

돼지감자 유래 1-sst와 1-fft 유전자의 형질전환 발현에 의한 벼의 fructan 생합성 증진

강권규 · 송범현 · 이경아 · 이해정 · 박진하 · 정유진 · 조용구

Increment of fructan biosynthesis in rice by transformation of 1-sst and 1-fft genes isolated from jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)

Kwon-Kyoo Kang · Beom-Heon Song · Gyong-A Lee · Hye-Jung Lee · Jin-Ha Park · Yu-Jin Jung · Yong-Gu Cho

Received: 25 February 2010 / Accepted: 10 March 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Fructan has been found to accumulate in various tissues during periods when light levels increased carbon fixation where low temperatures reduced growth rates while photosynthesis continued. In this study, we have cloned 1-sucrose:sucrose fructosyl transferase(1-sst) and 1-fructan:fructan fructosyl transferase (1-fft, a key enzyme for the synthesis of fuctan) from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). The recombinant vector with 1-sst and 1-fft has been constructed under the control of 35S promoter of KJGV-B2 vector and transgenic plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. PCR analysis carried out on the putative transgenic plants for amplification of the coding region of specific gene (1-sst, 1-fft), and *HPT* genes. Transgenic lines carrying of 1-sst and 1-fft were confirmed for integration into the rice genome using Southern blot hybridization and RT-PCR. The transgenic plants in T₂ generation were selected and expression pattern analysis revealed that 1-sst and 1-fft were stable. This analysis confirmed the presence of low-molecular-weight fructan in the seedling of the transgenic rices. Therefore, cold tolerance

and carbohydrate metabolism will be possible to develop resistant plants using the transgenic rice.

Keywords 1-sst, 1-fft, fructan, carbohydrate metabolism, cold tolerance

서론

대부분의 식물은 생장과 발육을 위해 필요한 에너지를 앞에서 광합성 작용을 통해 포도당과 산소를 얻는데 생장에 필요한 양만큼을 남기고 식물체의 각 부분으로 이동하여 소모된다. 그리고 포도당 녹말과 결합하여 기관에 저장되는데 이를 저장 녹말이라고 한다. 포도당과 결합되어 있어 분자가 크며 물에 녹지도 않는다. 따라서 녹말의 상태로는 식물체의 다른 부분으로 이동하기 어렵다. 화본과에 속하는 식물들의 약 15%는 광합성 작용을 통해 얻은 탄수화물을 저장녹말이 아닌 fructose라는 성분으로 저장한다 (Hendry 1987).

Fructan들은 fructose의 중합체로써 Rose (1804)에 의해 *Inula helenium*으로부터 알려졌으며, 이들 물질은 Thompson (1818)에 의해 inulin이라고 불리게 되었다 (Stevens et al. 2001). Fructan들의 형태는 multiple fructose unit들에 연결되어진 glucose와 같은 일반적인 구조를 가지고 있으며 식물에서는 200개 이상의 fructose unit이 한 개의 fructan 분자에 연결되어져 있다. 또한 박테리아 fructan은 100,000 개의 fructose unit으로 구성되어 있다. 자연 상태에서 존재하는 fructan은 몇 가지로 나누어지는데, 이들 형태는

K.-K. Kang · Y.-J. Jung
한경대학교 원예학과
(Hankyong National University, 67 Seokjung-dong, Ansung
456-749, Korea)

B.-H. Song · G.-A. Lee · H.-J. Lee · J.-H. Park · Y.-G. Cho (✉)
충북대학교 식물자원학과
(Chungbuk National University, 410 Seongsong-ro
Heungdok-gu, Chongju 361-763, Korea)
e-mail: ygcho@chungbuk.ac.kr

fructose 잔류기가 서로 다른 형태로 연결되는 것에 의해 glycosidic 연쇄의 기본구조가 구별될 수 있다 (Lewis 1993). 이들 구조는 크게 3가지로 나누어지며, 첫 번째 group은 inulin으로 linear fructan으로 fructose unit이 beta (2→1)결합에 의해 연결되어진다. 몇몇의 단자엽 식물을 포함하여 모든 쌍자엽 식물에 존재하는 fructan으로 알려져 있으며 fructan 중에서 가장 짧은 형태로 구성되어 있다. 두 번째 group인 fructan은 levan으로 linear fructan이며, fructose unit이 beta (2→6)결합에 의해 연결된 형태이다. 이형태의 fructan은 단자엽 식물 및 bacteria에 존재한다. 세 번째 group은 혼합된 형태의 fructan으로써 graminan type이라고 불리우며 이들 fructan은 fructose unit들 사이에 beta (2→1) 결합과 beta (2→6) 결합이 함께 존재한다. 이런 형태의 fructan은 주로 화본과 식물에 존재하는 것으로 알려져 있다.

