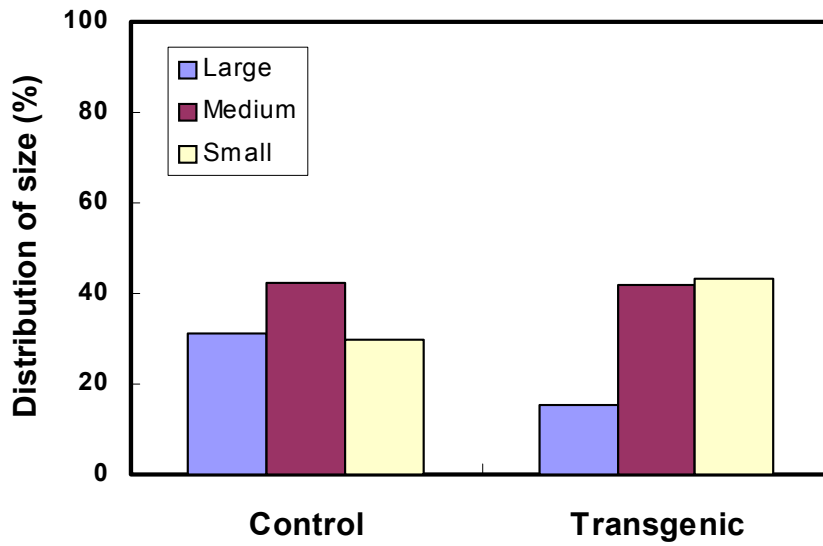
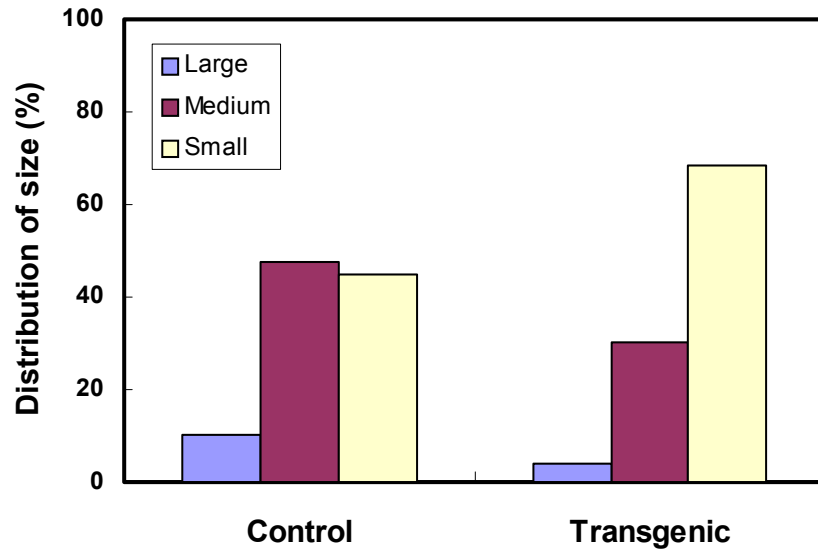


Figure 4-2. Distribution of size of harvested microtuber of transgenic and non-transgenic potatoes2 cultivars. upper, 'Dejiree'; lower, 'superior'. Large : >150mg, Medium : 100 - 150mg, Small : <100mg

나. 형질전환감자의 포장재배시 농업적 특성

제 1 세부과제에서 CAX유전자가 도입된 형질전환 감자를 획득하였고 기내선발과 온실재배를 거쳐서 CAX1유전자가 도입된 감자에서는 대조구에 비해 칼슘함량이 증가함을 확인하였다. 그러나 형질전환된 식물체의 경우 유용유전자가 계속적으로 발현되지 않고 그 다음 세대로 내려가면서 도입된 유전자 발현정도가 낮아지거나 안 되는 경우가 종종 발생한다(Jones 등, 1996). 영양번식작물인 감자의 경우는 감수분열의 단계를 거치지 않기 때문에 외부로부터 도입된 유전자의 안정성이 높다고 할 수 있겠지만 그 안정성이 어느 정도인지 포장재를 통하여 확인할 필요가 있다.

본 연구에서는 형질전환된 감자의 수가 제한적이었으므로 이미 형질전환이 확인된 line을 기내소괴경 생산시스템을 이용하여 대량증식 시킨 다음 멩아된 소괴경을 이용하여 포장에서의 생육기간 중 형태적 특성, 수량성을 검정하였다.

35SCAX형질전환체와 대조구의 멩아된 기내 소괴경의 파종 후 입모율을 조사한 결과 형질전환체와 대조구간 차이가 없었다. 그러나 형질전환체와 대조구 모두 소괴경 크기에 따른 입모율은 크기가 큰 쇄괴경이 작은것에 비하여 높았다.

Table 1. Comparison of seedling growth between transgenic and non-transgenic potatoes, 'Dejima'.

Microtuber diameter (mm)	Explant	Plant height (cm)	No. of leaves	No. of shoots
3~4	T	16.6b ^z	6.7	1.2
	N	17.5b	6.8	1.4
5~7	T	19.3a	7.5	1.2
	N	20.3a	7.4	1.3

Explants were transgenic (T) and non-transgenic potatoes (N).

^zMean separation by Duncan's multiple range test at 5% level.

기내 소피경의 크기별로 형질전환체와 대조구의 45일 육묘후 정식직전의 묘소질을 조사한 결과(Table 4-1) 기내 소피경의 크기가 크고 대조구가 형질전환체에 비해 초장, 엽수와 경경 모두 차이가 없었다. 또한, 정식 30일과 60일 후 형질전환체와 대조구간 생육특성을 조사한 결과(Table 4-2) 육묘후 묘소질에서와 같이 초장, 엽수 및 경수에 차이가 없었다. 다만 소피경 크기에 따른 생육차이는 괴경의 크기가 큰 것이 초장, 엽수 및 경경이 양호하였다.

