

오갈피 (*Eleutherococcus sessiliflorus*)의 배형성 세포를 이용한 고빈도 형질전환 및 재분화

정재훈, 한성수¹, 최용의*

중앙대학교 인삼산업연구센터, ¹원광대학교 생명자원과학대학

Agrobacterium-mediated Transformation of *Eleutherococcus sessiliflorus* using Embryogenic Calli and the Regeneration of Plants

Jae-Hun Jeong, Seong-Soo Han¹, Yong-Eui Choi*

Korea Ginseng Institute, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

¹College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

ABSTRACT We have developed a reliable and high-frequency genetic transformation and regeneration system via somatic embryogenesis of *Eleutherococcus sessiliflorus*. Embryogenic callus obtained from seed were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101/pIG121Hm harboring genes for intron- β -glucuronidase (GUS), kanamycin and hygromycin resistance. Following co-cultivation, two types of samples (fine embryogenic calli and early globular embryo clusters) were cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium containing 1 mg/L 2,4-D for 3 days in dark. Transient expression of GUS gene was found to be higher in the early globular embryo clusters than in the embryogenic calli. Also, co-cultivation period affected the transient expression of GUS gene; the best result was obtained when globular embryo clusters were co-cultivated with *Agrobacterium* for 3 days. Subsequently, this callus transferred to selective MS medium containing 1 mg/L 2,4-D, 50 mg/L kanamycin or/and 30 mg/L hygromycin and 300 mg/L cefotaxime. These embryogenic callus were subcultured to the same selection medium at every 2 weeks intervals. Approximately 24.5% of the early globular embryos co-cultivated with *Agrobacterium* for 3 days produced kanamycin or/and hygromycin-resistant calli. Transgenic somatic embryos were converted into plantlets in half strength MS medium supplemented with 3 mg/L GA₃ and 50 mg/L kanamycin and were confirmed by GUS histochemical assay and polymerase chain reaction analysis. Genomic Southern blot hybridization confirmed the incorporation of *NPT II* gene into the host genome.

Key words: *Eleutherococcus sessiliflorus*, high-frequency, embryogenic callus, early globular embryo clusters, *Agrobacterium tumefaciens*

서 론

오갈피 나무 (*E. sessiliflorus*)는 두릅나무과에 속하는 다년생 목본류로서 주로 동북아시아에 분포되어 자생되고 있으며,

한방에서는 주로 근피나 수피를 약용으로 사용하고 있는데, 약리작용은 항암, 당뇨, 진통해열, 신경통, 스트레스 피해 감소, 피로회복, 생명연장 등 다양한 분야에 효과가 있는 것으로 확인되고 있다 (Brekman and Dardymov 1969; Davydov and Krikorian 2000). 최근에는 오갈피의 다양한 약리효과가 국내에 알려지면서 오갈피의 수요가 급증하여 시장이 확대됨에 따라 국내에서 자생하고 있는 오갈피류의 식물체들이 훼손되

*Corresponding author Tel 031-670-4682 Fax 031-676-5121
E-mail yechoi@cau.ac.kr

어 멸종위기에 처해져 있다. 따라서 오갈피를 고소득 약용작물로서 재배하려는 농가 또한 증가하고 있는데 농가 재배를 위해서는 체계적인 재배법이나 병충해 방제법의 확립 및 병충해 저항성 및 이차대사산물의 함량이 높은 고품질의 오갈피 묘목 등이 요구되고 있다. 그러나 아직까지 전국적인 표준 재배법조차 확립되어 있지 않으며, 품종 육성은 더더욱 미진한 실정이다. 오갈피 품종 육성의 어려움은 목본류의 특성상 긴 생장기간과 휴면기간을 가지며, 결실에 이르기까지는 매우 긴시간이 소요되는 등 육종에 많은 노력과 매우 긴 기간이 요구되는 한계가 있기 때문인데, 특정 유용유전자를 선택적으로 식물체에 도입시키는 식물형질전환 기술은 이러한 문제점을 획기적으로 극복할 수 있는 방법으로 생각되어진다.

오갈피속 내의 종에 따른 조직배양에 대한 연구는 오갈피 (Choi et al. 2002a), 가시오갈피 (Gui et al. 1991; Choi et al. 1999, 2002b), 섬오갈피 (Choi et al. 1997) 등에서 이루어진 바 있으며, 특히 가시오갈피의 경우에는 본 연구자들에 의해 세포배양에서 효율적으로 배를 유도한 후 토양순화에 이르는 가시오갈피 묘목 대량생산체계를 개발하여 실용화단계에까지 연구가 수행되어 이를 보고한바 있다 (Han and Choi 2003). 한편, 오갈피의 경우에도 세포배양 및 정상적인 배를 유도하는 선행연구가 있었지만 유전자 도입을 통한 형질전환 식물체 개발은 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 유용형질을 오갈피 식물체에 도입할 수 있는 형질전환체계를 확립하고자 GUS 유전자를 이용하여 오갈피배 발달 시기별 및 균과의 공동배양기간에 따른 형질전환 효율을 비교하는 실험을 실시하였으며, 배형성 캘러스를 이용하여 고빈도 오갈피 형질전환체계를 확립하였다.