식물체내에서 fructose의 중합체인 fructan의 생합성경로는 Edelman과 Jefford (1968)에 의해 밝혀진 1-sst/1-fft Model이 있다. Fructan은 액포내에서 sucrose로부터 합성된다. 그 중 첫 번째 단계에서 sucrose로부터 tri-saccharide kestose (GF2)가 생산되는데, 이 반응은 1-sucrose:sucrose fructosyl transferase(1-sst, EC 2.4.1.99) 효소에 의해 촉매된다 (Wiemken et al. 1995; Vijn and Smeekens 1999). 두 번째 단계는 효소 1-fructan:fructan fructosyltransferase (1-fft, EC 2.4.1.100)의 작용으로 GF2와 큰 fructan들 사이에 fructosyl unit을 전달함으로써 중합에 의해 fructan을 합성한다 (Hellwege et al. 1998; Vergauwen et al. 2003).

Fructan은 식물이 저온에 노출 되었을 때 다양한 조직에 축적됨으로써 여러 스트레스에 저항을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Livingston et al. 2009; Pollock and Cairns 1991; Eude et al. 2000; Hellwege et al. 1997; Roover et al. 1999). Fructan은 세포내 액포에 저장되어 이용되며 지속적인 광합성을 할 수 있도록 작용하며 (Edelman and Jefford 1968), 보리는 저온하에서도 높은 fructan 함량을 유지하면서 식물의 내냉성을 증진한다고 보고하였다 (Wagner et al. 1983; Hochstrasser et al. 1998).

본 연구에서는 돼지감자의 구근으로부터 fructan 생합성에 관여하는 효소인 1-sst와 1-fft 유전자를 분리하여 벼에 형질전환을 통해 과발현 시킨 후 fructan 합성의 생리생화학적 기작을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

1999년부터 안성 주변에 자생하고 있는 돼지감자 구근을 수집하여 한경대학교 자생식물 유지 포장에서 직경 2~3cm 정도의 크기로 절단하여 수돗물로 깨끗이 닦고,

마지막으로 멸균수로 3회 세척한 후, 비닐장갑을 끼고 껍질을 벗긴 후, total RNA의 추출재료로 사용하였다.

RT-PCR에 의한 유전자 분리

돼지감자 구근(직경 2~3cm)을 이용하여 mRNA를 추출하였다. 약 2g의 시료를 이용하여 Guanidine 방법 (Chirgwin et al. 1979)으로 mRNA를 추출한 후 oligo(dT)-칼럼에 의해 poly(A⁺) RNA를 조제하였다. Total RNA를 역전사 반응시켜 cDNA로 만든 다음 이 cDNA를 주형 DNA로 하여, RT-PCR (reverse transcription-PCR) 분석을 실시하였다. 이때 사용한 primer는 Ingrid et al (1998) 등이 보고한 fructan 생합성에 관련된 유전자인 1-sst 와 1-fft 의 염기서열을 이용하여 각각 1-sst와 1-fft 유전자 특이적인 primer (SST-1; 5'-ATGATGGCTC ATCCACCACCACC-3'), (SST-2; 5'-TCA AAGTTCGAAAGTCCACCCAGG-3'), (SST-3; 5' -ATGATAA GTGGTACCCAGATGACC-3'), (SST-4; 5'-GGTCATCTGGG TACCACTTAT CAT-)와 (FFT-1; 5'-ATGCAAACCCCTGAA CCCTTTACA-3'), (FFT-2; 5'-TTAAAAAG GGTATTGATGA ATTGG-3'), (FFT-3; 5'-TGCTGATCAGGACCTCTCTAGAG GAT-3'), (FFT-4; 5'-CCTCTAGAGAGGTCTGATCAGCA-3') 들을 합성하여 사용하였다.

PCR 반응은 95°C에서 1분간 pre-denaturation시킨 후, 95°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 4분간 extension 과정을 35 cycles로 하였으며, 1.5% 아가로스 겔 상에서 증폭된 밴드를 확인하였다. 증폭산물은 pGEM T-Easy vector (Promega)에 cloning하여 염기서열을 조사하였고, 유전자 염기배열을 토대로 아미노산서열을 결정하여 유전자간 상동성 비교는 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 분석에 의하여 실시하였다.

유전자 도입 형질전환 벼 육성

형질전환을 위한 식물 발현벡터는 GUS (β -glucuronidase) 유전자를 포함하고 있는 KJG V-B2 vector에 *Sma* I을 처리하여 절단하고, 그 위치에 1.8 kbp의 1-sst와 1-fft 유전자를 삽입하여 재조합 DNA를 제작하였다 (Fig. 1). 1-sst와 1-fft 유전자는 35S promoter의 지배하에 발현되며, 선발 marker 유전자로 hygromycin 저항성유전자 (HPT)를 포함하고 있다. 벼의 형질전환은 1-sst와 1-fft 유전자가 삽입된 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 수행하였다.