Table 4-2. Comparison of the planting rate, plant height, number of shoots and diameter between transgenic and non-transgenic potatoes, 'Dejima' after transplanting

Microtuber diameter (mm)	Explant	Planting rate (%)	After 30 days			After 60 days		
			Plant height (cm)	No. of shoots	Shoot diameter (mm)	Plant height (cm)	No. of shoots	Shoot diameter (mm)
3-4	N	95.9	34.3b ^z	2.5	6.4	74.1ab	7.4	9.5
	T	97.2	36.8b	2.4	7.8	72.2ab	6.7	10.7
5-7	N	97.3	38.0a	2.3	7.0	84.2a	8.1	9.8
	T	95.9	37.5a	2.5	7.3	83.8a	7.5	10.6

Explants were transgenic (T) and non-transgenic potatoes (N).

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

아울러 수확 후 수량을 보면(Table 4-3) 1주당 총괴경 형성수, 형성된 감자크기별 괴경수 및 10a당 총 수량 모두 형질전환체와 대조구간 큰 차이를 보이지 않았으며 통계적 유의성도 없었다. 정식 후 60일까지의 생육은 소피경의 크기에 따른 차이는 인정된 반면 형질전환체와 대조구간 차이는 없었는데 비해 수확 후 수량에서는 소피경 크기별로도 차이가 나타나지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 보면CAX유전자의 도입으로 인한 대조구와 형질전환체간 생육차이가 인정되지 않아 지금까지 보고된 연구결과(Choi 등, 1997, Park 등, 2004)와 동일하였다. 소피경 크기에 따른 수량 차이가 나타나지 않

은 것은 플러그셀을 이용하여 육묘 후에 재배함으로써 입모율을 높이고 초기생육이 촉진되어 정식 후 감자 생산이 이루어졌기 때문인 것으로 판단된다.

Table 4-3. Comparison of the number of tubers and yield between transgenic and non-transgenic potatoes, 'Dejima'

Microtuber diameter (mm)	Expalnt	No. of tubers				Yield (kg/10a)			
		Below 50g	Above 50g(A)	Total (B)	A/B (%)	Below 50g	Above 50g(C)	Total (D)	C/D (%)
3-4	N	5.6	2.8	7.6	36.8	1,442.1	846.9	2,289.0ab	37.0
	T	5.3	3.5	8.8	39.8	1,419.0	946.0	2,365.0a	40.0
5-7	N	5.5	4.0	7.6	52.6	1,382.8	1,052.3	2,435.1a	43.2
	T	4.0	3.8	7.8	48.7	1,184.7	1,138.3	2,323.0ab	49.0

Explants were transgenic (T) and non-transgenic potatoes (N).

²Mean seperation by Duncan's multiple range test at 5% level.

한편, 최초로 제 1세부과제가 확보하고 있던 35S::CAX 및 cdc2a::CAX 벡터를 이용한 형질전환체 'Russet Norkotah' 감자의 세대별 칼슘함량 및 수량성을 조사하기 위하여 괴경무게가 약 45g 내외인 것 만을 재료로 사용하여 수확량을 조사한 결과, 형질전환체와 대조구 간에 수량 차이는 없는 것으로 나타났다(그림 4-3). 따라서, CAX1 유전자의 도입에 따른 수량증가 효과는 포장재배에서도 없는 것으로 인정되었다. 또한 이들 형질전환체에서 얻은 괴경으로부터 칼슘함량을 측정한 결과 35S::CAX 유전자가 도입된 감자와 cdc2a::CAX1 유전자가 도입된 감자 모두 CAX1 유전자가 형질전환되지 않은 감자에 비해 칼슘함량이 높았으며 cdc2a::CAX1 유전자가 도입된 감자는 35S::CAX1 유전자가 도입된 감자에 비해 칼슘함량이 높은 것으로 나타났다(그림 4-4).



그림 4-3. 35S::CAX1 유전자와 cdc2a::CAX1 유전자가 형질전환된 감자의 수량성비교
 좌; non-transgenic, 중앙; transgenic with 35S::CAX1, 우; transgenic with
 cdc2a::CAX1

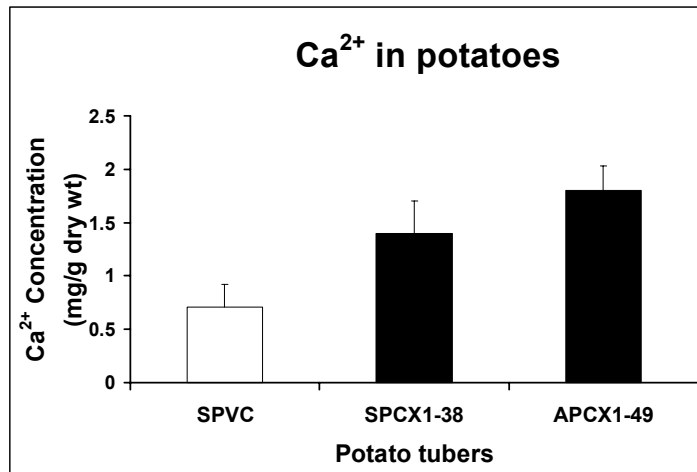


그림 4-4. 35S::CAX1 유전자와 cdc2a::CAX1 유전자가 형질전환된 감자의 칼슘함량비교
 SPVC; non-transgenic, SPCX1-38; transgenic with 35S::CAX1, APCX1-49;
 transgenic with cdc2a::CAX1.

