

최 종
연구보고서

철분흡수 관련 유전자의 개량에 의한
식물체내 철분대사 증진 벼 육성

Development of Transgenic Rice
Improved in Iron Metabolism by
Introducing Genes Related to Iron
Uptake and Storage

연 구 기 관

충 북 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “철분흡수 관련 유전자의 개량에 의한 식물체내 철분대사 증진 벼 육성”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 13 일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 조 용 구

세부과제책임자 : 송 범 헌

연 구 원 : 이 철 원

연 구 원 : 박 상 규

연 구 원 : 이 재 준

연 구 원 : 유 선 상

연 구 원 : 류 호 진

협동연구기관명 : 한경대학교

협동연구책임자 : 강 권 규

연 구 원 : 박 기 배

연 구 원 : 박 세 화

요 약 문

I. 제 목

철분흡수 관련 유전자의 개량에 의한 식물체내 철분대사 증진 벼 육성

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발 목표와 내용

본 연구는 벼의 체내 철분대사에 철의 흡수능력을 증가시킬 목적으로 식물체내의 철분관련 기작을 분자생물학적 기법에 의해 유전자 발현을 증가시켜 기존 벼보다 더 많이 토양으로부터 철을 흡수 및 이용할 수 있는 새로운 type의 식물체를 육성하고자 한다.

이에 관련된 연구로는 철분흡수 증진 관여 유전자의 분리 및 구조해석, 뿌리로부터 철분흡수 기작과 관련된 유전자의 도입을 통한 흡수능력 부여, 주요 생육시기별 벼의 철 흡수 양상 및 식물체 부위별 철의 전류, 저장 기작 해석, 고 철분 함유 쌀 생산을 위한 source-sink간 Fe^{2+} 의 전류 및 저장 능력 증진, 철분흡수, 이용기능 강화 벼 계통 육성 등이다.

철의 생체항상성(homeostasis)의 정확한 조절은 세포의 원활한 기능을 위한 기초적 필요조건이다. 철분(Fe^{2+})은 미량원소로서 적은 양이 필요하지만 인체에 있어서 헤모글로빈의 주성분으로서 성장 속도가 빠른 유아, 임산부 및 가임 여성 등에 있어서 결핍은 매우 심각한 문제를 야기할 수 있다. 벼를 주식으로 하고 있는 우리나라에서 쌀밥에서의 철분의 함량을 고려할 때에 임산부의 경우 20mg/day 정도의 철분이 필요하나 벼에서는 단지 0.4 mg/100g에 불과하므로 결핍현상이 초래되기 쉽다. WHO 통계에 따르면 전 세계의 30억이 넘는 인구에서 철분이 부족한 음식을 섭취함에 의해 심각한 문제점으로 대두되고 있는 실정이다. 따라서 세계의 많은 연

구자들은 고철함유 식물의 육성에 많은 노력을 하고 있으며, 식물의 부위에 따른 철함유정도가 달라 고농도로 함유되어 있는 배유의 이용이 증가되고 있다.

벼 뿌리에서의 철분의 흡수 능력을 증진시키고 식물체내에 흡수된 철분의 이용효율을 높이는 한편, 저장기관에 ferritin 유전자를 도입하여 벼 종자 내에 철분의 함량이 높은 양질의 벼 품종을 개발하면 임신부가 밥을 해 먹음으로써 자연스럽게 철분을 흡수하여 태아에 영향을 주지 않게 되고, 또한 이유식 산업에서 이를 재료로 하여 천연의 철 성분이 강화된 유아용 이유식을 생산할 수 있으므로 유아들에게 천연의 철분을 안정적으로 공급할 수 있어서 국민 건강에 크게 기여할 수 있다.

최근에는 국민소득이 높아지고 여성의 사회참여도가 확대되면서 식생활 양상이 고급화, 다양화, 간편화되고 있어서 쌀의 가공식품 수요가 확대되고 있으며, 특히 특정 영양성분이 강화된 양질의 농산물의 생산이 요구되고 있다. 우리나라의 벼 품종개량은 그 동안 밥쌀용 중심으로 추진되어 왔기 때문에 재배품종의 쌀외관이나 배유의 이화학적 특성 등 품질변이가 좁고 단순하다. 따라서 쌀가공 제품별 그 특성에 알맞은 품종이 없어 쌀가공 제품의 생산이 크게 제한을 받아 왔다.

유전공학기법을 이용한 작물의 품종개량은 특정의 기능을 가진 품종을 단 시일에 육성하고자 할 때에 매우 효율적으로 적용되고 있다. 세계적으로 45 개국에서 유전공학기법을 이용하여 형질전환된 식물체들을 만들어 포장에서 실험을 하고 있으나 우리나라는 자체개발기술 및 유용한 유전자가 미흡한 실정으로 작물의 유용유전자에 대한 지적소유권 보호대책이 전무한 실정이다. WTO 대응은 기술선진이 필수적이며 선진각국은 지적소유권 보호를 강화하여 개발기술 및 유전자를 보호하고 있는 추세에 있으므로 우리 고유의 유전자를 개발하고 이를 형질전환기술을 통하여 작물에 도입함으로써 특수 기능이 강화된 양질의 농산물을 다량으로 생산하여 특허화함으로써 지적소유권의 확보가 가능하며 농산물의 대외 경쟁력을 확보할 수 있다.

토양내 철은 자연 pH하에서 용해도가 낮아 안정된 상태로 존재하고 있다. 대부분의 호기성 토양 (aerobic soils)에서 자란 식물들에서 철분결핍

의 주요 원인은 Fe(III)-oxides의 불용성 때문이므로, 근권에서 뿌리와 미생물의 산화력이나 pH 변화는 식물 종들에 있어서 뿌리의 철분이용 정도에 크게 영향을 미친다 (Bienfait 1989; Moraghan and Mascagni 1991). 식물은 토양내에 존재하는 철을 뿌리를 통해 uptake하는데, 이와 관련된 메카니즘은 식물군에 따라 두 가지 전략으로 나누어진다. 쌍자엽과 벼 이외의 단자엽의 경우(strategy I), 많은 proton의 돌기와 황원효소범위 plasma membrane의 유도에 따라 Fe³⁺에서 Fe²⁺의 감소 때문에 토양층의 산성화가 증가되기 때문에 철의 흡수가 촉진된다. 그러나 벼의 경우(strategy II), 토양안에서 mugineic산 및 이들 합성물은 Fe²⁺ 이온의 chelator 처럼 작동하여 Fe³⁺ 복합체 같은 뿌리세포에 의해 흡수된다. 식물체내 미량원소의 흡수, 이용은 1) 뿌리에 의한 미량원소의 흡수, 2) 뿌리로부터 지상부로의 이동, 3) 저장기관으로의 부위별 재이동 및 저장과정에서의 효율성에 의하여 좌우되고 있다. 따라서 이러한 과정에서 일어나는 제반 생리적 반응들이 활성화되도록 유전자의 기능을 강화시키는 것이 궁극적으로 철분과 같은 미량원소의 흡수 및 저장에 매우 중요한 역할을 할 것이다.

모든 식물에서 nicotianamine synthase는 iron uptake mechanism에서 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 토마토에서 *chloronerva* mutant는 nicotianamine을 합성하지 못하므로 철분의 결핍을 초래하여 intercostal chlorosis를 일으킨다. 따라서 철분의 흡수를 위해서는 nicotianamine synthase 유전자의 작용을 필요로 한다 (Hong et al. 1999).

따라서 뿌리에서 철분의 흡수 능력을 증대시키고 식물체내에 흡수된 철분을 xylem과 phloem을 통하여 철분의 이용기관 및 저장기관에 잘 전이 되도록 하기 위하여 Fe(III)-reductases와 citrate synthase 유전자를 벼에 형질전환시키고 철분을 저장하는 단백질인 ferritin 유전자를 저장기관인 벼 배유에 최대로 발현시킴으로써 고농도 철단백질 생산능력을 가진 벼 품종의 육성이 절실하다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 벼의 체내 철분대사에 철의 흡수능력을 증가시킬 목적으로 식물체내의 철분관련 기작을 분자생물학적 기법에 의해 유전자 발현을 증가시켜 기존 벼보다 더 많이 토양으로부터 철을 흡수 및 이용할 수 있는 새로운 type의 식물체를 육성하고자 수행하였다.

이에 관련된 연구로는 철분흡수 관련 유전자의 분리 및 특성 연구, *Agrobacterium tumefaciens* 방법을 이용한 벼 형질전환체의 육성, 벼 식물체에서의 철분의 흡수 및 전류연구 등이다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

벼의 체내 철분대사에 철의 흡수능력을 증가시킬 목적으로 식물체내의 철분관련 기작을 분자생물학적 기법에 의해 유전자 발현을 증가시켜 기존 벼보다 더 많이 토양으로부터 철을 흡수 및 이용할 수 있는 새로운 type의 식물체를 육성하고자 철분흡수 증진 관련 유전자의 분리 및 구조해석, 뿌리로부터 철분흡수 기작과 관련된 유전자의 도입을 통한 흡수능력 부여, 주요 생육시기별 벼의 철 흡수 양상 및 식물체 부위별 철의 전류, 저장 기작 해석, 고 철분 함유 쌀 생산을 위한 source-sink간 Fe^{2+} 의 전류 및 저장 능력 증진, 철분흡수, 이용기능 강화 벼 계통 육성 등의 연구를 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다.

제 1 절 철분흡수 관련 유전자의 분리 및 특성 연구

1. Nicotianamine synthase 유전자 분리 및 구조해석

○ 철분흡수 관련 유전자인 nicotianamine synthase 유전자를 보리로부터 분리한 결과 유전자의 DNA 염기서열은 986bp이며, 종결코돈을 포함하여 328개의 아미노산으로 구성되었다. 이미 알려진 유전자들과의 아미노산 상동성을 비교한 결과 벼와는 87%, 옥수수와는 80%, 보리와는 99%의 상동성을 보였다.

○ 보리유래 nicotianamine synthase 유전자의 발현양상을 알아보기 위하여 semi-quantitative RT-PCR 방법을 사용하여 분석한 결과 줄기 및 뿌리에서 발현되는 것을 확인할 수 있었으며 특히 뿌리조직에서 강한 발현을 보였다.

2. Citrate synthase 유전자 분리 및 구조해석

당근으로부터 물질의 이동에 관련된 유전자인 citrate synthase 유전자를 RT-PCR에 의하여 분리한 결과 1,419bp의 DNA 염기서열을 얻었으며 이는 종지코돈을 포함하여 472개의 아미노산으로 구성되어 있었다.

3. NAS, CS 유전자의 벼 염색체상의 위치 확인

Nicotianamine synthase 및 citrate synthase 유전자의 벼 염색체 위치 정보를 얻기 위하여 밀양23/기호벼 F11 RI 유전집단을 가지고 작성한 기본 분자유전자지도를 이용하여 벼 염색체 상의 위치를 확인한 결과 nicotianamine synthase 유전자 OsNAS1과 OsNAS2는 벼 3번 염색체의 상부의 RM7 부근에 위치하였고 OsNAS3는 벼 7번 염색체의 말단부위의 C213과 가까운 곳에 위치하였다. 한편, citrate synthase 유전자 OsCS는 벼 2번 염색체 상부의 RZ87 부근과 11번 염색체의 동원체 부근의 RM21과 가까운 곳에 위치하는 것으로 분석되었다.

4. 벼 철분 저장능력이 큰 품종 선발

벼 철분의 저장능력이 큰 품종을 선발하고자 국내 장려품종들을 선정하여 종자내에 철분 함량의 변이를 분석한 결과 철 함량이 높은 품종들로는 진부벼 50.3 ppm, 낙동벼 46.6 ppm, 팔달벼 46.0 ppm, 밀양23호 40.0 ppm 등은 철분함량이 40% 이상으로서 철분함량이 낮은 품종들에 비하여 2배에 가까운 철분함량을 나타내었다. 철분함량이 낮은 품종들로는 일미벼 21.1 ppm, 서진벼 21.7 ppm, 금남벼 24.2 ppm, 화신벼 24.2 ppm, 계화벼 25.7 ppm, 추청벼 25.9 ppm 등으로 30 ppm 이하였다. 한편, 분석에 이용된 대부분의 품종들은 종실내의 철분함량이 30~40 ppm 범위를 나타내었다.

제 2 절 *Agrobacterium tumefaciens* 방법을 이용한 벼 형질전환체의 육성

1. NAS, CS 유전자들의 식물 형질전환벡터의 구축

Nicotianamine synthase(pNAS)와 citrate synthase(pCS) 유전자를 식물 발현벡터 35S(KJGV-B2) 및 ubiquitin (KJGV-B3) 내의 *SmaI* site에 각각 삽입하여 구축하였다. 따라서 도입하는 유전자의 구성은 promoter로는 35S (KJGV-B2) 및 ubiquitin (KJGV-B3), terminator로는 *Arbcs*의 지배하에 발현될 수 있도록 구축하였다.

2. *Agrobacterium*을 이용한 NAS 및 CS 유전자의 형질전환

*Agrobacterium*을 이용하여 pNAS 유전자와 pCS 유전자를 형질전환실험을 수행하여 재분화된 식물체는 Hygromycin이 포함된 2N6-7-CP 선발배지에서 증식된 callus만을 선발하여 bialaphos 10mg/L이 포함된 MS 배지 상에 치상한 결과 배양 3주후부터 embryogenic callus의 왕성한 생장을 보였으며, 5주 후부터 callus에 녹색의 반점이 보이기 시작하였으며, 이들 callus를 MS기본배지에 옮겨 재분화를 유도하여 multishoot를 유기한 다음 이들을 분리하여 rooting 배지에 옮겼다. 그리고 순화과정을 걸쳐 pot에 옮겨 자연광상태에서 성장시켜 후대를 육성하였다.

3. 형질전환계통 선발 및 유전자들의 도입확인

o Nicotianamine synthase 유전자의 형질전환을 통해 얻어진 T0세대 식물체는 총 158개체로 온실에서 순화 후, pot로 이식하여 성장시켰다. 이들 식물을 대상으로 유전자의 도입 여부를 확인하기 위하여 nicotianamine synthase 유전자의 특이 primer를 이용하여 PCR 분석을 한 결과 형질전환체는 PCR 증폭에 의해서 예상 크기인 550bp의 밴드가 증폭되었으나, 형질전환되지 않은 식물체의 경우에는 밴드가 보이지 않았다. PCR 분석에 의해 형질전환체로 확인된 개체수는 150개체이었다.

o Citrate synthase 유전자의 형질전환을 통해 얻어진 T0세대 식물체는 총 22개체로 온실에서 순화 후, pot로 이식하여 성장시켰다. 이들 식물을 대상으로 유전자의 도입 여부를 확인하기 위하여 citrate synthase 유전자의 특이 primer를 이용하여 PCR 분석을 한 결과 예상 크기인 900bp의 증폭 산물을 보인 것은 13개체이었다.

4. RT-PCR에 의한 형질전환체의 발현분석

RT-PCR에 의한 형질전환체의 발현분석에서 먼저 nicotianamine synthase 유전자가 도입된 형질전환체들에서 뚜렷하게 발현하고 있음을 보여주었다. 또한 promoter 간의 발현량은 35S-NAS, ubiquitin-NAS의 형질전환체에서 거의 유사하였으며, 조사한 형질전환체에서는 높은 양으로 발현하고 있음을 알 수 있었다. 또한, citrate synthase 유전자가 도입된 형질전환체에서도 wild type에서는 유전자가 발현되지 않았으나, 형질전환체에서는 뚜렷하게 발현하고 있음을 보여주었다.

5. 형질전환체의 발현량 분석

Realtime-PCR 방법에 의해 도입된 유전자의 세포내에서 발현량을 조사한 결과 NAS 유전자가 도입된 형질전환체 lane 2-1, 3-1, 4-1 및 5-1의 4 sample을 분석한 결과 control에서는 발현되지 않았으나, 형질전환체에서는 안정적으로 발현하고 있었음을 보여주었다. 특히 3-1에서는 다른 형질전환체보다 훨씬 높은 발현량을 보였다. 또한 citrate synthase 유전자를 도입한 형질전환체에서도 NAS 유전자가 도입된 것과 유사한 결과를 얻었으나 발현량에서는 훨씬 낮게 발현하고 있었다.

6. 형질전환체의 후대육성 및 농업특성조사

여 형질전환체들의 초기 생육상황을 비교한 결과 초장은 형질전환체에 따라서 많은 변이를 보였으며, 형질전환에 이용한 동안벼와 화신벼에 비하여 50%정도 감소한 왜성 식물체 및 이형 식물체의 출현도 보였다. 또한 분얼수에서도 상당한 영향을 보여 전혀 분얼을 보이지 않는 형질전환체도 출현하였다. 그러나 형질전환체 중에서 표현형적으로 대조품종과 거의 같은 식물체도 작출되었다. 이런 변이체들은 외래유전자의 도입에 따른 영향보다는 재분화 과정상에서 식물 호르몬 등의 영향을 받은 somaclonal variation 등의 유발에 의해 일어난 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 형태적으로 대조품종과 매우 유사한 형질전환체를 선발하여 후대계통 육성에 이용하였다.

제 3 절 벼 식물체에서의 철분흡수 및 전류

1. 철 농도별 주요 벼 품종의 성장반응

○ 초장은 이앙 후 34일까지는 완만한 증가를 보였고, 그 후부터 이앙 후 48일까지 14일 동안은 급격한 증가를 보였으며, 이후 수확기까지는 큰 차이를 보이지 않았다. 전 시기를 통틀어 두 품종간의 초장은 큰 차이를 보이지 않았다. 철농도 수준간의 초장을 비해 보면, 두 품종 공히 철농도 수준이 낮을수록 약간 높게 나타났다.

○ 분얼수는 이앙 후 41일까지는 현저한 증가를 보였고, 이후 수확기까지는 아주 적은 증가를 나타냈다. 철 처리별로 보면, 20ppm 처리구가 전 시기를 통틀어 다른 처리구보다 매우 많았으며, 품종간에는 현저한 차이를 보이지는 않았다.

○ 생체중은 출수 전 15일에서 수확기에 이르기까지 20ppm 처리구가 다른 처리구에 비해 높았다. 동안벼는 15DBH에서 수확기에 이르기까지 큰 차이를 보이지 않았으나, 화신벼에서는 15DBH에서 출수 후 20일까지는 약간의 증가를 보였으며 이후 감소하였다. 생체중과 달리, 건물중은 15DBH에서 수확기까지 점차적으 증가를 보였으며, 철분 20ppm 처리구가 다른 처리구에 비해 건물중이 높았다.

○ S/R률은 15DBH에서 수확기까지 계속적인 증가를 보였다. 두 품종간에 S/R률은 서로 다른 경향을 보였는데, 철 사용량이 높을수록 동안벼는 S/R률이 낮았으며, 화신벼는 반대의 경향을 보였다. 수확기 S/R률을 보면 동안벼는 20ppm처리구에서 약 25로 가장 높았고, 화신벼는 40 ppm 처리구에서 약 33으로 가장 높았다.

○ 광합성량은 동안벼가 화신벼에 비해 높았으며, 철분 처리간에는 현저한 차이를 보이지 않았다. 동안벼는 철 20ppm 처리구에서 광합성량이 가장 높았으며, 반면에 화신벼는 철분 사용량이 많을수록 광합성량이 낮았다.

2. 철 농도별 주요 벼 품종의 수량 및 수량 구성 요소

수량은 두 품종 모두에서 철농도 수준 간에 비슷한 경향을 보였고, 동안벼와 화신벼 모두 철분 20ppm 처리구에서 각각 개체당 235g와 개체당 279g로 가장 높은 값을 보였다. 수량구성요소 중에 등숙률과 1000립중에서 철분 처리간의 효과가 현저하게 나타났다.

3. 식물체내 철분 및 무기성분들의 함량과 흡수 이용량

○ 식물체 부위별 철분의 함량은 품종간과 시기별로 현저한 차이를 보였다. 출수기와 수확기 두 시기에서 식물체 부위별 철 함량을 비교해 보면, 동안벼에서는 뿌리, 줄기, 엽신, 이삭 순으로 높게 나타났고, 화신벼에서는 뿌리, 엽신, 줄기, 이삭 순으로 높게 나타났다. 수확기에선 동안벼가 화신벼에 비해 철분 함량이 높게 나타났다. 동안벼의 이삭의 철 함량은 0,20.40 ppm 철분 처리에서 각각 94, 144, 140 ppm을 보였고, 화신벼의 이삭에서는 84, 105, 117 ppm을 보였다.

○ 철분의 흡수량은 두 품종간에 서로 다른 경향을 보였는데, 동안벼는 출수기에서 수확기까지 다른 처리구에 비해 20ppm 처리구에서 철분 흡수량이 가장 높았다. 반면에 화신벼는 출수 전 15일부터 출수 후 20일까지 다른 처리에 비해 40 ppm 처리구가 가장 높았으며, 20ppm 철분처리구와 비교해 큰 차이를 보이지는 않았다.

4. Source-sink 간의 철 함량 및 전류량 분석

뿌리생장점, 성숙된 뿌리, 성숙엽, 줄기 그리고 이삭의 순으로 전류되는 철분의 전류량은 두 품종 모두에서 현저히 감소되는 것으로 나타났으며, 동안벼는 뿌리 생장점에서 성숙된 뿌리로의 전류량을 제외하고는 화신벼에 비해 약간 높게 나타났다. 출수 전 15일에 뿌리생장점으로부터 성숙된 뿌리로의 철 전류량은 동안벼와 화신벼에서 각각 42와 50을 나타냈다. 또한, 줄기에서 이삭으로의 철분 전류량은 동안벼와 화신벼에서 각각 9과 8.5의 값을 보였다.

5. 단백질 함량 및 SDS-PAGE에 의한 철-단백질 분리

o 이삭에서의 수용성 단백질의 함량은 동안벼에서는 0, 20, 40 ppm 처리구에서 각각 0.58, 0.70, 0.80%로 나타났으며, 화신벼에서는 각각 0.32, 0.78, 0.50%로 나타났다. 수용성 단백질의 함량은 품종과 철 처리간에 현저한 차이를 보였으며, 품종과 철분 처리간의 상호작용 효과 또한 통계적으로 유의성이 인정됐다.

o Ferritin 단백질의 분자량은 두 품종의 출수 전 15일의 엽 부위의 시료로 SDS-PAGE에 의한 분석 결과, 철분 처리구에서 21, 24, 28kDa으로 나타났다. 21kDa와 28kDa 사이에 나타난 철 단백질들은 출수기와 수확기에서도 나타났다.

2. 기대효과 및 활용방안

가. 기대효과

(1) 기술적 측면

- 식물체내 미량원소의 흡수, 이용은 1) 뿌리에 의한 미량원소의 흡수, 2) 뿌리로부터 지상부로의 이동, 3) 저장기관으로의 부위별 재이동 및 저장 과정에서의 효율성에 의하여 좌우되고 있으므로 이러한 과정에서 일어나는 제반 생리적 반응들이 활성화되도록 유전자의 기능을 강화시킴으로써 철분, 아연과 같은 미량원소의 흡수 및 저장에 관련된 생리적, 유전적 기작을 밝힐 수 있다.
- 분자생물학 기술의 핵심분야인 유전자분리와 형질전환 시스템을 확립하고 철분흡수, 이용 기능이 강화된 벼 계통을 육성하여 종실에 철분저장 능력이 매우 높은 벼 품종을 개발하는데 까지 체계적이고 집중적인 연구를 통하여 분자유종의 실용화를 기할 수 있음.
- RFLP, PCR 등의 기술을 활용하여 여교잡 후대에서 DNA 마커를 활용한 기내선발법의 확립으로 기존의 육종기간을 획기적으로 단축할 수 있는 생력육종기술이 개발될 것임.

(2) 경제 · 산업적 측면

- 철분흡수, 이용 기능이 강화된 벼 계통을 육성하여 종실에 철분저장 능력이 매우 높은 벼 품종을 개발함으로써 4,500개의 철원자를 저장할 수 있는 ferritin 유전자의 도입에 의하여 벼의 저장기관인 쌀알에 최대로 철분을 저장시킴으로써 고부가가치를 가진 가공용 벼 품종을 육성하여 천연의 철 성분이 강화된 쌀을 생산하여 유아용 이유식 생산에 이용하거나 철분을 많이 필요로 하는 임산부에게 천연의 철분을 안정적으로 공급할

수 있어서 국민 건강에 크게 기여할 수 있음.

- WTO 체제하의 농산물 수입개방은 벼 품종에도 완전 경쟁체제가 도래함을 의미하며 UPOV 가입과 지적재산권 보호의 강화 및 최근 개정된 품종등록제 등으로 벼 품종생산에도 품종권 보호에 따른 로열티 문제가 제기될 것이므로 이에 대한 능동적인 대처가 가능함.
- 높은 기술수준의 벼 육종기술에 분자생물학적 기술인 유전자분리 및 기능분석, 분자유전자지도 작성 기술, marker-assisted selection 기술 등을 접목시킨 분자유종 기술의 확립으로 다수의 형질전환 작물을 육성할 수 있을 것임.

나. 활용방안

- 식물의 영양대사계의 유전자 control 기술개발 제공
- 벼의 가공용 고유 품종개발에 의한 지적소유권 확보
- 분자유종기술의 확립으로 육종기간을 획기적으로 단축할 수 있는 생력육종기술 개발
- 천연 철성분이 다량 필요한 임산부, 유아 등에 천연영양식품으로 제공
- 국내 이유식산업에 고부가가치 가공용 고농도 철단백질 생산미 제공

SUMMARY

To increase the ability of iron uptake by introducing genes in rice, nicotianamine synthase (NAS) and citrate synthase (CS) genes which are related to iron uptake and translocation have been cloned by RT-PCR. The structure and function of the genes have been characterized. The recombinant DNAs with NAS and CS genes have constructed with the plant expression vectors having 35S promoter (KJGV-B2) and ubiquitin promoter (KJGV-B3). They were transformed into rice plant by *Agrobacterium*-mediated method. Iron uptake and its translocation in rice plant have been investigated. The results are summarized as follow :

Section 1. Isolation and characterization of genes related to iron uptake and translocation

(1) A cDNA encoding nicotianamine synthase (NAS) was isolated by RT-PCR from Barley. The cDNA clone composed of an open reading frame with 986bp which have 328 deduced amino acid sequences including stop codon. In homology analysis, the amino acid sequence showed 87% homology with rice, 80% with corn, and 99% with Barley nicotianamine synthase, respectively.

The gene expression of NAS was tested by semi-quantitative RT-PCR. The expression was observed in stem and root, especially much stronger in root.

(2) A citrate synthase (CS) was isolated by RT-PCR from carrot. The cDNA clone composed of an open reading frame with 1,419bp which have 427 deduced amino acid sequences including stop codon.

(3) The recombinant inbred population (F13 generation, 164 RILs), which was derived from the cross between Milyang 23 and Gihobyeo was

used to locate NAS and CS genes on rice chromosome. Nicotianamine synthase genes, OsNAS1 and OsNAS2, were mapped near to RM7 on the short arm of chromosome 3, while OsNAS3 was located near to C213 at the bottom of chromosome 7. OsCS was mapped near to RZ87 on chromosome 2 and near to RM21 on chromosome 11.

Section 2. Development of transgenic rice plants by *Agrobacterium tumefaciens*

(1) The recombinant genes, named by pNAS and pCS, have been constructed with nicotianamine synthase and citrate synthase genes into *SmaI* site of KJGV-B2 and KJGV-B3 vectors with 35S (KJGV-B2) and ubiquitin (KJGV-B3) promoters and *Arbcs* terminator for transformation of NAS and CS genes into rice plant.

(2) A total of 158 regenerated plants with pNAS gene was obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. To identify nicotianamine synthase gene in rice transformants, genomic DNAs isolated from regenerated plants were amplified with PCR primers designed from nicotianamine synthase sequence. One hundred fifty plants detected the expected band of 550bp.

(3) A total of 22 regenerated plants with pCS gene was obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. To identify citrate synthase gene in rice transformants, genomic DNAs isolated from regenerated plants were amplified with PCR primers designed from citrate synthase sequence. Thirteen plants detected the expected band of 900bp.

(4) RT-PCR analysis was carried out to detect the gene expression of NAS and CS in transgenic rice plants. A wild type plant did not

identify mRNA in the RT-PCR analysis, while transgenic plants detected clear mRNA bands showing the expression of NAS and CS genes. The gene expression compared to promoter between 35S-NAS and ubiquitin-NAS was almost similar each other, but it was higher in transgenic rice.

(5) To detect the amount of mRNA expression in transgenic plants, transgenic and wild type plants were evaluated by real time-PCR. A wild type plant did not show any amount of mRNA in the RT-PCR analysis, while transgenic plants, line 2-1, 3-1, 4-1, and 5-1, detected large amount of mRNA showing the expression of NAS and CS genes. Especially line3-1 detected the highest amount of mRNA expression. Transgenic rice plants with pCS showed the similar results, but the expression level was relatively lower than those of the transgenic rice plants with pNAS.

Section 3. Iron uptake and its translocation in rice plants

(1) The S/R ratios were increased from 15 DBH to harvesting stage. They were appeared differently between two rice cultivars; Donganbyeo had lower S/R ratio with increasing the application amount of Fe, whereas Hwashinbyeo had higher S/R ratio. At the harvesting stage, the S/R ratio was highest with 25 at the treatment of 20 ppm Fe in Donganbyeo, it was highest with 33 at the treatment of 40 ppm Fe in Hwashinbyeo.

(2) Photosynthetic ability was higher in Donganbyeo than that in Hwashinbyeo, showing that it was not clearly different among the application levels of Fe, Donganbyeo had the highest photosynthetic ability with treatment of 20 ppm Fe, while Hwashinbyeo had lower photosynthetic ability with increasing the application amount of Fe.

(3) Fe contents of plant tissues were different significantly between two rice cultivars and among different growth stages. Comparing Fe contents of plant tissues in heading and harvesting stages of Donganbyeo, it was appeared to be higher with ordering of the root, leaves, culm, and panicle at the heading stage, while it was showed to be higher with ordering of the root, culm, leaves, and panicle at the harvesting. In Hwashinbyeo, the Fe content was appeared to be higher with ordering of the root, leaves, culm, and panicle at two growth stage. At the harvesting stage, Donganbyeo contained higher Fe content than did Hwashinbyeo; the Fe contents in panicles of Donganbyeo were 94, 144, and 140 ppm with application levels of 0, 20, and 40 ppm Fe, respectively. Those of Hwashinbyeo were 84, 105, and 117 ppm.

(4) The uptake amounts of Fe were shown differently between two rice cultivars of Donganbyeo and Hwashinbyeo. The uptake amount of Fe in Donganbyeo was highest with treatment of 20 ppm Fe from the heading growth stage to the harvesting stage compared to those of others. On the other hand, it in Hwashinbyeo was highest with treatment of 40 ppm from 15 days before heading stage to 15 days after heading stage, showing not big different contents compared to those in 20 ppm Fe.

(5) Translocation amount of Fe in ordering of root tips, mature root, mature leaves, culm, and panicle was calculated to be decreased clearly in both rice cultivars, showing that Donganbyeo was slightly higher than that of Hwashinbyeo except for the Fe amount between root and mature root. The translocated Fe amount at 15 days before between root and mature root was about 42 and 50 of Donganbyeo and Hwashinbyeo, respectively. it between culm and panicle was about 9 and 8.5 of Donganbyeo and Hwashinbyeo, respectively.