형질전환 벼의 유전자 도입 확인

재분화된 식물체에서 1-sst 및 1-fft 유전자의 도입여부를 확인하기 위하여, 포트에 이식하기 전 50~100 mg의 잎을 채취하였고, CTAB 방법 (Sambrook et al. 2001)으로

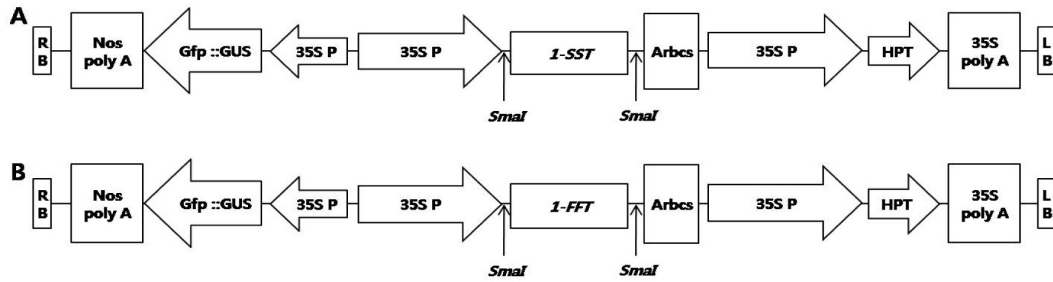


Fig. 1 Vector construction of 1-sst (A) and 1-fft (B) genes encoding 1-sucrose:sucrose :fructosyl transferase and 1-fructan:fructan fructosyl transferase in Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)

DNA를 추출하였다. 추출한 DNA 20 ng을 PCR 분석에 이용하였다. PCR에 사용한 primer는 35S promoter 단편의 특이적인 DNA 증폭을 위하여 (5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCGG-3')와 (5'-CGAAGGATAGTGGGATTGTGC-3')를 합성하여 사용하였다. 또한 1-sst 및 1-fft 유전자의 증폭을 위하여 1-sst 특이적으로 증폭되는 primer set와 1-fft 특이적으로 증폭되는 primer set를 합성하여 이용하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation시킨 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 35 cycle, 72°C에서 5분간 마지막 extension을 실시하여 증폭하였으며 1% agarose gel 상에서 35S promoter와 1-sst 및 1-fft 유전자의 도입여부를 확인하였다.

Southern blot 분석

벼 식물체로부터 분리한 DNA를 제한효소를 처리하여 절단한 다음 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후, nylon membrane (Hybond-N, Amersham)에 transfer시켰다. DNA가 전이된 membrane을 filter paper 위에 올려놓고 UV trans-illuminator로 2분간 cross-linking시켰다. Pre-hybridization은 6 × SSC, 5% dextran sulfate, 0.1% SDS 용액을 넣고 60°C에서 2시간 동안 수행하였으며, 1-sst 및 1-fft 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set에 의해 증폭된 DNA를 ³²P로 labelling한 probe와 15시간 동안 hybridization시켰다. Membrane의 세척은 2 × SSC, 0.1% SDS 용액으로 실온에서 5분씩 2회, 0.5 × SSC, 0.1% SDS 용액으로 65°C에서 15분간, 0.1 × SSC, 0.1% SDS 용액으로 65°C에서 15분간 세척한 후, X-ray film (Agfa)에 감광시켜 band를 확인하였다.

SDS-PAGE에 의한 단백질 분석

단백질의 발현 양상을 관찰하기 위해 단백질을 추출한 후 SDS-PAGE로 확인하였다. 단백질 추출을 위해 마쇄한 시료 0.05 g에 1 ml buffer (0.05 M Tris-HCl, 0.2% SDS, 5 M urea, 0.1% mercaptoethanol)를 가하여 30분간 추출하였

으며 4°C, 13,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액을 취하였다. SDS-PAGE는 Bio-Rad사의 protein III를 사용하였으며 전기영동시 12%의 resolving gel과 5%의 stacking gel을 사용하여 1시간 30분간 실시하였다. 염색은 staining solution (0.5% coomassie blue R-250 : 40% methanol : 10% acetic acid)에서 3시간 염색 후 destaining solution (40% methanol : 10% acetic acid)에서 탈색하여 밴드의 양상을 분석하였다.

Semi-quantitative RT-PCR을 이용한 기관별 발현양상 분석

벼에 형질전환한 1-sst와 1-fft 유전자의 기관별 발현 양상을 조사하기 위하여 벼의 조직을 이용하여 total RNA extraction kit (Promega)로 RNA를 추출하였고 이를 주형으로 하여 RT-PCR 분석을 수행하였다. RT-PCR 분석은 앞에 기술한 방법에 의하여 수행하였으며, PCR 산물의 양적 발현양상의 분석은 densitometer를 사용하여 정량분석하였다.