재료 및 방법

식물재료

오갈피의 배형성 캘러스는 Choi 등 (2002a)의 방법에 따라 종자에서 접합자배를 무균적으로 적출하여 발아시킨 다음, 발아된 유식물로부터 1~3 cm의 유식물 절편을 절취하여 1 mg/L의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3% sucrose, 0.8% agar가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에서 배양하여 유도하였다. 오갈피 형질전환을 위해서는 유도된 배형성 캘러스를 동일배지에서 3주 간격으로 계대배양하며 증식시킨 고운 배형성 캘러스와 이를 2,4-D가 제거된 배지에 옮겨 초기상태의 구형배 (약 200 μ m 크기)를 유도한 후, 이를 오갈피 형질전환 재료로 사용하였다. 이때의 배양실의 조건은 30 μ mol \cdot m² \cdot sec⁻¹, 백색 형광등으로 16시간 명처리, 8시간 암처리 하였으며 온도는 23°C로 유지하였다.

유전자

오갈피 형질전환에 이용된 유전자는 식물조직에서 항상 발현하는 Cauliflower Mosaic Virus 35S (35S) promoter로 발현이 조절되는 intron 영역을 포함하는 GUS와 HPT 유전자 및 nos promoter를 가지는 NPT II 유전자를 포함하는 식물발현용 운반체인 pIG121Hm를 가지고 실험을 수행하였다. 또한, 식물체로의 형질전환을 위한 균주로서 *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 균주를 이용하였으며, 이들은 일본 NAIST의 Dr. Sano 교수로부터 분양 받아 실험을 수행하였다.

식물체 재분화

2,4-D가 첨가된 MS 고체 배지에서 증식된 배형성 캘러스는 배양 6주 이후부터 2,4-D를 제거한 배지로 옮겨 배발생을 유도하였으며, 3주 간격으로 새로운 배지로 계대하여 배를 발달시켰다. 증식된 자엽단계의 체세포배들은 발아를 위해 3 mg/L의 gibberellic acid (GA₃)가 첨가된 발아유도배지에 옮겨졌으며, 약 4주가 경과된 후 자엽이 전개된 기내 유식물체를 식물 생장조절제를 제거한 1/3 MS, 1% sucrose가 첨가된 고체 배지 120 mL이 담긴 500 mL 플라스틱 배양용기로 옮겨 뿌리를 유도하였으며, 완전한 식물체로 생육시켰다. 이렇게 생육시킨 식물체들은 perlite와 peatmoss (5:1, v/v)를 섞은 인공토가 담긴 배양용기에 옮겨 순화시킨 후 자연조건에서 생육시켰다.

오갈피 형질전환

오갈피 형질전환은 상기 방법에 의해 유도된 배형성 캘러스와 2,4-D가 제거된 배지에서 4주간 배양된 초기 구형배를 이용하여 실시하였다. 균주는 YEP배지 (5 g/L yeast extract, 5 g/L bacto-peptone, 5 g/L sucrose; pH 7.2)에 접종하여 1~2일 동안 120 rpm으로 배양한 후 사용하였으며, 배양된 아그로박테리움은 3,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 제거한 후 새로운 MS 액체배지를 이용하여 재현탁하여 오갈피의 배형성 캘러스 및 구형배 시기의 배에 접종하였다. 균주와 접종된 이들은 필터페이퍼에서 박테리아 잔액을 충분히 제거하고 1 mg/L 2,4-D와 3% sucrose가 첨가된 MS 고체배지로 옮겨 암 상태에서 1, 3, 5일간 각각 공동배양기간을 달리하여 형질전환 효율을 비교하였다. 공동배양 이후 배형성 캘러스 및 구형배들은 300 mg/L cefotaxime이 첨가된 동일한 배지에 1주일간 배양하며 항생제 (kanamycin)를 첨가하지 않은 배지에서 균만을 제거하는 단계를 거쳤다. 이후 50 mg/L kanamycin 혹은 30 mg/L hygromycin과 300 mg/L cefotaxime을 첨가한 배지에서 2주마다 계대배양하며 선발하였다.