(6) In Donganbyeo, soluble protein contents of panicle at the harvesting stage

were about 0.58, 0.70, and 0.80 % with treatments of 0, 20, 40 $\mu\text{m Fe}$, respectively. They were about 0.32, 0.78, 0.50% in Hwashinbyeon.

Soluble protein contents were significantly different between cultivars and among Fe levels. Also, the interaction effect between cultivars and Fe treatments was statistically approved with the soluble protein content.

(7) Subunits of ferritin was detected to 21, 24, and 28 kDa in leaf tissues at 15 days before heading stages of two rice cultivars by treatment of iron. The subunits of ferritin detected from 21 to 28 kDa were found at the heading, 20 days after heading, and harvesting stages.

CONTENTS

Summary	-----	15
Contents	-----	20
Chapter 1	Introduction-----	24
Section 1	Research background-----	24
Section 2	Research objectives-----	31
Chapter 2	Current Research of Technology Development-----	32
Chapter 3	Contents and Results on Performance of Research and Development-----	34
Section 1	Isolation and characterization of genes related to iron uptake and translocation-----	34
Section 2	Development of transgenic rice plants by <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -----	56
Section 3	Iron uptake and translocation in rice plants-----	78
Chapter 4	Future Plan Due to the Results of Research and Development-----	123
Chapter 5	References-----	124

목 차

요 약 문	2
Summary	15
Contents	20
목 차	21
제 1 장 연구개발과제의 개요	24
1절 연구의 필요성	24
2절 연구개발 내용 및 범위	31
제 2 장 국내외 기술개발 현황	32
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	34
1절 철분흡수 관련 유전자의 분리 및 특성 연구	34
1. 서 론	34
2. 재료 및 방법	36
3. 결과 및 고찰	40
가. Nicotianamine synthase 유전자분리 및 구조해석	40
나. Citrate synthase 유전자분리 및 구조해석	46
다. NAS, CS 유전자의 벼 염색체상의 위치 확인	50
라. 벼 철분 저장능력이 큰 품종 선발	52

4. 결과 요약	54
2절 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 방법을 이용한 벼 형질전환체의 육성	56
1. 서론	56
2. 재료 및 방법	57
3. 결과 및 고찰	63
가. NAS, CS 유전자들의 식물 형질전환 벡터 구성	63
나. <i>Agrobacterium</i> 을 이용한 NAS, CS유전자의 형질전환	66
다. 형질전환계통의 선발 및 유전자들의 도입 확인	68
라. RT-PCR에 의한 형질전환체의 발현분석	70
마. 형질전환체의 발현량 분석	72
바. 형질전환체의 후대육성 및 농업특성조사	75
4. 결과 요약	76
3절 벼 식물체에서의 철분흡수 및 전류	78
1. 서론	78
2. 재료 및 방법	79
3. 결과 및 고찰	83
가. 철 농도별 주요 벼 품종의 성장반응	83
나. 철 농도별 주요 벼 품종의 수량 및 수량 구성 요소	88
다. 식물체내 철분 및 무기성분들의 함량과 흡수 이용량	91

라. Source-sink 간의 철 함량 및 전류량 분석-----	110
마. 단백질 함량 및 SDS-PAGE에 의한 철-단백질 분리-----	112
4. 결과 요약-----	120
제 4 장 연구개발결과의 활용계획-----	123
제 5 장 참고문헌-----	124

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 필요성

1. 기술적 측면

- 철의 생체항상성(homeostasis)의 정확한 조절은 세포의 원활한 기능을 위한 기초적 필요조건이다. WHO 통계(1992)에 의하면 철분결핍은 전세계 인구의 30%가량이 겪고 있는 영양결핍 문제로서 주로 채식을 하고 있는 후진국이나 유아, 임산부 및 가임 여성 등에 있어서 철분결핍은 매우 심각한 문제를 야기할 수 있다고 보고하였다.
- 철분(Fe^{2+})은 미량원소로서 적은 양이 필요하지만 인체에 있어서 헤모글로빈의 주성분으로서 성장 속도가 빠른 유아, 임산부 및 가임 여성 등에 있어서 결핍은 매우 심각한 문제를 야기할 수 있다. 벼를 주식으로 하고 있는 우리나라에서 쌀밥에서의 철분의 함량을 고려할 때에 임산부의 경우 20mg/day 정도의 철분이 필요하나 벼에서는 단지 0.4 mg/100g에 불과하므로 결핍현상이 초래되기 쉽다.
- 식물체내 미량원소의 흡수, 이용은 1) 뿌리에 의한 미량원소의 흡수, 2) 뿌리로부터 지상부로의 이동, 3) 저장기관으로의 부위별 재이동 및 저장과정에서의 효율성에 의하여 좌우되고 있다. 따라서 이러한 과정에서 일어나는 제반 생리적 반응들이 활성화되도록 유전자의 기능을 강화시키는 것이 궁극적으로 철분과 같은 미량원소의 흡수 및 저장에 매우 중요한 역할을 할 것이다.
- 토양내 철은 자연 pH하에서 용해도가 낮아 안정된 상태로 존재하고 있다. 대부분의 호기성 토양(aerobic soils)에서 자란 식물들에서 철분결핍의 주요 원인은 Fe(III)-oxides 의 불용성 때문이므로, 근권에서 뿌리와

미생물의 산화력이나 pH 변화는 식물 종들에 있어서 뿌리의 철분이용 정도에 크게 영향을 미친다 (Bienfait 1989; Moraghan and Mascagni 1991).

- o 식물에 있어서 철분의 흡수, 이동에는 3 가지 모델이 제시되고 있는데, Strategy I 에는 쌍자엽식물과 벼과 이외의 단자엽 식물이 속하여 뿌리 세포로 철분의 유입, organic acid, reductants 와 H^+ -ions 및 Fe^{3+} -chelate reductase 등으로 구성되며, Strategy II 에는 Poaceae 속 식물들이 속하며 뿌리 세포로 철분의 유입, phytometallophores의 방출 및 metal-phytometallophore 복합체의 유입 등으로 구성되고, Strategy III 에는 모든 고등식물들이 속하는데 microbial metallophore-metal 복합체로 구성되어 있다.

- o 모든 식물에서 nicotianamine synthase는 iron uptake mechanism에서 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 토마토에서 *chloronerva* mutant는 nicotianamine을 합성하지 못하므로 철분의 결핍을 초래하여 intercostal chlorosis를 일으킨다. 따라서 철분의 흡수를 위해서는 nicotianamine synthase 유전자의 작용을 필요로 한다 (Hong et al. 1999).

- o Gramineae를 제외한 모든 고등식물들은 strategy I 철분흡수 기구에 의하는 것으로 알려져 있다. 그 주요작용은 Fe^{3+} 의 용해도를 증가시키기 위하여 근권으로 H^+ 를 분출하는 것과 뿌리 표면에서 Fe^{3+} 를 Fe^{2+} 로 환원시키는 작용을 하는 root-specific iron reductase의 작용에 의하여 철분을 뿌리세포 내로 흡수하는 기작으로 이루어진다.

o Strategy I 종 (그림 1)에서 뿌리세포는 standard reductase system과 root-cell plasma membrane reductase의 두 종류의 Fe(III)-reductases를 포함하고 있는데, membrane-bound Fe(III)-reductases는 plasma membrane의 표면에서 작용을 하는 것으로서 이들 환원제의 활성이 철분의 이용성에 크게 영향을 미칠 수 있다.

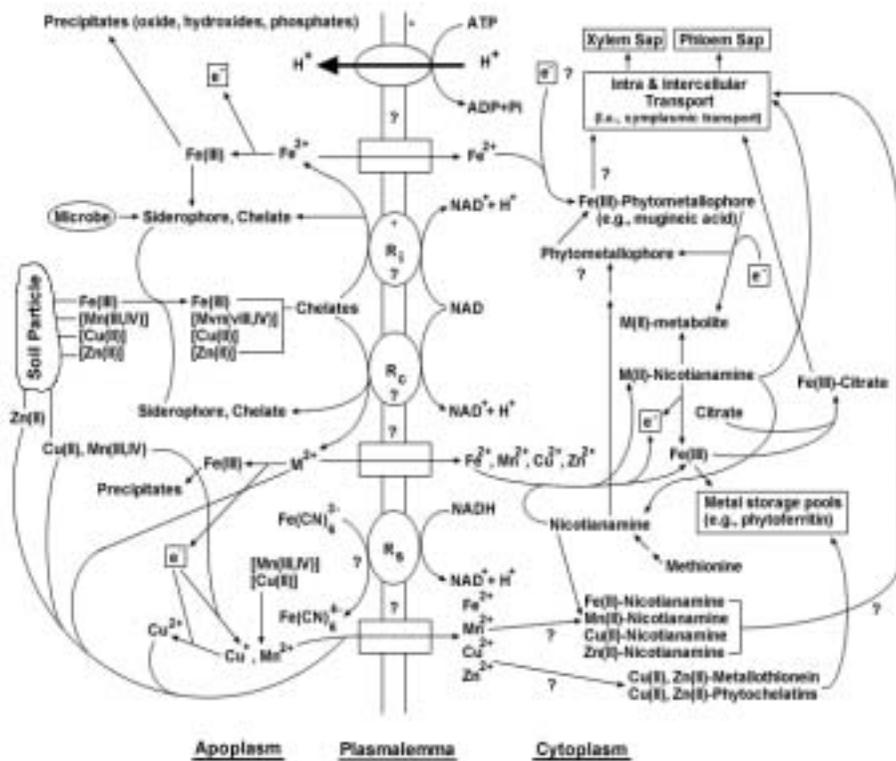


Figure 1. Micronutrient cation uptake model for dicotyledonous and nongrass monocotyledonous plants.

- o Strategy II 종 (그림 2)에서는 철분 결핍 조건에서 phytometallophore라고 불리는 low-molecular-weight compounds들이 뿌리세포들에 의하여 합성되는데 S-adenosyl-L-methionine (SAM)과 nicotianamine에 의하여 cellular methionine으로부터 합성되어지며, 이 물질들은 철분과 결합하여 고도로 안정한 hexadentate chelate를 형성한다.

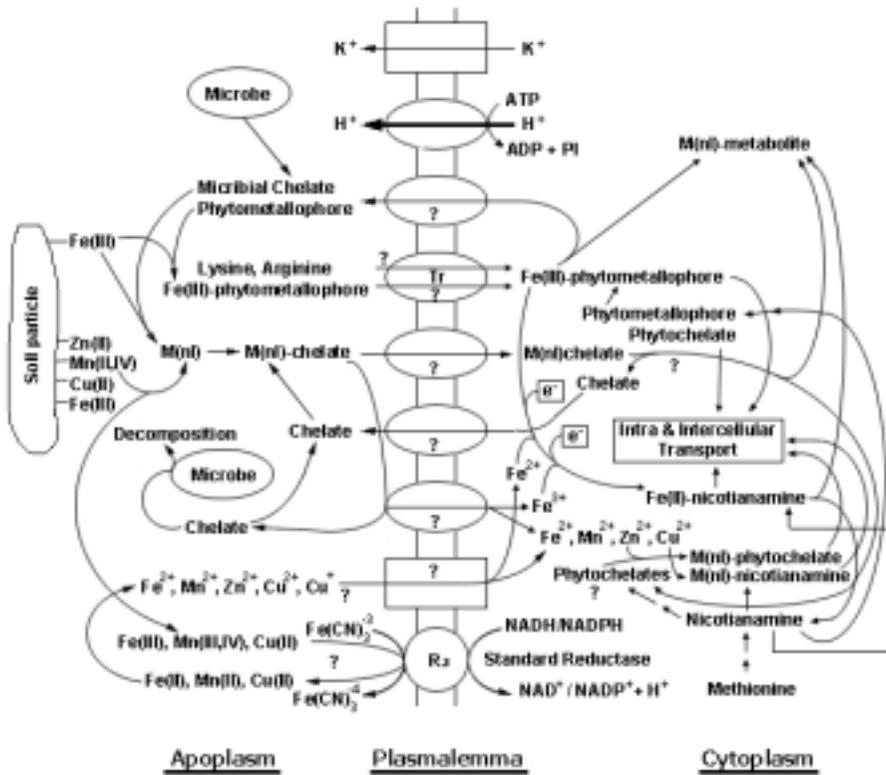


Figure 2. Micronutrient metal uptake model for grasses.

- o 식물 뿌리세포에 의하여 토양으로부터 Fe^{2+} 와 Zn^{2+} 이온들의 흡수는 뿌리세포 plasma membrane을 가로질러 존재하는 electrical chemical potential gradients에 의하여 이루어지는 것으로서 이것은 뿌리세포의 plasma membrane에 결합된 H^+ -translocating ATPase (ATP 가수분해시에 H^+ 이온을 강하게 공급해 주는 역할을 함)에 의하여 이루어진다 (Welch 1994).
- o 식물체내에서 ferritin은 철을 저장하는 단백질로 알려져 있다. 또한 ferritin은 분자량이 약 450kDa의 거대한 단백질로, 하나의 분자당 최고 4,500개의 철원자를 저장할 수 있는 것으로 동물 및 식물뿐만 아니라 거의 모든 생물에 넓게 존재하는 성분이다.
- o 따라서 뿌리에서 철분의 흡수 능력을 증대시키고 식물체내에 흡수된 철분을 xylem과 phloem을 통하여 철분의 이용기관 및 저장기관에 잘 전이 되도록 하기 위하여 Fe(III)-reductases와 citrate synthase 유전자를 벼에 형질전환시키고 철분을 저장하는 단백질인 ferritin 유전자를 저장기관인 벼 배유에 최대로 발현시킴으로써 고농도 철단백질 생산능력을 가진 벼 품종의 육성이 절실함.

2) 경제·산업적 측면

- o 벼 뿌리에서의 철분의 흡수 능력을 증진시키고 식물체내에 흡수된 철분의 이용효율을 높이는 한편, 저장기관에 ferritin 유전자를 도입하여 벼 종자 내에 철분의 함량이 높은 양질의 벼 품종을 개발하면 임신부가 밥을 해 먹음으로써 자연스럽게 철분을 흡수하여 태아에 영향을 주지 않게 되고, 또한 이유식 산업에서 이를 재료로 하여 천연의 철 성분이 강화된 유아용 이유식을 생산할 수 있으므로 유아들에게 천연의 철분을 안정적으로 공급할 수 있어서 국민 건강에 크게 기여할 수 있음.
- o 최근에는 국민소득이 높아지고 여성의 사회참여도가 확대되면서 식생활

양상이 고급화, 다양화, 간편화되고 있어서 쌀의 가공식품 수요가 확대되고 있으며, 특히 특정 영양성분이 강화된 양질의 농산물의 생산이 요구되고 있다.

- 우리나라의 벼 품종개량은 그 동안 밥쌀용 중심으로 추진되어 왔기 때문에 재배품종의 쌀외관이나 배유의 이화학적 특성 등 품질변이가 좁고 단순하다. 따라서 쌀가공 제품별 그 특성에 알맞은 품종이 없어 쌀가공 제품의 생산이 크게 제한을 받아 왔다.
- WTO 체제하의 농산물 수입개방은 벼 품종에도 완전 경쟁체제가 도래함을 의미하며 UPOV 가입과 지적재산권 보호의 강화, 및 최근 개정된 품종등록제 등으로 벼 품종생산에도 품종권 보호에 따른 로열티 문제가 제기될 것이므로 이에 대한 적극적 대처가 절실함.

3) 사회·문화적 측면

- 유전공학기법을 이용한 작물의 품종개량은 특정의 기능을 가진 품종을 단 시일에 육성하고자 할 때에 매우 효율적으로 적용되고 있다. 세계적으로 45 개국에서 유전공학기법을 이용하여 형질전환된 식물체들을 만들어 포장에서 실험을 하고 있으나 우리나라는 자체개발기술 및 유용한 유전자가 미흡한 실정으로 작물의 유용유전자에 대한 지적소유권 보호대책이 전무한 실정임.
- WTO 대응은 기술선진이 필수적이며 선진각국은 지적소유권 보호를 강화하여 개발기술 및 유전자를 보호하고 있는 추세에 있으므로 우리 고유의 유전자를 개발하고 이를 형질전환기술을 통하여 작물에 도입함으로써 특수 기능이 강화된 양질의 농산물을 다량으로 생산하여 특허화함으로써 지적소유권의 확보가 가능하며 농산물의 대외 경쟁력을 확보할 수 있다.
- 최근에는 벼 게놈연구를 통하여 연구수준이 많이 향상되었으나 아직도

그 기술수준이 단편적이어서 유전자분리에서 형질전환을 거쳐 새로운 품종으로 완전히 개발하는데 까지 체계적이고 집중적인 연구의 실용화가 미비한 실정임. 따라서 다양한 분야의 공동연구를 통하여 실용화 기술을 확보하고자함.

- 국제적 수준인 우리나라의 벼 육종기술에 분자생물학적 기술인 유전자분리 및 기능분석, 분자유전자지도 작성 기술, marker-assisted selection (MAS) 기술 등을 도입하여 작물육종 분야의 제도약의 발판을 세움.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 벼의 체내 철분대사에 철의 흡수능력을 증가시킬 목적으로 식물체내의 철분관련 기작을 분자생물학적 기법에 의해 유전자 발현을 증가시켜 기존 벼보다 더 많이 토양으로부터 철을 흡수 및 이용할 수 있는 새로운 type의 식물체를 육성하고자 수행하였으며, 이에 관련된 연구개발 내용은 표 1과 같다.

표 1. 연구개발 내용 및 범위

연구개발 내용	연구 범위
철분흡수 관련 유전자의 분리 및 특성 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ Nicotianamine synthase 유전자분리 및 구조해석 ○ Citrate synthase 유전자분리 및 구조해석 ○ NAS, CS 유전자의 상동성 분석 ○ 철분흡수, 전이 관여 유전자의 벼 염색체상의 위치 확인 ○ 벼 철분 저장능력이 큰 품종 선발
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 방법을 이용한 벼 형질전환체의 육성	<ul style="list-style-type: none"> ○ NAS, CS 유전자들의 형질전환 벡터 구성 ○ NAS, CS 유전자의 형질전환 ○ 형질전환계통 선발 및 유전자들의 도입확인 ○ RT-PCR에 의한 형질전환체의 발현분석 ○ 형질전환체의 발현량 분석 ○ 형질전환체의 농업특성조사
벼 식물체에서의 철분의 흡수 및 전류	<ul style="list-style-type: none"> ○ 철 농도별 주요 벼 품종의 생장반응 ○ 철 농도별 주요 벼 품종의 수량 및 수량구성요소 ○ 식물체내 철분의 저장, 이용, 전류양상분석 ○ 식물체내 철분 전류, ferritin-단백질 함량조사 ○ Source-Sink간의 철 함량 및 전류량 분석 ○ 엽록소 및 광합성능력 조사 ○ 철분흡수 및 전류량 및 전류율 조사 분석 ○ 벼 뿌리의 철분 흡수양상 및 흡수된 철분의 식물체내 이동기작 구명

제 2 장 국내외 기술개발 현황

o 저장기관 내의 철분함량 증가의 한계 - 일본의 Goto 등은 glutelin 유전자의 promoter인 *GluB-1* promoter를 사용하여 콩 ferritin 유전자를 벼에 형질전환한 결과, 형질전환 전에 종실 내에 철분함량이 14.3 mg이었던 것을 38.1 mg으로 증가시켜 2.6배의 철분함량 증가를 이루었다. 그러나, 실제 벼 종자내 glutelin 단백질은 총 단백질의 약 20% 정도로서 그 함량을 고려해 볼 때에 ferritin 단백질의 함량은 비슷한 수준으로 저장될 것으로 예측되었으나 예상에 훨씬 미치지 못하였다. 이는 뿌리에서의 철분의 절대 흡수량이 적었기 때문에 저장기관인 종실에 저장량이 적었던 것으로 생각된다. 따라서 ferritin 유전자를 벼에 형질전환하여 종실 내에 철분함량을 증대시키기 위해서는 Fe(III)-reductase인 nicotianamine synthase 유전자 및 citrate synthase 유전자를 벼에 형질전환시킴으로써 뿌리에서 철분의 흡수 능력을 증대시키고 식물체내에 흡수된 철분을 xylem과 phloem을 통하여 철분의 이용기관 및 저장기관에 잘 전이되도록 하여야 할 것으로 생각된다.

o Promoter 문제 - 유전공학의 가장 큰 관점은 유전자의 발현유도, 즉 개량하려고 하는 유전자를 적절한 시기와 부위에 발현시켜 목적하는 산물을 얻을 수 있어야 한다. 이는 promoter의 역할이며, 적절한 promoter의 사용이 최대의 관건이라고 할 수 있다. 일본의 Goto 등은 glutelin 유전자의 promoter인 *GluB-1* promoter를 사용하여 ferritin 유전자를 벼에 형질전환한 결과, 형질전환 전에 종실 내에 철분함량이 14.3 mg이었던 것을 38.1 mg으로 증가시켜 2.6배의 철분함량 증가를 이루었다. 그러나, 약 50%의 철분이 호분층에 발현되어 저장되기 때문에 건조된 종실내에는 효과를 볼 수 없었다. 따라서 건조된 종자의 배유내에서 발현할 수 있는 globulin 및 zein 단백질의 promoter를 사용하여 형질전환함으로써 철분의 저장 능력을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다. 그러나, 이들 promoter를 통해 증가시킬 양은 기존의 흡수기구를 갖는 식물에서 한계가 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 과제를 통하여 뿌리로부터 철분흡수 기작 내의 Fe³⁺ reductase

인 nicotianamine synthase 유전자의 도입을 통한 흡수능력을 부여할 수 있는 뿌리 특이적으로 발현하는 promoter와 흡수된 철을 citrate synthase 조작을 통해 Phloem으로의 철분의 pumping 능력 부여할 수 있는 stem 특이적인 promoter를 사용하여 형질전환한다면 sink(저장)능력을 높일 수 있는 source (철분흡수 및 전류)의 증대를 초래 할 것으로 사료된다. 따라서 철분흡수, 이용 기능이 강화된 벼 계통을 육성하여 종실에 철분저장 능력이 매우 높은 벼 품종을 개발하고자 한다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 철분흡수 관련 유전자의 분리 및 특성연구

1. 서론

철은 DNA 합성, 광합성, 호흡, 질소고정 및 세포내의 전자전달과정에 필수적으로 이용되는 미량원소이다. 따라서, fenton 반응에 의한 높은 hydroxyl radical 반응이 형성되기 때문에 cellular 혼합물에 의해 손상이 초래되며 이에 따라 과잉으로 축적되어진다. 철의 생체항상성(homeostasis)의 정확한 조절은 세포의 원활한 기능을 위한 기초적 필요조건이다. WHO 통계에 따르면 전 세계의 30억이 넘는 인구에서 철분이 부족한 음식을 섭취함에 의해 심각한 문제점으로 대두되고 있는 실정이다. 따라서 세계의 많은 연구자들은 고철함유 식물의 육성에 많은 노력을 하고 있으며, 식물의 부위에 따른 철함유정도가 달라 고 함유되어 있는 배유의 이용이 증가되고 있다. 토양내 철은 자연 pH하에서 용해도가 낮아 안정된 상태로 존재하고 있다. 식물은 토양내에 존재하는 철을 뿌리를 통해 uptake하는데, 이와 관련된 메카니즘은 식물군에 따라 두가지 전략으로 나누어진다. 쌍자엽과 벼 이외의 단자엽의 경우(strategy I), 많은 proton의 돌기와 황원효소범위 plasma membrane의 유도에 따라 Fe^{3+} 에서 Fe^{2+} 의 감소 때문에 토양층의 산성화가 증가되기 때문에 철의 흡수가 촉진된다. 그러나 벼의 경우(strategy II), 토양안에서 mugineic산 및 이들 합성물은 Fe^{2+} 이온의 chelator 처럼 작동하여 Fe^{3+} 복합체 같은 뿌리세포에 의해 흡수된다. 전략 1식물에서 NA는 symplast 내, 목질부 이동을 위한 구리의 이동 및 phloem이동에서 철의 chelator와 같은 기능을 하고 있다고 알려져 있다. 이들 현상은 전략2의 식물에서도 비슷한 역할을 하고 있다고 최근 NA chelate Fe^{3+} 과 Fe^{2+} 모두 증명되어 졌다. 이들 합성물은 부족한 fenton (시약)반응물, oxidative(산화)손상으로부터 세포를 보호하는 것도 NA가 역

할을 하고 있다고 암시하였다. 또한 strategy II 식물 NA는 mugineic acid 군의 phytosiderophore의 생합성을 위한 전구물질로 작용하고 있어 철 부족아래 NAS 활성은 전락1과 2식물에서 다르게 조절기능을 갖고 있다고 하였다. 그럼에도 불구하고, NAS는 전락1과 2 식물 모두에서 철 대사의 조절을 위해 매우 중요한 효소이다. NA의 부족을 나타내는 식물로서 철 대사상에 inhibition이 있는 토마토 돌연변이체는 어린잎에서 chlorosis가 엽맥 사이에서 나타나고, 뿌리와 shoot에서 철이 과잉으로 축적되며, pathway상에 존재하는 유전자의 발현양상이 정상형에 비해 매우 다른 양상을 보였다. 따라서 이와 같은 다면적 발현은 표현형에 의해 철 부족 증후군이라고 불리우고 있다. 이와 같은 돌연변이체에 외부로부터 철을 시용하면 정상형과 같은 표현형을 보인다. 따라서 철의 uptake 메커니즘은 multicellular 식물에서 규칙적이며, 다양한 경로에 의해 행해지고 있으며, 체내에 철을 인식할 수 있는 효소로는 nicotianamine synthase으로 인식되고 있다. 따라서 본 연구에서는 보리로부터 nicotianamine synthase 유전자를 RT-PCR 방법에 의해 분리하여 유전자의 구조를 분석하고자 한다.

Citrate synthase (CS)는 acetyl-CoA와 oxaloacetate로부터 citrate의 형성을 촉매하는 효소로서 mitochondria에 존재하고, TCA 회로상에서 가장 끝에 작용하는 것으로 알려져 있다 (oxaloacetate + acetyl-CoA → citrate + CoASH). 진핵생물에서 citrate synthase는 미토콘드리아와 glyoxysomes 내의 동위효소로 알려져 있으며, 분자량이 90kDa이며, 때로는 45kDa의 subunit의 분자량을 가진 동일한 크기의 dimer 이다. 또한 Mg²⁺의 존재하에서 식물 glyoxysomal citrate synthase는 tetramers를 형성한다. 그러나 대다수의 박테리아에서는 분자량이 280kDa 이상의 것들이 보고 되고 있다. CS 유전자 활성에 영향을 주는 많은 조절요인들로는 NADH, a-oxoglutarate, 5,5-dithi-obis-(2-nitrobenzoic acid), AMP, ATP, KCl 등으로 알려져 있다. 식물, 동물 및 fungi의 미토콘드리아 CS 효소들은 거의 유사한 진화과정을 통해 유전자의 상동성이 매우 높다. 그러나 식물의 glyoxysomal enzyme은 eubacterial 효소의 group으로 분류되거나 proteobacterial 이나 cyanobacterial과의 상동성은 거의 없는 실정이다. *Aspergillus niger*의 경우 특이적인 성장조건하에서 탄소근원으로 sucrose

나 glucose을 이용하여 성장배지에 첨가하면 고농도의 citric acid가 축적된다. 구연산생합성을 포함한 대사경로에서 citrate synthase(CS)가 구연산회로상의 key step으로 생각되어지는데 아마도 회로상의 첫 번째 단계가 무시되었기 때문으로 생각된다. 최근 citric acid 생산에 관련된 탄수화물대사가 많이 연구되어지고 있으며, 유전공학적 수법에 의해 생합성 경로를 이해하려는 시도가 다각적으로 연구되고 있다. 그러나, citrate synthase는 citric acid 생합성 경로에서 물질수송조절 기구에 대한 model은 아직 보고되고 있지 않다. 본 연구에서는 Yeast 유래 citrate synthase 관련 유전자를 clone화하여 유전자의 구조분석을 하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. Nicotianamine synthase 유전자의 분리 및 특성분석

식물재료 : 올보리, 서둔찰보리, 토마토, 추청벼의 종자를 70% 에탄올로 30초간 표면살균한 후, 몇 방울의 Tween 20액을 혼합시킨 1% 차염소산나트륨 (NaOCl) 용액에 20분간 침지 소독한 후, 멸균수로 6-7회 수세하여 무균적으로 발아한 후, 철이 걸땀된 MS배지에 치상하여 14일간 성장시켜 잎은 황백화현상이 나타났을 때 뿌리조직을 이용하였다.

RNA 분리 및 nicotianamine synthase 유전자의 분리 : 올보리, 서둔찰보리, 토마토 및 추청벼의 유묘 2g을 이용하여 Guanidine 방법 (Chirgwin 등 1979)으로 전 RNA를 추출한 후 oligo(dT)-칼럼에 의해 poly(A⁺) RNA를 조제하였다. Nicotianamine synthase 관련 유전자를 증폭하기 위해 사용된 primer는 기존에 보고된 유전자의 보존지역(conserved region) 및 Full length의 ATG codon과 TGA codon이 함유된 forward primer 및 reverse primer를 합성하여 사용하였다 (Table 1). PCR 반응에 사용한 Template는 mRNA를 역전사 반응시켜 cDNA로 만든 다음 이 cDNA를 주형 DNA로 하여, RT-PCR(reverse transcription PCR) 분석을 실시하였다. 먼저 조

제한 mRNA를 25°C에서 10분간 미리 반응을 실시한 후 42°C에서 30분간 역전사 반응시켰다. 99°C에서 5분간 다른 효소의 활성을 제거하고, 합성한 cDNA를 template로 하여 95°C에서 1분간 hot step, 95°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 4분간 extension의 과정을 1 cycle로 하여 35회 PCR 반응을 실시하였고, 1.5% 아가로스 겔 상에서 증폭된 밴드를 확인하고, 증폭산물을 TA cloning vector (Promega사)에 cloning한 뒤 염기서열을 분석하였다.

염기배열 및 상동성 분석 : TA cloning vector에 cloning한 DNA를 이용하여 유전자의 염기배열을 분석하였는데, 염기배열은 Green Gene biotech사에 의뢰하여 조사하였으며, 유전자 염기배열을 토대로 아미노산서열을 결정하여 유전자간 상동성을 비교하였다. 타 식물종의 유전자와 상동성의 비교는 인터넷을 이용한 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 분석에 의하여 실시하였다.

Semi-quantitative RT-PCR을 이용한 기관별 발현양상 분석 : 보리 유래 nicotianamine synthase 유전자의 발현 양상을 조사하기 위하여 보리의 조직(잎, 뿌리, 줄기, 꽃)을 이용하여 total RNA extraction kit (Promega사)로 RNA를 추출하였고 이를 template로 하여 RT-PCR 분석을 수행하였다. RT-PCR 분석은 위에서 행하였던 방법으로 하였으며, PCR 산물의 양적 발현양상의 분석은 densitometer를 사용하여 정량분석 하였다.

나. Citrate synthase 유전자의 분리 및 특성분석

식물재료 : 당근 및 담배 종자를 70% 에탄올로 30초간 표면살균한 후, 몇 방울의 Tween 20액을 혼합시킨 1% 차염소산나트륨(NaOCl) 용액에 20분간 침지 소독한 후, 멸균수로 6-7회 수세하여 MS배지에 치상하여 발아시킨 유묘를 이용하였다.