Fructan 합성 확인 및 함량 분석

신운봉벼 등 내냉성이 상이한 보급 품종을 온도조건이 다른 인공환경 조절실과 영남농업시험장 상주출장소 내 냉성 시험포장(15°C이하의 지하수를 이용함)에 재배하면서 수용성 탄수화물이 많이 저장, 이용되는 엽신, 엽초, 생장점 부위를 일정주기별로 분석시료로 채취하였다. 탄수화물과 fructan 분석시료는 채취 후 78°C로 유지되는 열풍건조기를 이용하여 48시간 건조 후 건물시료로부터 수용성 탄수화물 및 fructan을 분석하였다. 채취된 시료를 이용하여 첫째로 수용성 탄수화물을 추출하고 추출되어진 용액을 TLC (thin layer chromatography)를 이용하여 당의 DP (degree of polymerization)별로 분리한 후 벼의 생육 시기별, 식물체부위별, 온도수준별, 품종별로 fructan의 합성 및 존재여부를 확인하였고, 분리되어진 fructan을 Anthrone 법을 이용하여 비색정량하였다.

결과 및 고찰

돼지감자 유래 fructan 생합성 유전자의 분리 및 형질전환 벼의 육성

Fructan 생합성 관련 1-sst 및 1-fft 유전자의 분리는 Ingrid et al (1998) 등과 같이 돼지감자 구근으로부터 RT-PCR에 의해 full length cDNA를 분리하였다. 분리한 유전자는 염기서열이 보고된 유전자와 동일한 것을 선별하여 Ti-plasmid vector를 구축하였다 (Fig. 1).

1-sst 및 1-fft 유전자를 sense 방향으로 각각 도입한 식물발현 vector인 KJG V-B2를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 이용하여 벼의 callus에 형질전환하여 식물체를 재분화시킨 결과는 Fig. 2와 같다. 벼 종자를 2N6 고체 배지에 치상하여 배양하였을 때, 배반으로부터 왕성한 캘러스가 유기되었으며, 2~3 mm 크기의 체세포 배 발생 캘러스를 선발하여, 재조합 유전자를 함유한 *Agrobacterium* 과 접종하여 3일 동안 배양한 후 hygromycin이 첨가된 배지에서 선발하였다. 배반에서 유기된 캘러스 중 등글고 딱딱하며 연 노란색을 띠는 캘러스들을 형질전환 하였을 때 재분화가 잘되는 경향을 보여 육안과 현미경으로 배 발생 캘러스를 구분할 수 있었다. 항생제인 hygromycin이 첨가된 선발배지에서는 형질전환된 캘러스들이 왕성하게 증식되었으나, 비형질전환 캘러스들은 더 이상 증식되지 않고 갈변하여 고사하였다. 형질전환된 캘러스를 hygromycin이 포함된 MS 배지 상에 치상시 배양 3주 후

부터 embryogenic callus의 왕성한 성장을 보였고, 5주 후부터 callus에 녹색의 반점이 보이기 시작하였으며, 이들 callus를 MS기본배지에 옮겨 재분화를 유도하여 1-sst와 1-fft 유전자가 도입된 형질전환 재분화 식물체를 획득하였다.

형질전환 벼의 확인

형질전환 실험에서 얻어진 재분화 식물체는 먼저 1-sst 및 1-fft 유전자의 primer set에 의해 PCR분석을 통해 1차적으로 형질전환 벼 유무를 확인하였다. 그 결과 얻어진 대부분의 재분화식물체는 유전자가 도입되어 band를 확인할 수 있었다 (데이터 미기재). 확인된 형질전환 벼는 순화과정을 통해 온실에서 T1 종자를 계통별로 수확하였다. 수확된 종자들은 hygromycin 배지에 파종하여 계통별 10 개체씩 선발하였으며, 이들 계통들을 포장에 옮겨 후대를 육성하였다. 1-sst 및 1-fft 유전자를 도입한 형질전환 벼에서 도입유전자의 도입 여부 및 copy수를 확인하기 위하여 Southern hybridization 방법에 의해 수행하였다. 그 결과 1-sst 및 1-fft 유전자가 도입된 T2 형질전환 계통들에서 안정적으로 벼 게놈에 single copy로 integration 되었다 (Fig. 3). Single copy로 1-sst 및 1-fft 유전자가 도입된 T2세대의 형질전환 계통들의 표현형은 거의 변화가 없었으며, 몇몇 계통에서 초장 및 엽색이 wild type에 비교해 볼 때, 왜성 및 진한 초록 등의 변화를 보였다. 이런 결과는 형질전환실험에서 세포가 기관 분화과정에서 흔히 볼 수 있는 표현형으로 생각된다.