또한, 35S::CAX1과 cdc2a::CAX1 유전자의 도입이 확인된 감자는 MS 무기염에 kinetin 0.5 mg/L 와 sucrose 30 g/L를 첨가한 고체배지에서 증식하고 증식된 multi-shoot는

shoot tip을 포함하여 0.5~1.0 cm의 크기로 잘라 2주일 동안 60 rpm으로 액체 진탕배양하여 shoot를 비대시킨 다음 소과경 형성을 위한 재료로 사용하였다. 소과경은 MS에 CCC 500 mg/L, sucrose 80 g/L를 첨가한 배지에 액아가 2~3개 부착된 shoot(3~4cm)를 shoot tip과 잎을 제거하고 수평으로 치상하여 18±2℃가 유지되는 암 배양실에서 60일 동안 배양하여 생산하였다. 암상태에서 형성된 소과경은 20일 동안 2,000lux 정도의 광조건에서 녹화시킨 후 기외로 수확할 수 있었다 (그림 4-5).



그림 4-5. 35S::CAX1 유전자가 도입된 감자로부터 기내 소과경 생산시스템을 이용해 기외 수확된 소과경

형질전환하여 1차로 생산된 소과경을 이용하여 생육특성과 수량성을 조사한 T0V2의 ‘대지’ 품종을 이용하여 제 2세대 포장재배에서의 35S::CAX1 유전자의 유전자 발현 안정성을 검정하기 위하여 추작재배하여 생육을 조사한 결과, 35S::CAX1, 유전자의 도입이 확인된 감자와 대조구 간에 수량 차이는 없는 것으로 나타났다(표 4-4, 그림 4-6). 따라서 시설재배에서와 같이 CAX1 유전자의 도입에 따른 수량증가 효과는 없었다. 또한, :CAX1 유전자가 도입된 형질전환 감자의 부위별 칼슘함량을 측정한 결과, 괴경내 칼슘함량은 바깥쪽이 안쪽에 비해 그리고 형질전환된 감자에서 형성된 소과경이 형질전환되지 않은 대조구 T0V2 세대의 괴경에 비해 높은 것으로 나타났다 (그림 4-7).

표. 4-4. 포장재배시 형질전환 감자 ‘대지’의 수량성

품 종	정식일(월.일)	개화일(월.일)	초장(cm)	중서생산량(g/주)
대지(씨감자)	4.17	6. 4	72.0	475.4
대지(35S::CAX1)	4.17	6. 4	64.5	477.9



그림 4-6. 포장재배시 형질전환되지 않은 감자 ‘대지’(A)와 형질전환된 감자 (B)의 생육상태. 수확된 대조구(C) 및 형질전환 감자 괴경(D).

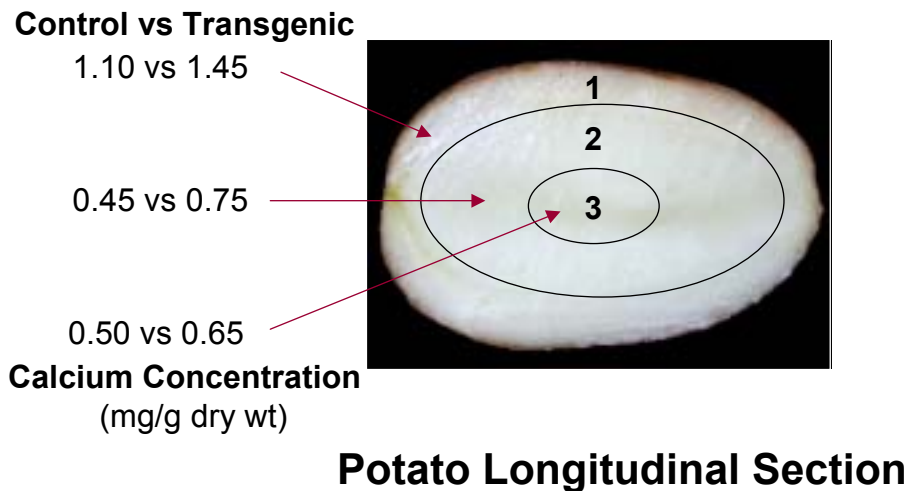


그림 4-7. CAX1 유전자가 형질전환된감자 T0V2 세대의 부위별 칼슘함량비교

협동과제인 ‘CAX 유전자발현 감자의 포장안정성 검증’의 연구결과를 종합하면 다음과 같다.

세부과제에서 형질전환에 이용할 ‘수미’와 ‘대지’ 품종은 기내에서 계속 유지, 증식시켜 형질전환용 재료로 공급하였으며, CAX유전자의 도입 및 발현이 확인된 형질전환 감자의 기내 소피경 형성 특성이 변하지 않고 그대로 유지되는지 알아보기 위하여 형질전환체와 대조구의 배양기간별 소피경 형성 정도를 조사하였다. ‘대지’ 및 ‘수미’ 2품종 모두 형질전환체와 대조구인 정상식물체에서 배양기간이 지날수록 소피경 형성율이 높아졌으며 배양 5주까지는 소피경 형성이 활발히 진행되었으나 배양 6주 후 부터는 소피경 형성율이 더 이상 높아지지 않았다. ‘대지’ 품종의 경우 배양 4주까지는 형질전환체의 소피경 형성율이 대조구에 비하여 월등히 높았으나 배양 5주후부터는 오히려 대조구의 소피경 형성율이 약간 더 높았고 8주후에는 형질전환체와 대조구와의 차이점은 특별히 나타나지 않았다.