RNA 분리 및 citrate synthase 유전자의 분리 : 당근 및 담배의 유묘

2g을 이용하여 Guanidine방법 (Chirgwin 등 1979)으로 전 RNA를 추출한 후 oligo(dT)-칼럼에 의해 poly(A⁺) RNA를 조제하였다. Nicotianamine synthase 관련 유전자를 증폭하기 위해 사용된 primer는 기존에 보고된 유전자의 보존지역(conserved region) 및 Full length의 ATG codon과 TGA codon이 함유된 forward primer 및 reverse primer를 합성하여 사용하였다 (Table 2). PCR 반응에 사용한 template DNA는 mRNA를 역전사 반응시켜 cDNA로 만든 다음 이 cDNA를 주형 DNA로 하여, RT-PCR (reverse transcription PCR) 분석을 실시하였다. 먼저 조제한 mRNA를 25°C에서 10분간 미리 반응을 실시한 후 42°C에서 30분간 역전사 반응시켰다. 99°C에서 5분간 다른 효소의 활성을 제거하고, 합성한 cDNA를 template로 하여 95°C에서 1분간 hot step, 95°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 4분간 extension 과정을 1 cycle로 하여 35회 PCR 반응을 실시하였고, 1.5% 아가로스 겔 상에서 증폭된 밴드를 확인하고, 증폭 산물을 TA cloning vector (Promega사)에 cloning한 뒤 염기서열을 분석하였다.

염기배열 및 상동성 분석 : TA cloning vector에 cloning한 DNA를 이용하여 유전자의 염기배열은 Green Gene biotech사에 의뢰하여 조사하였으며, 유전자 염기배열을 토대로 아미노산서열을 결정하여 유전자간 상동성 비교는 인터넷을 이용한 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 분석에 의하여 실시하였다.

Yeast 유래 citrate synthase 유전자 : Yeast 유래 citrate synthase 유전자는 충남대학교 미생물학과 맹교수 연구실에서 plasmidtkdxo를 분양받아 개시코돈 및 종결코돈 부분의 primer를 합성하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 1분간 hot step, 95°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 4분간 extension 과정을 1 cycle로 하여 35회 PCR 반응을 실시하였고, 1.5% 아가로스 겔 상에서 증폭된 밴드를 확인하고, 증폭된 DNA를 TA cloning vector (Promega사)에 cloning한 뒤 염기서열을 분석하였다.

다. NAS, CS 유전자의 벼 염색체상의 위치 확인

Intercross 유전집단에서 nicotianamine synthase 및 citrate synthase 유전자의 염색체상 위치를 결정하기 위하여 밀양23호를 모본으로 하고 기호벼 부분으로 하여 교배 육성한 recombinant inbred 유전집단인 밀양23/기호벼 F11 집단 164 계통을 활용하여 작성된 기본 분자유전자지도를 이용하여 nicotianamine synthase 및 citrate synthase 유전자의 염색체상 위치를 조사하였다.

라. 벼 종자내 철분함량 분석

벼 알의 종피를 제거하고 현미를 유발에서 곱게 분쇄한 후 품종별로 0.5 gram을 취하여 농황산 5ml을 첨가하고, 시료와 황산을 잘 혼합 후, 24 시간 실온에 방치하였다. 분해시에는 분해를 촉진시키기 위하여 과산화수소를 조금씩 가하면서 시료가 맑고 투명하게될 때까지 4~5시간 동안 분해하였다. 분해가 완료된 분해액을 Whatman No.2 여과지를 이용하여 100 ml mass flask에 여과시킨 다음 100 ml로 부피를 맞춘 후 무기성분 분석용액으로 이용하였다. Fe 및 무기성분 분석시 0.45 μ M membrane filter를 통과시켜 ICP로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Nicotianamine synthase 유전자 분리 및 구조해석

1) Nicotianamine synthase (Fe^{3+} reductase) 유전자 및 구조해석

고등식물에서 Fe^{3+} reductase에 관여되는 효소는 nicotianamine synthase로서 모든 식물에서 철을 흡수하는데 관여하는 것으로 보고 되어 있다. 이 효소는 식물 뿌리 안에서 Fe^{3+} /phytosiderophore 복합체를 흡수하는 매개체로서 몇몇 식물군에서 유전자가 cloning되어 구조분석 및 기능이 알려져 있다. 따라서 본 실험에서 목적으로 하는 유전자인 nicotianamine synthase 유전자를 분리하기 위하여 기존에 알려진 유전자들의 coding region부위의 정보를 활용하여 primer를 디자인하여 올보리, 서든찰보리, 토마토, 추청벼의 유묘의 뿌리 유래 cDNA를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다.

NS II primer를 가지고 PCR을 수행한 결과 올보리에서는 예상되는 크기가 증폭하였으나, 단일 band로 나타나지 않았다 (Figure 1). NS II primer가 multi로 제작되어 일어난 현상이라 생각되어 PCR 증폭 DNA를 가지고 2차 PCR을 수행하여 확인한 결과 단일 primer에서는 목적 band가 증폭되지 않았다 (Figure 2). 따라서, 앞에서 증폭된 986bp의 단편을 Gene Clean Kit를 이용하여 gel로부터 재추출하여 PCR Cloning Kit에 의해 cloning하여 염기배열을 분석하였다. 분석된 clone은 NCBI의 BLAST 프로그램을 사용하여 homology 검색을 실시하였다. 분석결과 보리유래의 nicotianamine synthase 유전자의 DNA 염기서열은 986bp이며, 종결코돈을 포함하여 328개의 아미노산으로 구성되었다 (Figure 3). 이미 알려진 유전자들과의 아미노산 상동성을 비교한 결과 벼와는 87%, 옥수수와는 80%, 보리와는 99%의 상동성을 보였다 (Figure 4).

Table 1. Primers for amplification of nicotianamine synthase gene.

Primer Name		Sequence		
NS I	Forward	5'-	ATG GAT GCC CAG AAC AAG GAG GTC	-3'
	Reverse	5'-	TCA AAA GGC CAG CTC TTT GGC GGT	-3'
NS II	Forward	5'-	ATG GA/CT/C CAG AA/GC AAG/C G/AA	-3'
	Reverse	5'-	TCA G/AAA GGC CAC TTC C/GGC G/CTT	-3'

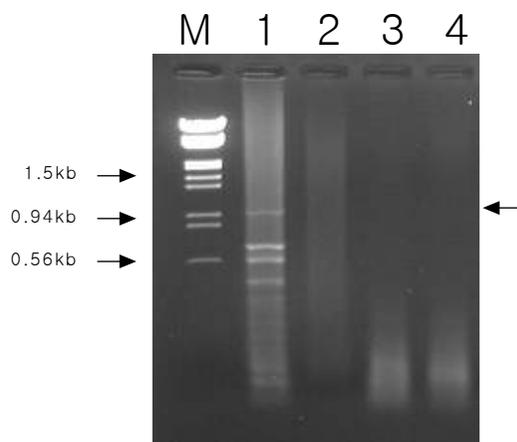


Figure 1. DNA band patterns amplified with NAS II by RT-PCR. 1 : Olbori, 2 : Seodunchalbori, 3 : tomato 4 : Chucheongbyeo

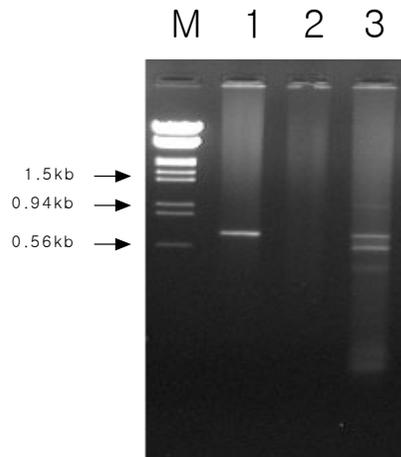


Figure 2. DNA band patterns amplified by RT-PCR with primers as follow, 1 : NSII Forward, 2 : NSII Reverse, 3 : NSII Forward+Reverse.

atggatgccagaacaaggaggtcgctgctctgatcgagaagatgccggtatccaggcc 60
M D A Q N K E V A A L I E K I A G I Q A
gccatcgccgagctgcccgtcgctgagcccgtccccgaggtcgacaggctcttcaccgac 120
A I A E L P S L S P S P E V D R L F T D
ctcgtcaaggcctgctgcccggagccccgtcgacgtgacgaagctcagccccggagcac 180
L V T A C V P P S P V D V T K L S P E H
cagaggatgccccgagctctcatccgcttgtgctccgccgccgaggggaagctcaggcg 240
Q R M R E A L I R L C S A A E G K L E A
cactacgccgacctgctgccaccttcgacaacccgctcgaccacctggcctcttccc 300
H Y A D L L A T F D N P L D H L G L F P
tactacagcaactacgtcaacctcagcaggctggagtacgagctcctggcgcgccactg 360
Y Y S N Y V N L S R L E Y E L L A R H V
ccgggatcgccggcgcgctgacctcgtcggtccggcccgtgccgttcagctcg 420
P G I A P A R V A F V G S G P L P F S S
ctcgtcctcgccgacccacctgcccagaccttcgacaactacgacctgtcgccg 480
L V L A A H H L P E T Q F D N Y D L C G
gcccgaacgagcgcgccaggaagctgttcggcgcgacggcggaacggcgtcggcgcgct 540
A A N E R A R K L F G A T A D G V G A R
atgtcgttccacacggcgagctgcccacctcaccaggagctcggcgcctacgactg 600
M S F H T A D V A D L T Q E L G A Y D V
gtcttctcgcgcgctcgtcgcatggcagccgaggagaaggccaaggtgattgccac 660
V F L A A L V G M A A E E K A K V I A H
ctggcgcgccacatggtggagggggcgtccctggctgctcggagcgcacggcccccgcc 720
L G A H M V E G A S L V V R S A R P R G
tttctttaccattgtcgacccggaggacatcaggcggggtgggttcgaggtgctggcc 780
F L Y P I V D P E D I R R G G F E V L A
gtgcaccaccggaaggtgaggtgatcaactctgtcatcgtcggcgttaaggccgtcgaa 840
V H H P E G E V I N S V I V A R K A V E
gcgagctcagtgggcgcgagaacggagacgacgcacggggcgcggtgcccgttggtc 900
A Q L S G P Q N G D A H A R G A V P L V
agcccccatgcaacttctccaccaagatggaggcgagcgcgcttgagaagagcgaggag 960
S P P C N F S T K M E A S A L E K S E E
ctgaccgccaagagctggccttttga 986
L T A K E L A F .

Figure 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of nicotianamine synthase gene isolated from *Hordeum vulgare*.

HNAS MDAQNKEVAALIEKIAGIQAAIAELPSLSPSPEVDRLFDTLVTACVPPSPVDVTKLSPEH 60
RNAS MEAQNQEVAALVEKIAGLHAAISKLPSLSPSAEVDALFTDLVTACVPASPVDVAKLGPEA

HNAS QRMREALIRLCSAAEGKLEAHYADLLATFDNPLDHLGLFPYYSNYVNLRSLEYELLARHV 120
RNAS QAMREELIRLCSAAEGHLEAHYADMLAAFDNPLDHLARFPYYGNYVNLKLEYDLLVRYV

HNAS PGIAPARVAFVGSGLPFSSVLAAHHLPETQFDNYDLCGAANERARKLFGATADGVGAR 180
RNAS PGIAPTRVAFVGSGLPFSSVLAAHHLPDVAVFDNYDRCGAANERARRLFRGADEGLGAR

HNAS MSFHTADVADLTQELGAYDVVFLAALVGMAAEEKAKVIAHLGAHMVEGASLVVRSAR-PR 240
RNAS MAFHTADVATLTGELGAYDVVFLAALVGMAAEEKAGVIAHLGAHMADGAALVVRTAHGAR

HNAS GFLYPIVDPEDIRRGGEVLAVHHPEGEVINSVIVARKAVEAQLSGPQNGD--AHARGAV 300
RNAS GFLYPIVDPEDVRRGGFDVLAVCHPEDEVINSVIVARKVGAAAAAARRDELADSRGVV

HNAS PLVSPPCNFSTKMEASALEKSEELTA-KELA 332
RNAS LPVVGPPST-CCKVEASAVEKAEFEFAANKELS

Figure 4. Comparison of the amino acid sequences of nicotianamine synthase. Deduced amino acid sequences for *Hordeum vulgare* was compared with the multiple alignment program CLUSTALW version 1.7. *RNAS*; nicotianamine synthase from rice (accession number AB023818).

2) 보리기관에서 nicotianamine synthase의 발현 양상

보리유래 nicotianamine synthase 유전자의 발현양상을 알아보기 위하여 semi-quantitative RT-PCR 방법을 사용하였다. 그 결과 Figure 5에 나타낸바와 같이 잎 및 꽃 조직에서는 발현되지 않았으나, 줄기 및 뿌리에서 발현되는 것을 볼 수 있었다. 특히 뿌리조직에서 강한 발현을 보이는 것으로 볼 때, 토양에서 철분을 흡수할 때에 nicotianamine synthase가 작용하고 있음을 시사하였다.

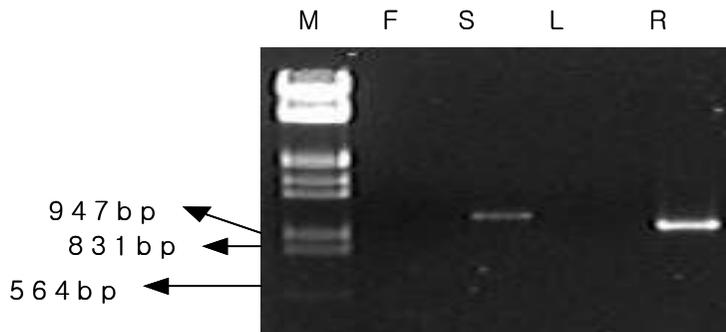


Figure 5. Expression analysis of nicotianamine synthase (NAS) gene in various *Hordeum vulgare* organ by semi-quantitative RT-PCR. M; Molecular marker, F; Flower tissue, S; L; leaf, R; Root.

나. Citrate synthase 유전자 분리 및 구조해석

1) Citrate synthase 유전자의 분리 및 구조분석

Citrate synthase 유전자는 당근, *Arabidopsis thaliana*와 담배 등에서 보고되어 있다. 따라서 본 실험에서 목적으로 하는 유전자인 citrate synthase 유전자를 cloning하기 위하여 기존에 알려진 유전자들의 coding region 부위의 정보를 활용하여 RT-PCR용 primer를 제작하여 (Table 2) 분석한 결과 full length용 CS I, CS II primer에서는 증폭산물을 얻을 수 없었다. 그러나 당근, *Arabidopsis thaliana*와 담배의 citrate synthase 유전자의 conserve region을 이용하여 CS III Primer에서 당근과 담배는 목적하는 증폭 산물을 얻었으나, *Arabidopsis thaliana*에서는 band가 출현되지 않았다 (Figure 6). 따라서 이들 산물의 염기배열을 조사한 결과 기존에 알려진 유전자들과 89%와 98%의 상동성을 보인 것을 미루어 볼 때 당근 및 담배유래의 citrate synthase임을 확인 할 수 있었다. 따라서 당근유래 full length DNA를 얻기 위하여 조사한 염기배열을 토대로 5' RACE용 primer 및 3' RACE용 primer를 합성하여 PCR 분석한 결과 당근유래 citrate synthase의 1,419bp의 DNA 염기서열을 얻었으며 이는 종지코돈을 포함하여 472개의 아미노산으로 구성되어 있었다 (Figure 7).

Table 2. Primers for isolation of citrate synthase gene by RT-PCR.

Primer Name		Sequence		
CS I	Forward	5'-	ATG GTG TTC TTT CGG ATG GTT T	-3'
	Reverse	5'-	TCA AAC TTA AGA AGA TTT	-3'
CS II	Forward	5'-	ATG GTG TTC TAT CGC GGC GTT TCT	-3'
	Reverse	5'-	TCA GTC TTT CTT GCA ATG GTT CTC	-3'
CS III	Forward	5'-	TGG GAA ACC TCT/A TTA CTT GAC C	-3'
	Reverse	5'-	GCT AAA CCA TTT AAT/A GCA GC	-3'

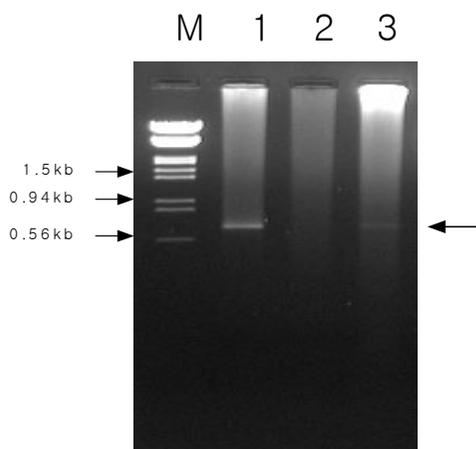


Figure 6. RT-PCR analysis for cloning of citrate synthase gene. M; molecular marker, 1: *Daucus carota*. 2: *Arabidopsis thaliana*, 3: Tobacco.

```

atgggtgtcttttcggagtggttctgctgcttaacaagctgcggctctcgggctgttcagcag 60
M V F F R S V S L L N K L R S R A V Q Q
tcgaacctcagtaatacagtgctgttggtttcaagtcgacacctcgccttctgatctcgat 120
S N L S N T V R W F Q V Q T S A S D L D
cttcgttctcaacttaaggagctgattccagaacagcaggagcgattaaaaaacttaa 180
L R S Q L K E L I P E Q Q E R I K K L K
gcagaacatgaaaggttcagctgggaaacataactgttgatgatgtacttggcggatg 240
A E H G K V Q L G N I T V D M V L G G M
agagggatgacaggacttctatgggaaacctctttacttgacccagaagagggaaattcgc 300
R G M T G L L W E T S L L D P E E G I R
tttaggggttgccataacctgaatgtcagaagctattaccaggagcgaagcccggtgga 360
F R G L S I P E C Q K L L P G A K P G G
gaaccattgcctgagggtctgctctggctcttttaactgaaaggtaccaactaaagag 420
E P L P E G L L W L L L T G K V P T K E
caagtagatgcattgtccgagagtgccaagtgcgtgctgtaccagagcattgtatac 480
Q V D A L S A E L R S R A A V P E H V Y
aaaaccatcgatgcttacctgttacagctcatccaatgactcaatttgaactgggtgc 540
K T I D A L P V T A H P M T Q F A T G V
atggccctccaggttcaaatgcaatcagaaggcatacagaaaagggttcacaaaaca 600
M A L Q V Q S E F Q K A Y E K G I H K T
aagtattggagccaacatgaggactctattactttaattgctcaattaccagttgta 660
K Y W E P T Y E D S I T L I A Q L P V V
gcagcttatatctatcgaggatgtacaagaatggacaaaagtatatccacggatgattct 720
A A Y I Y R R M Y K N G Q S I S T D D S
ctagattatggtgcaaaacttggccacatgcttggttacgatagtcaccagatgcaagag 780
L D Y G A N F A H M L G Y D S P S M Q E
cctatgaggctttacgttactatccatactgacctgaaggtggaacgttagtgcctcat 840
L M R L Y V T I H T D H E G G N V S A H
actggctcatctagttgcaagtgcctttcagacccatattcttcttttcagctgcatta 900
T G H L V A S A L S D P Y L S F A A A L
aatggtttagcagggcctcttcatggtttggcaaatcaggaagttttgttatggatcaag 960
N G L A G P L H G L A N Q E V L L W I K
tctgtggtttccgaatgcggagaaaatgtaactaaggaacaattgaaagattatctgg 1020
S V V S E C G E N V T K E Q L K D Y I W
aaaacattaaacagcgggaaggttggctcctggatattggacatggtgttctgcgtaacaca 1080
K T L N S G K V V P G Y G H G V L R N T
gatccaagatatactgtcagagagagtttgctttaaagcatttacctgatgatccactc 1140
D P R Y I C Q R E F A L K H L P D D P L
tttcaattggtttcaaacctctttgaagtggctcctctattcttacagaacttggcaag 1200
F Q L V S N L F E V V P P I L T E L G K
gtaaagaacccctggccaaatggtgatgccatagtggtgactgctgaatcattatggc 1260
V K N P W P N V D A H S G V L L N H Y G
ctaacagaagccagatattatactgttctctttggagtatcgaggccattgtattgt 1320
L T E A R Y Y T V L F G V S R A I G I C
tctcagctggtatgggacagagctcttggattaccacttgagaggccaaaaagtgttaca 1380
S Q L V W D R A L G L P L E R P K S V T
atggaatggcttgaaccactgcaagaatcttcttaa 1419
M E W L E N H C K K S S -

```

Figure 7. Nucleotide and deduced amino acid sequence of citrate synthase from *Daucus carota*.

2) *Saccharomyces cerevisiae* 유래 citrate synthase

Saccharomyces cerevisiae 유래 citrate synthase는 충남대학교 미생물학과 맹교수 연구실에서 분양받았다. *Saccharomyces cerevisiae*의 citrate synthase 유전자는 총 1,530bp로 종결코돈을 포함하여 509개의 아미노산으로 구성되어 있다 (Figure 8).

```

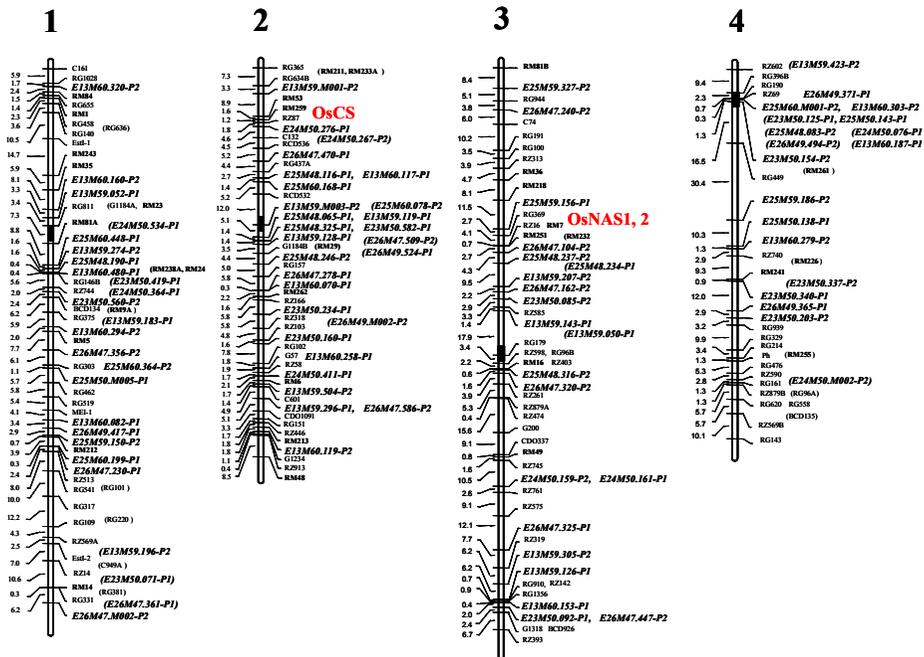
1  atggagatatacagagagaggttcgagctcgcattagctgttctctcagggtcatttatcggaa
   M E I S E R V R A R L A V L S G H L S E
61  ggaaaaacaggattctccagcgatcgcgagcgtggtgcacgctcggcggatacagagtgctgca
   G K Q D D S P A I E R W C T S A D T S V A
121  ccgcttggtatcttgaagggaacactgcgacgatcgtcgcgaaacggcaccggaaaaaatat
   P L G S L K G T L T I V D E R T G K N Y
181  aaagtccgggtctcagatgatgggtaccggttaaagcggttgatttcaaaaaagatagtgacg
   K V P V S D D G T V K A V D F K K I P V T
241  gggaaaggaagacaagggttaagtatacagatccagggttacttgaacacggctcctggtt
   G K E D K G L K L Y D P G Y L N T A P V
301  cgatcttcgatcttctacatcgatggagatgaagggatccttcgttaccgtggctaccca
   R S S I S Y I D G D E G I L R Y R G Y P
361  attgaggaaatggctgagaacagtaacttttctggagggtggcttatcttctcatgatggg
   I E E M A E N S T F L E V A Y L L M Y G
421  aatctgcctctgaaaagtcagctatctgattggggagtttgagtttctcagcattcagct
   N L P S E S Q L S D W E F A V S Q H S A
481  gtgccacaagggtgattagatattatacagctctatgcctcatgatgcacacccaatggga
   V P Q G V L D I I Q S M P H D A H P M G
541  gttcttgtgagtgcaatgagtgcgctttccatcttccatcctgatgctaactcctgctctt
   V L V S A M S A L S I F H P D A N P A L
601  agggccaggatatttacgattcaaaaacaagtttagagataaaacaaattatccgcattatt
   R G Q D I Y D S K Q V R R D K Q I I R I I
661  ggaaaggccaccaacaattgcagcagctgcttatctgaggatggcaggaaggcctcctggtt
   G K A P T I A A A A A Y L R M A G R I P V
721  ctctctcaggaaacctctcttatgcagataatttccctctatgatcttgattccctggga
   L P S G N L P Y A D N F L Y M L D S L G
781  aatagatcctacaaaacctaatcctcggctggctcgggtggtggacatcctcttatactg
   N R S Y K P N P R L A R V L D I L F I L
841  catgcagagcatgaaaatgaaactgctccaccgctgctcggcagtttgcctctagcgggt
   H A E H E M N C S T A A A R H L A S S G
901  gttgatgtctacactgctgttgctggagctgtgggagcgttatttggtccacttcatggt
   V D V Y T A V A G A V G A L Y G P L H G
961  ggtgcaaacgaggctgtgcttaagatggtgctcagagattgggactgtgaaaaatattcca
   G A N E A V L K M L S E I G T V E N I P
1021  gagttcattgaggggtggaagaacaggaaggaagatgctgggttttggacaccggtgtg
   E F I E G V K N R K R K M S G F G H R V
1081  tacaaaaactatgacctcgcagctaaaagtcataagaacctggctgatgaagtattttcc
   Y K N Y D P R A K V I K N L A D E V F S
1141  attgttggaaaggatcctctaatgaggttgctgttgcaactgagaaggcagctctctct
   I V G K D P L I E V A V A L E K A A L S
1201  gacgattactttgtaagagaaagctgtatccaaatggtgacttctactctggattaata
   D D Y F V K R K L Y P N V D F Y S G L I
1261  tacagggcaatgggatttccaccggagtttctcaccggtcttattcgcgattcctcgcgatg
   Y R A M G F P P E F F T V L F A I P R M
1321  gctggatacttgtcacattgaaaagagtcactggatgatcctgacaccaagatcatgaga
   A G Y L S H W K E S L D D P D T K I M R
1381  ccacaacaggtgtacacagcggtgtggctgaggcattacacaccagtgagagagagaata
   P Q Q V Y T G V W L R H Y T P V R I
1441  gtgacggatgactcgaagagtcagacaaaattgggtcaagtcgagcattcaaatgcatca
   V T D S K E S D K L G Q V A T S N A S
1501  agaagacggttggctggatcttcagtttag
   R R R L A G S S V .

```

Figure 8. Nucleotide and deduced amino acid sequences of citrate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*.

다. NAS, CS 유전자의 벼 염색체상의 위치 확인

Nicotianamine synthase 및 citrate synthase 유전자의 벼 염색체 위치 정보를 얻기 위하여 Cho et al. (TAG, 1998)이 밀양23/기호벼 F11 집단 164 계통의 RI 유전집단을 가지고 작성한 기본 분자유전자지도를 이용하여 (Figure 9) nicotianamine synthase와 citrate synthase 유전자의 벼 염색체상의 위치를 분자유전자지도에 작성하였다. 그 결과 Figure 9에 나타낸 바와 같이 nicotianamine synthase 유전자 OsNAS1과 OsNAS2는 벼 3번 염색체의 상부의 RM7 부근에 위치하였고 OsNAS3는 벼 7번 염색체의 말단 부위의 C213과 가까운 곳에 위치하였다. 한편, citrate synthase 유전자 OsCS는 벼 2번 염색체의 상부의 RZ87 부근과 11번 염색체의 동원체 부근의 RM21과 가까운 곳에 위치하는 것으로 분석되었다.



라. 벼 철분 저장능력이 큰 품종 선발

벼 철분의 저장능력이 큰 품종을 선발하고자 국내 장려품종들을 선정하여 종자내에 철분 함량의 변이를 분석한 결과는 Table 3과 같다.

종자내에 철 함량이 높은 품종들로는 진부벼 50.3 ppm, 낙동벼 46.6 ppm, 팔달벼 46.0 ppm, 밀양23호 40.0 ppm 등은 철분함량이 40% 이상으로서 철분함량이 낮은 품종들에 비하여 2배에 가까운 철분함량을 나타내었다. 철분함량이 낮은 품종들로는 일미벼 21.1 ppm, 서진벼 21.7 ppm, 금남벼 24.2 ppm, 화신벼 24.2 ppm, 계화벼 25.7 ppm, 추청벼 25.9 ppm 등으로 30 ppm 이하였다. 한편, 분석에 이용된 대부분의 품종들은 종실내의 철분함량이 30~40 ppm 범위를 나타내었다.

Table 3. Iron contents of grains in Korean rice varieties (unit:ppm).

Cultivar	Iron content	Cultivar	Iron content
Jodongji	37.3	Dongjinbyeo	30.9
Hwashinbyeo	24.2	Chucheongbyeo	25.9
Ilmibyeo	21.1	Hwaseongbyeo	30.3
Seojinbyeo	21.7	Janganbyeo	28.0
Hwasambyeo	29.7	Geahwabyeo	25.7
Nonganbyeo	31.8	Ilpumbyeo	27.6
Juanbyeo	38.5	Seoanbyeo	28.3
Ansanbyeo	37.5	Daeyabyeo	28.0
Donganbyeo	30.6	Hwanambyeo	26.4
Daesanbyeo	30.1	Daeanbyeo	27.1
Dasanbyeo	37.3	Gumnambyeo	24.2
Hwasunchalbyeo	37.0	Hyangmibyeo 2	38.6
Damagum	28.0	Yanjobyeo	31.4
Jungsangeunbangju	33.0	Daeripbyeo 1	30.6
Paldal	46.0	Odaebyeo	38.1
Jinheung	35.4	Gumobyeo	35.3
Nagdong	46.6	Gumobyeo 2	34.9
Tongil	37.9	Obongbyeo	31.4
Milyang 23	40.0	Jinmibyeo	34.1
Jungwonbyeo	34.3	Jinbubyeo	50.3
Yongmunbyeo	38.3	Junghwabyeo	35.3

4. 결과요약

- o 철분흡수 관련 유전자인 nicotianamine synthase 유전자를 분리하기 위하여 기존에 알려진 유전자들의 coding region 부위의 정보를 활용하여 primer를 디자인하여 올보리, 서둔찰보리, 토마토, 추청벼의 유묘의 뿌리 유래 cDNA를 이용하여 PCR 분석을 수행한 결과 보리유래의 nicotianamine synthase 유전자의 DNA 염기서열은 986bp이며, 종결코돈을 포함하여 328개의 아미노산으로 구성되었다. 이미 알려진 유전자들과의 아미노산 상동성을 비교한 결과 벼와는 87%, 옥수수와는 80%, 보리와는 99%의 상동성을 보였다.
- o 보리유래 nicotianamine synthase 유전자의 발현양상을 알아보기 위하여 semi-quantitative RT-PCR 방법을 사용하여 분석한 결과 줄기 및 뿌리에서 발현되는 것을 확인할 수 있었으며 특히 뿌리조직에서 강한 발현을 보였다.
- o 벼에서 물질의 이동에 관련된 유전자인 citrate synthase 유전자를 cloning하기 위하여 당근, *Arabidopsis thaliana*와 담배의 citrate synthase 유전자의 conserve region을 이용하여 제작한 Primer를 이용하여 RT-PCR에 의하여 당근유래 citrate synthase의 1,419bp의 DNA 염기서열을 얻었으며 이는 종결코돈을 포함하여 472개의 아미노산으로 구성되어 있었다.
- o Nicotianamine synthase 및 citrate synthase 유전자의 벼 염색체 위치 정보를 얻기 위하여 밀양23/기호벼 F11 RI 유전집단을 가지고 작성한 기본 분자유전자지도를 이용하여 nicotianamine synthase와 citrate synthase 유전자의 벼 염색체 상의 위치를 분자유전자지도에 작성한 결과 nicotianamine synthase 유전자 OsNAS1과 OsNAS2는 벼 3번 염색체의 상부의 RM7 부근에 위치하였고 OsNAS3는 벼 7번 염색체의 말단부위의 C213과 가까운 곳에 위치하였다. 한편, citrate synthase 유전

자 OsCS는 벼 2번 염색체의 상부의 RZ87 부근과 11번 염색체의 동원체 부근의 RM21과 가까운 곳에 위치하는 것으로 분석되었다.