형질전환은 약 20여 개의 배형성 캘러스와 구형배 덩어리들을 각각 하나의 페트리디쉬에 치상하여 시도하였으며, 실험은 3반복으로 실시하였다. 형질전환체의 선발은 항생제가 첨

가된 선발배지에서 2주마다 계대하며 약 12주 동안 실시하였으며, 선발배지에서 살아남아 증식되는 체세포배들을 선발하였다. 또한, 선발된 체세포배들은 2,4-D가 제거된 MS배지에 옮겨 성숙한배로 발달시킨 다음 3 mg/L GA₃가 첨가된 1/2 MS배지로 옮겨 발아를 유도한 후 식물체로 재생시켰다. 한편, 각 처리에 따른 오갈피 형질전환을 비교는 GUS 유전자의 발현을 조사하여 실시하였는데, 균과의 공동배양 후 7일과 3주 후에 각각 GUS 반응을 조사하였다.

Histochemical GUS assay

항생제 선발배지에서 선발된 체세포배에서 발아된 식물체에서 유전자의 도입 및 발현의 확인은 먼저 쉽게 유전자의 도입 및 발현을 확인할 수 있는 GUS 유전자를 이용하여 실시하였다. GUS 유전자의 확인은 Jefferson 등 (1987)의 방법에 따라 실시하였으며, 선발배지에서 살아남은 체세포배, 발아된 기내 소식물체 그리고 식물체의 잎조직은 2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide을 포함하는 50 mM의 sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 침지시킨 후 24시간 동안 37°C에서 반응시켰으며, 이후 99% 에탄올에서 식물색소 등을 제거한 후 발색 정도를 해부현미경으로 관찰하였다.

Polymerase chain reaction

GUS 반응에서 양성으로 확인된 식물체들은 잎을 취해 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR 분석시 항생제 마커유전자인 *NPT II* 유전자를 확인하고자 700 bp의 PCR 산물을 증폭하는 5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA-3'과 5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3' primer를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 ApplyBiosystem 2700 DNA thermal cycler 기기를 사용하였으며, 반응조건은 96°C에서 3분간 pre-denaturation 반응을 거친 후 96°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분간 반응을 36회 반복하였으며, 최종 72°C에서 15분간 신장반응을 실시하였다. PCR 반응이 끝난 뒤 생성된 산물은 1% agarose gel에서 전기영동 후 유전자의 도입여부를 확인하였다.

Southern blot analysis

Southern blot은 전체 20 µg의 DNA를 *EcoRI*으로 overnight 절단한 후, 1%의 agarose gel (25 V, overnight)상에서 전기영동하여 크기별로 분리하였으며, 이를 Hybond-N⁺ nylon membrane (Amersham Pharmacia, UK)으로 Turbo blotter system (Schleicher and Schuell Co., Germany)를 이용하여 전이시켰으며, UV crosslink (1200 µJ/cm²)로 고정시켰다. Probe 제작을 위해서 사용된 *NPT II* gene은 PCR로 증폭하여 전기영동한

후 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 정제하였으며, 이 0.7 kb의 PCR 산물을 AlkPhos direct system (Amersham Pharmacia, UK)을 이용하여 probe를 제작하였으며, hybridization과 washing 그리고 detection 또한 제공된 방법에 의해 수행하였다. Signal의 검출은 Hyper film-ECL (Amersham Pharmacia, UK)를 이용하여 1시간에서 12시간 동안 감광시킨 후 검출하였다.

결과 및 고찰

유식물 절편으로부터 배발생 캘러스 유도 및 식물체 재분화

오갈피 종자에서 접합자배를 적출하여 발아된 유식물체의 절편을 취해 3% sucrose, 1 mg/L 2,4-D 및 0.8% 한천이 첨가된 MS배지에 치상 후 약 2주경부터 배양절편으로부터 캘러스가 유도되었으며, 이후 3주에 한 번씩 동일배지로 계대배양하며 배발생 캘러스를 선발, 증식시켰다. 배양 6주 이후 캘러스로부터 배 발생을 유도하기 위해 증식된 캘러스를 2,4-D가 제거된 배지로 옮겨졌으며, 약 4주경부터 배형성 캘러스에서 구상형의 배들을 발견할 수 있었으며, 이들은 이후의 배형성 과정을 거쳐 정상적인 체세포배로 발달되어 약 6주에서 8주 후에는 체세포배를 대량으로 증식시킬 수 있었다 (Figure 1A). 대량으로 증식된 체세포배는 3 mg/L의 지베렐린 처리에 의해 발아를 유도할 수 있었는데, 발아유도배지에 이식한 후 약 2주 정도 배양하였을 때 모든 체세포배에서 자엽이 전개되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 1B). 또한, 이렇게 자엽이 전개된 기내 유식물체를 MS배지의 농도를 1/3으로 낮추고 설탕의 농도를 1%로 낮춘 배지로 옮겨 완전한 식물체로 생육시켰다 (Figure 1C). 또한, 정상적인 식물체는 토양으로 순화되어 자연조건에서도 생육이 가능하였다 (Figure 1D).