기내소피경 형성율이 품종간 차이는 있지만 형질전환체와 정상식물체간에는 별다른 차이가 없었다. 또한, 기내 소피경의 크기별로 형질전환체와 대조구의 45일 육묘후 정식직전의 묘소질을 조사한 결과, 기내 소피경의 크기가 크고 대조구가 형질전환체에 비

해 초장, 엽수와 경경 모두 차이가 없었다. 또한, 정식 30일과 60일 후 형질전환체와 대조구간 생육특성을 조사한 결과 육묘후 묘소질에서와 같이 초장, 엽수 및 경수에 차이가 없었다. 다만 소괴경 크기에 따른 생육차이는 괴경의 크기가 큰 것이 초장, 엽수 및 경경이 양호하였다.

아울러 수확 후 수량을 보면 1주당 총괴경 형성수, 형성된 감자크기별 괴경수 및 10a 당 총 수량 모두 형질전환체와 대조구간 큰 차이를 보이지 않았으며 통계적 유의성도 없었다. 정식 후 60일까지의 생육은 소괴경의 크기에 따른 차이는 인정된 반면 형질전환체와 대조구간 차이는 없었는데 비해 수확 후 수량에서는 소괴경 크기별로도 차이가 나타나지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 보면 CAX유전자의 도입으로 인한 대조구와 형질전환체간 생육차이가 인정되지 않았다.

한편, 최초로 제 1세부과제가 확보하고 있던 35S::CAX 및 cdc2a::CAX 벡터를 이용한 형질전환체 'Russet Norkotah' 감자의 세대별 칼슘함량 및 수량성을 조사하기 위하여 괴경무게가 약 45g 내외인 것 만을 재료로 사용하여 수확량을 조사한 결과, 형질전환체와 대조구 간에 수량 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서, CAX1 유전자의 도입에 따른 수량증가 효과는 포장재배에서도 없는 것으로 인정되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

본 연구개발의 궁극적 목표는 Ca²⁺ transporter의 발현을 통한 칼슘강화 기능성 감자 개발에 있었으며 세부인 ‘CAX관련 유전자를 이용한 형질전환 감자개발’과 협동과제인 ‘CAX 유전자발현 감자의 포장안정성 검정’으로 과제가 구성되어 있다. 년차별 연구개발 목표의 달성도는 다음 표와 같다.

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척도 (점수)	달성도 (%)
1차년도 (2003)	○CAX1 유전자발현 감자의 유지 및 증식 ○감자(대지,수미,대서)의 기내배양체계 확립 ○감자의 형질전환효율향상 및 35S::CAX1, cdc2a::CAX1 및 patatinB33::CAX1 유전자의 국내 재배 품종으로의 형질전환 ○특이 promoter 에 대한 CAX유전자의 발현양상 조사	30 20 30 20	100
2차년도 (2004)	○35S::CAX2V, cdc2a::CAX2 및 patatinB33::CAX2V 유전자 재조합 및 국내 재배품종으로의 형질전환 ○형질전환감자의 포장안정성 검정 및 Ca 함량분석 ○유전분석(Southern 및 Northern 분석)	50 30 20	100
3차년도 (2005)	○재배배환경조건에 따른 형질전환 감자의 생육특성 및 수량성 검토 ○CAX2V 및 CAX4-HA 유전자의 형질전환 ○Ca 함량분석 및 유전분석	40 40 30	100
최종평가	○CAX1, CAX2V 및 CAX4-HA 유전자 발현 국내감자 개발 ○CAX 관련 유전자의 포장안정성 검정 및 실용성 분석	60 40	100

제 2 절 연구개발 관련분야에의 기여도

○ 형질전환 방법에 의한 칼슘강화 기능성 감자의 개발은 식물체내 액포막에서 칼슘을 이송 저장하는 다양한 CAX 관련 유전자의 확보 및 분자유종의 실용화에 크게 기여함으로써 이들 유전자의 농업적 형질로서의 이용가능성에 대한 중요한 연구결과를 제공하게 될 것이다.

○ 식물은 체내에 다양한 pattern의 Ca^{2+} 농도의 증가 혹은 축적은 하부 신호전달계를 통하여 수십여종의 생체방어 관련 유전자들(pathogenesis-related protein gene)의 발현을 증폭시켜 자체방어를 가능하게 한다. 따라서 생체내에서 Ca과 관련된 유전자에 대한 연구는 내재해성(내병성, 내충성, 내한성, 내염성, 중금속 저항성 등) 작물 개발을 위한 기초자료에도 유용하게 이용되어질 수 있을 것이다.

○ 1997년 현재 기능성 식품의 국제적 시장 규모는 약 650억 달러에 이르는 것으로 추정되고 있으며, 연평균 10% 정도 성장하여 2006년에는 1,500억 달러를 넘어설 것으로 전망되고 있다. 따라서 국내에서 생산되는 농산물의 품질 고급화 및 안정성 향상은 국제 경쟁력 제고 및 우리 농산물의 소비촉진과 더불어 국민 건강 향상에도 크게 기여하게 될 것이다.

○ 또한, 생체내에서 Ca과 관련된 유전자에 대한 연구는 내병성 및 내충성 작물 개발을 위한 기초자료에도 유용하게 이용되어져 연간 농약 소비량 약 8천억원과 매년 전체 생산량의 35%에 달하는 병충해에 의한 농작물 피해를 줄일 수 있는 파급효과를 가져올 것이다.

다음은 지금까지의 연구결과로 확보한 칼슘관련 유전자 및 형질전환체 그리고 국내외 학술지 및 심포지움에 발표한 연구성과 결과들이다.