- 벼 철분의 저장능력이 큰 품종을 선발하고자 국내 장려품종들을 선정하여 종자내에 철분 함량의 변이를 분석한 결과 철 함량이 높은 품종들로는 진부벼 50.3 ppm, 낙동벼 46.6 ppm, 팔달벼 46.0 ppm, 밀양23호 40.0 ppm 등은 철분함량이 40% 이상으로서 철분함량이 낮은 품종들에 비하여 2배에 가까운 철분함량을 나타내었다. 철분함량이 낮은 품종들로는 일미벼 21.1 ppm, 서진벼 21.7 ppm, 금남벼 24.2 ppm, 화신벼 24.2 ppm, 계화벼 25.7 ppm, 추청벼 25.9 ppm 등으로 30 ppm 이하였다. 한편, 분석에 이용된 대부분의 품종들은 종실내의 철분함량이 30~40 ppm 범위를 나타내었다.

제 2 절 *Agrobacterium tumefaciens* 방법을 이용한 벼 형질전환체 육성

1. 서 론

쌀을 주식으로 하는 우리나라의 경제 및 대외경쟁력을 고려할 때 고품질미의 육성이 최우선과제로서 기존의 우량 품종에 주동 및 미동유전자들을 도입한 고품질미의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 철분 결핍성 빈혈은 철분의 섭취량이 적거나, 철분 요구량이 증가하는 청소년기, 월경을 통한 철분 손실이 많은 성인 여성, 임신으로 인한 철분 요구량이 증가하는 임산부에서 빈번히 발생한다. 이러한 철분 부족 현상을 방지하기 위한 대책으로는 우선 약품 섭취가 가능하겠으나 개발도상국에서는 비용문제와 부실한 건강 보호 대책으로 인해서 어려운 실정이다. 또한 철분 함량이 높은 식물물을 섭취하는 방법이 있으나, oxalic acid와 phytate 등과 같은 물질로 인해서 생체 이용률이 낮으며, 수경재배와 토양을 개량함으로써 향상시킬 수 있으나 비용이 많이 들고, 식물체의 주요 이용 부위에 철을 집중적으로 축적하기가 어려운 단점이 있다. 토양내에 존재하는 Fe를 식물 뿌리로부터 흡수능력을 증진시키기 위하여 철흡수에 관련된 효소인 nicotianamine synthase의 개량하며 물질수송을 위해 citrate synthase의 개량이 필수적이다. 이들 유전자의 분리 및 구조 분석에 대해서는 앞장에서 서술되었다.

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 기술은 *Agrobacterium*이 식물의 상처 부위를 통해 DNA 일부(T-DNA)를 기주 식물의 핵내 DNA에 삽입함으로써 외래 유전자가 안정적으로 도입되는 특징이 있고, single-copy integration의 빈도가 높고 비용도 적게 드는 장점이 있다 (Hiei 등 1997). 하지만 *Agrobacterium*의 숙주범위는 주로 쌍자엽 식물이기 때문에 일부 식물종을 제외한 단자엽 식물에서는 이 형질전환법을 적용할 수 없는 것으로 알려져 왔다. 그러나 최근 벼 (Hiei 등 1994; Rashid 등 1996)와 옥수수 (Gould 등 1991; Shen 등 1993)와 같은 단자엽 식물에도 항생제 저항성 유

전자를 도입하여 형질전환 식물을 만들어 내었다.

*Agrobacterium*을 이용하여 식물의 영양 가치 증진과 병충해에 대한 저항성 증진(Shah 등 1997; Yuan과 Knauf 등 1997), 제초제 저항성 유전자(Choi 등 1996)와 내 바이러스성 유전자(Harrison 등 1987)등 유용 유전자의 도입을 통한 신품종의 육성, 약물의 생합성, 백신 생산 및 산업적으로 유용한 단백질의 생산 (Goddijn 과 Pen 등 1995; Haq 등 1995)과 같은 의약품 산업, 아미노산의 생합성 (Matthews 와 Hughes 1993)과 철분 (Goto 등 1999), 비타민 (Ye 등 2000)과 같은 영양적 가치를 높이기 위한 외래 유전자의 도입 등 다양한 분야의 연구가 활발하게 진행되고 있다.

형질전환법을 이용하여 외래 유전자를 식물에 도입한 후에는 도입 유전자가 안정적으로 발현되는 것이 가장 중요하다. Jones 등(1985)은 도입 유전자의 copy수와 발현 수준에는 연관성이 없다고 하였으며, Finnegan 등(1994)은 도입 유전자가 두 개 이상 존재할 경우에는 도입 유전자의 발현이 정지할 경우가 많다고 하였다. 그리고 Vain 등(1998)은 형질전환된 작물 중 50% 정도가 세대를 거듭함에 따라 도입 유전자의 발현수준이 떨어지거나 정지하는 경향을 나타낸다고 하였다. 이는 형질전환 식물체의 육성에 큰 걸림돌이 되어왔다.

본 연구에서는 벼의 체내 철분대사에 철의 흡수능력을 증가시킬 목적으로 식물체내의 철분관련 기작을 분자생물학적 수법에 의해 유전자 발현을 증가시켜 기존 벼보다 더 많이 토양으로부터 철의 흡수 및 이용할 수 있는 새로운 type의 식물체를 육성하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시품종 및 균주

종실내의 철분함량이 중간정도인 동안벼 품종의 종자를 MS기본배지에 2,4-D 2ppm을 넣은 callus 유도배지에 무균적으로 치상하여 callus를 유도하였고 이 callus를 형질전환용 공시재료로 사용하였다.

유전자의 형질전환에 사용한 균주는 PAL4404를 가진 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404를 Host strain으로 하고 형질전환 식물체를 선발할 수 있는 표지유전자를 Hygromycin(Hyg)를 Ti plasmid의 T-DNA border sequence 사이에 가진 구조이다.

나. NAS, CS 유전자들의 식물 형질전환 벡터 구성

NAS, CS 유전자들의 형질전환용 식물벡터는 GFP 및 GUS assay를 할 수 있는 vector인 KJGV-B2 및 KJGV-B3를 사용하였다. Promoter는 35S (KJGV-B2) 및 ubiquitin (KJGV-B3)을 이용하여 구축하였다. 이들 Vector는 hygromycin 저항성을 가진 유전자가 left border 옆에 존재하여, 감염 후 선발 마커로 사용할 수 있다. Clone화되어 있는 NAS 및 CS유전자를 blunt화하여 KJGV-B2 및 KJGV-B3 vector 내에 존재하는 *SmaI* site에 cloning하여 35S 및 ubiquitin promotor의 지배하에 발현되도록 하였으며, terminator로서 *Arbcs*를 사용하여 유전자 형질전환 벡터를 작성하였다 (Figure 1).

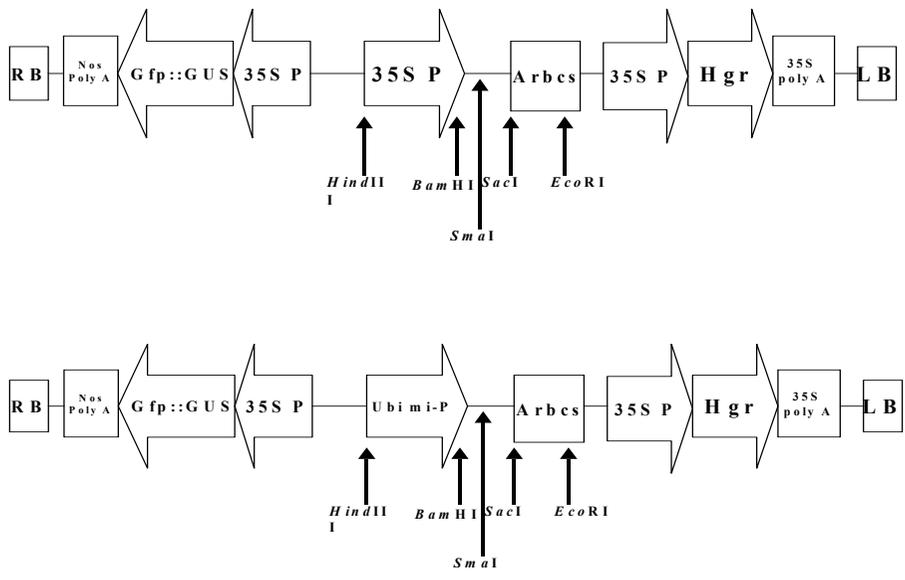


Figure 1. Ti-plasmid vector for construction of genes encoding nicotianamine synthase and citrate synthase in rice.

다. *Agrobacterium*을 이용한 NAS, CS 유전자의 형질전환

균주는 PAL4404를 가진 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404를 Host strain으로 하고 형질전환 식물체를 선발할 수 있는 표지유전자 Hygromycin(Hyg)을 Ti plasmid의 T-DNA border sequence 사이에 가진 균주를 사용하였다. 균주의 증식 및 계통유지를 위해서 Hygromycin (50mg/ℓ, Sigma)과 Carbenicilin (25mg/ℓ, Sigma)이 첨가된 LB 고체배지 (1% Bacto peptone 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl, 15g/ℓ Bacto agar)에서 한달 간격으로 계대배양하면서 (26±1℃, 암상태) 고체배지상에 형성된 single colony를 접종봉으로 취한 후 Kanamycin(50mg/ℓ)과 Carbenicilin (25mg/ℓ)을 함유한 LB 액체배지에서 120 rpm으로 24시간 현탁배양 하여 비의 캘러스와 co-cultivation 하였다.

종실내의 철분함량이 중간정도인 동안벼 품종의 종자를 MS기본배지에 2,4-D 2ppm을 넣은 callus 배지에 종자를 멸균 후 치상하여 callus를 유도하였으며, 이 callus를 형질전환용 공시재료로 사용하였다. 앞에서 서술한 바와 같이 cointegration system을 이용하여 형질전환 벡터를 구성, 도입된 *Agrobacterium*을 Acetosyringon을 넣은 배지액 중에 2일간 성장시켜 OD=1.0으로 조제한 현탁액 속에 5분간 침적시킨 후, 여분의 현탁액을 여지로 제거하여, 하룻밤 동안 감염시킨 후, Carbenicylin 500ppm을 첨가한 MS기본배지에 3분간 침적시켜, 여분의 *Agrobacterium*을 제거한 후, 선발배지 (MS 기본배지에 2,4-D 1ppm, 50mg/l Kanamycin과 100mg/l Carbenicylin, 2mg/l Acetosyringon을 함유한 배지)에 옮겼다. 이들 선발배지에서 분열된 callus를 재분화 배지에 옮겨 재분화를 유도하였다. 재분화된 식물체를 MS 기본배지에 옮겨 순화과정을 통해 얻어진 형질전환체를 이용하여 유전자 분석 및 교배모본으로 사용하였다.

라. 형질전환계통의 선발 및 유전자들의 도입 확인

재분화된 식물체에서 NAS, CS 유전자의 도입여부를 확인하기 위하여, 포트에 이식하기 전에 50mg~100mg의 잎을 채취하였다. 채취한 잎을

15ml tube에 넣고, 액화질소를 이용하여 곱게 마쇄한 후 DNA 추출용액 (200mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM NaCl, 25mM EDTA, Sodium bisulfate 0.38g/100ml) 1ml를 첨가하여 유봉으로 잘 혼합하였다. 다음으로 Chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 1ml를 첨가하여 10분간 흔들어 잘 혼합한 다음 3,500rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 분리한 후 동일 양의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1)을 첨가하여 10회 정도 흔들어 준 후, 12,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 1.5ml tube에 옮긴 다음 2 μ l의 RNase(10mg/L)를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 2/3~1 volume의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 응축시킨 다음 12,000rpm으로 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시킨 후, 70% 에탄올로 세척하여, 12,000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고 DNA를 풍건시킨 다음 70 μ l의 TE에 DNA를 녹여서 PCR 분석에 사용하였다. 추출한 DNA를 10~50배로 희석한 다음 시료당 20ng을 취하여 PCR 분석에 이용하였다.

PCR에 사용한 primer는 도입한 NAS 및 CS 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있도록 design한 primer들을 이용하였다. PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 hot step, 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 과정을 1 cycle로 하여 35 cycle을 수행하였고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 마지막 extension을 실시하여 증폭하였으며 1% agarose gel 상에서 유전자의 도입여부를 전기영동에 의하여 확인하였다.

마. RT-PCR 및 realtime PCR에 의한 발현분석

1) RT-PCR

Total RNA 10 μ g을 template로 하여 first strand cDNA는 SuperScriptTM II (Invitrogen, USA)를 이용하여 합성하였다. Second strand의 증폭은 NAS 및 CS primer, Taq polymerase(NEB)을 이용하여 GeneAmp PCR system (Perkin Elmer Applied Biosystem, USA)에서 통상의 방법으로 수행하였다. PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 predenaturation 시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분을 1

cycle로 하여 30 cycle을 수행하였고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시키도록 하였다. 최종 PCR 산물은 1% agarose gel상에서 전기영동으로 분리하여 ethidium bromide로 염색을 하여 확인하였다.

2) Realtime PCR

형질전환체의 발현량을 알기 위하여 probe는 5'말단에 FAM과 3'말단에 Tamra로 labelling(GENESET Singapore Biotech Pte Ltd.)하였으며, 도입한 유전자의 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set를 각각 합성하였다. 예상되는 증폭산물은 약 150bp로 TaqMan PCR을 사용하였다.

PCR 반응은 10mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 1U Taq polymerase (TAKARA EX Taq TM, Japan), 1X PCR buffer로 하였으며, TaqMan PCR은 Rotor-Gene(Rotor-Gene 2000 Corbett research, Australia)으로, PCR 조건은 95℃에서 2분간 predenaturation 시킨 후 94℃에서 15초, 60℃에서 1분간 extension을 1 cycle로 하여 45 cycle polymerization 하였다.

바. 형질전환체의 후대육성 및 농업특성조사

Nicotianamine synthase, citrate synthase 유전자 형질전환계통을 포장에 전개하여 수수, 영화수, 천립중, 등숙률 및 수량성 등을 비롯하여 초장, 간장, 수장 등 초형에 관련된 제반 농업 특성을 동진벼와 화진벼를 대조 품종으로 하여 조사하여 nicotianamine synthase, citrate synthase 유전자만 치환되고 다른 제반 특성들은 반복친과 동일한 새로운 품종을 선발하는 지표로 활용하고자 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. NAS, CS 유전자들의 식물 형질전환벡터 구성

Nicotianamine synthase와 citrate synthase 유전자를 식물체내로 도입하기 위하여 먼저 식물유전자 발현벡터 35S(KJGV-B2) 및 ubiquitin (KJGV-B3) (재료 및 방법의 기본 벡터 map) 내의 *SmaI* site에 NAS 및 CS 유전자를 삽입하기 위하여 full length cDNA는 pBluescript에 cloning 하였기 때문에 제한효소 *KpnI* 및 *EcoRI*으로 절단하여 Blunt 처리 (TAKARA)한 후 Geneclean Turbo kit로 재추출하였다. 또한 35S (KJGV-B2) 및 ubiquitin (KJGV-B3) promoter는 같은 vector 내의 *SmaI* site에 subcloning하여 promoter 및 유전자(NAS 및 CS)의 frame을 구축하였다. 유전자의 sense 및 antisense의 방향을 찾기 위하여 유전자내의 제한효소와 벡터내의 제한효소를 이용하여 cutting site의 크기에 의해 Sense 방향으로 삽입된 clone을 선발하였다 (Figure 2). 따라서 도입하는 유전자의 구성은 promoter로는 35S (KJGV-B2) 및 ubiquitin (KJGV-B3), terminator로는 Arbc의 지배하에 발현될 수 있도록 구축하였다(Figure 3). 구축한 vector는 DH5 α 균주에 heat shock 방법에 의해 형질전환 시켰으며, *Agrobacterium* LBA 4404 균주에 도입하기 위해서 helper 균주를 이용하여 도입, 확인하여 사용하였다.

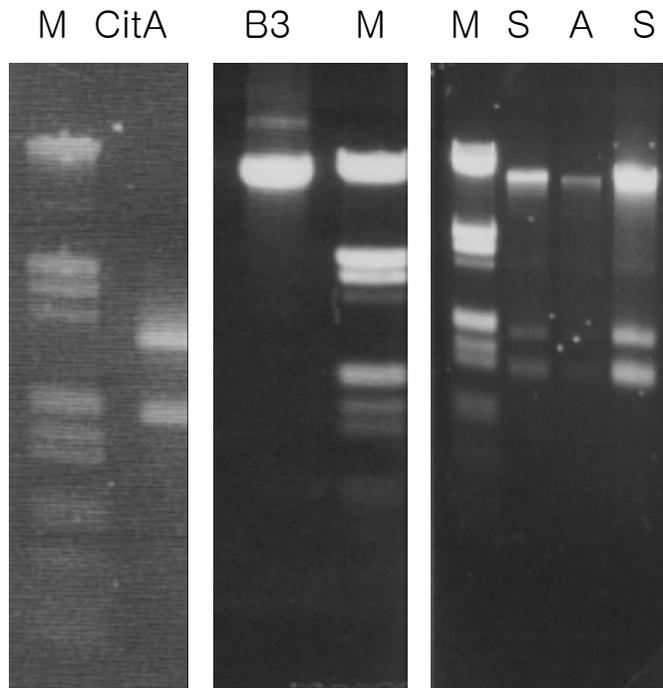


Figure 2. CitA gene, B3(Ti-plasmid vector) and sense(S), antisense(A) for vector construction

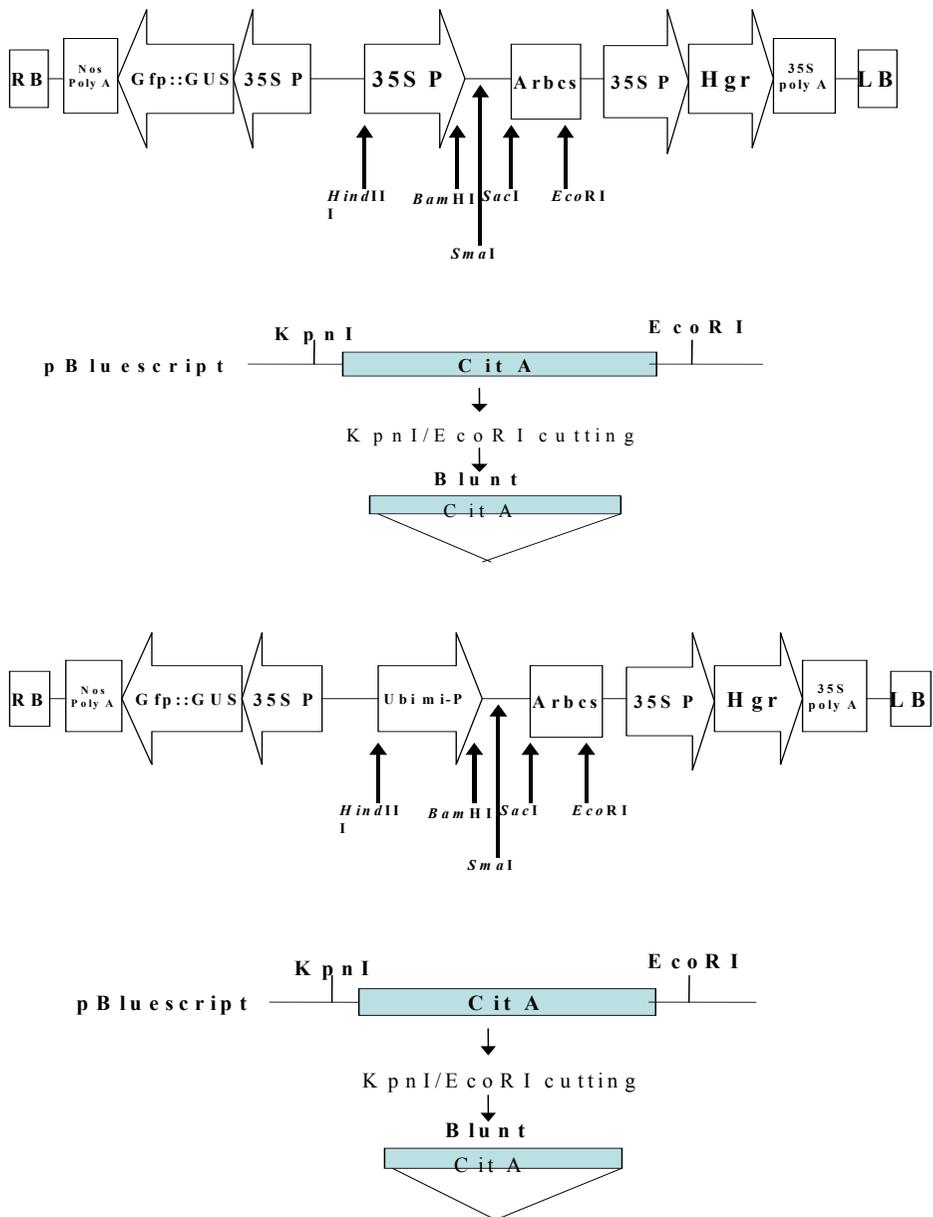


Figure 3. Vector construction of nicotianamine synthase(pNAS) and citrate synthase(pCS) genes by using ³⁵S (KJGV-B2) and ubiquitin (KJGV-B3) promoter.

나. *Agrobacterium*을 이용한 NAS 및 CS 유전자의 형질전환

*Agrobacterium*을 이용하여 nicotianamine synthase(pNAS) 유전자와 citrate synthase(pCS) 유전자를 형질전환한 과정과 재분화 벼 식물체를 획득한 과정은 Figure 4와 같다.

벼 종자 (동안벼, 화신벼) 300립을 1% 차염소산나트륨으로 소독한 후, 2,4-D 2ppm이 포함된 N6 배지에 파종하여 암 상태로 3주간 배양하여 callus를 유기하였다. 이들 callus를 이용하여 *Agrobacterium* 계통 LBA4404 및 EHA101 균주에 35S(KJGV-B2)-CitA-Arbcs와 ubiquitin (KJGV-B3)-CitA-Arbcs을 갖춘 형질전환용 벡터를 도입하여 감염시킨 결과 초기선발배지에서 치상한 callus 일부에서 새로운 callus의 증식이 관찰되었다. 저항성 callus의 출현과정을 살펴보면 배양초기에 N6배지에서 대부분 증식이 억제되고 갈변화하는 현상을 보이다가 배양 3주 후부터 갈변된 callus의 일부세포에서 연노랑색의 callus가 출현하면서 점차 빠른 속도로 증식되어 가는 특징을 갖고 있다. Hygromycin이 포함된 2N6-7-CP 선발배지에서 증식된 callus만을 선발하여 bialaphos 10mg/L이 포함된 MS 배지 상에 치상한 결과 배양 3주 후부터 embryogenic callus의 왕성한 생장을 보였으며, 5주 후부터 callus에 녹색의 반점이 보이기 시작하였으며 (Figure 4), 이들 callus를 MS기본배지에 옮겨 재분화를 유도하여 multishoot를 유기한 다음 이들을 분리하여 rooting배지에 옮겼다.

그리고 순화과정을 걸쳐 pot에 옮겨 자연광상태에서 성장시켜 후대를 육성하였다.

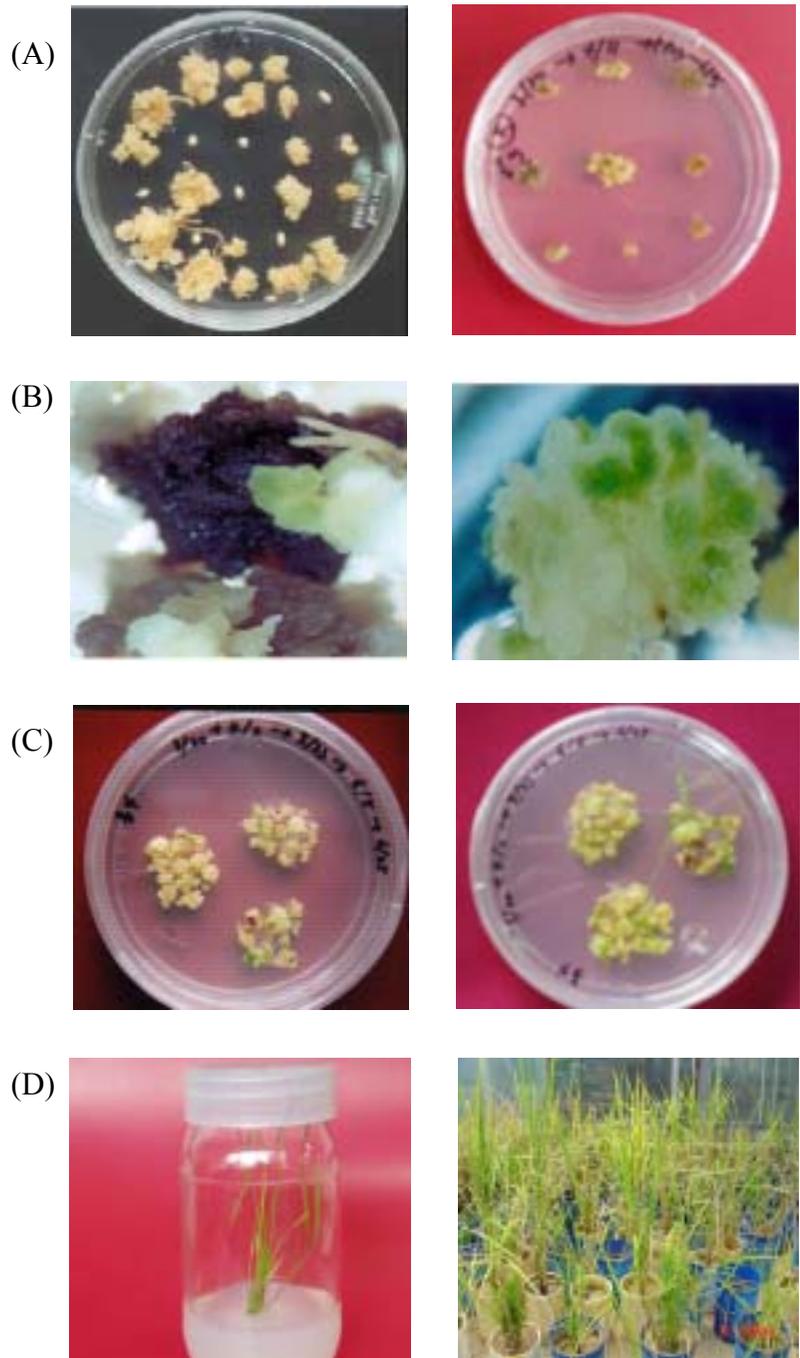


Figure 4. Callus induction and regeneration of rice embryogenic calli after transformation of pNAS and pCS genes. (A) Three-week old scutellum derived calli used for co-cultivation with *Agrobacterium*, and Hygromycin resistant cell lines proliferated on N6-7-CP medium containing hygromycin in 1 month after selection, (B) transformed embryogenic callus, (C) rice plants are regenerating from the embryogenic callus, (D) regenerated rice plants with pNAS and pCS gene, respectively.

다. 형질전환계통의 선발 및 유전자들의 도입확인

1) NAS 유전자의 도입확인

Nicotianamine synthase 유전자의 형질전환을 통해 얻어진 T0세대 식물체는 총 158개체로 온실에서 순화 후, pot로 이식하여 성장시켰다. 이들 식물을 대상으로 유전자의 도입 여부를 확인하기 위하여 잎조직을 사용하여 전 DNA를 추출 후, nicotianamine synthase 유전자의 특이 염기서열을 이용하여 primer를 합성하고 PCR 분석을 한 결과는 Figure 5와 같다.

형질전환된 식물체에서는 PCR 증폭에 의해서 예상 크기인 550bp의 밴드가 증폭되었으나, 형질전환되지 않은 식물체의 경우에는 밴드가 보이지 않았다. PCR 분석에 의해 형질전환체로 확인된 개체수는 150개체로써 품종 및 promoter별로 나누어 충북대학교 격리포장에 옮겨 후대육성 및 유전자 발현분석에 이용하였다.

2) CS 유전자의 도입확인

Citrate synthase 유전자의 형질전환을 통해 얻어진 T0세대 식물체는 총 22개체로 온실에서 순화 후, pot로 이식하여 성장시켰다. 이들 식물을 대상으로 유전자의 도입 여부를 확인하기 위하여 잎조직을 사용하여 전 DNA를 추출 후, citrate synthase 유전자의 특이 염기서열을 이용하여 primer를 합성하고 PCR 분석을 한 결과는 Figure 6과 같다.

형질전환된 식물체에서는 PCR 증폭에 의해서 예상 크기인 900bp의 밴드가 증폭되었으나, 형질전환되지 않은 식물체의 경우에는 밴드가 보이지 않았다. PCR 분석에 의해 형질전환체로 확인된 개체수는 13개체로써 품종 및 promoter별로 나누어 충북대학교 격리포장에 옮겨 후대육성 및 철분함량을 측정하는데 이용하였다.

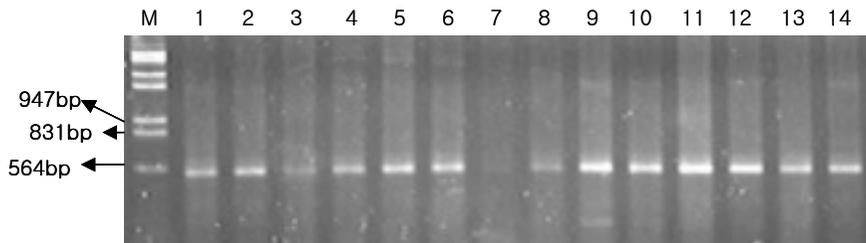


Figure 5. Amplification of nicotianamine synthase gene in putative transgenic rice plants with specific primers by PCR. M : Molecular weight marker, lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 : transgenic rice plants, lane 7 : non-transgenic rice plant.

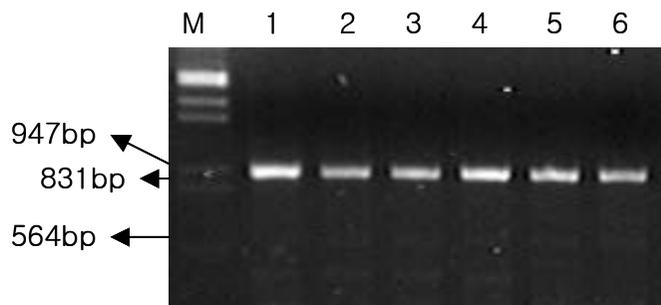


Figure 6. Amplification of citrate synthase gene in putative transgenic rice plants with specific primers by PCR. M : Molecular weight marker, lane 1, 2, 3, 4, 5, 6 : transgenic rice plants.

