

## 담배 인산수송자 유전자를 이용한 벼의 형질전환

유남희<sup>1,3</sup> · 윤성중<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>(주)그린바이오텍 생명공학연구소, <sup>2</sup>전북대학교 농과대학 생물자원과학부, <sup>3</sup>전북대학교 농업과학기술연구소

### Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.) with Phosphate Transporter cDNA from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

YOO, Nam Hee<sup>1,3</sup> · YUN, Song Joong<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Greenbiotech Co., Ltd., Paju, 413-830, Korea

<sup>2</sup>Faculty of Biological Resources Sciences, Chonbuk National University, chonju, 561-756, Korea

<sup>3</sup>Institute of Agricultural Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

**ABSTRACT** In order to improve phosphate use efficiency of rice using phosphate transporter (PT), transgenic rice plants containing a tobacco PT gene were developed. Calli from Dongjinbyeo (*Oryza sativa* L.) were cocultured with *A. tumefaciens* LBA 4404 harboring PT gene. Multiplied calli were transferred to MS medium supplemented with 50 mg/L hygromycin, 500 mg/L carbenicillin, 2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L NAA. After 2 weeks, hygromycin resistant shoots were obtained from the calli on the selection medium. The putative transgenic shoots were transferred to rooting MS medium supplemented with 250 mg/L cabenicillin. Plant regeneration rate from the calli was about 52%. Stable incorporation of the tobacco PT gene into rice genomic DNA was confirmed by PCR and Southern blot analysis.

**Key words:** *Agrobacterium* transformation, PCR, Southern blot, Transgenic rice

## 서 론

인산은 작물생육에 필요한 다량원소이며 작물 건물중의 약 0.2%를 차지한다. 인산은 핵산, 인지질, ATP 등의 구성성분이며 효소활성 및 대사경로의 중요한 조절요소로 작용하여 작물 생육에 필수적이다 (Theodorou and Plaxton 1993). 인산은 생화학 에너지를 소비하여 세포막을 가로질러 뿌리세포 내로 흡수된다 (Marschner 1995). 인산의 흡수와 이동은 세포막과 미소기관의 막에 존재하는 인산 수송자 (phosphate transporter, PT)를 통하여 능동적으로 이루어진다. 뿌리의 세포막에서 인산을 흡수하는 작용을 하는 인산수송자 유전자는 최근에 *Arabidopsis* (Muchhal et al. 1996), 토마토 (Liu et al.

1998), 감자 (Leggewie et al. 1997), 담배 (Baek et al. 2001) 등에서 분리되어 이들 유전자의 구조와 발현 조절 특성이 밝혀지고 있다. 뿌리 세포막에는 인산 친화도가 50 - 330  $\mu$ M인 2 종류의 인산수송자 동위형이 존재한다. 뿌리 세포막의 인산 수송자 중 친화도가 상대적으로 낮은 동위형은 항시적으로 발현되며 인산부족시 발현이 더 높아지는 반면, 친화도가 더 높은 수송자는 주로 뿌리에서 인산부족 조건에서만 발현된다 (Schachman et al. 1998). 이는 인산 농도가 현저히 감소할 경우, 식물은 인산에 대한 친화도가 더 높은 수송자를 발현하여 낮은 인산 농도에서 효과적으로 생존하는 것으로 생각되어진다. 이러한 식물의 생존 기작은 인산 고친화도 수송자 유전자를 이용한 작물의 인산 이용효율 개량 가능성을 시사하고 있다. 담배에 고친화도 인산 수송자를 촉진 발현시키면 저 인산 조건에서의 세포 생장률이 증가한다는 보고 (Mitsukawa et al. 1997)는 고친화도 인산 수송자를 이용한 인산 흡수효율 개선 연구의 필요성을 구체적으로 제시한 예라 할 수 있다.

\*Corresponding author. Tel 063-270-2508 Fax 063-270-2640  
E-mail sjyun@moak.chonbuk.ac.kr

본 연구에서는 인산 이용효율이 높은 벼 계통 선발을 위해 담배의 인산수송자 유전자를 벼에 도입하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 Callus 유도

농촌진흥청 호남농업시험장에서 분양받은 동진벼를 실험에 사용하였다.