<형질전환용 벡터>

1. p35SCAX1(35S::CAX1)
2. pK3-1(cdc2::CAX1)
3. pCAXPatatin(patatin::CAX1)
4. pCAX759A(35S::CAX2a)
5. pCAX760B(35S::CAX2b)

<형질전환 감자>

1. 35S::CAX 형질전환 감자 'Russet Norkotah' 3계통 (포장 안정성검정 완료)
2. 35S::CAX 형질전환 감자 '대지' 14계통 (포장 안정성검정 완료)
3. cdc::CAX 형질전환 감자 '대지' 8계통 (포장 안정성검정 완료)
4. 35S::CAX 형질전환 감자 '수미' 5계통
5. patatin::CAX 형질전환 감자 '수미' 3계통
6. cdc::CAX 형질전환 감자 '수미' 7계통
7. 35S::CAX2b 형질전환 감자 '대지' 9계통

<국외 전문학술지>

1. Park SH, Kang TS, Kim CK, Han JS, Kim SG, Smith RH, Pike LM, Hirschi KD* (2005) Genetic manipulation for enhancing calcium content in potato tuber. J Agri Food Chem 53:5598-5603
2. KimM*, Park YH, Kim CK, Hirschi KD, Sohn (2005) Development of transgenic plants overexpressing the *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 gene. Plant Cell Rep 23:678-682

<국내 전문학술지>

1. Han JS, MY Chung, Oh JY, Kim CK* (2005) Increased calcium in Potato (*Solanum tuberosum* cv. Daejiree) tuber by overexpression of *Arabidopsis* sCAX1 gene. J. Kor Soc Hort Sci 46:108-112
2. 오중열, 정미명, 이현숙, 김현란, 지선옥, 한중술, 김진화, 김창길* (2005) *Arabidopsis* sCAX1 유전자발현에 의한 칼슘강화 형질전환 감자(*Solanum tuberosum* cv. Superior)의 선발. 원예과학기술지 23:170-174
3. Han JS, Oh DG, Woo JG, Kim JH, Kim CK* (2005) Ectopic Expression of an *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ Antiporter Gene in Bottle Gourd (*Lagenaria Siceraria*). J Kor Soc Hort Sci 46:250-254

<심포지움 및 세미나 발표>

1. Development of calcium-rich potatoes by expression of *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ transporter (제 2회 한국감자 심포지움)
2. CAX관련유전자의 형질전환에 의한 칼슘강화 식물체개발 (2003. 11, 농우바이오)
3. 칼슘강화 기능성 감자개발 (2005 감자분야 농림기술개발 설명회, 농림부)

<특허>

1. 애기장대에서 분리된 칼슘이온수송체 유전자를 이용한 칼슘 강화 기능성 인공 씨감자 개발 (출원번호;10-2005-0013225)

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

○ 본 연구에서 확보된 다양한 CAX 관련유전자 및 이들 유전자발현 감자의 개발은 기능성 품종 및 육종재료 확보 등의 연구에 유용하게 이용되어 분자유종기술의 실용화에 활용할 예정이며

○ 이들 유전자가 도입된 형질전환감자개발기술은 ‘애기장대에서 분리된 칼슘이온수송체 유전자를 이용한 칼슘 강화 기능성 인공 씨감자 개발’이라는 제목으로 이미 특허출원(출원번호;10-2005-0013225)하여 지적재산권을 확보중에 있다.

○ 또한, 포장검정을 통하여 유전자의 안정성이 확보된 칼슘강화 감자 생산은 농산물의 고품질화는 물론 이를 이용한 다양한 가공식품생산이 가능하여 관련 기술을 이용한 상품화 재료로 관련기관과의 협의를 거쳐 분양, 공급될 수 있을 것이다.

○ 생체내에서 Ca와 관련된 유전자에 대한 연구는 내재해성 작물 개발을 위한 기초자료로 유용하게 이용되어질 수 있을 것이다.

○ 한편, 보다 안정적으로 식물체내 칼슘 함량을 증가시키기 위한 연구개발 모델로서 다음 연구를 제안코저 한다. 식물 세포는 세포질의 pH를 7.5 정도의 수준에서 유지하려는 항상성(homeostasis)을 가지고 있다(Gaxiola 등, 2002; Hirschi, 2001).

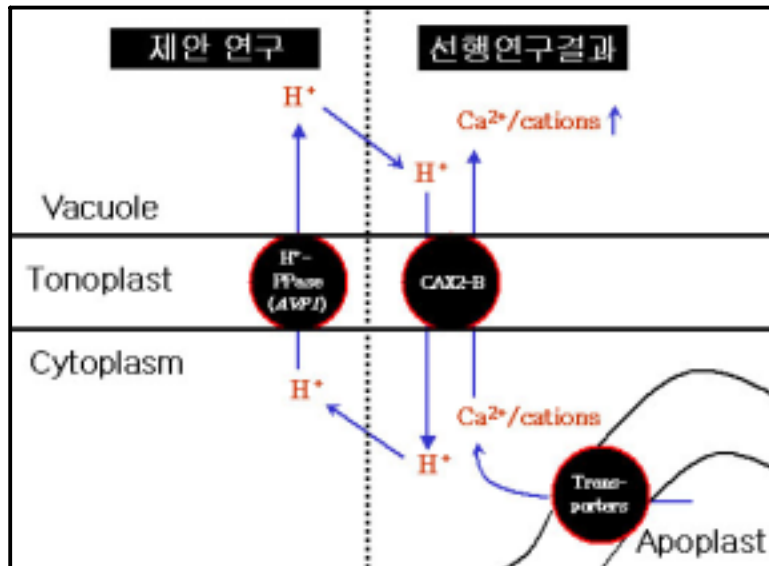


그림 5-1. 제안 연구의 가설

따라서 CAX 유전자

로 형질전환된 감자의 경우 CaMV35S 프로모터에 의한 과발현으로 인해 세포질로 방출된 수소 이온이 세포질의 pH 항상성 유지에 걸림돌이 될 수 있을 것이다. 물론 다른 H⁺/cation exchanger나 H⁺ pump 등에 의해 항상성 유지를 위한 노력이 자발적으로 이루어질 수도 있지만 여기에는 상당한 에너지가 필요할 것이며 자발적 항상성 유지를