형질전환 후대에서 유전자 발현

선발한 형질전환 계통들 중에서 정상적 표현형을 보인 계통을 대상으로 1-sst 및 1-fft 유전자의 발현을 RT-PCR 및 SDS-PAGE 분석으로 수행하였다. 1-sst 유래 6 형질전환계통 및 1-fft 유래 3 형질전환계통으로부터 RT-PCR 분석한 결과 계통간의 발현량에서 약간의 차이를 보였으나, 조사한 모든 계통에서 발현되었다 (Fig. 4). 또한 1-sst와 1-fft 유전자가 강하게 발현된 2계통 (S2, F3)을 선택하여 단백질 발현을 관찰한 결과 유전자가 삽입되지 않은

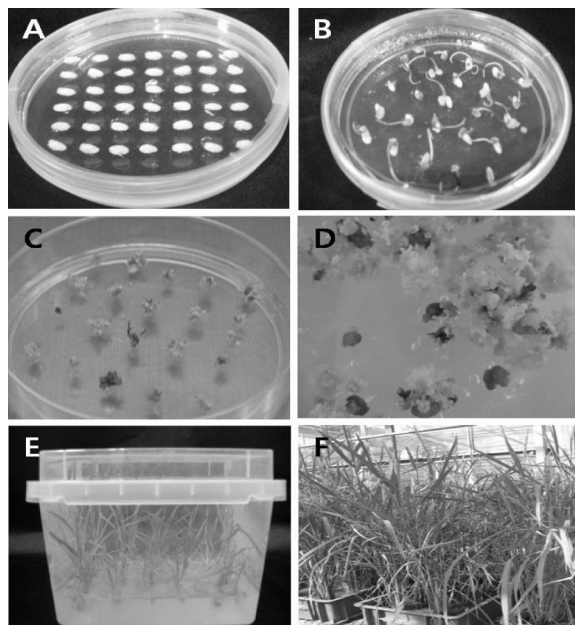


Fig. 2 Introduction of 1-sst and 1-fft genes through *Agrobacterium*-mediated transformation (A) callus formation; (B) callus selection using hygromycin; (C), (D) shoot formation and elongation; (E) root formation and elongation; (F) acclimatization

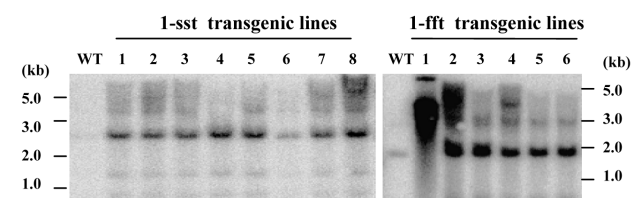


Fig. 3 Identification of gene introduction in regenerated rice plants by Southern blot analysis. Probe 1-sst: 880 bp, 1-fft: 780 bp

vector만을 발현시킨 대조구에서는 특이 밴드가 관찰되지 않았지만, 1-sst와 1-fft 유래 형질전환 벼 계통들 (S2,

F3)에서 모두 특이 단백질이 관찰되었다 (Fig. 4).

RT-PCR 및 SDS-PAGE 분석에 의해 1-sst 및 1-fft 유전자가 벼에 도입되어 안정적으로 발현하고 있는 양상을 볼 수 있었으나, 도입된 계통들간 유전자의 발현량을 조사하기 위해 semi-quantitative RT-PCR분석을 실시하였다. 1-sst 유전자 유래 형질전환계통들 (S1, S2, S5 및 S6)과 1-fft 유전자 유래 형질전환계통들 (F1 및 F3)에서 도입 유전자의 발현량이 각각 다른 양상을 보였다. 1-sst 유전자 유래 형질전환 S2 계통은 대조구에 비해 약 12배, 형질전환 계통들에 비해 2~3배 정도 높게 발현되었다. 또한 1-fft 유전자 유래 형질전환 F3 계통은 대조구에 비해 약 18배, 형질전환 F1 계통에 비해 4배 정도 높게 발현되었다 (Fig. 5).

이런 결과로 미루어 볼 때 도입된 유전자가 벼 세포내에서 안정적으로 mRNA 및 protein으로 발현되고 있음을 시사한다. 특히 1-fft로 도입된 형질전환 벼의 경우 강하게 발현하고 있는 것으로 미루어 볼 때 벼에서 fructan polymer가 도입식물체에서 많이 만들어져 외부의 signal에 저항성을 보일 것으로 생각되었다.

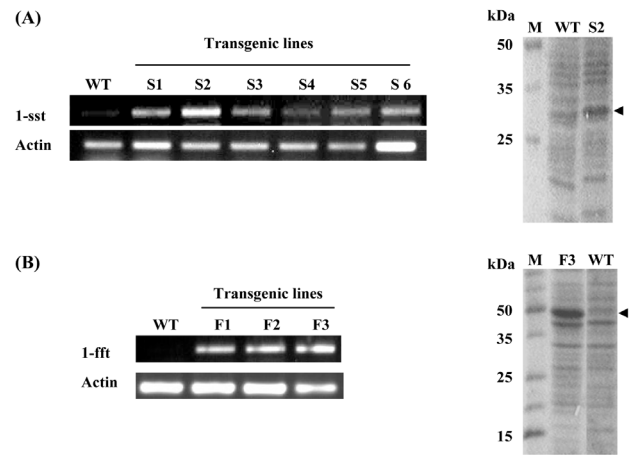


Fig. 4 Overexpression of 1-sst and 1-fft genes encoding fructan biosynthase in transgenic rice plants of T2 generations. RT-PCR and SDS-PAGE analysis was performed on leaf tissues of T2 generation lanes. (A): Plants transformed 1-sst gene (B): Plants transformed 1-fft gene