성숙종자의 영을 제거하고 2% sodium hypochlorite (100 µl Tween 20 첨가)에 50분간 교반하여 표면살균하였으며, 멸균수로 5회 세척한 후 2 mg/L 2,4-D가 첨가된 N<sub>6</sub> (Chu et al. 1975) callus 유도 배지에 15립씩 치상하였다. 25°C, 암조건에서 4주간 배양한 후 단단하면서도 잘 부스러지는 callus를 분리하여 callus 유도배지에 옮겨 3일간 25°C, 암조건에서 전배양하였다.

### 인산수송자 분리 및 형질전환

실험에 사용된 담배의 고친화도 인산수송자 (phosphate transporter, PT) 유전자는 감자의 인산수송자 유전자를 탐침으로 이용하여 담배의 cDNA library로부터 분리하였다 (Baek et al. 2001). 분리한 PT 유전자를 포항공대에서 분양받은 ubiquitin promoter를 갖는 pGA 1611 vector에 재조합하여 (Figure 1) freezing-thawing 방법을 이용하여 *A. tumefaciens* LBA 4404에 도입하였다 (An et al. 1988).

pGA-PT 유전자 재조합체가 도입된 *A. tumefaciens* LBA 4404를 4 mg/L tetracycline이 포함된 AB (3 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 0.15 g/L KCl, 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.012 g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.025 g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 g/L glucose) 액체배지에서 28°C, 암상태에서 72시간 동안 진탕배양 (250 rpm)하였다. *Agrobacterium* 배양액을 원심분리하여 수확한 후 100 µM acetosyringone이 첨가된 AAM (75 mg/L glycine, 877 mg/L glutamine, 266 mg/L aspartic acid, 50 mg/L casamino acid, 65.5 g/L sucrose, 35 g/L glucose, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>와 KNO<sub>3</sub>를 제외하고 2.74 g/L KCl이 첨가된 MS 기본배지, pH 5.2) 액체배지에 10배 희석하여 전배양한 callus를 30분간 접종하였다. *Agrobacterium*을 접종한

callus는 100 µM acetosyringone, 2 mg/L 2,4-D, 10 g/L glucose가 첨가된 N<sub>6</sub> 배지에 치상하여 21°C, 암상태에서 3일간 배양하였다.

### 형질전환 식물체 선발

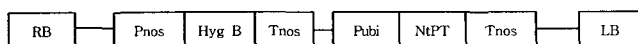
형질전환체 1차 선발을 위해 공동배양된 callus를 500 mg/L carbenicillin, 40 mg/L hygromycin B, 2 mg/L 2,4-D가 첨가된 N<sub>6</sub> 배지에 옮긴 후 25°C, 암상태에서 배양하였다. 형질전환체 2차 선발을 위해 증식된 callus를 500 mg/L carbenicillin, 50 mg/L hygromycin B, 1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L BA가 첨가된 N<sub>6</sub> 배지에 옮긴 후 25°C, 암상태에서 배양하였다. 선발배지에서 증식된 callus를 250 mg/L carbenicillin, 2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L NAA, 20 g/L sorbitol, 50 g/L sucrose가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 재분화 배지에 치상하고 25°C, 연속조명 조건에서 배양하였다. 재분화 배지에서 분화된 식물체를 MS 기본배지에 옮겨 뿌리를 유도하고, 얻어진 식물체를 pot에 이식하여 온실에서 순화시킨 후 특성을 검정하였다.

### PCR

선발된 재분화 벼 식물체에 대한 PCR분석을 통하여 담배 PT 유전자의 삽입여부를 확인하였다. Hong 등 (1993)의 방법에 따라 추출한 벼 genomic DNA와 담배의 인산수송자 유전자 특이적 정방향 primer (5'-TGAGAAAGCTTAGTC ATGGC-3')와 역방향 primer (5'-ACACGAATTCA CAAAAGTGC-3')를 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응액 25 µl의 조성은 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM primer, 200 µM dNTP, 주형 DNA 10 ng 그리고 *Taq* polymerase 1 unit이었다. PCR 반응은 95°C에서 1분간 pre-denaturation 반응을 거친 후 증폭반응 (94°C에서 50초, 55°C에서 50초, 72°C에서 1분간 반응)을 30회 진행하였고 최종 신장반응은 72°C에서 3분간 실시하였다. PCR 산물은 0.5 µg/L EtBr이 포함된 1% agarose gel에서 전기영동 후 UV하에서 확인하였다.