이를 수 있을 것인지도 의문이다. 이미 개발한 *CAX* 형질전환 감자에서의 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 세포질로 방출된 수소 이온의 액포로의 재유입을 고려할 수 있다. 이러한 전략에 적합한 기작으로는 액포의 H^+ -ATPase와 H^+ -pyrophosphatase가 대상이 될 수 있는데, 전자의 경우 많은 subunit으로 구성되어 있어 형질전환에 이용되기 어렵다. 그러나 후자의 경우는 한개의 유전자(*AVPI*)에 의해 발현되며 내건성도 동시에 획득할 수 있기 때문에 좋은 후보 유전자가 될 수 있을 것이다(Gaxiola 등, 2001). 따라서 *CAX2-B* 유전자와 *AVPI* 유전자의 공동발현(co-expression) 전략은 항상성 유지를 위한 H^+ 이온의 순환이라는 측면에서 상당히 유효할 것이다(그림 5-1).

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 분자생물학의 발달과 더불어 식물체내 Ca^{2+} 축적과 농도조절에 관련된 여러 가지 중요 유전자가 cloning 되고 있다. 뿐만 아니라 이들 유전자의 기능과 식물체내에서의 역할에 대한 연구도 활발히 진행중에 있는데 본 연구과정중에서 연구자가 관심을 가지고 수집한 정보는 1)신호전이에서의 칼슘의 역할과 2)신호전이에 이용되는 칼슘이온의 항상성 유지에 대한 부분이다. 왜냐하면 본 연구에 사용된 CAX유전자의 활용이 단순히 세포내 액포기관으로의 칼슘축적에 따른 칼슘함량증가 효과외에 액포내 증가된 칼슘이 어떻게 신호전달 물질로 이용되어 질수있을 것인지에 대한 문제해결을 가능하게 할것이기 때문이다.

해외과학기술 수집은 주로 문헌 검색을 통하여 실시하였으며 수집된 많은 양의 문헌 중 흥미있는 몇가지를 소개하면 다음과 같다. 소포체(ER)에는 chaperone binding protein (BiP), calnexin 및 calreticulin (CRT) 등과 같은 다양한 Ca^{2+} 결합단백질이 존재하고 있다. 이들 중 CRT는 소포체내의 Ca^{2+} 의 농도조절 기능을 지니고 있다 (Hassan et al. 1995). 식물에서 calreticulin의 정확한 역할은 여전히 베일에 싸여있어 많은 연구의 초점이 되어 있다. calreticulin이 소포체에서 볼 수 있는 칼슘 완충계의 중요한 한 가지 성분일 것이라는 가설은 서 있지만 한편에서는 소포체 보호자로서, 신호분자로서 역할을 하고 단백질-단백질 상호작용을 증대한다고 보고(Mery 등, 1996)되어 있기도 하다. calreticulin이 소포체에서의 칼슘 저장 농도를 선택적으로 증가시키는지 칼슘 저장 현상이 스트레스에 대한 식물의 생리적 반응에 영향을 주는지를 조사하기 위하여 애기장대에 calreticulin의 C-도메인 유전자를 도입시킴으로써 칼슘이 없는 배지에서 재배했을 때 형질전환체는 비형질전환체 보다 엽록체 퇴화속도가 느렸을 뿐만 아니라 형질전환체의 조직 내 칼슘 농도를 9-35% 정도 증가시킬 수 있었다(Hassan et al. 1995).

식물세포 내의 calcium 증가는 다양한 biotic 혹은 abiotic stress 등에 반응하여 발생한다. 그러기에 다양한 신호에 대응하여 작용하는 "calcium의 증가"라는 같은 종류의 중간신호가 어떻게 최종적으로 다양한 신호 전달로 decoding되는 지에 대한 논란이 많이 있었다. 최근 Trewavas(1999)는 다양한 환경 스트레스 신호에 따라 calcium 증가과정에는 질적으로 "lag period, rise time, total transient time"에서 차이가 있음을 발견하여, 단순히 양의 증가만이 아니라 증가 과정의 질적 형태가 초기신호의 종류를 포함

하여 전달하고 있음을 주장한 바 있다. 구체적으로 저온신호의 경우는 담배의 유묘는 "lag period"가 없고, "rise time"이 4-5초, "전체 transient time"은 30초임을 다른 신호와 구별하여 확인하였다. 따라서 다양한 환경 스트레스 신호의 전달이 감지되어 세포질의 calcium 농도의 증가를 공통적 중간신호로 사용하나, calcium 증가 파장의 질적 차이가 각 신호의 특이성을 나타내어 신호전달세계의 정확성을 확보하는 것으로 생각된다.