Fructan 합성 생리생화학적 구명

1-sst와 1-fft 유전자의 도입이 확인된 형질전환 벼를 이용하여 fructan의 합성 및 생리적인 기능을 알아보고자 실험을 수행하였다. 우선 1-sst와 1-fft 유전자가 생육에 미치는 영향을 관찰하기 위해 형질전환된 벼와 보급 벼 품종들 간에 온도 조건에 따른 생육정도를 알아보았다. 온도 조건에 따른 초장을 살펴본 결과 모든 품종에서 온도가 높아질수록 초장이 길었으며, 분얼수의 경우 내냉성이 강하다고 보고된 상주벼, 운봉벼, 운두벼는 온도가 높은 수록 많은 분얼수를 나타내었으나, 이와 달리 1-sst와 1-fft 유전자가 형질전환된 벼에서는 온도가 낮은 처리구에서 가장 많은 분얼수를 보였다 (Table 1).

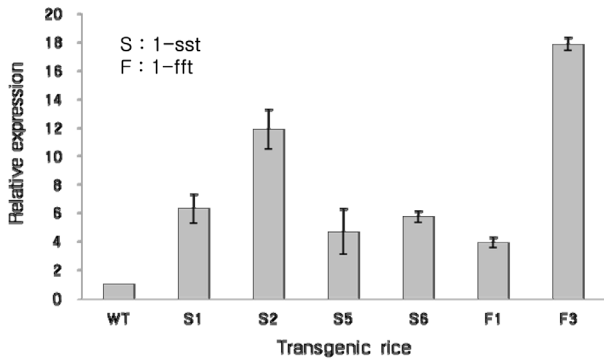


Fig. 5 Gene expression of regenerated rice plants analyzed by semi-quantitative Real-Time PCR. WT; wild type, T1-T4; 1-sst transgenic plants, T5-T6; 1-fft transgenic plants

Table 1 Plant height and number of tiller in heading stage of transgenic rice and recommended rice cultivar

Variety	Temperature	Plant height (cm)	No. of tiller	
Recommended rice cultivar	Sangjubyeo	Inlet	74	12
		Outlet	92	13
		Control	98	15.3
	Unbongbyeo	Inlet	83	17.7
		Outlet	99	14.3
		Control	100	18.7
	Woondubyeo	Inlet	91	8.7
		Outlet	95	15.7
		Control	104	19
Transgenic rice	1-fft	Inlet	84	16.7
		Outlet	90	14
	1-sst	Control	97	17
	Midlet	83	19	

Inlet: 15°C, Midlet: 17°C, Outlet: 20°C

Table 2 Temperature-dependent WSC (%) of transgenic lines transformed with the 1-fft gene and recommended rice cultivar

Variety	Temperature	WSC(%)				
		LB	LS	CU	PA	
Recommended rice cultivar	Sangjubyeyo	Inlet	1.4	1.2	2.4	0.9
		Outlet	1.3	2.4	5.2	1.7
		Control	1.1	1.0	2.5	3.8
	Unbongbyeyo	Inlet	1.1	2.7	5.0	1.3
		Outlet	2.1	2.9	6.0	2.6
		Control	1.2	2.1	2.9	0.8
	Woondubyeyo	Inlet	3.0	5.9	4.3	1.4
		Outlet	1.4	2.9	2.8	2.5
		Control	0.6	1.3	4.0	2.0
Transgenic rice	1-fft	Inlet	2.6	7.0	10.2	13.6
		Outlet	7.9	8.9	8.0	4.5
		Control	6.8	3.8	4.8	1.8
	1-sst	Midlet	6.6	11.0	22.6	3.8