배형성 과정을 통한 식물체 재분화는 매우 이상적인 재분화 체계이며, 이것은 성공적인 형질전환체계의 확립에 있어 중요한 요건이 된다. 오갈피의 배형성 캘러스 유도 및 이로부터의 성공적인 재분화는 상기 실험과 본 연구자들에 의해 확립되어 보고된 바 있으며 (Choi et al. 2002a), 본 연구에서는 이러한 배형성 과정을 통한 식물체 재분화 체계를 이용하여 오갈피 형질전환체계를 확립하고자 하였다.

배형성 캘러스를 통한 오갈피 형질전환체 생산

배형성 캘러스를 이용한 형질전환 시 배발달 시기 및 공동 배양기간을 달리하여 형질전환을 실시하였다. 즉, 1 mg/L 2,4-D배지에서 계대되어 증식된 배형성 세포와 이를 4주간 호르몬 무첨가 배지에 치상하여 유도된 초기 구형배를 이용하였으며, 균과의 접종 후 공동배양기간을 1, 3, 5일로 각각 달리하였다. 한편, 실험에 앞서 대조구로 사용된 오갈피의 배발생 캘

러스 및 자엽시기의 배에서 GUS 활성을 조사하였던 바 모두 GUS 활성을 보이지 않았으며 (Figure 2C), 선발을 위한 항생제 kanamycin 및 hygromycin의 농도 결정은 균과 접종되지

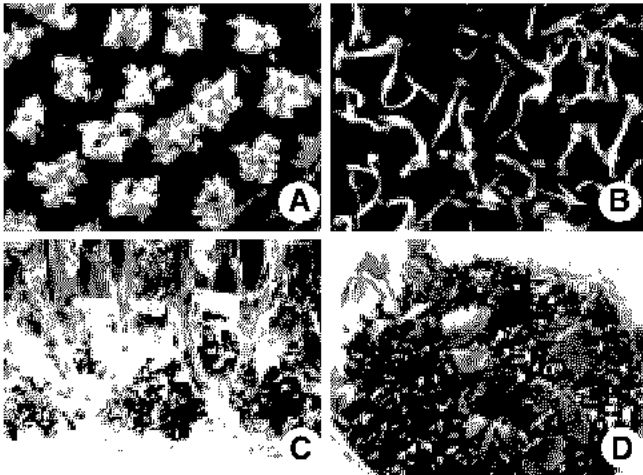


Figure 1. Plant regeneration of *E. sessiliflorus* via embryogenesis from the zygotic embryos. A, Mass production of somatic embryos from embryogenic calli; B, Germinated somatic embryos; C, *In vitro* plantlets; D, Accumulated plants in soil.

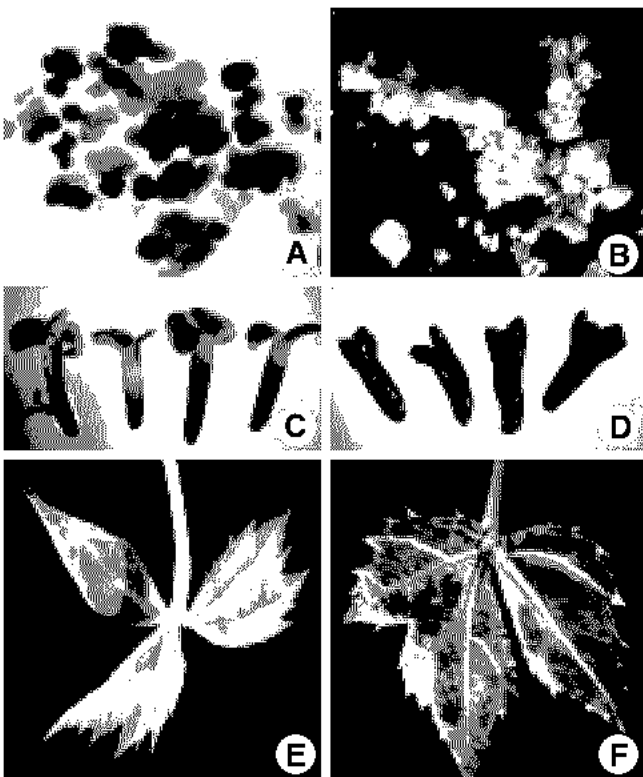


Figure 2. Genetic transformation of *E. sessiliflorus* via *Agrobacterium* co-cultivation. A, Transient GUS expression on the surfaces of early globular embryos after three days of *Agrobacterium* co-cultivation; B, Selection of putative transgenic calli among brown calluses on medium with 50 mg/L kanamycin; C-D, X-gluc reaction of cotyledonary embryos derived from untransformed calli (C) and from kanamycin-resistant calli (D); E-F, X-gluc reaction of leaf of non-transformed (E) and transformed (F) plantlets.