### Southern blot 분석

PCR을 통하여 형질전환 식물체의 genomic DNA로부터 증폭한 DNA 단편을 1% agarose gel에서 전기영동한 후, capillary transfer 방법 (Southern 1975)을 이용하여 나일론 막에 전이시켰다. Dig-High Prime Labeling kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 표지된 담배의 인산수송자 유전자 탐침과 Dig Nucleic Acid Detection kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 Southern 분석을 수행하였다.



**Figure 1.** Partial structure of the binary vector, pGA-PT, containing phosphate transporter (PT) expression cassette. Abbreviations used are : Pnos, nopaline synthase promoter; Hyg B, hygromycin phosphotransferase gene; Tnos, polyadenylation signal of the nopaline synthase gene; Pubi, polyubiquitin gene promoter; NtPT, *Nicotiana tabacum* phosphate transporter; RB, T-DNA right border; LB, T-DNA left border.

결과 및 고찰

Callus 선발

담배의 인산수송자 유전자가 도입된 *A. tumefaciens* LBA 4404와 공동배양한 벼의 callus를 약 3주간 배양하였다. 그 결과 많은 callus에서 증식이 억제되고 갈변화하는 증상을 보였으나, 일부 callus는 왕성하게 증식하거나 또는 갈변된 callus의 일부 세포로부터 callus가 출현하여 빠른 속도로 증식하였다.

형질전환과 식물체 재분화

2차 선발을 통해 증식된 callus를 재분화배지에 치상하였다. 치상 1주일 경부터 녹점이 형성되었으며, 2주 후부터 신초와 뿌리가 형성되었다 (Figure 2A). 식물체 재분화는 2차 선발된 callus로부터 약 52%의 출현율을 나타내었으며, 소식물체의 길이가 3 cm 이상일 때 건전한 식물체 생육을 위해 MS 기본배지에 이식하였다 (Figure 2B).

이식 후 7일째부터 모든 식물체에서 양분 결핍 증상과 유사하게 잎 선단부부터 암갈색으로 변하거나 검은 반점들이 출현하였고, 반면 1/2 MS 배지에 이식한 유식물체에서는 일부 개체만 소수의 검은 반점이 출현하였다 (Figure 3). 이것은 인산 수송자의 발현에 따른 인산 과다 흡수에 의한 길항작용으로 K, Fe, Zn, Cu 등의 결핍에 따른 증상이 아닌가 사료되나 이에 대한 추후 연구가 필요하리라 생각된다.

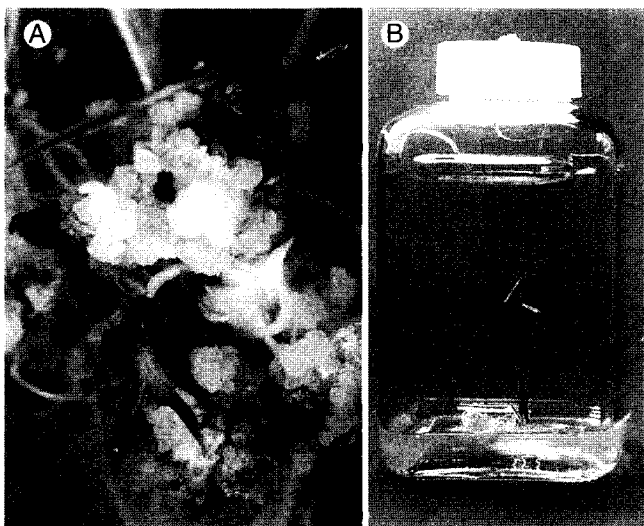


Figure 2. Transgenic rice shoots transformed with NtPT cDNA growing on the medium containing 50 mg/L hygromycin (A). Regenerated rice plantlets growing in the rooting medium (B).