*CAX1*과 *CAX2*는 미국의 Dr. Hirschi팀에 의해 식물에서는 처음으로 동정된 식물의 Ca^{2+} transporter이다(Hirschi 등, 1996). 그 중 *CAX2*의 경우는 Ca^{2+} 뿐만 아니라 Mn^{2+} 을 포함한 다양한 양이온 기질 특이성을 갖고 있는데, 당해 연구팀이 최근 Mn^{2+} 의 과도한 특이성만을 돌연변이 기법을 이용하여 제거한 유전자가 *CAX2-B* 이다(Shigaki 등, 2003). 이 유전자의 산물인 transporter는 액포막에 상주하면서 세포 외부로부터 세포질로 유입된 독성 수준의 양이온을 세포질로부터 액포로 수송하고 수소 이온을 세포질로 방출함으로써 세포질의 양이온 독성을 해소하거나(Shigaki 등, 2003), 칼슘 이온에 특이적으로 반응하여 액포에 높은 농도의 칼슘 이온을 축적시킴으로써 고염류에 대한 내성발현에 소요되는 칼슘 이온 의존적 신호전달에 직접적으로 관여할 가능성이 있다(Bressan 등, 1998; Liu와 Zhu, 1998; Zhu, 2001). 그러나 보다 세부적이고 구체적인 작용기작에 관한 세포생리적 연구는 좀더 필요한데, 이를 위해서는 이온의 visualization 기법의 개발과 응용이 도움을 줄 수 있을 것이다.

H^{+} -pyrophosphatase를 encoding하는 *AVP1* 유전자는 미국의 Rea 연구팀이 *Arabidopsis*에서 동정한 것으로 유전자 산물은 액포막에 위치하여 세포질로부터 액포 내로 H^{+} 이온을 수송하는 pump의 기능을 가진다(Sarafian 등, 1992). 최근에 이 유전자를 과발현 시킨 *Arabidopsis*가 기대되었던 내염성 뿐만 아니라 내건성도 동시에 가지는 것으로 보고 되었다(Gaxiola 등, 2001).

국외에서는 1980년대 초부터 식물 유전자의 발현을 조절하는 프로모터에 관한 연구가 진행되어 왔다. Cauliflower mosaic virus의 35S RNA 프로모터가 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도할 것이라는 가능성이 제시되고 (Hohn 등, 1982), 프로모터의 염기서열이 밝혀졌으며(Odell 등, 1985), 식물체내에서 강한 발현이 실제로 증명(Sanders 등, 1987)된 이후 CaMV 35S 프로모터(특허번호: JP1993192172-A1)는 식물 형질전환 연구에 있어 가장 광범위하게 활용되는 프로모터가 되었다. 한편, 뿌리 조직 특이적으

로 발현하는 프로모터에 관한 연구로는 애기장대(*Arabidopsis*)에서 뿌리 조직 특이적인 *Pyk10*가 있는데 그 조절인자도 규명되었고(Nitz 등, 2001) amino acid proton co-transporter(*AAP3*) 유전자의 프로모터는 뿌리의 체관 특이적인 발현을 유도하였으며, 주로 원형질막에서 발현하는 것으로 확인되었다(Okumoto 등, 2004). 또한, 벼의 카탈라제(*CatB*) 프로모터는 단자엽과 쌍자엽의 원형질체와 뿌리에서 강한 발현이 유도되는 것으로 보고되었다(Iwamoto 등, 2004)

궁극적으로 식물 생체방어 상부 신호전달체계에서 calcium 신호전달과정을 해석하고 신호물질이 하부 신호전달계에서 MAP kinase cascade에 의한 신호전달과정을 규명할 수 있다면 이들 신호전달물질의 증폭으로 다양한 식물생체방어 관련 유전자들의 발현을 유도하여 광범위 내재해성 및 병저항성 형질전환 작물의 개발이 가능할 것이며 이에 대한 연구가 활발히 진행중에 있는 것으로 조사되었다.

제 7 장 참고문헌

- Abrams, S.A., O'Brien, K.O. & Stuff, J.E. (1996) Changes in calcium kinetics associated with menarche. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 2017-2020
- Abrams, S.A. & Stuff, J.E. (1994) Calcium metabolism in girls Current dietary intakes lead to low rates of calcium absorption and retention during puberty. *Am. J. Clin. Nutr.* **60**, 739-743
- Allen, G.J. et al (1995) Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**, 735-737
- Bachrach, L.K. (2001) Acquisition of optimal bone mass in childhood and adolescence. *Trends Endocrin. Met.* **12**, 22-28
- Bachrach, L.K., Hastie, T., Wang, M.C., Narasimhan, B. & Marcus, R. (1999) Bone mineral acquisition in healthy Asian, Hispanic, black, and Caucasian youth: A longitudinal study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 4702-4712.
- Bonjour, J.P. Bone mineral acquisition in adolescence. In Osteoporosis, Eds., 465-476 (Academic Press, New York; 1996).
- Cheng, N.-H., Pittman, J.K., Shigaki, T. & Hirschi, K.D. (2002) Characterization of CAX4: an Arabidopsis H⁺/Cation Antiporter. (In press in Plant Physiology)
- De Block, M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.* **76**:767-774.
- Doerner, P., Jorgensen, J.-E., You, R., Steppuhn, J. & Lamb, C. (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**, 520-523
- Feagley, S.E., Valdez, M.S. & Hudnall, W.H. (1994) Papermill sludge, phosphorous, potassium, and lime effect on clover grown on a mine soil. *J. Environ. Qual.* **23**, 759-765
- Fleming, K.H. & Heimback, J.T. (1994) Consumption of calcium in the US: food sources and intake levels. *J. Nutr.* **124**, 1426S-1430S
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1