않은 배형성 세포 및 구형배를 이용하여 항생제 농도에 따른 생장을 조사한 바 50 mg/L 및 30 mg/L의 농도에서 각각 생장이 저해되어 이를 선발농도로 결정하였다 (자료 미제시).

배발달 시기에 따른 GUS의 일시적 발현은 균과 공동배양 후 3일 만에 조사하였으며, GUS의 발현율은 전체 세포피 중 청색을 띠는 세포피의 수를 조사하여 백분율로 나타내었다. GUS 반응 결과 배형성 캘러스의 경우 청색 반응이 매우 약한 반면에 구형배의 경우 강한 청색 반응을 보였으며, 세포피 전반에 걸쳐 양성반응을 보였다 (Figure 2A). 또한, 구형배 시기의 배양체를 균과 접종한 실험구에서 약 54.3%±8.9의 GUS 양성반응을 보였으며, 이는 배형성 캘러스 실험구의 9.5%±3.2에 비해 5배 이상의 높은 결과였다 (Figure 3). 배발달이 시작되기 이전의 배발생 세포의 경우가 형질전환 효율이 낮은 점은 배발생 세포의 세포 구조적 특징 및 생리적 특징에 따른 것으로 생각된다.

균과 공동배양된 배형성 캘러스와 구형배들은 이후 50 mg/L kanamycin을 첨가한 항생제 선발배지에서 3주마다 새로운 배지로 계대하였다. 배양 3주 후에 조사된 GUS의 안정적인 발현율은 배형성 캘러스에서는 약 2.8%±0.9인 반면에 구형배의 경우에는 약 23.7%±3.8로 8배나 높은 형질전환율을 보였다 (Figure 3). 따라서 아그로박테리움과 공동배양하는 경우 배발달 단계에 따른 형질전환 효율은 순수한 배형성 캘러스보다는 어린구형배로 발달되기 시작하는 시기가 일시적 유전자 발현 (transient expression)은 물론 안정적인 발현 (stable expression)률이 높은 것은 특기할 만한 결과로서 생각되며 다른 식물에서도 이러한 결과를 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

공동배양기간이 형질전환율에 미치는 영향에 대한 연구는 다양한 식물체에서 수행되었으며, 일반적으로 2일에서 3일간의 공동배양기간이 최적의 조건으로 보고된바 있으나 (Holford et al. 1992; Muthukumar et al. 1996), 6일에서 7일간의 공동배양기간에서 형질전환율이 높은 결과를 보인 예도 보고된 바

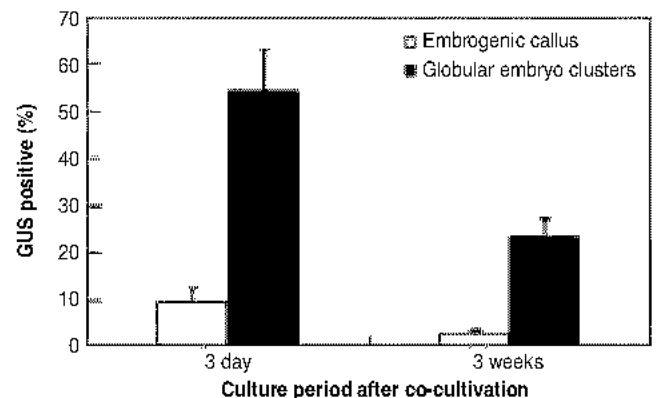


Figure 3. Comparison of efficiency of transient and stable expression of GUS gene between fine embryogenic calli and early globular embryo clusters of *E. sessiliflorus*.

있다 (Dong and McHughen 1991; Suzuki et al. 2001). 따라서 공동배양기간은 각 식물체 및 절편체에 따라 상이한 결과를 보이고 있으므로 효율적인 형질전환체계의 확립을 위해서는 실험시 이를 확립할 필요성이 있다. 본 실험에서는 상기 실험에서 높은 효율을 보였던 구형배 시기의 배양체를 이용하여 균과의 공동배양기간을 각각 1, 3, 5일로 설정하여 GUS의 발현을 비교한 결과 1, 5, 3일 순으로 높아져 각각 6.5, 28, 55%의 GUS 양성반응 결과를 얻었으며, 3일간의 공동배양기간에서 최적의 조건을 얻었다 (Figure 4).