PCR과 Southern blot 분석

재분화된 유식물체 내로의 인산수송자 유전자 삽입 여부를 확인하기 위해 genomic DNA를 추출하고 담배의 인산수송자 유전자 특이적인 primer 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 모든 형질전환 식물체에서 예상되는 크기의 1.7 kb 단편이 증폭되었지만, 대조 식물체에서는 아무런 band도 출현하지 않았다 (Figure 4A). Lane 1은 인산수송자 유전자가 재조합된 binary vector에서 증폭된 단편이며, lane 3, 4, 5, 6, 7은 형질전환한 벼로부터 증폭된 DNA 단편이다. 형질전환된 식물체에서는 예상된 크기인 1.7 kb의 DNA 증폭 단편을 볼 수 있으나, 형질전환하지 않은 식물체 (lane 2)에서는 DNA 단편이 증폭되지 않아 담배의 인산수송자 유전자가 벼 게놈상에 삽입된 것으로 추정되었다.

담배의 인산수송자 유전자를 탐침으로 사용하여 PCR 증폭 DNA 단편에 대한 Southern blot 분석을 실시한 결과 pGA-PT 재조합 DNA나 형질전환 식물체 모두에서 1.7 kb의 band가 검출되었다 (Figure 4B). 이것은 선발된 식물체에 담배의 인산수송자 유전자가 안정적으로 도입되었음을 나타내는 결과이다.

작물의 양분 이용 효율 개선 연구는 주요 식량 작물에 대하여 진행되고 있으며 근래 이에 대한 연구에 관심이 고조되고 있다. 최근 작물의 양분흡수 기작에 관한 분자 수준의 연

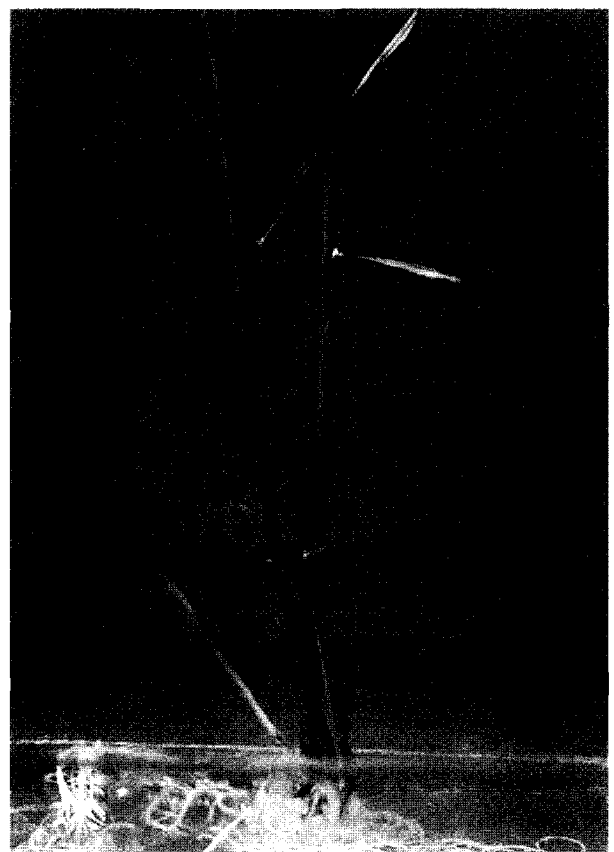
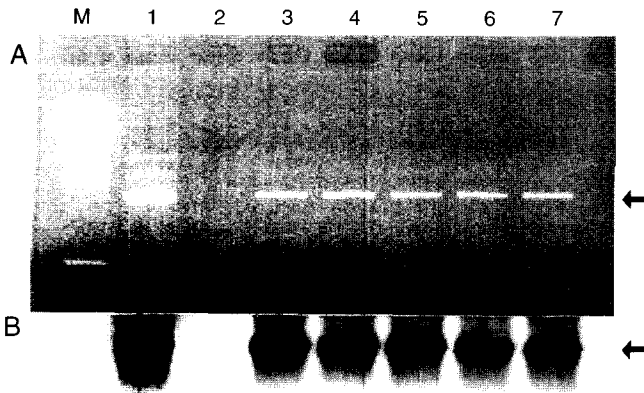


Figure 3. Dark spots (arrowed) on leaves of the regenerated rice plant growing in MS basal medium.