라. RT-PCR에 의한 형질전환체의 발현분석

1) NAS 도입 형질전환체의 발현분석

PCR 분석에 의하여 확인된 형질전환체를 대상으로 promoter에 따라 조직특이적으로 유전자의 발현양상을 알아보기 위해 promoter 별로 1개체씩을 선정하여 RT-PCR 분석을 수행한 결과는 Figure 7과 같다.

Nicotianamine synthase 유전자가 도입된 형질전환체로부터 잎을 시료로 사용하여 전 RNA를 추출하였다. 그 결과 형질전환 되지 않은 wild type에서는 nicotianamine synthase 유전자가 발현되지 않았으나, 형질전환체에서는 뚜렷하게 발현하고 있음을 보여주었다. 또한 promoter 간의 발현량은 35S-NAS, ubiquitin-NAS의 형질전환체에서 거의 유사하였으며, 조사한 형질전환체에서는 높은 양으로 발현하고 있음을 알 수 있었다.

2) CS 도입 형질전환체의 발현분석

PCR 분석에 의하여 확인된 형질전환체를 대상으로 promoter에 따라 조직특이적으로 유전자의 발현양상을 알아보기 위해 promoter 별로 1개체씩을 선정하여 RT-PCR 분석을 수행한 결과는 Figure 8과 같다.

Citrate synthase 유전자가 도입된 형질전환체로부터 잎을 시료로 사용하여 전 RNA를 추출하였다. 그 결과 형질전환 되지 않은 wild type에서는 citrate synthase 유전자가 발현되지 않았으나, 형질전환체에서는 뚜렷하게 발현하고 있음을 보여주었다.

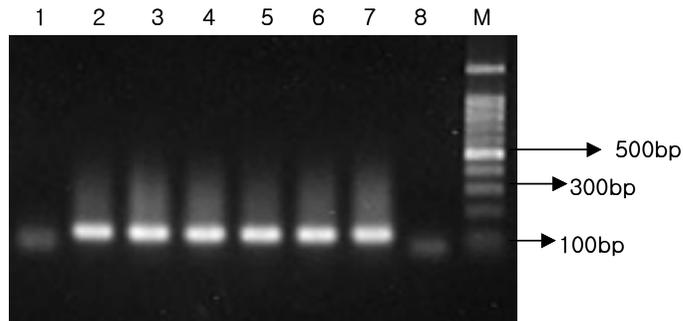


Figure 7. RT-PCR analysis in rice transgenic plants with specific primers derived from nicotianamine synthase gene. M ; molecular weight marker, Line 2, 3, 4, 5, 6, 7 ; transgenic plants, Line 1, 8 ; non-transgenic plant.

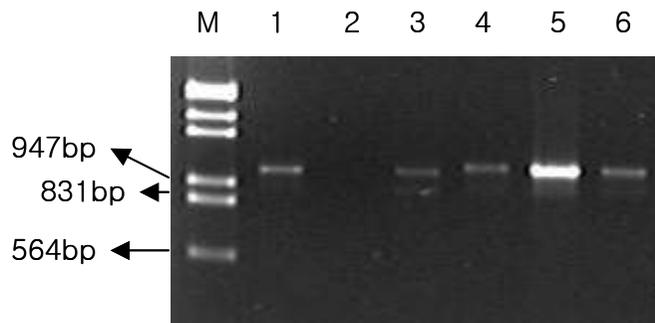


Figure 8. RT-PCR analysis in rice transgenic plants with specific primers derived from citrate synthase gene. M ; molecular weight marker, Line 1, 3, 4, 5, 6 ; transgenic plants, Line 2 ; non-transgenic plant.

마. 형질전환체의 발현량 분석

RT-PCR 분석에서 형질전환체가 mRNA로 안정적으로 전사되고 있는 것을 알았다. 따라서 이들 형질전환체가 어느 정도로 발현되는지를 알기 위해 realtime-PCR 방법에 의해 도입된 유전자의 세포내에서 발현량을 조사한 결과는 Figure 9 및 Table 1과 같다. NAS유전자가 도입된 형질전환체 lane 2-1, 3-1, 4-1 및 5-1의 4개의 sample을 분석한 결과 control에서는 발현되지 않았으나, 형질전환체에서는 안정적으로 발현하고 있음을 보여주었다. 특히 lane 3-1에서는 다른 형질전환체보다 훨씬 높은 발현량을 보였다. 또한 citrate synthase 유전자를 도입한 형질전환체에서도 NAS 유전자를 도입한 것과 유사한 결과를 얻을 수 있었으나 발현량에서는 훨씬 낮게 발현하고 있었다. 이런 결과는 CS 유전자의 발현량의 분석에서 잎을 사용하였기 때문이라고 생각되며, 줄기 등의 검토가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서 NAS 유전자가 뿌리 정단에 많이 발현되는 것으로 미루어 볼때 철을 흡수할 때에 효과적으로 작용할 가능성을 보여주었다.

Quantitation data for Cycling A.FAM/Sybr

StandardCurve

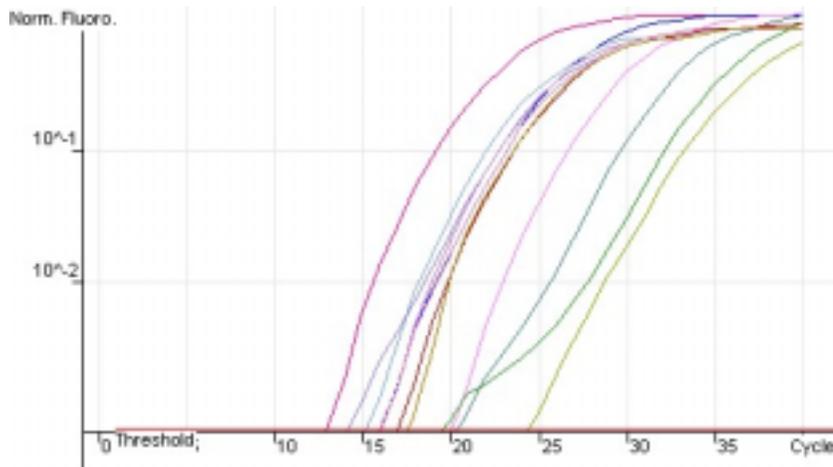
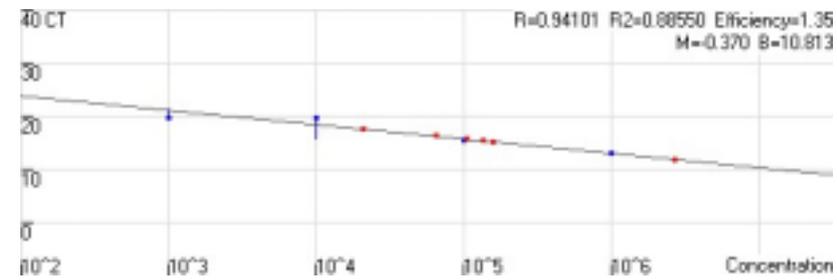


Figure 9. Amplification plots of *Theileria* standard DNA. The threshold cycle, number of amplification start, was monitored through probe fluorescence labeled.

Table 1. RNA calculate of realtime PCR analysis. Sample No. 2-1, 3-1, 4-1, 5-1: transformants of nicotianamine synthase gene, Sample No. 6-1, 6-2: transformants of citrate synthase gene.

No	Color	Name	Type	Given Conc. (copies/ul)	Calculated Conc. (copies/ul)	CV (%)	Ct	Ct Std Dev
2		Standard10-7	Standard	1,000,000	908,312	9.2	13.11	
4		Standard10-6	Standard	100,000	110,530	10.5	15.58	
6		Standard10-5	Standard	10,000	2,923	70.8	19.84	
8		Standard10-4	Standard	1,000	3,408	240.8	19.66	
9		negative	Negative Control				17.85	
16		2-1	Sample		155,461		15.18	
17		3-1	Sample		2,659,931		11.85	
18		4-1	Sample		105,017		15.64	
19		5-1	Sample		133,339		15.36	
20		6-1	Sample		64,041		16.22	
21		6-2	Sample		20,778		17.54	
22		Negative	Negative Control				18.98	

* This report generated by Rotor Gene Real Time Analysis Software (C) Corbett Research 2000(R)All Rights Reserved

바. 형질전환체의 후대육성 및 농업특성조사

벼 형질전환체들의 초기 생육상황을 비교한 결과 초장은 형질전환체에 따라서 많은 변이를 보였으며, 형질전환에 이용한 동안벼와 화신벼에 비하여 50%정도 감소한 왜성 식물체 및 이형 식물체의 출현도 보였다. 또한 분얼수에서도 상당한 영향을 보여 전혀 분얼을 보이지 않는 형질전환체도 출현하였다. 그러나 형질전환체 중에서 표현형적으로 대조품종과 거의 같은 식물체도 작출되었다. 이런 변이체들은 외래유전자의 도입에 따른 영향보다는 재분화 과정상에서 식물 호르몬 등의 영향을 받은 somaclonal variation 등의 유발에 의해 일어난 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 형태적으로 대조품종과 매우 유사한 형질전환체를 선발하여 후대계통 육성에 이용하였다.

4. 결과요약

o Nicotianamine synthase와 citrate synthase 유전자를 식물발현벡터 35S(KJGV-B2) 및 ubiquitin (KJGV-B3) 내의 *SmaI* site에 각각 삽입하여 구축하였다. 따라서 도입하는 유전자의 구성은 promoter로는 35S (KJGV-B2) 및 ubiquitin (KJGV-B3), terminator로는 *Arbcs*의 지배하에 발현될 수 있도록 구축하였다.

o *Agrobacterium*을 이용하여 nicotianamine synthase 유전자와 citrate synthase 유전자를 형질전환실험을 수행하여 재분화된 식물체는 Hygromycin이 포함된 2N6-7-CP 선발배지에서 증식된 callus만을 선발하여 bialaphos 10mg/L이 포함된 MS 배지 상에 치상한 결과 배양 3주후부터 embryogenic callus의 왕성한 성장을 보였으며, 5주 후부터 callus에 녹색의 반점이 보이기 시작하였으며, 이들 callus를 MS기본배지에 옮겨 재분화를 유도하여 multishoot를 유기한 다음 이들을 분리하여 rooting 배지에 옮겼다. 그리고 순화과정을 걸쳐 pot에 옮겨 자연광상태에서 성장시켜 후대를 육성하였다.

o Nicotianamine synthase 유전자의 형질전환을 통해 얻어진 T0세대 식물체는 총 158개체로 온실에서 순화 후, pot로 이식하여 성장시켰다. 이들 식물을 대상으로 유전자의 도입 여부를 확인하기 위하여 잎조직을 사용하여 전 DNA를 추출 후, nicotianamine synthase 유전자의 특이 염기서열을 이용하여 primer를 합성하고 PCR 분석을 한 결과는 PCR 증폭에 의해서 예상 크기인 550bp의 밴드가 증폭되었으나, 형질전환되지 않은 식물체의 경우에는 밴드가 보이지 않았다. PCR 분석에 의해 형질전환체로 확인된 개체수는 150개체이었다.

o Citrate synthase 유전자의 형질전환을 통해 얻어진 T0세대 식물체는 총 22개체로 온실에서 순화 후, pot로 이식하여 성장시켰다. 이들 식물을 대상으로 유전자의 도입 여부를 확인하기 위하여 잎조직을 사용하여 전

DNA를 추출 후, citrate synthase 유전자의 특이 염기서열을 이용하여 primer를 합성하고 PCR 분석을 한 결과는 예상 크기인 900bp의 증폭산물을 보인 것은 13개체이었다.

o RT-PCR에 의한 형질전환체의 발현분석에서 먼저 nicotianamine synthase 유전자가 도입된 형질전환체들에서 뚜렷하게 발현하고 있음을 보여주었다. 또한 promoter 간의 발현량은 35S-NAS, ubiquitin-NAS의 형질전환체에서 거의 유사하였으며, 조사한 형질전환체에서는 높은 양으로 발현하고 있음을 알 수 있었다. 또한, citrate synthase 유전자가 도입된 형질전환체에서도 wild type에서는 유전자가 발현되지 않았으나, 형질전환체에서는 뚜렷하게 발현하고 있음을 보여주었다.

o Realtime-PCR 방법에 의해 도입된 유전자의 세포내에서 발현량을 조사한 결과 NAS 유전자가 도입된 형질전환체 lane 2-1, 3-1, 4-1 및 5-1의 4 sample을 분석한 결과 control에서는 발현되지 않았으나, 형질전환체에서는 안정적으로 발현하고 있었음을 보여주었다. 특히 3-1에서는 다른 형질전환체보다 훨씬 높은 발현량을 보였다. 또한 citrate synthase 유전자를 도입한 형질전환체에서도 NAS 유전자가 도입된 것과 유사한 결과를 얻었으나 발현량에서는 훨씬 낮게 발현하고 있었다.

o 벼 형질전환체들의 초기 생육상황을 비교한 결과 초장은 형질전환체에 따라서 많은 변이를 보였으며, 형질전환에 이용한 동안벼에 비하여 50% 정도 감소한 왜성 식물체 및 이형 식물체의 출현도 보였다. 또한 분얼수에서도 상당한 영향을 보여 전혀 분얼을 보이지 않는 형질전환체도 출현하였다. 그러나 형질전환체 중에서 표현형적으로 대조품종과 거의 같은 식물체도 작출되었다. 이런 변이체들은 외래유전자의 도입에 따른 영향보다는 재분화 과정상에서 식물 호르몬 등의 영향을 받은 somaclonal variation 등의 유발에 의해 일어난 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 형태적으로 대조품종과 매우 유사한 형질전환체를 선발하여 후대계통 육성에 이용하였다.

제 3 절 벼 식물체에서의 철분흡수 및 전류

1. 서 론

철분은 식물영양학적인 면에서 미량원소이며 인체나 동물에서는 헤모글로빈, 미오글로빈의 구성성분으로 동식물의 생장 및 발달에 꼭 필요한 성분이다. 또한 철분은 산소의 이동과 저장에 관여하며, 미토콘드리아의 전자전달계에서 산화·환원과정에 작용하는 시토크롬계 효소의 구성성분으로 에너지 대사에 중요한 역할을 담당한다. 이외에도 과산화수소분해효소나 과산화효소, NADH 탈수소효소, 숙신산 탈수소효소와 같은 효소의 보조인자로 작용한다. 또한 신경전달물질(도파민, 에피네프린, 노르에피네프린, 세로토닌 등)이나 콜라겐 합성에 필요한 효소의 보조인자로도 작용한다. 이 밖에도 면역적 기능의 유지, 약물의 독성 제거 등에서 중요한 역할을 담당한다.

그 동안 알려진 철분 함량이 높은 작물로는 두류 및 진한 녹색 채소, 들깨, 벼, 곡류 등이 알려져 있으며, 콩은 12.5mg/100g, 들깨는 16mg/100g, 시금치 0.66mg/100g, 양송이 0.8mg/100g, 귀리 3.8mg/100g를 함유하고 있는 것으로 알려졌다.

벼의 철분 함량은 현미는 1.85mg/90g(생체), 백미는 1.05mg/90g(생체)로 다른 작물에 비해 매우 낮은 함량을 나타내지만, 주곡 작물로 일반적인 섭취량이 많기 때문에 철함량을 보다 높인다면 철분의 주요 공급원이 될 수 있을 것이다. 이런 이유로 콩의 철저장 단백질을 이용하여 천연 철 성분이 강화된 형질전환 벼에 대한 연구가 이루어지고 있는 것으로 알려졌다.

식물체는 ferritin과 ferredoxin의 형태로 철분을 저장하는 것으로 알려졌다는데, 이중 ferritin은 한 분자당 4,500개나 되는 다량의 철원자를 저장할 수 있는 능력이 있어 철이 관여하는 모든 식물체 대사 과정에 중요한 역할을 한다.

Ferritin 단백질에 대한 특성 연구가 콩과 호박, 알팔파 등에서 이루어지고 있으나 정작 주곡 작물인 벼에서는 그 특성이 아직 명확하게 이루어

지지 못한 실정이다.

따라서 본 실험에서는 동안벼와 화신벼, 그리고 형질전환체를 이용하여 수경액에서 재배하면서 주요생육시기 및 식물체 부위별로 철분 및 주요 무기성분과 단백질을 분석함으로써 철분의 벼 생육과 수량 및 수량구성요소에 대한 효과를 알아보고, 철과 무기성분들의 흡수 이용 및 전류 관계를 구명하고, 철과 단백질과의 연관성 그리고 나아가 ferritin 단백질의 분자량 등의 특성과 이에 미치는 철의 효과를 분석하여 천연 철 성분이 다량 함유된 고품질의 벼 육성을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시재료 및 재배방법

공시품종으로 동안벼와 화신벼를 공시하여 150g/육묘상자로 2001년 5월 26일에 파종하여 4-5엽령기까지 재배한 중묘를 묘생육이 일정한 것들로 골라 가로 55cm, 세로 35cm, 높이 15cm인 포트에 6주씩, 주당 3개체로 6월 14일에 이양하였으며, 이양 후 20일 후에 주당 1개체만을 남기고 모두 제거하여 포트당 6개체를 광조건이 동일한 충북대 유리온실에서 재배하였다. 수경액은 국제 미작 연구소 표준양액을 이용하였으며 철분의 농도만을 0ppm, 20ppm, 40ppm으로 달리 처리하였고, 수경액은 주 1회 교체하였다.

나. 주요 생육조사

벼의 초장은 각 처리구별로 10개체를 지정하여 이양 후 20일부터 이양 후 100일까지 주1회 조사하였다. 분얼수는 초장 조사와 동일한 개체를 조사하였으며 3엽 이상인 것을 대상으로 이양 후 63일까지 주 1회 조사하였다. 생체중은 처리구별로 3주를 3반복으로 하여 출수전 15일, 출수기, 출수 후 20일, 수확기 등 4시기에 시료를 채취하여 출수전 15일에는 식물체를 뿌리 성장점, 뿌리, 엽초, 성숙엽, 어린엽, 줄기로 분리하였으며, 출수기 이후에는 뿌리성장점, 그 외의 뿌리 부분, 엽신, 엽초, 줄기, 이삭으로 분리하여 개체당 각 부위별 생체중을 조사했는데 뿌리 성장점은 뿌리의 끝에서 3cm 부

위까지를 채취하였으며, 어린엽은 지엽을 포함하여 끝에서부터 3개엽을 지정하여 채취하였다. 건물중은 생체중과 동일하게 분리하여 78℃로 유지되는 열풍 건조기에서 48시간 동안 건조시킨 후 조사하였다. 광합성량은 출수 후 3일에 광도가 높은 11:00에서부터 2시까지 처리당 5반복으로 지엽을 측정하였다.

다. 시료 채취 및 수량 조사

단백질 시료의 채취는 출수 전 15일, 출수기, 출수 후 20일, 수확기 등 4시기에 부위별로 생체중을 조사 후 바로 비닐팩에 밀봉하여 -72℃의 저온 냉동고에 보관하였으며, sample의 채취 및 식물체 부위 분리간의 작업은 모두 얼음 위에서 실시하였다. 무기성분 분석을 위한 시료는 단백질 시료와 동일한 시기에 채취하였으며, 각 부위별 건물중 조사 후 믹서기를 이용하여 곱게 마쇄하고 시료통에 담아 수분이 들어가지 않도록 철저히 밀봉한 후에 무기분석에 이용할 때까지 4℃ 냉장고에서 보관하였다. 수량성 검정을 위해 수량구성요소로 이삭수, 이삭당 영화수, 등숙율, 천립중을 조사하였는데, 처리당 6개체를 선정하여 이삭수를 조사하였고, 1주당 3개의 이삭을 선정하여 이삭당 영화수, 등숙율, 천립중을 조사하였다.

라. 무기영양성분 분석

건조된 시료를 분쇄기를 이용하여 곱게 마쇄한 후, 시료 0.5g을 평량하여 100ml 삼각플라스크에 넣고 5ml의 황산을 첨가하여 12시간 동안 상온에서 방치 후 $H_2SO_4-H_2O_2$ 법으로 습식분해 하였다. 습식분해 후 Whatman No. 2. 여과지를 이용하여 증류수와 함께 여과시킨 후 100ml volumetric flask를 채우고, 이를 무기영양성분 분석용액으로 이용하였다. 질소는 Indophenol blue법을 이용하여 Spectro-photometer(HP 8453)로 665nm에서 비색 측정하였고, 인산은 Vanadate법을 이용하여 420nm에서 비색 측정하였으며 철분, 칼륨, 마그네슘, 칼슘은 ICP(Inductive Coupled Plasma spectrophotometer ; JOBIN-YVON)를 이용하여 측정하였다.

마. 단백질 함량 및 분리

1) 시료의 조제

(가) 수용성 단백질

식물체 500mg을 액화질소를 이용하여 마쇄 후 추출용액 (50mM Tris-HCl, 5% 2-mercapto EtOH, 10% Sucrose, 1mM EDTA, 5% SDS, 1mM PMSF, 1 μ M Pepstatin, 0.01% Bathophenanthroline; pH 8.0)을 1ml를 첨가하여, 얼음 위에서 1시간 정도 균질화한 후 14,000 rpm에서 10분간 2회 원심분리하여 상등액을 채취하고 이를 soluble protein sample로 사용하였다.

2) 단백질 정량

단백질의 Assay는 Bradford method (1974)에 근거하여 BSA (bovine serum albumin)를 1mg, 10mg, 25mg, 50mg, 100mg으로 한 각 표준 용액 200 μ l에 염색시약 (Bio-Rad, Cadalog 500-0006) 100 μ l와 증류수 2ml를 혼합하여 5분간 상온에서 방치한 후 분광도계(HP 8453)로 595nm에서 비색 측정하여 단백질 정량 표준으로 설정하였으며, 단백질 sample은 같은 처리에 의해 측정하였다.

3) SDS-PAGE 전기영동법

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)는 Laemmli의 방법에 의거 12% Polyacrylamide gel상에서 전기영동을 실시하였다. 12% Polyacrylamide gel의 조성은 아래와 같다.

Running gel	Stacking gel
<ul style="list-style-type: none"> ○ 12% acrylamide-0.1% Bis acrylamide ○ 0.375M Tris-HCl(pH 8.8) ○ 0.1% SDS ○ TEMED(20μl/50ml gel) ○ 0.075% Ammonium persulfate ○ dH₂O 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 5% acrylamide-0.13% Bis acrylamide ○ 0.125M Tris-HCl(pH 6.8) ○ 0.1% SDS ○ TEMED(20μl/50ml gel) ○ 0.075% Ammonium persulfate ○ dH₂O

Sample buffer로 Laemmli buffer (4% SDS, 20% glycine, 10% 2-mercapto EtOH, 0.004% bromophenol blue and 125mM Tris HCl, pH 6.8)를 사용하여 위에서 준비한 시료와 1:1로 섞고 끓는 물에서 5분간 진탕한 후에 전기영동을 실시하였다. 단, insoluble protein은 진탕하지 않았다. 각각의 well당 loading량은 protein standard는 20 μ l, sample은 80 μ l, 빈 Well에는 Laemmli buffer 80 μ l를 넣었다. Running buffer는 0.192M Glycine, 25mM Tris/HCl, pH 8.3으로 하였으며, 0.1% SDS를 포함하는 용액을 이용하였다. Running 시간은 20mA로 대략 6시간 정도로 tracing dye가 gel의 밑부분에서 1cm정도 위까지 내려오도록 실시하였다.

4) 염색 및 탈색

전기영동이 끝난 후 gel을 분리하고, 염색액 (1% Coomassie Brilliant blue R-250, 25% Isopropanol, 10% Acetic acid)을 사용하여 1시간 정도 염색을 하고, 탈색액 (10% ethanol, 10% acetic acid, 80% Distilled water)을 넣고 1시간 정도 탈색한 후에 다시 100%-MeOH로 10분간 2-3 번 반복해서 탈색하고 증류수에 넣어 하루 동안 방치한 후 밴드를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 철 농도별 주요 벼 품종의 생장반응

1) 초장

철분처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 생육에 따른 초장의 변화는 Figure 1과 같다.

동안벼와 화신벼 모두 이앙 후 76일까지 지속적인 증가를 보였다. 이앙 후 41일까지의 초장의 변화는 동안벼와 화신벼 공히 철분 무처리구에 비해 철분처리구에서 초장이 컸으며, 그 크기는 동안벼는 40, 20, 0ppm 순으로 컸으며 이와 반대로 이앙 후 41일 이후에는 철분 처리 농도가 높을수록 초장의 길이가 짧았으며 동안벼와 화신벼 모두 0, 20, 40ppm 처리순으로 크게 나타났다.

2) 분얼수

철분 처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 생육에 따른 분얼수의 변화는 Figure 2와 같다. 분얼은 동안벼는 이앙 후 62일까지 지속적인 증가를 보였고, 화신벼는 이앙 후 41일까지 지속적인 증가를 보이다가 이후 일정한 수준을 유지하였다. 생육 초기인 이앙 후 30일까지는 동안벼가 화신벼에 비해 많은 분얼수를 나타내었으나 생육 후기로 갈수록 화신벼의 분얼수가 많게 나타났다. 또한 최고분얼에 이르는 시기가 동안벼에 비해 화신벼가 빨랐다.

철분 처리구별로 동안벼는 생육초기에는 20, 0, 40ppm 순으로 많았으며 이앙 후 40일이 지나서는 철분 무처리구 보다도 40ppm 처리구가 분얼의 수가 적었다. 화신벼에서는 이앙 후 62일까지 20, 0, 40ppm 순으로 많게 나타났다. 위의 결과로 보아 철분의 처리는 분얼에 대해서 식물체내 철분 함량이 낮은 화신벼에 비해 식물체내 철분 함량이 높은 동안벼에서 더 크게 영향을 끼치며 철분농도가 지나치게 높으면 오히려 분얼의 감소를 초래함을 보였다.

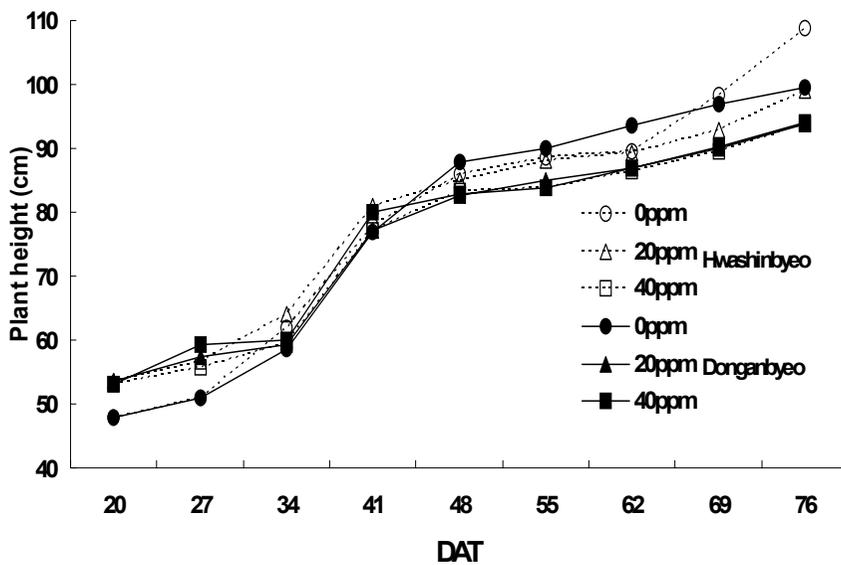


Figure 1. Plant height of Donganbyeo and Hwashinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels. (DAT: Day after transplanting).

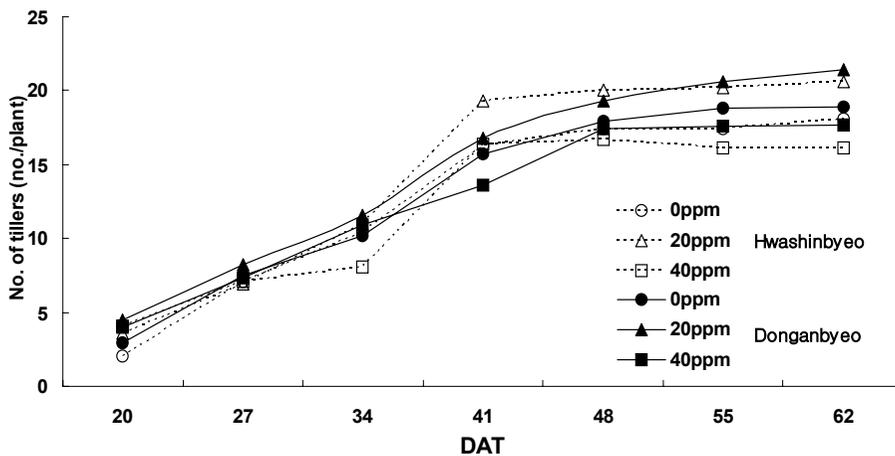


Figure 2. Number of tiller of Donganbyeo and Hwashinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels. (DAT: Day after transplanting).

3) 생체중과 건물중

철분 처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 생육에 따른 생체중 및 건물중의 변화는 Figure 3과 같다. 동안벼와 화신벼 공히 건물중이 계속적인 증가를 보인데 반하여 생체중은 출수 전 15일에서 수확기까지 큰 차이를 보이지 않았다. 동안벼의 경우 20ppm 처리구가 수확기에 건물중 55g/plant, 생체중 150g/plant로 가장 높게 나타났으며 건물중과 생체중 모두에서 철농도 처리 20, 0, 40ppm 순으로 컸으며 건물중은 철처리 농도 0ppm, 20ppm에 비해 40ppm의 무게가 현저하게 적으며 그 크기는 대략 15g/plant 정도를 보였다. 화신벼에서는 출수 전 15일을 거쳐 출수기까지는 철분 처리농도가 낮을수록 건물중과 생체중은 컸으며 출수기 이후에는 철농도 처리 20, 40, 0ppm 순으로 건물중 및 생체중의 크기가 컸다. 또한 화신벼는 동안벼와 달리 등숙기에 생체중이 약간 증가하다가 다시 수확기에 감소하는 경향을 나타내었고, 철분처리농도 20ppm에서 35.4g/plant로 가장 높게 나타났다. 동안벼에서는 앞의 생육조사와 마찬가지로 철분시용이 과다하면 오히려 생체중 및 건물중이 크게 감소하는 경향을 볼 수 있었다.

철분 처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 생육에 따른 건물중 S/R률의 변화는 Figure 4와 같다. 동안벼와 화신벼 모두 출수기에서 출수 후 20일 사이에 크게 증가함을 보이고 수확기에 다시 일정 수준을 이루거나 무처리에서 처럼 감소하는 경향을 보인다. 동안벼는 출수 전 15일에는 40, 0, 20ppm 순으로 높게 나타났으며 출수기, 출수 후 20일을 거치는 동안 0, 40, 20ppm 순으로 높았고, 최종적으로 수확기 때에는 20, 40, 0ppm 순으로 높게 나타났다. 이에 반해 화신벼는 전 생육시기에 걸쳐 40, 20, 0ppm 순으로 나타났으며 철분 처리농도 40ppm 처리구가 20ppm과 0ppm에 비해 현저하게 높게 나타났다. 동안벼는 높은 철농도 수준에서도 뿌리생장이 원만하여 상대적으로 낮은 S/R률을 보인 반면, 화신벼는 높은 철농도시 뿌리생장이 매우 저조하여 S/R률이 높게 나타난 것으로 판단됐다.