항생제 선별배지에서 약 3주간의 선별 후부터 약한 갈색을 띄는 캘러스들을 해부현미경하에서 관찰할 수 있었으며, 새 선별배지로 계대하며 항생제에 저항성을 보이는 배형성 캘러스들을 선별할 수 있었다. 저항성을 보이는 캘러스들은 선별배지에서 계대를 거듭할수록 생장에 저해받지 않으며 왕성하게 증식되는 반면에 형질전환되지 않은 캘러스들은 갈색으로 변화되며 더 이상 증식되지 않았다 (Figure 2B). 항생제 선별은 12주간 실시하였으며, 이 선별과정 중 항생제 저항성 캘러스들은 각각 독립되게 증식되는 캘러스들로 선별하여 약 30여 개의 라인을 선별할 수 있었다. 이렇게 선별된 라인들은 이후 2,4-D가 제거된 MS배지에 옮겨 성숙한 배로 발달시킬 수 있었으며, 지베렐린 처리를 통해 발아를 유도한 후 상기 재분화 방법에 의해 식물체로 재생시켰다.

형질전환체의 특성검정

항생제 선별배지에서 선별되어 성숙한 배로 발달된 30여 개 라인들의 유전자 도입 여부를 확인하기 위해 형질전환실험을 수행하지 않은 배와 함께 GUS 반응을 실시한 결과, 균과 접촉하지 않은 자엽시기의 배에서는 아무런 변화가 없었으나 선별된 배에서는 강한 청색의 반응이 일어났으며 (Figure 2-C,D), 전체 반응 중 90%가 양성반응을 보이며 대부분의 라인들에서 유전자의 도입 및 발현을 확인할 수 있었다.

따라서 배형성 캘러스의 선발에 있어 kanamycin과 hygromycin을 이용한 항생제 선발조건에서 성공적으로 형질전환된 캘러스의 선발이 이루어질 수 있음을 검증하였다. 또한, 정상적인 식물체로 재생시킨 후 식물체의 잎을 이용하여 GUS 반응을 실시하였을 때에도 정상식물체의 잎 조직에서는 아무런 변화가 없었으나 형질전환 식물체의 잎에서는 청색의 양성반응이 일어나 유전자가 성공적으로 도입되어 발현됨을 증명할 수 있었다 (Figure 2E, F).

GUS 양성반응으로 확인된 선발 라인들 중 5개체를 선별하여 genomic DNA을 추출하여 PCR 분석을 실시하였으며, 사용된 유전자는 항생제 마커유전자인 *NPT II* 유전자로 700 bp의 PCR 산물을 증폭하는 프라이머를 제작하여 PCR을 수행한 결과 형질전환된 식물체에서는 모두 도입된 유전자의 PCR 밴드를 확인할 수 있었으나 형질전환 되지 않은 식물체에서는 밴드를 확인할 수 없었다 (Figure 5). 이러한 결과는 선발된 식물체의 염색체 안에 도입하고자 하는 유전자가 삽입되었음을 확인하는 결과이다. 또한, PCR 반응에 의해 유전자의 도입이 확인된 3개의 식물체에서 *NPT II* 유전자를 probe로 하여 genomic Southern을 실시한 결과 선발된 개체에서 각각 1개에서 3개의 밴드가 확인되었으며, 이를 통해 1~3 copy의 유전자가 오갈피 식물체 염색체 안에 삽입되었음을 확인하였으며, 이러한 개체들은 각각 독립적인 형질전환체임을 확인하였다 (Figure 6).

일반적으로 목본류는 식물체 재분화가 어렵고, 형질전환은 더더욱 쉽지 않은 것으로 보고되고 있다. 따라서 목본류의 재분화는 몇몇 수목에 국한되어 있으며, 대표적인 수종으로는 재분화능이 높은 포플러를 모델로 하여 재분화 및 형질전환이 연구되고 있다 (Chun 1994; De Block 1990). 본 연구에서는 목본류이며 인삼과 더불어 중요 약용작물인 오갈피식물체의 배형성 캘러스 유도과 이로부터의 식물체 재분화 체계를 확립하였으며, 배형성 캘러스를 이용한 고빈도의 형질전환체계를 확립하였다. 이러한 결과는 형질전환체계가 아직 보고되

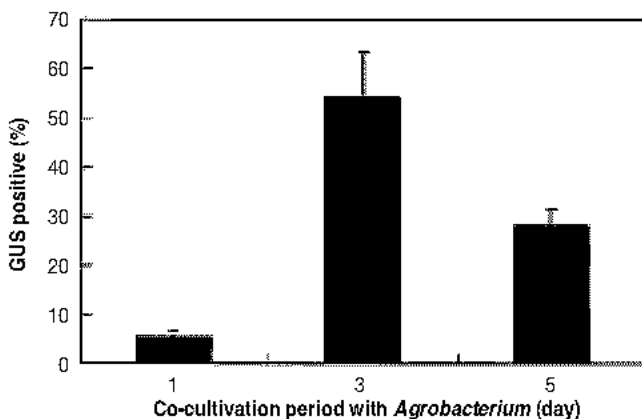


Figure 4. Effect of co-cultivation period on the production of GUS positive calli of *E. sessiliflorus*.