- H⁺-pump. PNAS 98:11444-11449
- Hassan, A.-M., Wesson, C., Trumble, W.R. (1995). Calreticulin is the major Ca²⁺ storage protein in the endoplasmic reticulum of the pea plant (*pisum sativum*). Biochem Biophys Res Commun 211, 54-59.
- Herman C.W., G.A. Mignery, L.M. Fisher, and W.D. Park. 1989. Analysis of a chimeric class-I patatin-GUS gene in transgenic potato plants: High-level expression in tubers and sucrose-inducible expression in cultured leaf and stem explants. Plant Mol. Biol. 12:41-50.
- Hirschi, K.D., Zhen, R.-G., Cunningham, K.W., Rea, P.A. & Fink, G.R. (1996) CAX1 a H⁺/Ca²⁺ antiporter from Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8782-8786
- 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., Korenkov, V., Wilganowski, N. & G Wagner, G. (2000) Expression of Arabidopsis CAX2 in tobacco: altered metal accumulation and increased manganese tolerance. Plant Physiol 124, 125-134
- Hirschi, K.D. (2001) Vacuolar H⁺/Ca²⁺ transport: Whos directing the traffic. Trends Plant Sci. 6, 100-104
- Hohn T, Richards K, Lebeurier G (1982) Cauliflower mosaic virus on its way to becoming a useful plant vector. Curr Topics Microbiol Immunol 96:193-236
- Iwamoto M. et al. (2004) Strong expression of the rice catalase gene CatB promoter in protoplasts and roots of both a monocot and dicots. Plant Physiol. Biochem. 42: 241-249
- Kleinhenz, M.D., Palta, J.P., Gunter, C.C. & Kelling, K.A. (1999) Impact of source and timing of calcium and nitrogen applications on Atlantic Potato tuber calcium concentrations and internal quality. J. Am. Soc. Hort. Sci. 124, 498-506
- Lester, G.E. & Grusak, M.A. (1999) Postharvest application of calcium and magnesium to honeydew and netted muskmelons: effects on tissue ion concentrations, quality, and senescence. J. Am. Soc. Hort. Sci. 124, 545-552.

- Maser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J.M., Sanders, D., Harper, J.F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A. & Guerinot, M.L. (2001) Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**, 1646-1667
- Marty, F. (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* **11**, 587-599
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**:473-497.
- Nitz I, Berkefeld H, Puzio PS, Grundler FM (2001) Pyk10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **161**: 337-346
- Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus promoter. *Nature* **313**:810-812
- Olsen, N.L., Hiller, L.K. & Mikitzel, L.J. (1996) The dependence of internal brown spot development upon calcium fertility in potato tubers. *Potato Res.* **39**, 165-178
- Okumoto S, Koch W, Tegeder M, Fischer W, Biehl A, Leister D, Stierhof Y, Frommer W (2004) Root phloem-specific expression of the plasma membrane amino acid proton co-transporter AAP3. *J. Exp. Botany* **55**: 2155-2168
- Park, S.H., C.K. Kim, L.M. Pike, R.H. Smith, and K.D. Hirschi. 2004. Increased calcium in carrots by expression of an *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ transporter. *Mol. Breed.* **14**:275-282.
- Paterson, A.H., Brubaker, C.L. & Wendel, J.F. (1993) A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**, 122-127
- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J. & Willmizer, L. (1989) Both developmental and metabolic signals activate the expression of a Class I patatin gene. *EMBO J.* **8**, 23-29
- 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* S401-S417
- Sanders PR, Winter JA, Barnason AR, Rogers SG, Fraley RT (1987) Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Res.* 15: 1543-58
- Sambrook, J., Fritsch, E.F.& Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 1989
- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA (1992) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 89:1775-1779
- Shigaki, T. & Hirschi, K.D. (2000) Cloning and characterization of CAX-like genes in plants. *Gene* **257**, 291-298
- Shigaki, T., Cheng, N.H., Pittman, J.K.& Hirschi, K.D. (2001) Structural determinates of Ca transport in the Arabidopsis Ca²⁺/H⁺ antiporter CAX1. *J. Biol. Chem* **276**, 43152-43159
- Shigaki T, Pittman JK, Hirschi KD (2003) Manganese specificity determinants in the Arabidopsis Metal/H⁺ antiporter CAX2. *J Biologic Chem* 278:6610-6617
- Trewavas A. 1999. Le Calcium, C'est la Vie: Calcium Makes Waves. *Plant Physiol.* 12) : 1-6
- Ueoka-Nakanishi, H, Nakanishi, Y. & Maeshima, M. (1989) Properties and molecular cloning of Ca²⁺/H⁺ antiporter in the vacuolar membrane of mung bean. *Eur J Biochem* **262**, 417-425
- Ueoka-Nakanishi, H, Nakanishi, Y. & Maeshima, M. (2000) Functional expression of mung bean Ca²⁺/H⁺ antiporter in yeast and its intracellular localization in the hypocotyls and tobacco cells. *Eur J Biochem* **267**, 3090-3098
- Vega, S.E., Palta, J.P. & Bamberg, J.B. (2000) Variability in the rate of cold acclimation and deacclimation among tuber-bearing Solanum (potato) species. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **125**, 205-211
- Weaver, C.M., Proulx, W.R. & Heaney, R. (1999) Choices for achieving adequate

- dietary calcium with a vegetarian diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 543S-548S
- Zapata, C. & Smith, R.H. Freeing plants of viruses. *Cell Biology: A laboratory handbook*, 2nd Ed., 485-489 (Academic Press, New York; 1998).
- Yi, J.Y., H.W. Seo, J.H. Cho, S.W. Lee, and H.D. Yun. 2003. Effects of hormone and several factors on the regeneration and transformation rate of potato cultivars bred in Korea. *Korean J. Plant Biotechnology* 30:27-33.
- Youm J.W., M.S. Kim, B.C. Lee, W.J. Kang, J.H. Jeon, H. Joung, and H.S. Kim. 2003. Distinct spatio-temporal expression patterns of patatin promoter-GUS gene fusion in transgenic potato microtubers. *Korean J. Plant Biotechnology* 30:13-18.