LB: Leaf blade, LS: Leaf sheath, CU: Culm, PA: Panicle

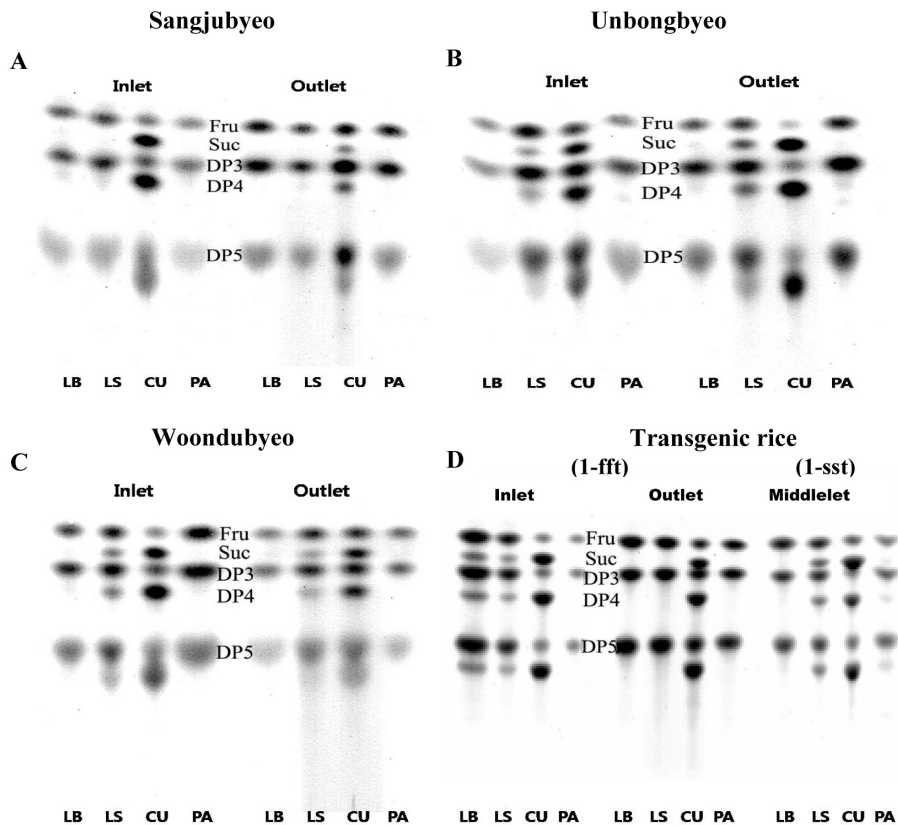


Fig. 6 TLC analysis of water soluble carbohydrates in heading stage of Sangjubyeyo, Unbongbyeyo, Woondubyeyo, and transgenic plants with 1-fft gene. Inlet: 15°C, Outlet: 20°C. LB: Leaf blade, LS: Leaf sheath, CU: Culm, PA: Panicle

1-sst와 1-fft 유전자가 저온처리시 fructan 및 수용성 탄수화물의 함량 변화에 주는 영향을 살펴본 결과는 Table 2와 같다. 형질전환 벼와 보급품종들을 이용해 저온처리에 따른 출수기의 식물체 부위별 수용성 탄수화물 (WSC) 함량의 변화를 비교해 본 결과 형질전환 벼 개체에 보급 품종들에 비해 현저하게 높은 WSC 함량을 나타냈으

며, 온도조건이 낮을수록 높은 WSC 함량을 보였다. 또한, 식물체 부위별로 WSC 함량을 비교했을 때에도 다른 보급종들 보다는 형질전환 벼에서 더 높게 나타남을 알 수 있었다. TLC를 이용하여 당의 DP별로 분리한 후 벼의 생육시기별, 식물체부위별, 온도수준별, 품종별로 fructan의 합성 및 존재여부를 확인한 결과 (Fig. 6) 단당류로부

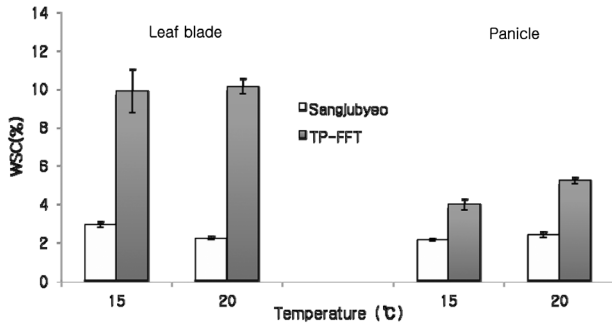


Fig. 7 Temperature-dependent WSC (%) of transgenic lines transformed with the 1-fft gene. Comparing with Sangjubyeo known as a low temperature tolerance, TP-FFT as a transgenic homozygote derived from the T2 line showed much higher level of the fructan synthesis, especially in low temperature

터 DP5까지 fructan이 존재하고 있는 것으로 관찰되었으며, 특히, 저온에서 높은 함량을 나타냈고, 식물체 부위에 따른 분석 결과 경 부위에서 단계별로 고르게 fructan이 존재하는 것으로 나타났다. 또한 형질전환 식물체의 경우 낮은 온도 처리구에서 다양한 fructan이 고르게 발현되었다. 내냉성이 높은 상주벼와 1-fft 유전자가 형질전환된 벼를 이용하여 식물체부위별, 온도수준별로 fructan 함량을 비교해 본 결과 (Fig. 7) 형질전환 벼가 상주벼에 비해 높은 수용성 탄수화물 함량을 나타내는 것으로 나타났으며, 특히 벼 잎 내에 존재하는 fructan의 함량은 형질전환 벼가 대조구인 상주벼에 비해 3.5~4배 높은 것으로 나타났다. 또한, TLC를 이용하여 fructan을 분리한 결과 모든 처리구에서 형질전환 벼가 더 많은 fructan을 합성하는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과를 통해 1-sst와 1-fft 유전자가 형질전환된 벼는 저온에서도 지속적인 fructan 생성이 가능하며 이를 통해 저온에 내성을 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