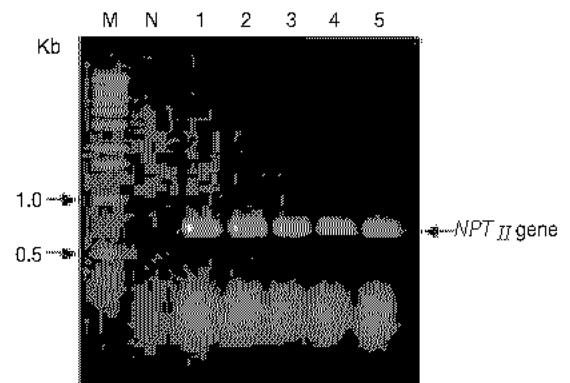


Figure 5. Detection of foreign gene in transgenic *E. sessiliflorus* by PCR with *NPT II* gene specific primers. M, Molecular marker (1 Kb ladder); N, Leaf explant of non-transformed plantlet; Lanes 1~5, Leaf explants from individual transgenic plantlets.

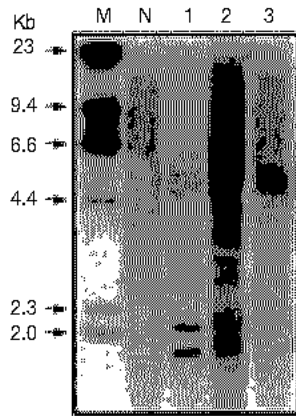


Figure 6. Southern analysis of genomic DNAs extracted from three different transgenic lines. The 0.7 Kb *NPT II* fragment labeled with AlkPhos DNA labeling system was used as a probe for Southern blot hybridization. M, λ /*Hind III* DNA as molecular markers; N, non-transformed plantlet; lanes 1~3, 3 independent transgenic plantlets.

고 있지 않은 오갈피식물체의 분자유종에 있어 중요한 결과로써 최근에 부각되고 있는 식물의 이차대사산물생성에 관계하는 다양한 유전자의 발굴 (Kushiro et al. 1998; Corey et al. 1993; Morita et al. 1997) 및 생합성 경로에 대한 이해가 더해지면서 (Harker et al. 2003), 유용물질의 생산량이나 함유된 물질의 조성을 조절할 수 있는 물질대사에 관계하는 분자유종 기술과 방법을 제공하는 의미를 가진다.

본 연구의 또 다른 의의는 목본류의 배형성을 통한 식물체 재분화 및 형질전환의 새로운 모델시스템으로서 가치가 있다고 생각된다. 배형성 캘러스는 일반적으로 재분화능이 높을 뿐만 아니라 왕성한 분열능력을 가짐에 따라 식물 형질전환에 있어 유용한 재료이며 이를 이용한 형질전환은 강력한 효율을 가진다. 따라서 단자엽 및 쌍자엽 식물에 걸쳐 배형성 캘러스를 이용한 형질전환에 대한 결과가 보고되고 있으며 (Suzuki and Nakano 2002; Delbreil et al. 1993; Li et al. 2002; Hu et al. 2002), 본 연구에서도 오갈피의 초기 구상형 배를 이용하여 형질전환 시 고효율의 형질전환율을 보였다. 또한 배발달 시기에 따른 형질전환 효율을 비교하여 배형성 캘러스보다는 초기 구상형 시기의배에서 고빈도의 형질전환이 이루어짐을 확인하였던 바 목본류의 배형성을 통한 형질전환모델체계로서 가치가 있으며, 이러한 체계를 이용하여 이차대사산물의 대사에 관계하는 유용유전자의 도입이 가능하다고 사료된다. 또한, 유전자가 도입된 형질전환체의 증식에도 왕성한 분열능력을 가지는 배형성 캘러스를 이용한다면 보다 신속하게 다량의 형질전환체를 생산할 수 있을 것이다.

사사 - 본 연구는 농촌진흥청 Biogreen 21 임업연구단 지원 연구비에 의해 수행되었으며, 연구지원에 감사의 뜻을 표합니다.