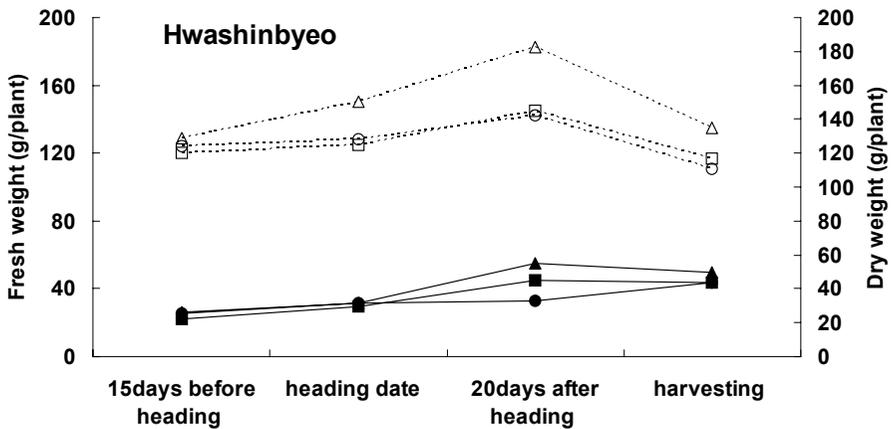
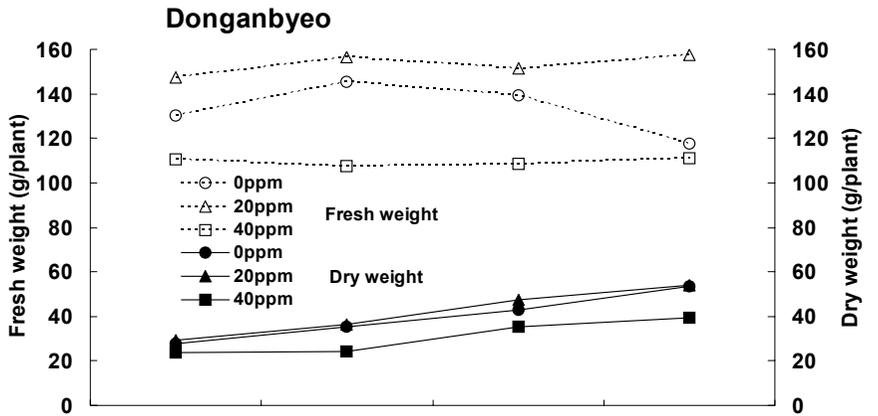


Figure 3. Change of fresh and dry weight of shoot of Donganbyeo and Hwashinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

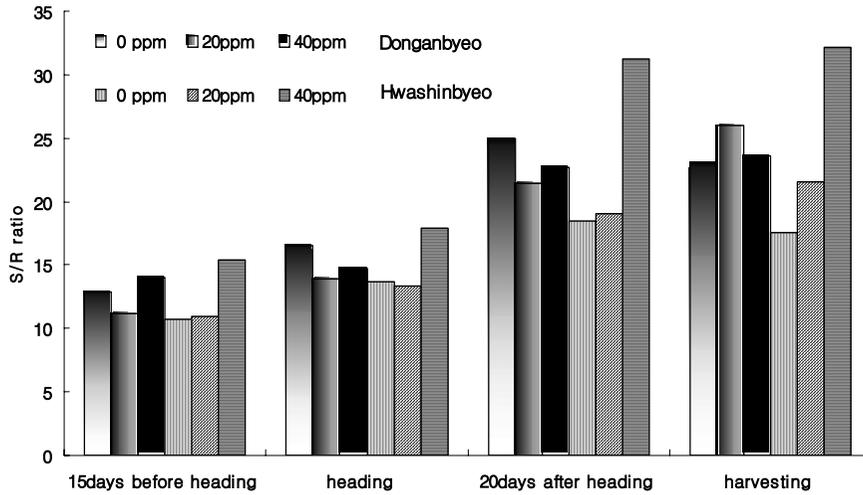


Figure 4. S/R ratio based on dry weight of Donganbyeo and Hwashinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

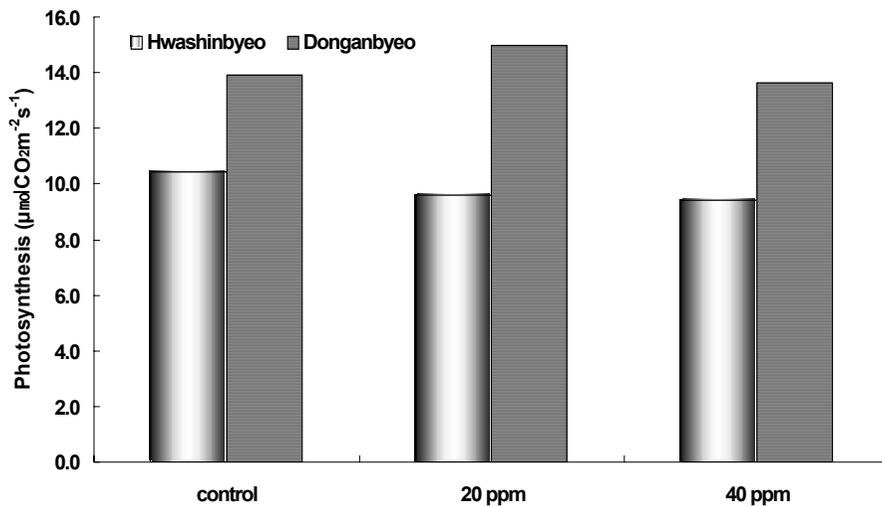


Figure 5. Photosynthetic ability of Donganbyeo and Hwashinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

4) 광합성량

철분 처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 생육에 따른 유수형성기의 광합성량은 Figure 5와 같다.

종실내 철분 함량이 많은 것으로 나타난 동안벼에서는 철 농도 20ppm 처리에서 $15\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 광합성량이 가장 많았으며, 철 농도 40ppm 처리구에서 $13.4\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 가장 적은 광합성량을 나타내었다. 종실내 철분함량이 적은 화신벼에서는 철분 무처리구에서 $10.2\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 광합성량이 가장 높았고 철처리 농도 40ppm에서 $9.3\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 가장 광합성량이 적었으며 철분처리 농도와 부의 상관을 보였다. 또한, 식물체내 전자전달시 매우 중요한 역할을 하는 철분에 의해서 동안벼와 화신벼에서 처리간에 큰 차이가 있을 것으로 생각되었으나, 처리간의 차이가 크지 않았으며 (동안벼: $1.6\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 화신벼: $0.9\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 처리간의 차이보다도 품종간의 차 (최고: $4.8\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 최저: $4.1\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)가 크게 나타났다. 또한, 두 품종 모두에서 철분 무처리구 보다도 40ppm 처리구에서의 광합성량이 적은 것으로 보아 철분 과다 시용시 오히려 광합성량의 저하를 가져옴을 알 수 있었다.

나. 철 농도별 주요 벼 품종의 수량 및 수량 구성 요소

1) 수량 구성 요소

철분 처리를 달리하여 재배된 철 함량이 상이한 동안벼와 화신벼의 수량 및 수량구성요소는 Table 1과 같다.

Pot당 이삭수의 경우 동안벼에서는 40ppm 처리구에서 116/pot로 가장 많았으며 20ppm 처리구에서 102/pot로 가장 적게 나타났고, 화신벼에서는 철분 무처리구에서 123/pot로 가장 많았으며 철분 40ppm 처리구에서 93/pot로 가장 낮게 나타났다. 이삭당 영화수의 경우 동안벼는 철분 처리 농도 20, 0, 40ppm 순으로 많았으며, 화신벼의 경우도 철처리 농도 20, 0, 40ppm 순으로 많았다. 등숙률은 품종간엔 화신벼가 높았고, 처리간에는 동안벼는 철처리 농도 20ppm에서 94.5%로 가장 높았고 0ppm 처리에서

85.4%로 가장 낮았으며, 화신벼에서도 철분 20ppm 처리에서 93.6%로 가장 높았고 철분 무처리구에서 89.9%로 가장 낮았으며 철처리구가 무처리구보다 높았다.

1000립중에서는 동안벼가 철분 처리농도 20ppm과 40ppm에서 각각 22.0g과 20.7g이었고 철분 무처리구에서는 19.7g으로 철분 처리구에 비해 낮게 나타났으며 화신벼에서는 무처리구가 20.3g으로 20ppm의 철분 처리농도에서의 값인 23.1g보다는 낮았지만 40ppm 처리와는 차이를 보이지 않았다. 위의 결과, 철분은 수량구성요소 중 등숙률과 1000립중에서 그 효과가 분명히 나타남을 알 수 있었다.

Table 1. Yield and yield components of Donganbyeo and Hwashinbye grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

Varieties	Treatments	No. of panicles /pot	Spikelet per panicles	Ratio of ripened grain(%)	1,000 grain weight (g)	Yield (g/pot)
Donganbye o	0 ppm	110	100.8	85.4	17.5	161
	20 ppm	102	101.9	94.5	22.0	235
	40 ppm	116	100.2	90.5	20.7	206
Hwashinby eo	0 ppm	123	100.0	89.9	20.3	207
	20 ppm	121	110.0	93.6	23.1	279
	40 ppm	93	99.1	91.9	20.4	187
F-Value	V	ns	ns	4.53*	7.7*	4.7*
	T	ns	3.7*	25.77**	25.57**	16.4*
	V×T	3.2*	ns	10.9*	4.23*	3.7*

ns: nonsignificance, *: significance at $P \leq 0.05$, **: significance at $P \leq 0.01$

2) 수 량

수량구성요소를 토대로한 전반적인 수량값에서도 동안벼는 235g/pot로 20ppm에서 가장 높은 값을 나타내었으며 무처리구에서는 161g/pot로 가장 낮은 값으로 나타나 철분 처리가 높을수록 수량이 향상됨을 보였다. 반면 화신벼는 철농도 20ppm 처리구에서 279g/pot으로 가장 높았지만 철분 40ppm 처리구에서는 오히려 무처리보다도 현저하게 낮은 187g/pot로 나타났다.

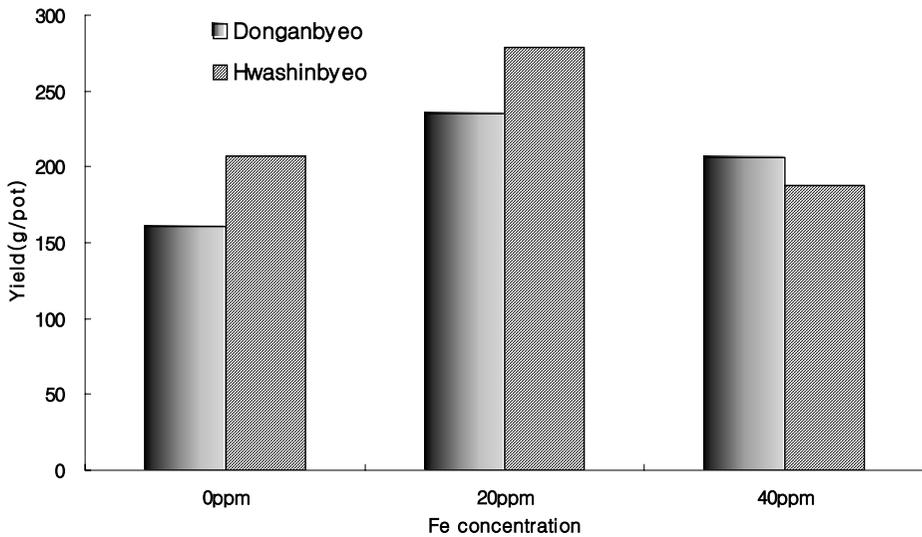


Figure 6. Yield of Donganbyeo and Hwashinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

다. 식물체내 철분 및 무기성분들의 함량과 흡수 이용량

1) 주요 생육시기 및 부위별 무기성분 함량

철분 처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 철분 처리에 따른 식물체 부위 및 주요 생육시기별 철의 함량은 Table 2와 같다.

품종간에는 종실내 철분함량이 많은 것으로 알려진 동안벼가 종실내 철분 함량이 적은 화신벼에 비해 뿌리를 제외한 식물체 전부위에서 높게 나타났으며, 수확기 종실내의 최종 철분 농도를 보더라도 품종간에는 적게는 무처리구에서 10ppm, 많게는 20ppm 처리구에서 39ppm정도의 차이를 보였다. 철분 처리간의 효과를 살펴보면, 동안벼의 주요생육시기 및 부위별 철분 함량을 살펴보면 뿌리에서는 생육 전반에 걸쳐 철 처리농도 20, 40, 0ppm 순으로 높게 나타났으며, 시기별로는 출수 전 15일에 최저 378ppm에서 최고 702ppm으로 가장 높은 경향을 보이다 이후에는 점차 감소하는 경향을 보였고, 처리간의 차이가 매우 크게 나타났다. 동안벼 엽신을 살펴보면 모든 생육시기에서 철처리 농도 40, 20, 0ppm 순으로 높게 나타났으며, 시기별로는 철분 무처리구와 20ppm 처리구는 출수기에 가장 높은 경향을 보였고 40ppm 처리구에서는 출수전 15일에 가장 높은 함량을 보였으며 이후 크게 감소하는 경향을 보였다. 동안벼 줄기를 살펴보면 철분 처리별로는 모든 생육시기에서 40, 20, 0ppm의 순으로 철분함량 컸으며, 시기별로는 출수 전 15일을 거쳐 출수기에 이르러 크게 감소를 보이고 다시 출수 후 20일에 가장 높은 함량을 보이다가 수확기에서 감소하는 경향을 보였다. 동안벼 이삭을 살펴보면 처리구별로는 20, 40, 0ppm 순으로 철분함량이 높게 나타났으며, 출수기 이후 점차 증가를 보였고 출수 후 20일 이후 크게 증가하는 경향을 보였다. 또한, 철분 처리구와 무처리구의 수확기 이삭에서의 철분 함량 차이는 46ppm~50ppm을 보여 철분 시용의 효과가 매우 큼을 알 수 있었다.

Table 2. Fe concentrations of plant tissues of Donganbyeo and Hwashinbyeo at major growth stages grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

Variety	(Unit: ppm)															
	15days before heading						20days after heading									
	Heading		Harvesting		Harvesting		Harvesting		Harvesting		Harvesting					
Treat	Root	Leaf	Cu/m	Root	Leaf	Cu/m	Panicle	Root	Leaf	Cu/m	Panicle	Root	Leaf	Cu/m	Panicle	
Donganbyeo	Open	378	177	121	232	268	35	52	291	206	106	49	237	166	94	84
	20ppm	702	332	205	532	387	248	87	634	241	350	66	495	175	277	144
	40ppm	519	472	284	507	429	275	78	604	437	354	117	360	238	388	140
Hwashinbyeo	Open	160	184	59	230	202	42	46	149	201	46	48	325	116	66	84
	20ppm	644	282	154	628	347	107	62	584	339	219	55	580	262	242	105
	40ppm	813	384	235	727	340	152	80	787	312	299	98	784	277	249	117
U	ns	4.8 ^b	ns	54.8 ^{ns}	252.8 ^{ns}	63.0 ^{ns}	28.4 ^{ns}	ns	ns	152.2 ^{ns}	7.8 ^{ns}	80.3 ^{ns}	ns	31.7 ^{ns}	9.0 ^{ns}	
F-value	T	107.7 ^{ns}	53.0 ^{ns}	15.0 ^{ns}	303.0 ^{ns}	532.8 ^{ns}	96.0 ^{ns}	64.5 ^{ns}	455.2 ^{ns}	451.1 ^{ns}	487.6 ^{ns}	95.4 ^{ns}	67.0 ^{ns}	23.3 ^{ns}	142.7 ^{ns}	9.5 ^{ns}
UXT	34.5 ^{ns}	ns	ns	20.7 ^{ns}	12.1 ^{ns}	18.2 ^{ns}	21.2 ^{ns}	50.0 ^{ns}	64.3 ^{ns}	13.3 ^{ns}	ns	24.2 ^{ns}	7.9 ^{ns}	9.0 ^{ns}	ns	

ns: non-significance, *: significance at $P \leq 0.05$, **: significance at $P \leq 0.01$

종실내 철분 함량이 적은 것으로 알려진 화신벼의 주요생육시기 및 부위별 철분 함량을 살펴보면 뿌리에서는 생육 전반에 걸쳐 철 처리농도 40, 20, 0ppm 순으로 철분함량이 높게 나타났으며, 시기별로는 철분 무처리구에서는 출수기에 230ppm으로 가장 높은 경향을 보이고 철분 시용구에서는 출수 전 15일에 각각 644ppm, 814ppm으로 가장 높은 함량을 나타냈으며 처리간의 차이가 매우 컸다. 화신벼의 엽신을 살펴보면 모든 생육시기에서 철처리 농도 20, 40, 0ppm 순으로 높게 나타났으며, 시기별로는 철분 무처리구와 20ppm 처리구는 출수기에 가장 높은 경향을 보였고 40ppm 처리구에서는 출수 전 15일에 가장 높은 함량을 보였으며 이후 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. 화신벼 줄기를 살펴보면 철분 처리별로는 모든 생육시기에서 40, 20, 0ppm의 순으로 철분함량 컸으며, 시기별로는 출수전 15일을 거쳐 출수기에 이르러 크게 감소를 보이고 다시 출수후 20일에 크게 증가를 보이고 수확기에 이르기까지 점점 증가하는 경향을 보였다. 화신벼 이삭을 살펴보면 처리구별로는 40, 20, 0ppm 순으로 철분함량이 높게 나타났으며, 출수기 이후 점차 증가를 보였고 출수 후 20일 이후 크게 증가하는 경향을 보였다. 또한, 40ppm 처리구에서 가장 높은 117ppm을 나타냈으며 철분 처리구와 무처리구의 철분 함량 차이는 21ppm~33ppm을 보였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 철분 처리시 종실내의 철분 함량을 크게 높일 수 있었으며 철분 함량이 높은 동안벼가 철분함량이 적은 화신벼보다 높은 시용효과를 얻을 수 있었다. 또한 식물체 부위별로 뿌리, 엽신, 줄기, 이삭의 순으로 철분의 함량이 많았는데 다른 식물체 부위의 비해 이삭의 철분 함량이 현저히 낮은 것으로 보아 식물체내 함유된 철분의 종실로의 전류 및 이용 효율이 벼에서는 매우 낮은 것으로 사료된다.

철분 처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 철분 처리에 따른 식물체 부위 및 주요 생육시기별 질소의 함량은 Table 3과 같다.

품종간에는 식물체내 철분함량이 많은 것으로 알려진 동안벼가 식물체내 철분 함량이 적은 화신벼에 비해 대부분의 부위에서 높게 나타났다. 철분 처리간의 효과를 살펴보면, 철분함량이 높은 것으로 알려진 동안벼의 중요생육시기 및 부위별 질소 함량은 뿌리에서는 생육 전반에 걸쳐 철 처리농도 40, 20, 0ppm 순으로 질소함량이 높게 나타났으며, 시기별로는 출

수전 15일에서 가장 높았으며 철 40ppm 처리구에서 2.39%으로 가장 높은 수치를 나타냈고 출수 전 15일 이후에는 점차 감소하는 경향을 보였다. 동안벼 엽신을 살펴보면 모든 생육시기에서 철처리 농도 40, 20, 0ppm 순으로 높게 나타났으며, 시기별로는 뿌리와 마찬가지로 출수 전 15일에 가장 높은 함량을 나타냈고 이후에는 크게 감소하는 경향을 보였으며 출수 전 15일 철 40ppm 처리구에서 최고 값인 3.37%를 보였다. 동안벼 줄기를 살펴보면 철분 처리별로는 출수기를 제외한 대부분의 생육시기에서 40, 20, 0ppm의 순으로 철분 처리농도를 높일수록 질소 함량이 컸으며, 시기별로는 철분 처리구에서는 출수 전 15일에서 수확기에 이르기까지 점차 감소하는 경향이었으나 무처리구에서는 출수기까지 증가를 보이다 이후 감소하는 경향을 보였다. 동안벼의 이삭은 처리구별로는 0, 40, 20ppm 순으로 질소 함량이 높게 나타났으며, 출수기 이후 점차 증가를 보였고 수확기 무처리구에서 1.62%로 가장 높은 함량을 보여 철분 사용과는 부의 관계를 보였다.

철분 함량이 적은 것으로 알려진 화신벼의 중요생육시기 및 부위별 철분 함량을 살펴보면 엽신에서는 모든 생육시기에서 철처리 농도 40, 20, 0ppm 순으로 나타났으며, 시기별로는 철분 처리구에서는 출수 전 15일에 그리고 무처리구에서는 출수기에 가장 높은 경향을 보였고 이후 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. 화신벼 줄기를 살펴보면 철분 처리별로는 출수전 15일과 출수 후 20일에는 철분 처리구가 무처리에 비해 높은 질소함량을 보였지만 출수기와 수확기에서는 무처리구와 철 20ppm 처리구에서는 비슷한 값을 가졌으며 40ppm 처리구에서 낮은 질소 함량을 가졌다. 화신벼 이삭을 살펴보면 처리구별로는 철 20ppm 처리구에서 1.52%로 가장 높은 질소함량을 보였고 40ppm 처리구에서는 1.43%, 그리고 무처리구에서는 1.17%로 가장 낮은 함량을 보였다.

철분 처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 철분 처리에 따른 식물체 부위 및 주요 생육시기별 인산의 함량은 Table 4와 같다.

동안벼의 뿌리에서는 출수 전 15일과 출수기에서 철처리농도 20ppm에 비해 무처리와 40ppm 처리에서 함량이 높았고, 출수 후 20일과 수확기에서는 반대로 20ppm 처리구에서 가장 높게 나타났다. 동안벼의 엽신에서는 뿌리에서와 마찬가지로 출수 전 15일과 출수기에서 철 시용구가 인산의 함량이 높게 나타났으나, 출수 후 20일에는 이와 반대로 무처리구에서 1.35%로 가장 높은 함량을 보였다. 동안벼 줄기의 인산함량은 출수 전 15일에서 출수 후 20일까지 지속적인 증가를 보이다 수확기에서 감소하였으며, 출수 전 15일에서 출수기까지는 철시용구가 무처리구에 비해 높은 인산 함량을 보였으나 출수 후 20일과 수확기에서는 반대의 경향을 보였다. 동안벼 이삭의 인산함량은 철시용구에 비해 무처리구의 인산 함량이 높게 나타났다. 화신벼의 뿌리를 살펴보면 출수 전 15일을 제외한 모든 생육시기에서 철분 시용구에 비해 무처리구에서 인산의 함량이 높게 나타났다. 화신벼의 엽신에서는 유수형성기 무처리구에서 1.32%로 가장 높은 인산함량을 보였으며, 출수 후 20일에 이르기까지 무처리구가 철 시용구에 비해 높은 함량을 보였다. 또한 무처리구는 출수 전 15일 이후 지속적인 감소를 보인 반면 철시용구에서는 출수기에서 가장 높은 함량을 보이고 이후 지속적인 감소를 보였다. 식물체 부위 중 인산함량이 가장 높은 것으로 나타난 줄기에서는 다른 부위와 마찬가지로 철 시용구에 비해 무처리 시용구의 인산함량이 많았으며 출수 전 15일 이후 지속적인 증가를 보이다 출수 후 20일에서 1.47%~1.79%로 가장 높은 함량을 나타내다가 수확기 이후 크게 감소하는 경향을 보였다. 화신벼의 이삭에서는 처리간에 차이를 보이지 않고 수확기까지 증가하는 경향을 보였으며 수확기 최종 이삭에서 철 20ppm 처리구에서 1.21%로 가장 높은 함량을 나타냈다.

Table 4. P concentrations of plant tissues of Donganbyeon and Hwashinbyeon at major growth stages grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

(Unit: %)

Variety	Treat	15days before heading						20days after heading						Harvesting		
		heading			Heading			20days after heading			Harvesting					
		Root	Leaf	Culm	Root	Leaf	Culm	Panicle	Root	Leaf	Culm	Panicle	Root	Leaf	Culm	Panicle
Dongan -byeon	0ppm	1.12	1.07	1.25	1.12	1.19	1.36	0.85	1.09	1.35	1.80	1.14	0.61	0.58	1.31	1.03
	20ppm	1.10	1.22	1.48	1.10	1.35	1.55	0.77	1.14	1.07	1.64	0.82	1.01	0.71	1.24	1.06
	40ppm	1.12	1.21	1.27	1.18	1.22	1.56	0.79	1.05	1.10	1.59	1.11	0.89	0.71	1.35	0.86
Hwashin -byeon	0ppm	1.00	1.32	1.38	1.20	1.29	1.42	0.83	1.25	1.25	1.79	0.97	0.89	0.45	1.38	1.02
	20ppm	1.22	1.19	1.40	0.93	1.20	1.21	0.94	1.04	1.03	1.68	0.86	0.81	0.63	1.38	1.21
	40ppm	1.06	1.19	1.42	1.17	1.31	1.39	0.74	1.03	1.02	1.47	0.93	0.87	0.60	0.91	0.98
U	ns	ns	4.9 [*]	ns	ns	227.4 ^{***}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	12.3 ^{***}	24.9 ^{***}	8.0 [*]
P-Value	T	21.1 ^{***}	ns	5.7 [*]	20.5 ^{***}	ns	37.0 ^{***}	ns	24.9 ^{***}	7.5 ^{**}	9.1 ^{**}	ns	7.8 ^{***}	11.1 ^{***}	80.0 ^{***}	32.4 ^{***}
U X T		32.0 ^{***}	4.5 [*]	6.0 [*]	11.5 ^{**}	7.5 [*]	132.9 ^{***}	ns	26.2 ^{***}	ns	ns	ns	15.7 [*]	ns	146.7 ^{***}	7.8 [*]

ns: non-significance, *: significance at $P \leq 0.05$, **: significance at $P \leq 0.01$

철분 처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 철분 처리에 따른 식물체 부위 및 주요 생육시기별 칼륨의 함량은 Table 5와 같다.

철 함량이 높은 동안벼를 살펴보면 뿌리에서는 철처리 농도가 높을수록 칼륨의 함량 또한 높았으며, 출수 전 15일에서 수확기에 이르기까지 계속적인 증가를 보였다. 엽신에서는 출수 전 15일을 거쳐 출수기까지는 철시용 농도가 높을수록 칼륨의 함량도 많았으나 출수 후 20일 이후에는 반대의 경향을 보였으며, 시기별로는 출수기에 2.6~2.9%로 가장 높은 함량을 보였고 이후로 감소하는 경향을 보였다. 줄기 또한 철분 처리에 따라 엽신과 같은 경향을 보였으며, 출수 후 20일에 5.51~5.90%로 가장 높은 함량을 보였고 이후 크게 감소하는 경향을 보였다. 동안벼 이삭의 경우를 보면 다른 식물체 부위와 같이 출수기에는 무처리구에 비해 철시용구에서 높은 함량을 보이지만 출수 후 20일 이후에는 오히려 무처리구의 함량이 높은 것으로 나타났고 출수기 이후 계속적으로 감소하는 경향으로 최종 수확기에는 0.77~0.83%의 값을 보였다. 철분 함량이 낮은 품종인 화신벼를 살펴보면 뿌리에서는 출수 전 15일을 제외하고 모든 시기에서 철 처리농도 0, 40, 20ppm 순으로 높게 나타났다. 엽신에서는 철분 처리농도가 높을수록 칼륨의 함량은 적었으며 출수 전 15일 무처리구에서 2.87%로 가장 높은 함량은 나타났고 이후 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 줄기에서는 출수 전 15일을 거쳐 출수기까지는 철 처리농도가 높을수록 칼륨의 함량은 많았으나 출수후 20일에서는 반대의 경향을 보였고 최종 수확기에는 20, 0, 40ppm의 순으로 칼륨의 함량이 높았다. 또한, 화신벼는 동안벼와 마찬가지로 등숙기에서 5.3~5.7%로 가장 높은 함량을 나타냈다. 이삭에서는 동안벼와 달리 철 처리농도 20, 40, 0ppm 순으로 함량이 많았고 무처리와 달리 철 처리구에서는 출수 후 20일 이후에 증가하는 경향을 나타냈다.

Table 5. K concentrations of plant tissues of Donganbyeo and Hwashinbyeo at major growth stages grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

Variety	Treat	15days before												Harvesting		
		Seedling				Hooflag				20days after Hooflag						
		Root	Leaf	Culm	Penicla	Root	Leaf	Culm	Penicla	Root	Leaf	Culm	Penicla			
Dongan -byeo	0ppm	0.94	2.59	2.62	0.82	2.60	2.17	0.96	1.10	2.22	5.80	0.89	1.34	2.43	2.83	0.83
	20ppm	0.72	2.55	2.66	0.86	2.80	3.42	1.14	1.85	2.18	5.53	0.78	1.80	2.05	2.48	0.77
	40ppm	1.17	2.73	2.20	1.28	2.79	3.02	1.13	1.23	2.18	5.51	0.84	1.49	2.28	2.01	0.79
Hwasha -byeo	0ppm	0.88	2.87	1.78	1.10	2.43	2.38	1.18	1.54	2.53	5.87	0.72	1.82	2.28	2.81	0.89
	20ppm	0.89	2.63	2.71	0.72	2.28	2.47	1.18	1.86	2.17	5.41	0.89	0.47	2.46	5.08	0.82
	40ppm	1.06	2.69	2.80	1.33	2.43	2.85	1.05	1.10	2.07	5.39	0.71	1.68	2.16	2.48	0.83
		0	ns	5.5 ^a	ns	61.8 ^{ab}	37.7 ^{ab}	8.2 ^a	59.7 ^{ab}	14.3 ^{ab}	ns	ns	0.2 ^a	ns	419.0 ^{ab}	17.3 ^{ab}
		F	46.01 ^{***}	ns	31.8 ^{***}	59.0 ^{***}	ns	38.6 ^{***}	8.1 ^{***}	105.8 ^{***}	78.3 ^{***}	4.8 ^a	ns	94.7 ^{***}	5.37 ^a	31.8 ^{***}
		PXT	7.6 ^a	28.7 ^{***}	51.7 ^{***}	8.88 ^{***}	0.3 ^{***}	23.6 ^{***}	18.8 ^{***}	185.8 ^{***}	54.8 ^{***}	ns	ns	230.2 ^{***}	31.1 ^{***}	84.5 ^{***}

ns: nonsignificance, =: significance at $P \leq 0.05$, =::: significance at $P \leq 0.01$

철분 처리를 달리하여 재배된 철 함량이 상이한 동안벼와 화신벼의 철분 처리에 따른 식물체 부위 및 주요 생육시기별 칼슘의 함량은 Table 6과 같다.