**Figure 4.** PCR (A) and Southern blot analysis (B) of NtPT transgene. A. M, Lamda DNA/*Hind* III DNA r.marker; lane 1, pGA-PT plasmid vector; lane 2, nontransgenic plant; lanes 3-7, transgenic plants transformed with pGA-PT. 1.7 kb amplification products are arrowed. B. Lane 1, pGA-PT plasmid vector; lane 2, nontransgenic plant; lanes 3-7, transgenic plants transformed with pGA-PT. 1.7 kb fragments hybridized with the PT probe are arrowed.

구가 활발히 진행되고 있으며 그 중에서 인산의 흡수 기작에 대한 연구는 주로 쌍자엽 식물을 대상으로 진행되어 *Arabidopsis* (Muchhal et al. 1996; Smith et al. 1997), 토마토 (Liu et al. 1998), 감자 (Leggewie et al. 1997)의 무기인산 수송유전자의 종류와 발현특성이 자세히 밝혀지고 있다. 그러나 벼의 무기인산수송자 유전자의 분리 및 이용을 위한 분자적 연구는 미흡한 실정이다.

*Arabidopsis*의 고친화도 인산수송자 유전자가 형질전환된 담배 세포에서의 인산 흡수량은 약 3배 증가하였고 또한 저 인산 조건에서 세포의 생체중은 42%, 건물중은 55% 증가하여 (Mitsukawa et al. 1997) 인산수송자를 이용한 작물의 인산이용 효율개량 가능성을 시사한 바 있다.

따라서 본 연구 결과 얻은 인산수송자 형질전환 벼 계통은 인산 흡수 효율이 높은 벼 품종의 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 인산수송자 유전자는 오염된 내륙수의 정화에 이용 가능한 식물종 개발에도 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

**적 요**

저인산 조건하에서 인산 흡수 효율이 높은 벼 품종을 개발하고자 담배의 인산수송자 유전자를 벼에 형질전환하였다. 동진벼로부터 유도된 callus를 담배의 인산수송자 유전자가 도입된 *A. tumefaciens* LBA 4404와 공동배양한 후, 선발배지에서 증식된 callus를 250 mg/L carbenicillin, 2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L NAA가 첨가된 MS 배지에 옮겨 약 2주 후부터 소 식물체를 얻었다. Carbenicillin 250 mg/L 첨가된 MS 기본 배지에서 소 식물체의 발근을 유도하여 재분화 식물체를 얻었

다. 선발된 callus는 약 52%의 식물체 재분화율을 보였다. 선발된 재분화 식물체에 대한 PCR 분석을 수행하여 형질 전환 벼 식물체에 담배의 인산수송자 유전자가 삽입되었음을 확인하였다. 형질전환체의 genomic DNA로부터 PCR에 의해 증폭된 DNA에 대한 Southern blot 분석 결과, 대조 식물체에서는 band가 검출되지 않았으나 형질전환 식물체에서는 인산수송자 유전자와 동일한 1.7 kb의 band가 검출되어 외래 유전자인 담배 인산수송자 유전자가 안정적으로 도입되었음이 확인되었다.

**참고문헌**

An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988) Binary vectors. Plant Molecular Biology Manual A3:1-19

Baek SH, Chung IM, Yun SJ (2001) Molecular cloning and characterization of a tobacco leaf cDNA encoding a phosphate transporter. Mol. Cells. 10(5) (Accepted)

Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY and Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sin. 18:659-668

Hong Wang, Meiqing Qi and Adrian J. Cutler (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Research 21(17):4153-4154

Leggewie G, Willmitzer L and Riesmeier JW (1997) Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: Identification of phosphate transporters from higher plants. Plant Cell 9:381-392

Liu C, Muchhal US, Uthaoam M, Kononowicz AK and Raghothama KG (1998) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. Plant Physiol. 116:91-99

Marschner, H (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press

Mitsukawa N, Okamura S, Shirano Y, Sato S, Kato T, Harashima S and Shibata D (1997) Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7098-7102

Muchhal US, Pardo JM, and Raghothama KG (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10519-10523

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-497

Schachman DP, Reid RJ and Ayling SM (1998) Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. Plant Physiol. 116:447-453

Smith FW, Ealing PM, Dong B and Delhaize E (1997) The cloning of

- two Arabidopsis genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant J.* **11**:83-92
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:505-517
- Theodorou ME, Plaxton WC** (1993) Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.* **101**:339-344

(접수일자 2000년 9월 9일)