적 요

오갈피 (*Eleutherococcus sessiliflorus*)의 배형성 캘러스를 아그로박테리움과 공동배양하는 방법을 이용하여 효율적인 목본류 형질전환 체계를 확립하였다. 먼저 오갈피의 접합자배 절편을 배양하여 배형성 캘러스를 유도한 후 체세포배를 유도하고 식물체를 생산하는 고빈도 식물체 재분화를 시스템을 확립하였으며, 배형성 캘러스와 어린 구상배 시기의배로 구분하여 아그로박테리움과 공동배양 한 후 형질전환 효율을 비교한 결과 어린 구상형 시기의 배를 공동배양한 경우에서 최적의 형질전환율을 보였으며, 균과의 공동배양기간에 따른 형질전환율에서도 3일 간의 공동배양이 효율적이었다. 이러한 형질전환 체계에 따른 실험 수행 시 약 24.5%의 고빈도 형질전환 효율을 보였으며, 균과의 공동배양 후 항생제가 포함된 선발배지에서 유전자가 도입된 배발생 세포만을 선발할 수 있었으며, 이를 증식하여 발아시킨 후 어린 유식물체로 생육시켜 형질전환 오갈피 묘목을 생산할 수 있었다. 또한, 유전자의 도입 확인은 GUS 반응과 PCR, genomic Southern blot을 실시하여 확인하였다. 본 연구는 목본 식물인 오갈피나무를 가지고 고빈도로 형질전환시킬 수 있는 방법이며, 소량의 세포를 이용하여 형질전환할 수 있는 방법으로 본 체계를 이용한 다면 목본류인 오갈피에 유용유전자를 효율적으로 도입할 수 있을 것이며, 이는 목본류의 형질전환 모델시스템으로 의미가 있다고 사료된다.

인용문헌

Brekman II, Dardymov IV (1969) New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Ann Rev Pharmacol* 9: 415
 Choi YE, Kim JW, Sch WY (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Acanthopanax koreanum* Nakai. *Plant Cell Rep* 17: 84-88
 Choi YE, Kim JW, Yoon ES (1999) High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Ann Bot* 83: 309-314
 Choi YE, Ko SK, Lee SK, Yoon ES (2002a) Production of plantlets of *Eleutherococcus sessiliflorus* via somatic embryogenesis and successful transfer to soil. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69: 201-204
 Choi YE, Lee KS, Kim SY, Han JY, Kim HS, Jeong JH, Ko SK (2002b) Mass production of Siberian ginseng plantlets through large-scale tank culture of somatic embryos. *Plant Cell Rep* 21: 24-28
 Chun YW (1994) Application of *Agrobacterium* vector systems for transformation in *Populus* species, conservation and manipulation of genetic resources in forestry. Kwang Moon Kag Pub, Seoul, pp 206-218
 Corey EJ, Matsuda SPT, Bartel B (1993) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional

- expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11628-11632
- Davydov M, Krikorian AD (2000) *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen; a closer look. *J Ethnopharmacol* 72: 345-393
- De Block M (1990) Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. *Plant Physiol* 93: 1110-1116
- Delbreil B, Guerche P, Jullien M (1993) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Asparagus officinalis* L. long-term embryogenic callus and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 12: 129-132
- Dong JZ, McHughen A (1991) Patterns of transformation intensity on flax hypocotyls inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 10: 555-560
- Gui Y, Guo Z, Ke S, Skirvin RH (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopanax senticosus*. *Plant Cell Rep* 9: 514-516
- Han JY, Choi YE (2003) Mass productin of *Eleutherococcus senticosus* plants through in vitro cell culture. *Kor J Plant Biotech* 30: 167-172
- Harker M, Hellyer A, Clayton JC, Duvoix A, Lanot A, Safford R (2003) Co-ordinate regulation of sterol biosynthesis enzyme activity during accumulation of sterols in developing rape and tobacco seed. *Planta* 216: 707-715
- Holford P, Hernandez N, Newbury HJ (1992) Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 11: 196-199
- Hu Z, Yang J, Guo GQ, Zheng GC (2002) High-efficiency transformation of *Lycium barbarum* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and transgenic plant regeneration via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 21: 233-237
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y (1998) β -Amyrin synthase; Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur J Biochem* 256: 238-244
- Li DD, Shi W, Deng XX (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of *Ponkan mandarin* and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Rep* 21: 153-156
- Morita M, Shibuya M, Lee MS, Sankawa U, Ebizuka Y (1997) Molecular cloning of pea cDNA encoding cycloartenol synthase and its functional expression in yeast. *Biol Pharm Bull* 20: 770-775
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Muthukumar B, Mariamma M, Veluthambi K, Gnanam A (1996) Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 15: 980-985
- Suzuki S, Nakano M (2002) *Agrobacterium*-mediate production of transgenic plants of *Muscari armeniacum* Leichtl. ex Bak. *Plant Cell Rep* 20: 835-841
- Suzuki S, Supabulwatana K, Mii M, Nakano M (2001) Production of transgenic plants of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton via *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli. *Plant Science* 161: 89-97

(접수일자 2003년 07월 28일, 수리일자 2003년 8월 27일)