Fructan은 식물이 저온에 노출 되었을 때 다양한 조직에 축적됨으로써 여러 스트레스에 저항을 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 fructan 생합성 경로에 관여하는 효소인 1-sst와 1-fft 유전자를 돼지감자 구근으로부터 분리하였다. 분리한 1-sst와 1-fft 유전자는 Ti-plasmid vector인 KJG V-B2 vector에 35S promoter에 의해 발현할 수 있도록 형질전환용 벡터를 구축하였다. *Agrobacterium tumefaciens*법에 의해 1-sst와 1-fft 유전자의 형질전환 벼를 육성하였고, 1-sst, 1-fft 및 HPT 유전자 특이적인 primer를 사용하여 PCR 분석한 결과 유전자가 벼의 callus 계층 내에 안정적으로 삽입되었음을 확인하였다. 또한 Southern 및 RT-PCR 분석에서도 같은 결과를 얻었다. 형질전환 벼

의 후대에서도 안정적으로 유전자가 발현되는 homo 계통을 선발하였고 이를 이용해 1-sst와 1-fft 유전자의 삽입이 확인된 형질전환 벼에서 유전자의 발현양상을 알아보기 위해 RT-PCR 및 Real-Time PCR를 수행한 결과 형질전환 벼에서 1-sst와 1-fft 유전자 모두 안정적으로 발현되고 있음을 확인하였다. 또한 1-sst와 1-fft 유전자가 삽입된 형질전환 벼를 이용한 기능 분석 연구를 통해 식물체가 저온에 노출되었을 때 1-sst와 1-fft의 작용에 의해 fructan 생합성량이 증가됨을 알 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 얻어진 fructan 생합성 관련 유전자가 삽입된 형질전환 벼는 탄수화물대사 및 저온, 건조 등의 환경 stress에 대한 내성에 대해 좋은 육종 소재로 이용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 바이오그린21 사업 연구비의 지원을 받아 수행된 연구입니다. 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Chirgwin JJ, Przbyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, *Biochemistry* 18:5294
- Edelman J, Jefford TG (1968) The mechanism of fructan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*, *New Phytol.* 67:517-531
- Eude WVD, Michiels A, Wouterghem DV, Vergauwen R, and Laere AV (2000) Cloning, Developmental, and Tissue-Specific Expression of Sucrose:Sucrose 1-Fructosyl Transferase from *Taraxacum officinale*. Fructan Localizati in Root, *Plant Physiol.* 123:71-79
- Hellwege Em, Gritscher D, Willmitzer L, Heyer G (1997) Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs, *The Plant Journal.* 12:1057-1065
- Hellwege EM, Raap M, Gritscher D, Willmitzer L, Heyer AG (1998) Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1-fft cDNAs, *FEBS Letter.* 427:25-28
- Hendry GAF (1987) The ecological significance of fructan in contemporary flora, *New phytol.* 106:201-216
- Hochstrasser U, Luscher M, Virgilio CD, Boller T, Wiemken A (1998) Expression of a functional barley sucrose-fructan 6-fructosyltransferase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEBS Letters.* 440:356-360
- Ingrid MM, Andries JK, Johanna CH, Arjen JT (1998) Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. *The*

- plant Journal* 15(4):489-500
- Livingston III DP, Hinch DK, Heyer AG (2009) Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants, *Cell. Mol. Life Sci.* 66:2007-2023
- Lewis DH (1993) Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans - paper for discussion, *New Phytologist*, 124:583-594
- Pollock CJ, Cairns AJ (1991) Fructan metabolism in grasses and cereals. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:77-101
- Roover JD, Vandenbranden K, Laere AV, Eude WVD (1999) Drought induces fructan synthesis and 1-sst (Sucrose:Sucrose 1-Fructosyltransferase) in root and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.), *Planta* 210:808-814
- Rose V. (1804) Über eine eigenthümliche vegetabilische Substanz, *Neues Allg. Jahrb. Chem.* 3:217-219
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (third ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Stevens CV, Meriggi A, Booten K (2001) Chemical Modification of Inulin, a Valuable Renewable Resource, and Its Industrial Applications. *Biomacromolecules* 2:1-16
- Thomson T. (1818) In *A System of Chemistry*, 5th London edition; Abraham Small: Philadelphia
- Vergauwen R, Van Laere A, Van den Ende W (2003) Properties of fructan:fructan 1-fructosyltransferases from *Cichorium intybus* L. and *Echinops ritro* L., two asteracean plants storing greatly different types of inulin, *Plant Physiology* 133:391-401
- Vijn I, Smeeckens S (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate, *Plant Physiol.* 120:351-360
- Wagner W, Keller F, Wiemken A (1983) Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles, *J. Plant Physiol.* 112:359-372
- Wiemken A, Sprenger N, Boller T (1995) Fructan Extension of Sucrose by Sucrose. In: Pontis HG, Salerno GL, Escheverria EL (eds) *Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology*, American Plant Physiology Society, Gainesville