종실내 철분 함량이 높은 것으로 알려진 동안벼를 살펴보면 뿌리에서는 출수 전 15일과 출수 후 20일에서 철 처리 농도가 높을수록 칼슘의 함량이 적었고 출수기와 수확기에서는 반대의 경향을 보였으며 출수 후 20일의 뿌리에서 781~ 1200ppm으로 가장 높은 함량을 가졌다. 엽신을 살펴보면 출수 전 15일에서는 무처리구에 비해 철분시용구의 칼슘함량이 높았고 이후 출수기와 출수 후 20일에서는 오히려 철분 무처리구의 칼슘 함량이 매우 높게 나타났으며 출수 전 15일 이후로 점차 증가하는 경향을 나타냈다. 줄기에서는 출수 후 15일 20ppm 처리구에서 621ppm으로 가장 높은 함량을 보였으며, 무처리가 오히려 40ppm 처리구보다 높은 함량을 보였다. 이삭을 살펴보면 철분 처리농도가 클수록 이삭내 칼슘 함량이 높았으며 출수 후 20일에 감소를 보이고 다시 수확기에 크게 증가함을 보였다. 식물체내 철분 함량이 적은 화신벼를 살펴보면, 뿌리에서는 철분 처리 농도가 높을수록 칼슘의 함량이 적었으며 출수 전 15일을 거쳐 출수 후 20일에 이르기까지 점차 증가하다가 수확기에 다시 감소하는 경향을 보였다. 엽신도 뿌리와 마찬가지로 철분 무처리구가 처리구에 비해 높은 칼슘 함량을 보였고 출수 후 20일에 이르기까지 지속적인 증가를 보였으며, 이후 수확기에 다시 감소함을 보였다. 줄기에서는 다른 식물체 부위와 달리 무처리구에 비해 철 처리구에서 칼슘 함량이 높았으며 수확기 철 처리농도 20ppm에서 560ppm으로 가장 높은 함량을 보였다. 이삭에서는 최종 수확기에 철분 무처리구는 346ppm, 20ppm 처리구는 370ppm, 40ppm 처리구는 379ppm의 칼슘함량을 보여 철분 처리농도가 높을수록 이삭내 칼슘의 함량이 높게 나타남을 알 수 있었고, 출수기 철 40ppm 처리구에서 517ppm으로 가장 높은 함량을 보였고 이후 점차 감소함을 보였다.

Table 8. Ca concentrations of plant tissues of Donganbyeo and Hwashinbyeo at major growth stages grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

Variety	Treat	15days before heading												30days after heading												Harvesting	
		before heading						heading						30days after heading						Harvesting							
		Root	Leaf	Culm	Root	Leaf	Culm	Root	Leaf	Culm	Root	Leaf	Culm	Root	Leaf	Culm	Leaf	Culm	Fanicle	Fanicle							
Donganbyeo -byeo	0ppm	859	1044	459	719	3310	394	452	1200	4010	578	394	515	2340	323	352											
	20ppm	740	2236	475	759	3927	432	573	888	3440	621	368	797	4050	363	425											
	40ppm	878	2217	488	775	2870	657	534	781	3280	558	381	799	3880	455	588											
Hwashin -byeo	0ppm	582	2058	381	884	2480	310	497	1045	2830	517	381	599	2620	391	348											
	20ppm	667	1858	489	891	2180	393	475	799	2520	528	368	819	2750	569	379											
	40ppm	734	1874	481	785	2480	625	517	888	2280	524	393	789	2240	431	378											
		U	7.5 [*]	ns	ns	6.3 [*]	104.0 ^{**}	14.35 ^{**}	13.6 ^{**}	9.0 ^{**}	133.7 ^{**}	80.0 ^{**}	ns	6.4 [*]	199.4 ^{**}	219.5 ^{**}	101.7 ^{**}										
		F	ns	ns	ns	ns	10.7 ^{**}	17.32 ^{**}	18.2 ^{**}	45.4 ^{**}	21.8 ^{**}	10.9 ^{**}	ns	34.7 ^{**}	67.8 ^{**}	142.8 ^{**}	77.9 ^{**}										
		UXT	ns	5.9 [*]	ns	ns	4.2 [*]	ns	ns	ns	ns	ns	ns	11.3 [*]	32.4 ^{**}	149.6 ^{**}	48.0 ^{**}										

ns: nonsignificance, *: significance at P<0.05, **: significance at P<0.01

철분 처리를 달리하여 재배된 철 함량이 상이한 동안벼와 화신벼의 철분 처리에 따른 식물체 부위 및 주요 생육시기별 마그네슘의 함량은 Table 7과 같다.

철분 함량이 많은 것으로 알려진 동안벼를 살펴보면, 뿌리에서는 처리구별로 철분 처리 농도가 높을수록 마그네슘의 함량 또한 높았으며 시기별로는 출수 후 20일에 마그네슘의 함량이 가장 높았고, 수확기 이후 크게 감소함을 보였다. 동안벼의 엽신을 살펴보면 처리에 따라 출수 전 15일에서는 철분 처리농도가 높을수록 마그네슘의 함량도 높았으나 출수기와 출수 후 20일에서는 반대의 경향을 보였고 수확기에 다시 출수 전 15일과 같은 경향을 보였다. 또한, 시기별로는 출수 전 15일을 거쳐 출수기까지 계속적인 증가를 보이다가 출수 후 20일 이후 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 동안벼의 줄기에서는 출수 후 20일을 제외한 전 시기에서 철분 처리농도가 높을수록 마그네슘의 함량 또한 높았으며, 철분 무처리구는 출수 후 20일에서 0.25%로 가장 높은 함량을 보였고 철분 20ppm 처리구와 40ppm 처리구에서는 각각 0.20%와 0.21%로 출수기에서 가장 높은 함량을 보였다. 이삭에서는 철분 처리구별로 무처리구 0.15%, 20ppm 처리 0.16%, 40ppm 처리 0.19%으로 철분처리농도가 높을수록 마그네슘의 함량 또한 높았다.

철분 함량이 낮은 화신벼를 살펴보면, 뿌리에서는 대부분의 시기에서 철분 처리농도가 높을수록 마그네슘의 함량 또한 높았으며 출수 전 15일을 거쳐 출수기까지 계속 증가하여 철분 무처리는 0.10%, 20ppm 처리는 0.11%, 40ppm 처리는 0.13%로 가장 높은 함량을 보였으며 이후 점차 감소하는 경향을 보였다. 화신벼의 엽신은 철분 처리농도가 적을수록 마그네슘의 함량이 높았으며 시기별로는 출수 후 20일까지 계속적인 증가를 보여 철분 무처리는 0.66%, 20ppm 처리구는 0.53%, 40ppm 처리구는 0.43%의 마그네슘 함량을 가졌으며 이후 수확기에는 크게 감소하는 경향을 보였다. 화신벼의 줄기를 보면 출수 전 15일과 출수기에는 철 처리구에서 마그네슘의 함량이 높았고 출수 후 20일에서는 이와 반대로 철분 무처리구에서 가장 많은 0.21% 나타냈고, 20ppm 처리구에선 0.18%, 40ppm 처리구에선 0.11%를 보였다. 화신벼 이삭의 경우는 철분 무처리구는 이삭내 0.15%의 함량을 보였고, 20ppm 처리구는 0.16%, 40ppm 처리구는 0.15%의 함량을

보어 철시용구가 무처리구에 비해 마그네슘의 함량이 높게 나타났다.

Table 7. Mg concentrations of plant tissues of Donganbyeo and Hwashinbyeo at major growth stages grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

Variety	Treat	15days before heading						20days after Heading						Harvesting					
		Root		Culm		Panicla		Root		Culm		Panicla		Root		Culm		Panicla	
		Leaf	Conc	Leaf	Conc	Leaf	Conc	Leaf	Conc	Leaf	Conc	Leaf	Conc	Leaf	Conc	Leaf	Conc	Leaf	Conc
Dongan -byeo	0ppm	757	3170	1515	867	5453	1375	1221	1247	6633	2453	1581	566	2642	878	1536			
	20ppm	841	3833	1760	1087	5273	2113	1615	1181	4673	1844	1538	723	3820	1301	1621			
	40ppm	1127	4167	1677	1017	5120	1877	1513	983	4220	1714	1387	832	4217	1785	1874			
Hwashin -byeo	0ppm	533	4080	1466	1018	5620	1221	1475	1086	6620	2053	1574	240	3180	818	1458			
	20ppm	818	4020	1721	1071	4453	1418	1644	885	5273	1788	1615	683	3873	1104	1637			
	40ppm	1374	3860	1643	1324	4340	1366	1583	1067	3823	1101	1316	863	3487	885	1518			
		U	ns	13.6 ^{***}	ns	20.8 ^{***}	57.5 ^{***}	448.8 ^{***}	8.6 ^{**}	38.0 ^{**}	ns	15.2 ^{**}	ns	50.0 ^{**}	ns	371.2 ^{**}	13.4 ^{**}		
		T	86.5 ^{***}	10.8 ^{**}	5.49 [*]	17.6 ^{**}	62.7 ^{***}	156.8 ^{***}	17.5 ^{**}	21.4 ^{**}	182.8 ^{***}	24.4 ^{**}	ns	242.0 ^{**}	44.6 ^{**}	207.0 ^{**}	8.8 ^{**}		
		UXT	14.2 [*]	24.5 ^{**}	ns	16.8 ^{**}	26.2 [*]	53.8 ^{**}	ns	32.8 ^{**}	6.6 [*]	ns	43.5 ^{**}	14.6 ^{**}	233.6 ^{**}	8.8 ^{**}			

ns: non-significance, *: significance at P≤0.05, **: significance at P≤0.01

2) 철분 및 주요 무기성분들의 흡수량

철분처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 주요생육 시기별 Fe의 흡수량의 변화는 Figure 7과 같다.

화신벼의 20ppm, 40ppm 처리구를 제외한 모든 처리에서 출수 전 15일 이후 Fe의 흡수량은 변화량이 없이 일정하였으며, 화신벼의 철 20ppm과 40ppm 처리구는 출수기에서 가장 낮았고 다른 시기에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 품종간에는 동안벼가 화신벼에 비해 Fe의 흡수량이 높았다. 철 처리농도간의 차이를 보면 동안벼와 화신벼 모두에서 철분 무처리구에 비해 철분 처리구의 흡수량이 크게 높았으며 동안벼 40ppm 처리에서 0.31kg/10a로 가장 높았고 0.08kg/10a로 화신벼 무처리구에서 가장 낮은 Fe 흡수량을 보였다.

철분 처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 주요생육 시기별 N의 흡수량의 변화는 Figure 8과 같다.

동안벼와 화신벼 모두에서 철분 무처리구는 출수기에서 가장 높은 흡수량을 보였으며 철분 처리구는 출수 후 20일에서 가장 높은 N 흡수량을 나타냈다. 품종간의 N 흡수량을 보면, 무처리구에서는 동안벼가 화신벼에 비해 높은 흡수량을 보였지만 철분 처리구에서는 반대의 경향을 보였다. Fe 농도 처리간의 차이를 보면, 동안벼에서는 철분 20, 0, 40ppm, 화신벼에서는 20, 40, 0ppm 순으로 흡수량이 많았다.

철분처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 주요생육 시기별 인산의 흡수량의 변화는 Figure 9와 같다.

동안벼는 철분 40ppm 처리구를 제외하고는 출수 전 15일에서 출수기까지 흡수량이 증가하다가 출수기 이후 흡수량의 변화가 없었다. 화신벼는 출수 후 20일까지 흡수량이 증가하였으며 수확기에서는 약간의 감소를 보였다. 철분 처리별로는 동안벼에서는 40ppm 처리구가 무처리구와 20ppm 처리구에 비해 매우 낮은 인산 흡수량을 보였으며 화신벼에서도 같은 경향을 보였으나 그 차이는 동안벼 보다 작았다.

철분처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 주요생육 시기별 칼륨의 흡수량의 변화는 Figure 10과 같다. 동안벼의 경우는 출수 전 15일에서

출수기까지 흡수량이 증가를 보이다가 출수기 이후 일정한 수준을 이루거나 감소하였으며 화신벼에서는 출수 후 20일까지 증가를 보이고 이후 감소하였다. 철분 처리별로는 동안벼는 20, 0, 40ppm 순으로 K흡수량이 높았고, 화신벼에서는 20, 40, 0ppm 순으로 K흡수량이 높았다.

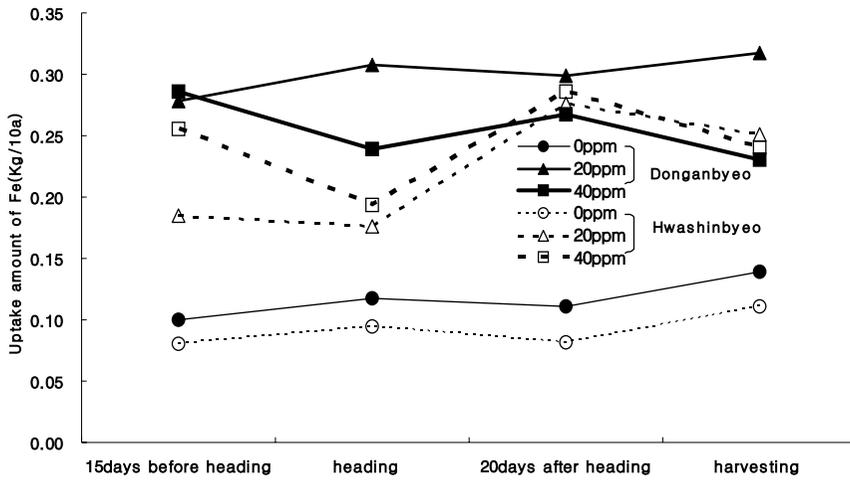


Figure 7. Uptake amount of Fe at major growth stages of Donganbyeo and Hwashinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

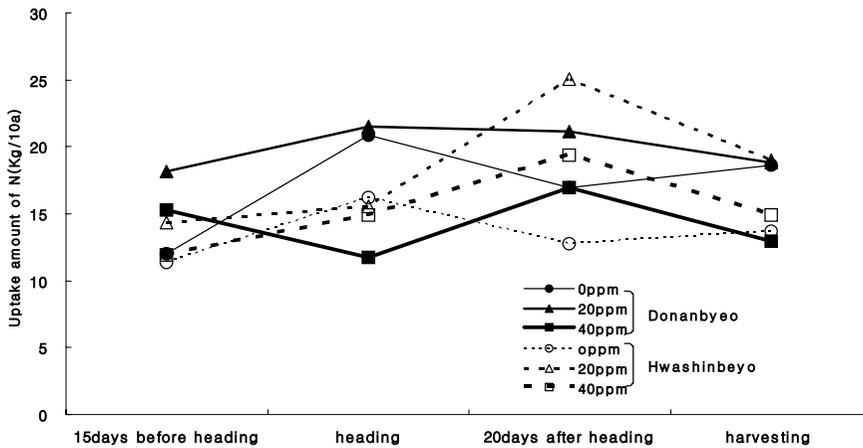


Figure 8. Uptake amount of N at major growth stages of Donganbyeo and Hwashinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

철분처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 주요생육 시기별 칼슘의 흡수량의 변화는 Figure 11과 같다.

동안벼와 화신벼 모두 철분 무처리구에서는 출수기 이후 흡수량이 점차 감소하였으며, 철분 처리구에서는 출수 후 20일까지 증가를 보이다가 이후 감소하는 경향을 보였다. 철분 처리간에는 동안벼를 보면 1.6kg/10a로 20ppm 처리구에서 가장 높았으며 철분 40ppm 처리구에서 0.6kg/10a로 가장 낮은 Ca 흡수량을 나타냈다. 화신벼에서는 1.1kg/10a로 20ppm 처리구에서 Ca 흡수량이 가장 컸으며 0ppm 처리구에서 0.71kg/10a로 가장 낮았다.

철분처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 주요생육 시기별 마그네슘의 흡수량의 변화는 Figure 12와 같다.

동안벼와 화신벼 모두 출수 후 20일까지 점차 흡수량이 증가하였고 수확기에 다시 감소하는 경향을 나타냈다. 품종간에는 동안벼가 화신벼에 비해 Mg 흡수량이 많았다. 철분 처리간의 양상을 보면 동안벼는 철분 20ppm 처리구에서 3.5kg/10a로 가장 흡수량이 높았고, 40ppm 처리구에서 1.7kg/10a로 가장 낮은 Mg 흡수량을 보였다. 화신벼는 동안벼와 마찬가지로 20ppm 처리구에서 2.5kg/10a으로 가장 높은 Mg 흡수량을 보였으며, 0ppm 처리구에서 1.6kg/10a로 가장 낮은 흡수량을 보였다.

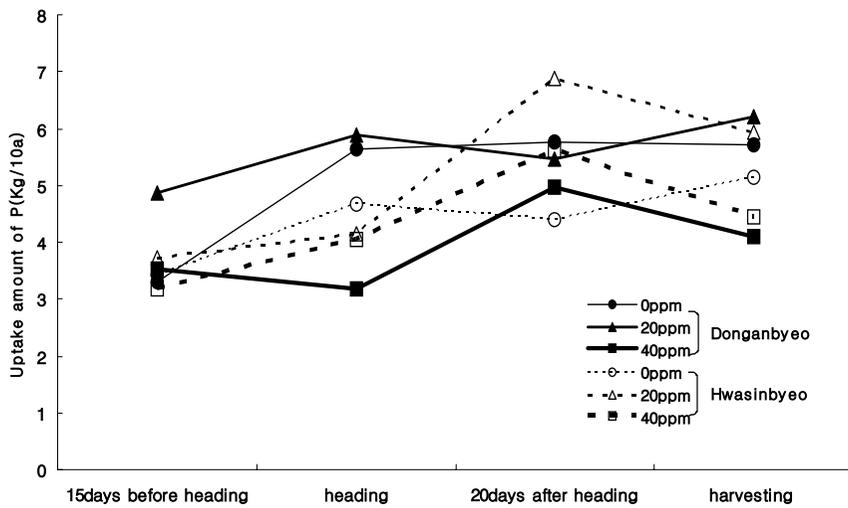


Figure 9. Uptake amount of P at major growth stages of Donganbyeo and Hwasinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

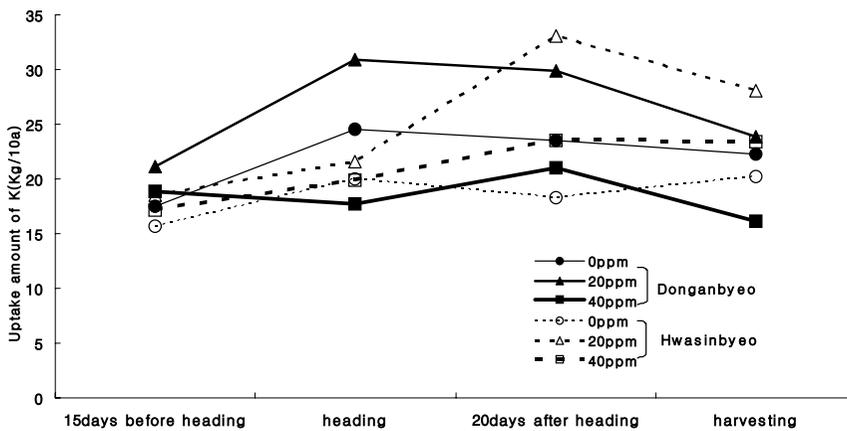


Figure 10. Uptake amount of K at major growth stages of Donganbyeo and Hwasinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

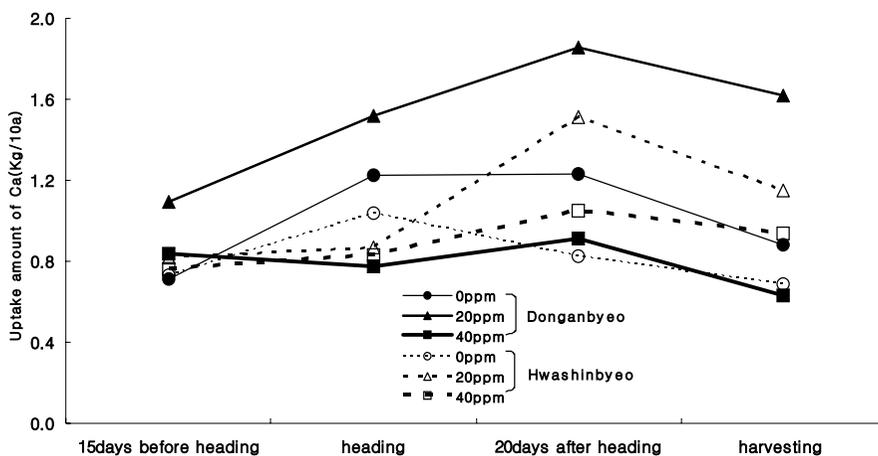


Figure 11. Uptake amount of Ca at major growth stages of Donganbyeo and Hwashinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

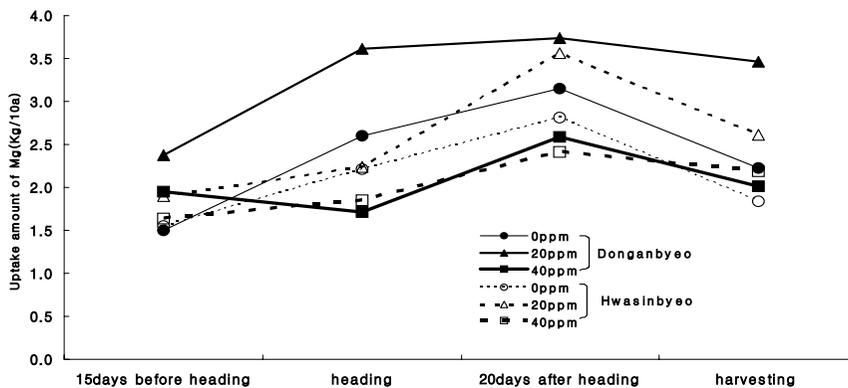


Figure 12. Uptake amount of Mg at major growth stages of Donganbyeo and Hwashinbyeo grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

라. Source-Sink 간의 철 함량 및 전류량 분석

1). 전류율

철 처리농도 20ppm에서 재배된 동안벼와 화신벼의 source로부터 sink로의 전류율은 Figure 13과 같다.

동안벼에서 Fe의 전류양상은 뿌리에서 엽신을 거쳐 줄기에 이르기까지는 점차 전류량이 증가를 보였으며 성숙엽으로부터 줄기에 이르는 전류량은 75%로 전류율이 가장 높게 나타났다. 그러나 이후 줄기에서 이삭으로의 전류율이 41%로 크게 감소함을 보였다. 화신벼에서의 Fe의 전류양상은 엽신에서 줄기로의 전류율이 68%로 가장 높았고 성숙한 뿌리에서 엽신으로의 전류율이 40%로 가장 낮았다. 화신벼는 뿌리로부터 엽신으로의 전류에서 전류율이 약간의 감소를 보이고 다시 엽신에서 줄기로의 전류율이 증가를 보이다가 줄기에서 이삭으로는 동안벼와 같이 크게 감소함을 보였다.

2) 전류량

철 처리농도 20ppm에서 재배된 동안벼와 화신벼의 source로부터 sink로의 철분 전류량은 Figure 14와 같다. 동안벼와 화신벼 모두 수확기의 종자에 이르기까지 계속적인 감소를 보인다. 품종간에는 뿌리 성장점에서 주뿌리에 이르는 전류에서는 종실내 철 함량이 낮은 화신벼가 오히려 높은 전류량을 보이지만 이후 주 뿌리에서 엽신과 줄기를 거쳐 수확기 이삭에 이르기까지 동안벼의 전류량이 많은 것을 볼 수 있었다. 또한 두 품종간에는 주근에서 엽신으로 다시 줄기로의 전류에서는 많은 전류량 차이를 보이거나 최종 이삭으로의 전류량은 차이가 매우 작았다.

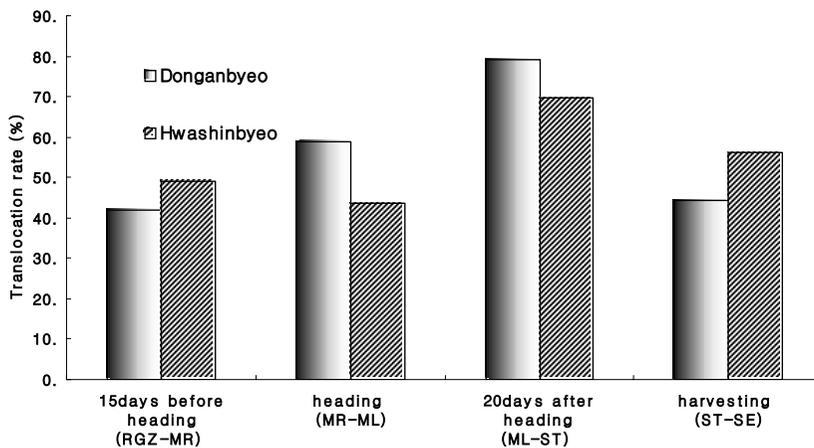


Figure 13. Rate of Fe translocation of Donganbyeo and Hwashinbyeo from source to sink tissues grown with hydroponic culture under 20ppm Fe level. (RGZ: root growing zone, MR: major-root, ML: major leaf, ST: stem, SE: seed).

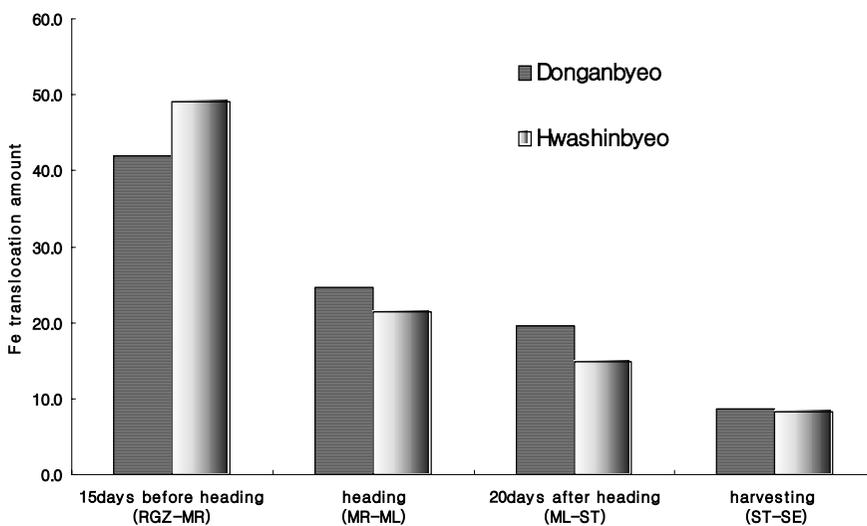


Figure 14. Amount (ppm) of Fe translocation of Donganbyeo and Hwashinbyeo from source to sink tissues grown with hydroponic culture under 20ppm Fe level. (RGZ: root growing zone, MR: major root, ML: major leaf, ST: stem, SE: seed).

마. 단백질 함량 및 SDS-PAGE에 의한 철-단백질 분리

1) 수용성 단백질 함량

철분 처리를 달리하여 재배된 동안벼와 화신벼의 철분 처리에 따른 식물체 부위 및 주요 생육시기별 단백질의 함량은 Table 8과 같다. 식물체내 철분함량이 많은 것으로 알려진 동안벼를 살펴보면, 뿌리를 제외한 모든 식물체 부위에서 단백질의 함량이 높은 것으로 나타났고 부위별로는 엽신에서 가장 높은 함량을 보였다. 동안벼의 엽신은 등숙기에 40ppm 처리구에서 1.88%로 가장 높은 함량은 보였다. 이삭은 출수기 이후 지속적인 증가를 보였고 수확기 최종 종실에서의 단백질 함량은 철 40ppm 처리구에서는 0.8%, 20ppm 처리구에서는 0.7%, 철분 무처리구에서는 0.58%로 철분 처리농도가 높을수록 단백질의 함량이 높았다.

철분 함량이 적은 화신벼를 살펴보면, 뿌리에서는 무처리구가 철분 처리구에 비해 단백질의 함량이 높았고 출수전 15일 이후 지속적인 감소를 보이는 것으로 나타났다. 화신벼의 엽신은 무처리구에 비해 철분 처리구가 단백질의 함량이 매우 높게 나타났으며, 철분 무처리구와 40ppm 처리구는 출수 전 15일에 각각 0.76%와 1.25%로 가장 높게 나타났고 20ppm 처리구는 출수 후 20일에 1.91%로 단백질 함량이 가장 높았다. 화신벼의 이삭은 수확기 철분 20ppm 처리구에서 0.78%로 가장 높은 단백질 함량을 보였으며, 무처리구와 40ppm 처리구에서 각각 0.32%와 0.5%로 나타났다. 품종간에는 식물체내 철분 함량이 높은 동안벼가 화신벼에 비해 단백질의 함량이 높았다.

Table B. Soluble protein contents of plant tissues of Donganbyeo and Hwashinbyeo at major growth stages grown with hydroponic culture under three different Fe levels.

Variety	Treat	15days before heading						Heading			20days after Heading			Harvesting					
		Root		Leaf		Culm	Root		Leaf		Panicle		Root		Leaf		Panicle		
Donganbyeo	0ppm	0.4B	0.61	0.11	0.11	0.4B	0.1B	0.14	1.33	0.2B	0.5B								
	20ppm	0.4B	1.64	0.13	0.10	0.74	0.32	0.11	1.6B	0.32	0.70								
	40ppm	0.52	1.72	0.50	0.10	0.82	0.35	0.15	1.6B	0.37	0.80								
Hwashinbyeo	0ppm	0.44	0.76	0.11	0.12	0.62	0.13	0.20	0.41	0.36	0.32								
	20ppm	0.25	1.21	0.09	0.11	0.86	0.35	0.13	1.61	0.29	0.78								
	40ppm	0.35	1.25	0.14	0.12	1.14	0.33	0.15	1.01	0.36	0.50								
U	477.5 ^{***}	214.1 ^{***}	80.9 ^{**}	27.2 ^{**}	17.1 ^{**}	17.58 ^{***}	45.5 ^{***}	456.5 ^{***}	ne	183.8 ^{***}									
F-value	T	50.2 ^{***}	229.3 ^{***}	347.2 ^{***}	ne	26.6 ^{***}	1250.4 ^{***}	47.6 ^{***}	489.9 ^{***}	7.9 [*]	579.9 ^{***}								
UXT		70.6 ^{***}	153.2 ^{***}	51.3 ^{**}	ne	ne	59.0 ^{**}	17.6 ^{***}	235.5 ^{***}	10.0 ^{**}	17.9 ^{***}								

ns: non-significance, *, significance at $P \leq 0.05$, **, significance at $P \leq 0.01$

2) SDS-PAGE에 의한 벼 단백질의 분리

수경액 중의 철분의 처리농도를 다르게 하여 재배된 동안벼와 화신벼의 엽신에서 단백질을 추출하여 SDS-PAGE에 의해 분석한 결과는 Figure 15와 같다.

수경액에 철분 무처리구, 20ppm 처리구, 40ppm 처리구에서 생장한 벼의 엽신에서 단백질을 추출하여 분석한 결과 철분 처리구에서는 21kDa, 24kDa, 28kDa의 단백질 밴드가 발견되었으나 무처리구에서는 존재하지 않았다. 품종간에는 동안벼가 화신벼 보다 뚜렷하게 나타났다. 위의 결과로 보아 벼 ferritin 단백질의 subunit은 21kDa에서 28kDa안에 존재할 것으로 추정되며 Oh 등(1996)의 결과와 같이 벼에서도 성장과 발달 과정에 따라 크기가 다른 ferritin이 존재할 수 있음을 시사한다.

수경액 중의 철분의 처리농도를 다르게 하여 재배된 동안벼를 주요생육시기별로 채취하여 부위별로 단백질을 추출하여 SDS-PAGE에 의해 분석한 결과는 Fig. 16과 같다. 출수 전 15일에는 무처리구에는 나타나지 않는 28kDa 과 21kDa에 밴드가 엽신에서만 나타났다. 출수기에는 엽신과 이삭에서 28kDa 과 21kDa에 밴드가 나타났다. 출수 후 20일에서의 엽신에는 28kDa에서 무처리구와 비교하여 밴드가 보였으며 이삭에서는 21kDa에 밴드가 나타났다. 또한, 28kDa에 밴드는 출수기에 철분 40ppm 처리구의 엽신에서 가장 선명하게 나타났고 이후 점차 감소를 보였다. Theil and Hase (1993)의 보고와 유사한 경향을 보였다. 21kDa 단백질에서의 밴드는 같은 경향으로 출수기의 엽신에서 가장 선명하게 나타났다. 그러나 28kDa 과 비교하면 이삭에서는 많이 나타나는 경향을 보였다.

수경액 중의 철분의 처리농도를 다르게 하여 재배된 화신벼를 주요생육시기별 및 부위별로 채취하고 단백질을 추출하여 SDS-PAGE에 의해 분석한 결과는 Figure 16, 17과 같다.

출수 전 15일에 있어서는 엽신처리에서 무처리구에 나타나지 않는 28kDa과 21kDa에 밴드가 나타났다. 출수기에서의 엽신은 28kDa과 21kDa에 밴드가 나타났으며 28kDa 보다도 21kDa의 밴드가 보다 선명하게 나타났다. 출수 후 20일에서의 엽신에는 동안벼와 동일하게 28kDa에서 철 처리 농도가 높을수록 밴드가 선명하게 나타났으며, 이삭에서는 21kDa에 밴

드가 나타났다. 28kDa과 21kDa에 ferritin이라고 추정되는 subunit 단백질들의 구성을 보면, 28kDa에서는 출수 전 15일과 출수기의 엽신과 이삭에서 관찰되었으나 출수 후 20일의 이삭에서는 나타나지 않았으며, 엽신에서도 생육후기로 갈수록 그 함량이 점점 감소되는 경향을 보였다. 21kDa의 subunit 단백질 구성은 출수 전 15일과 출수기의 엽신과 이삭에서 모두 나타났다으며, 생육 후기로 갈수록 엽신에서는 관찰되지 않았고 이삭에서 선명하게 관찰되었다.

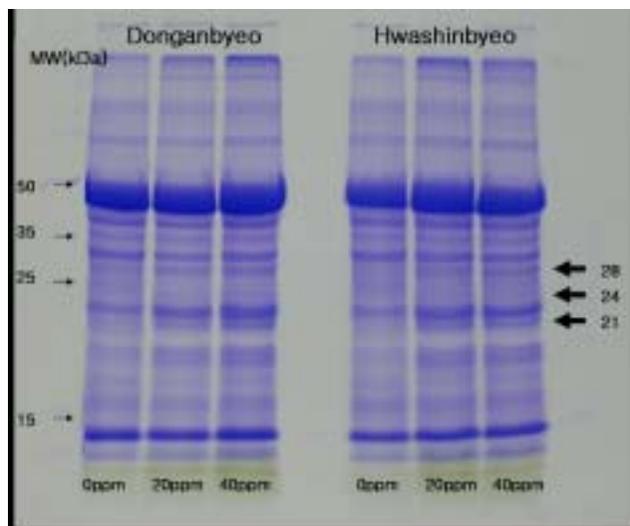


Figure 15. Subunit of proteins separated by SDS-PAGE from the leaves of Donganbyeo and Hwashinbyeo at panicle formation stage grown with different Fe levels.

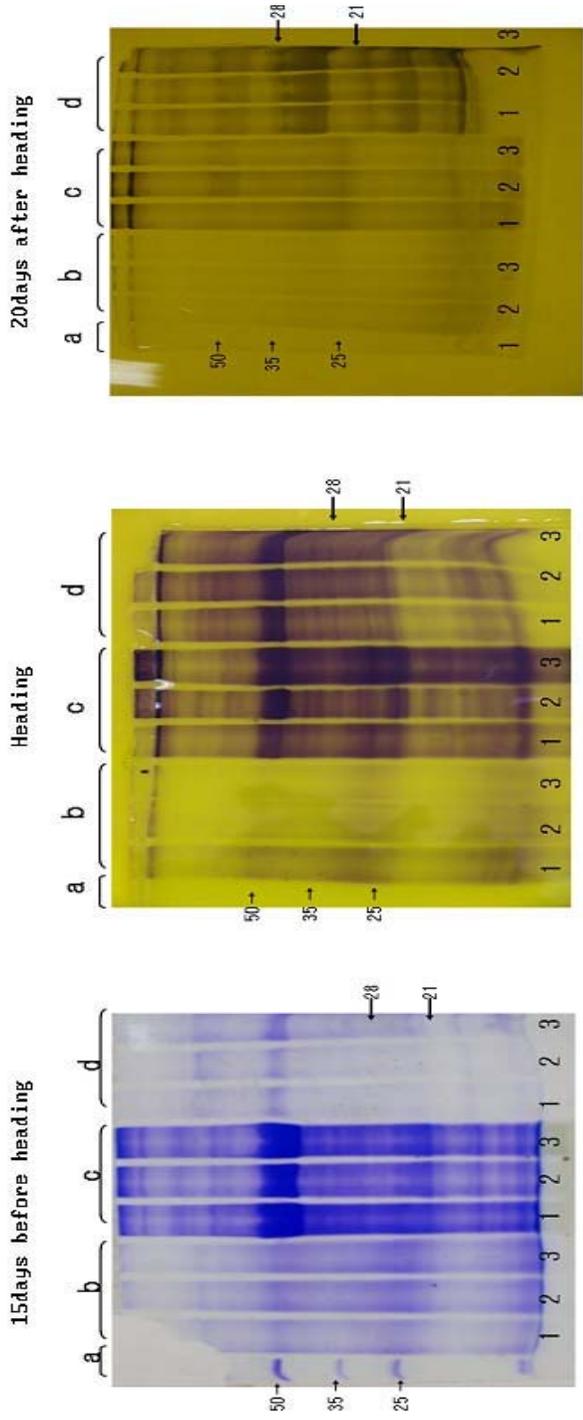


Fig 16. Subunits of proteins separated from plant tissues of Donganbyeo at major growth stages grown with hydroponic culture under three different Fe levels. (a: Molecular marker, b: Roots, c: Leaves, d: Panicle, 1: 0ppm, 2: 20ppm, 3: 40ppm)

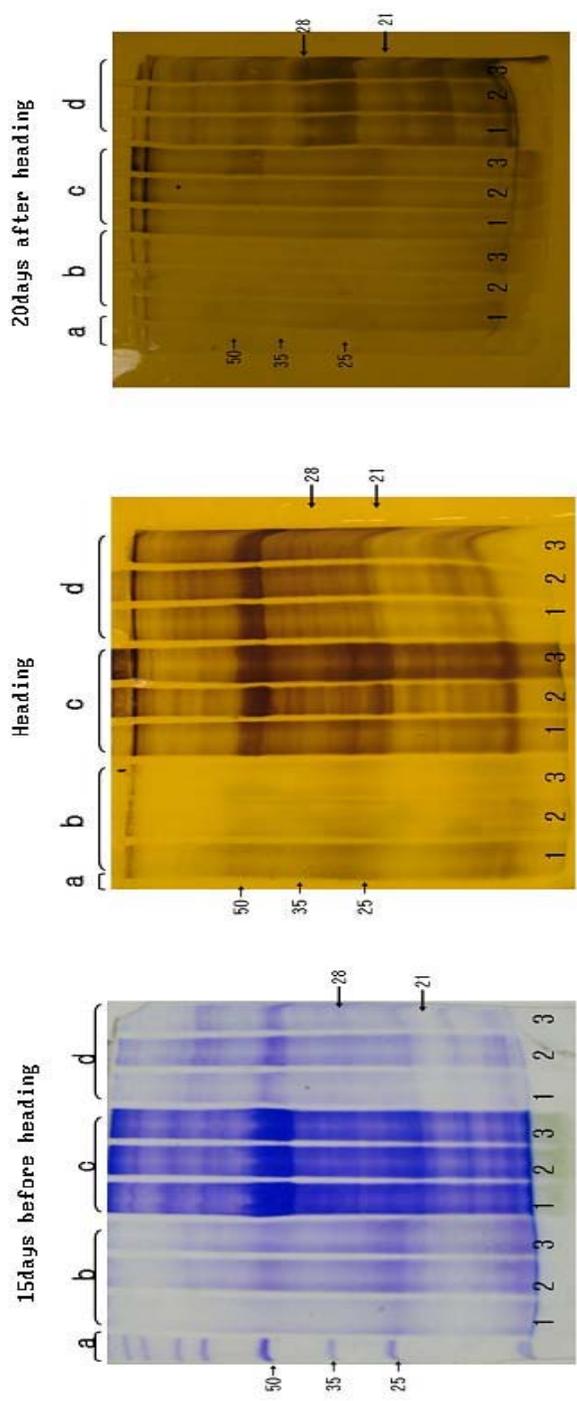


Fig 17. Subunits of proteins separated from plant tissues of Hwashinbyeo at major growth stages grown with hydroponic culture under three different Fe levels. (a: Molecular marker, b: Roots, c: Leafs, d: Panicle, 1: 0ppm, 2: 20ppm, 3: 40ppm)

철분 처리를 다르게 하여 재배된 동안벼와 화신벼의 종실을 SDS-PAGE에 의해 단백질을 분석한 결과는 Figure 18과 같다.

Fe 처리구에서는 21kDa 단백질에서 밴드가 나타났으며 무처리구에서는 밴드가 나타나지 않았다. 또한 이 밴드들은 철분 함량이 적은 화신벼보다 철분함량이 높은 동안벼에서 선명하게 나타났다. 위의 결과로서 엽신에서의 단백질 분석에서 벼 ferritin 단백질의 subunit 구성은 21kDa과 28kDa에서 존재할 것으로 추정되며 Oh 등(1996)의 결과와 유사한 경향으로 벼에서도 성장과 발달 과정에 따라 식물체의 부위별로 크기가 다른 ferritin 단백질이 존재할 것이라고 사료된다.

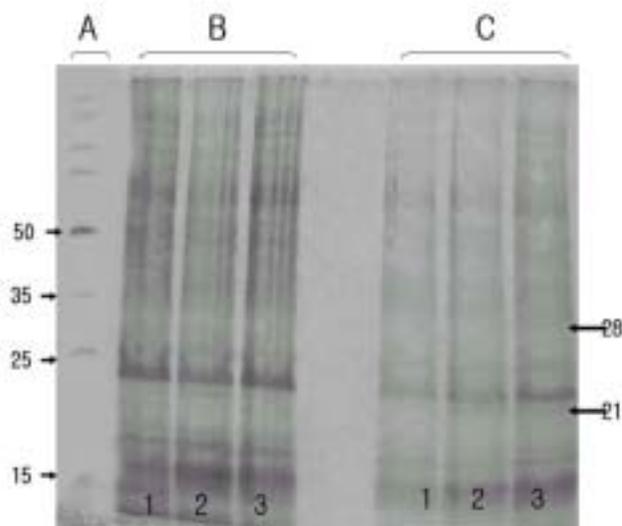


Figure 18. Subunit of proteins separated by SDS-PAGE from the panicles of Donganbyeo and Hwashinbyeo at harvesting stage grown with different Fe levels. (A:molecular marker, B: Donganbyeo, C: Hwashinbyeo, 1; 0ppm, 2; 20ppm, 3; 40ppm).

위의 연구 결과는 프로테옴 해석의 기본적인 출발점이지만, 앞으로 프로테옴 해석 수법을 이용하여 벼의 철분 함량이 다른 농도별, 시기별, 부위별 및 품종간 등의 단백질 함량과 각각 subunit으로 구성되는 단백질의 ferritin 단백질과의 관계를 구명하며, 단백질 세포 내에서의 기능을 해명할 필요성이 있다. 우선, 세포 내 단백질은 다종류이기 때문에 전기영동을 비교해서 목적 단백질을 검출하는 것은 그 양이 전 단백질의 1% 보다 지나지 않는 것이 많기 때문에 CBB로 염색하지 않고 Western blotting에 의해 검출하는 것이 일반적이다. 이것은 전기영동에 의해서 gel을 분리한 단백질을 PVDP 막을 전사한 후에 목적으로 하는 단백질의 항체를 이용해서 검출하는 방법이 있으며, 또 하나의 방향은 목적단백질의 분자로서 기능과 구조의 해명에 따른 경우에는 cDNA를 이용한 단백질의 개량 기술과 단백질 발현 기술이 기본이 된다. 그래서 단백질의 1차 구조(아미노산 배열) 정보를 이용할 수 있다. 그리고 단백질의 기능을 해명하기 위해서는 단백질의 번역후의 수식, 발현량, 발현시기, 국재성, 단백질의 상호작용 등을 분석할 필요성이 있으며, 프로테옴 해석에서 지금까지 분석결과와 게놈해석에 의한 유전자 분석결과에 의하여 단백질의 기능을 알아낸다. 이런 결과로 얻어진 SDS-PAGE 및 2-DE의 패턴과 각각의 단백질의 배열과 구조에 대한 정보, SDS-PAGE 및 2-DE에서 분리된 단백질을 code 하는 유전자 정보, 단백질의 기능에 대한 정보에 대하여는 Database화하여 벼의 철분 연구를 하는 연구자가 이용할 수 있도록 하는 것이 중요하다. 끝으로 프로테옴 해석에 의해서 이러한 단백질의 기능발현 양식에 대하여 깊게 파악할 수 있으며 단백질의 기능 발현을 유전적으로 개량함으로써 생산성이 높은 품종을 육성할 수 있다고 생각한다.

4. 결과요약

본 연구는 철분함량이 상이한 두 가지 벼 품종을 이용하여 철분농도 수준을 달리하여 재배하면서 단백질 및 철 단백질을 조사하여 철분함량이 높은 품종을 개발하기 위하여 수행하였다. 공시품종으로는 동안벼와 화신벼를 사용하였으며, 철 농도는 0, 20, 40 ppm의 3개 수준으로 처리하여 수경 재배하면서 생장반응, 무기양분의 흡수와 이용, 철-단백질은 주요 생육시기 및 식물체 부위별 조사하였으며, 철-단백질은 SDS-PAGE에 의해 분리하였다. 본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 초장은 이앙 후 34일까지는 완만한 증가를 보였고, 그 후부터 이앙 후 48까지 14일 동안은 급격한 증가를 보였으며, 이후 수확기까지는 큰 차이를 보이지 않았다. 전 시기를 통틀어 두 품종간의 초장은 큰 차이를 보이지 않았다. 철 농도 수준간의 초장을 비해 보면, 두 품종 공히 철 농도 수준이 낮을수록 약간 높게 나타났다.

2. 분얼수는 이앙 후 41일까지는 현저한 증가를 보였고, 이후 수확기까지는 아주 적은 증가를 나타냈다. 철 처리별로 보면, 20ppm 처리구가 전 시기를 통틀어 다른 처리구보다 매우 많았으며, 품종간에는 현저한 차이를 보이지는 않았다.

3. 생체중은 출수 전 15일에서 수확기에 이르기까지 20ppm 처리구가 다른 처리구에 비해 높았다. 동안벼는 15DBH에서 수확기에 이르기까지 큰 차이를 보이지 않았으나, 화신벼에서는 15DBH에서 출수 후 20일까지는 약간의 증가를 보였으며 이후 감소하였다. 생체중과 달리, 건물중은 15DBH에서 수확기까지 점차적이 증가를 보였으며, 철분20ppm 처리구가 다른 처리구에 비해 건물중이 높았다.

4. S/R률은 15DBH에서 수확기까지 지속적인 증가를 보였다. 두 품종간에 S/R률은 서로 다른 경향을 보였는데, 철 사용량이 높을수록 동안벼는 S/R

률이 낮았으며, 화신벼는 반대의 경향을 보였다. 수확기 S/R률을 보면 동안벼는 20ppm 처리구에서 약 25로 가장 높았고, 화신벼는 40 ppm 처리구에서 약 33으로 가장 높았다.

5. 광합성량은 동안벼가 화신벼에 비해 높았으며, 철분 처리간에는 현저한 차이를 보이지 않았다. 동안벼는 철 20ppm 처리구에서 광합성량이 가장 높았으며, 반면에 화신벼는 철분 시용량이 많을수록 광합성량이 낮았다.

6. 수량은 두 품종 모두에서 철농도 수준 간에 비슷한 경향을 보였고, 동안벼와 화신벼 모두 철분 20ppm 처리구에서 각각 개체당 235g와 개체당 279g로 가장 높은 값을 보였다. 수량구성요소 중에 등숙률과 1000립중에서 철분 처리간의 효과가 현저하게 나타났다.

7. 식물체 부위별 철분의 함량은 품종간과 시기별로 현저한 차이를 보였다. 출수기와 수확기 두 시기에서 식물체 부위별 철 함량을 비교해 보면, 동안벼에서는 뿌리, 줄기, 엽신, 이삭 순으로 높게 나타났고, 화신벼에서는 뿌리, 엽신, 줄기, 이삭 순으로 높게 나타났다. 수확기에선 동안벼가 화신벼에 비해 철분 함량이 높게 나타났다. 동안벼의 이삭의 철 함량은 0, 20, 40 ppm 철분 처리에서 각각 94, 144, 140 ppm을 보였고, 화신벼의 이삭에서는 84, 105, 117 ppm을 보였다.

8. 철분의 흡수량은 두 품종간에 서로 다른 경향을 보였는데, 동안벼는 출수기에서 수확기까지 다른 처리구에 비해 20ppm 처리구에서 철분 흡수량이 가장 높았다. 반면에 화신벼는 출수 전 15일부터 출수 후 20일까지 다른 처리에 비해 40 ppm 처리구가 가장 높았으며, 20ppm 철분처리구와 비교해 큰 차이를 보이지는 않았다.

9. 뿌리생장점, 성숙된 뿌리, 성숙엽, 줄기 그리고 이삭의 순으로 전류되는 철분의 전류량은 두 품종 모두에서 현저히 감소되는 것으로 나타났으며, 동안벼는 뿌리 성장점에서 성숙된 뿌리로의 전류량을 제외하고는 화신벼에

비해 약간 높게 나타났다. 출수 전 15일에 뿌리생장점으로부터 성숙된 뿌리로의 철 전류량은 동안벼와 화신벼에서 각각 42와 50을 나타냈다. 또한, 줄기에서 이삭으로의 철분 전류량은 동안벼와 화신벼에서 각각 9과 8.5의 값을 보였다.

10. 이삭에서의 수용성 단백질의 함량은 동안벼에서는 0, 20, 40 ppm 처리구에서 각각 0.58, 0.70, 0.80%로 나타났으며, 화신벼에서는 각각 0.32, 0.78, 0.50%로 나타났다. 수용성 단백질의 함량은 품종과 철 처리간에 현저한 차이를 보였으며, 품종과 철분 처리간의 상호작용 효과 또한 통계적으로 유의성이 인정됐다.

11. Ferritin 단백질 분자량은 두 품종의 출수 전 15일의 엽 부위의 시료로 SDS-PAGE에 의한 분석 결과, 철분 처리구에서 21, 24, 28kDa으로 나타났다. 21kDa와 28kDa 사이에 나타난 철 단백질들은 출수기와 수확기에서도 나타났다.

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

- 식물의 영양대사계의 유전자 control 기술개발 제공
- 벼의 가공용 고유 품종개발에 의한 지적소유권 확보
- 분자유종기술의 확립으로 육종기간을 획기적으로 단축할 수 있는 생력육종기술 개발
- 천연 철성분이 다량 필요한 임산부, 유아 등에 천연영양식품으로 제공
- 국내 이유식산업에 고부가가치 가공용 고농도 철단백질 생산미 제공

제 5 장 참고문헌

- Bienfait, H.F. (1989) Prevention of stress in iron metabolism of plants. *Acta Botanica Neerlandrica* 38: 105-129.
- Moraghan, J.T. and H.J. Mascagni. (1991) Environmental and soil factors affecting micronutrient deficiencies and toxicities. *In Micronutrients in agriculture*, 2d edition, ed J.J. Mortvedt, F.R. Cox, L.M. Shuman, and R.M. Welch, 371-425. Madison, Wis., USA : Soil Science Society of America.
- Welch, R.M. (1986) Effects of nutrient deficiencies on seed production and quality. *Advances in Plant Nutrition* 2: 205-247.
- Shojima, S, N.K. Nishizawa, S. Fushiya, S. Nozoe, T. Irifune, and S. Mori. (1990) Biosynthesis of phyto siderophores: *In vitro* biosynthesis of 2'-deoxymugineic acid from L-methionine and nicotianamine. *Plant Physiology* 93: 1497-1503.
- Welch, R.M. (1994) Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12.
- Hong-qing Ling, G. Koch, H. Baumlein, and M.W. Ganal. (1999) Map-based cloning of *chloronerva*, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*96: 7098-7103.
- Kyoko Higuchi, Kazuya Suzuki, Hiromi Nakanishi, Hirotaka Yamaguchi, Naoko-Kishi Nishizawa, and Satoshi Mori. (1999) Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phyto siderophores. *Plant Physiology* 119 : 471-479
- Stephane Lobreaux, Olivier Massenet and Jean-Francois Briat (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Molecular Biology* 19: 563-575
- Maria Ragland, Jean-Francois Briat, Jean Gagnon, Jean-Pierre Laulhere, Olivier Massenet, and Elizabeth C. Theil (1990) Evidence for

- conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. *J. Biol. Chem.* 265 : 18339-18344
- Michael J. Spence, Michael T. Henzl and Peter J. Lammers (1991) The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage protein ferritin. *Plant Molecular Biology* 17: 499-504
 - Mark FVD, Bienfait F, and Ende HVD (1983) Variable amounts of translatable ferritin mRNA in bean leaves with various iron contents. *Biochemical and Biophysical Res Communications.* 115(2) : 463-469
 - Lobreaux S. and Briat J. (1991) Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochem. J.* 274 :601-606
 - Vogelmann TC, Larson PR, and Dickson RE (1982) Translocation pathways in the petioles and stem between source and sink leaves of *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh. *Planta* 156 : 345-358
 - P. A. Zimmerman, N Lang-Unnasch and C.A. Cullis (1989) Polymorphic regions in plant genomes detected by an M13 probe. *Genome* 32: 824-828
 - Briat JF, Massenet O, Laulhere JP (1989) A Jack Bean protein similar to seed ferritin and unrelated to concanavalin A is the only iron storage protein in Jack Bean seeds, although concanavalin A can form ferritin-like iron cores *in vitro*. *J Biol Chem* 264 : 11550-11553.
 - Crichton RR (1990) Proteins of iron storage and transport. *Adv Protein Chem* 40 : 281-353.
 - Dickey LF, Wang YH, Shull GE, Wortman IA, Theil EC (1988) The importance of the 3'-untranslated region in the translational control of ferritin mRNA. *J Biol Chem* 263 : 3071-3074.
 - Harrison PM, Artymiuk PJ, Ford GC, Lawson DM, Smith JMA, Treffry A, White JL (1989) function and structural design of an iron-storage protein. In : Mann S, Webb J, Williams RJP(eds) *Biom mineralization : Chemical and Biomedical perspectives*, pp. 257-294.

- Koeller DM, Casey JL, Hentze MW, Gerhardt EM, Chan LN, Klausner RD, Harford JB (1989) A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferrin receptor mRNA. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 3574-3578.
- Laulhere JP, Lescure AM, Briat JF (1988) Purification and characterization of ferritins from maize, pea and soyabean seeds. J Biol Chem 263 : 10289-10294.
- Lescure AM, Proudhon D, Pesey H, Ragland M, Theil EC, Briat JF (1991) Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA.
- Longnecker N, Welch RM (1990) Accumulation of apoplasmic iron in plant roots. Plant Physiol 92 : 17-22.
- Mullner EW, Kuhn L (1988) A stem loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. Cell 53 : 815-825.
- Proudhon D, Briat JF, Lescure AM (1989) Iron induction of ferritin synthesis in soybean cell suspensions. Plant Physiol 90 : 586-590.
- Rouault TA, Teng CK, Kaptain S, Burgess WH, Haile DJ, Samaniego F, Mc Bridge OW, Harford JB, Klausner RD (1990) Cloning of the cDNA encoding an RNA regulatory protein - the human iron-responsive element-binding protein. Proc Natl Acad Sci USA 87 : 7958-7962.
- Seckbach S (1968) Studies on the deposition of plant ferritin as influenced by supply of iron to iron-deficient beans. J Ultrastructure Res 22 : 313-423.
- Spence MJ, Henzl MT, Lammers PJ (1991) The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage ferritin. Plant Mol Biol 117 : 499-504.
- Theil EC (1987) Ferritin : structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms. Annu Rev Biochem

56 : 289-315.

- van der Mark F, de Lange T, Bienfait HF : The role of ferritin in developing primary bean leaves under various light conditions. *Planta* 153 : 338-342 (1981).
- van der Mark F, Bienfait HF, van der Ende H (1983) Variable amounts of translatable ferritin mRNA in bean leaves with various iron contents. *Biochem Biophys Res Commun* 115 : 463-469.
- Wang YH, Sczekan SR, Theil EC (1990) Structure of the 5' untranslated regulatory region of ferritin mRNA studied in solution. *Nucl Acids Res* 18 : 4463-4468.
- Cho YG, SR McCouch, M. Kuiper, MR Kang, J Pot, JTM Groenen and MY Eun (1998) Intergrated Map of AFLP, SSLP and RFLP markers using a recombinant Inbred Population of Rice (*Oryza sativa* L.). 1998. *Theoretical & Applied Genetics* 97: 370-380
- A. Motta, B. Basso, J.F. Briat, C. Soave (2001) Ferritin synthesis in response to iron in the Fe-inefficient maize mutant *ys3*. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 461-465.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Branton D, Jacobson L (1962) Iron transport in pea plants. *Plant Physiol* 37, 539-545.
- Briat J.F. and Lobreaux S. (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 187-193.
- Crichton RR (1990) Proteins of iron storage and transport. *Adv protein Chem* 40: 281-353.
- Crichton, R.R., Poze-Ortiz, Y., Koch, M.H.J., Parfait, R., and Stuhmann, H.B. (1978) Isolation and characterization of phytoferritin from pea (*Pisum sativum*) and Lentil (*Lens esculenta*). *Biochem.J.* 171, 349-356.

- F. Barcelo, C. Otero Arean, and G.R. Moore. (1995) Isolation and preliminary characterisation of ferritin from clover seeds. *Biometals* 8, 47.
- F. Barcelo, F. Miralles, and C. Otero Arean (1997) Purification and Characterization of ferritin from Alfalfa Seeds. *Journal of Inorganic Biochemistry* 66, 23-27.
- F. Barcelo, F. Miralles, and C. Otero Arean (1997) Purification and Characterization of ferritin from Alfalfa Seeds. *Journal of Inorganic Biochemistry* 66, 23-27.
- Fabio Raguzzi, Emmanuel Lesuisse and Robert R. Crichton (1988) Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. Vol.231, No.1, 253-258.
- I. Murgia, J.F. Briat, D. Tarantino, C. Soave (2001) Plant ferritin accumulates in response to photoinhibition but its ectopic overexpression does not protect against photoinhibition. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 797-805.
- Irene Murgia, Jean Francois Briat, Delia Tarantino, Carlo Soave (2001) Plant ferritin accumulates in response to photoinhibition but its ectopic overexpression does not protect against photoinhibition. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 797-805.
- J.F. Briat, S. Lobreaux, N. Grignon and G. Vansuyt (1999) Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 56, 155-166.
- J.P. Laulhere, A.M. Laboure, and J.F. Briat (1989) Mechanism of the Transition from Plant Ferritin to Phytosiderin. Vol.264, No.6, Issue of February 25, pp.3629-3635.
- J.P. Laulhere, A.M. Lescure, and J.F. Briat (1988) Purification and Characterization of Ferritins from Maize, Pea, and Soyabean Seeds. Vol.263, No.21, Issue of July 25, pp.10289-10294.
- Jean-Francois Briat and Stephane Lobreaux (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends in plant science*.

- O Jean-Francois Briat, Isabelle Fobis-Loisy, Nicole Grignon, Stephane Lobreaux, Nadine Pascal, Gil Savion, Severine Thoiron, Nicolaus von Wiren, Olivier Van Wuytswinkel (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biol Cell* 84, 69-81.
- O Joshi, J.G. (1990) Minireview: Aluminum, a neurotoxin which affects diverse metabolic reactions. *Bio.Factors* 2, 163-169
- O Keith M. Erikson, John L. Beard, and James R. Connor (1998) Distribution of brain iron, ferritin, and transferrin in the 28-day-old piglet. *Nutritional Biochemistry* 9: 276-284.
- O Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- O Laulhere, J.P., A.M. Lescure, and J.F. Briat (1988) Purification and characterization of ferritins from maize, pea, and soybean seeds: Distribution in various pea organs. *J.Biol.Chem.* 263, 10289-10294.
- O Lescure A.M., Proudhon D., Pesey H., Ragland M., Theil E.C. and Briat J.F. (1991) Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 8222-8226.
- O Lobreaux S, Briat JF (1991) Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochem J.* 274: 601-606.
- O Lobreaux S, Massenet O, Briat JF (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol. Biol* 19: 563-575.
- O Marentes E. and Grusak M.A. (1998) Iron transport and storage within the seed coat and embryo of developing seeds of pea (*Pisum sativum* L.). *Soil Science Res.* 8: 367-375.
- O N. Dennis Chasteen and Pauline M. Harrison (1999) Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage. *Journal of Structural Biology* 126, 182-194.
- O O⁺ Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* 250, 4007-4021.

- Paul D. Hempstead, Aaron J. Hudson, Peter J. Artymiuk, Simon C. Andrews, Mark J. Banfield, John R. Guest, Pauline M. Harrison (1994) Direct observation of the iron binding sites in a ferritin. *FEBS Letters* 350, 258-262.
- Pauline M. Harrison, Paolo Arosio (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1275, 161-203.
- Price, D.J. and J.G. Joshi (1982) Ferritin: A zinc detoxicant and a zinc ion donor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3116-3119.
- Proudhon D., Briat J.F. and Lescure A.M. (1989) Iron induction of ferritin synthesis in soybean cell suspensions. *Plant Physiol.* 90: 586-590.
- S.H. Kim, I.S. Nou, C.S. Choi, K.K. Kang (2001) Transformation of Lettuce(*Lactuca sativa* L.)Using Iron Storage Protein Ferritin Gene. *Korean J. Plant Tissue Culture* Vol.28, No.3, 147~151.
- S.H. Oh, S.W. Cho. T.H. Kwon and M.S. Yang (1996) Purification and Characterization of Phytoferritin. *J.Biochem. Mol. Biol.* Vol.29. No.6 pp.540~544.
- S. Lobreaux, O. Massenet, and J.F. Briat, (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol. Biol.* 19, 563.
- S. Lobreaux, O. Massenet, and J.F. Briat. (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol.Biol.* 19, 563.
- Sczekan,S.R, and J.G.Joshi (1987) Isolation and characterization of ferritin from soybeans(*Glycine max*). *J.Biol.Chem.* 262, 13780- 13788.
- Seckback J.J. (1982) Ferreting out the secret of plant ferritin a review.*J. Plant Nutr.* 5: 369-394.
- Skikne,B.S., Whittaker,P., Cooke,A. and Cook.J.D. (1995) Ferritin excretion and iron balance in humans. *Br. J. Haematol.* 90, 681-687.
- Towbin,H., Staehlin,T., and Gordon,J. (1979) *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:*

procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350-4354.

- Yi Jin and Robert R.Crichton (1987) Iron transfer from ferritin to transferrin Effect of serum factors. Vol.215(1):41-46.
- 오석홍, 서경원 (1998) 콩 유용성분 탐색에 관한 연구: 콩 ferritin의 정제 및 특성. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. Vol.41(7) :522~526

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.