

## 기능획득 돌연변이 인삼 모상근의 대량생산

고석민<sup>1</sup>, 인동수<sup>1</sup>, 정확지<sup>1,3</sup>, 최동욱<sup>2</sup>, 유장렬<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>(주) 유진텍 부설연구소, <sup>2</sup>전남대학교 사범대학 과학교육학부 생물교육전공, <sup>3</sup>한국생명공학연구원 식물유전체센터

### Mass Production of Gain-of-Function Mutants of Hair Roots in Ginseng

Suk Min Ko<sup>1</sup>, Dong Soo In<sup>1</sup>, Hwa-Jee Chung<sup>1,3</sup>, Dong-Woog Choi<sup>2</sup>, and Jang Ryol Liu<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Functional Genomics for Plant Secondary Metabolism (National Research Laboratory), Eugentech Inc. 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

<sup>2</sup>Department of Biology Education, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>3</sup>Plant Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

**ABSTRACT** This study describes conditions for the mass production of activation-tagged mutant hairy root lines of ginseng by cocultivation with *Agrobacterium rhizogenes*. Because it is not currently possible to produce progeny from transgenic ginseng, a loss-of-function approach for functional genomics cannot be applicable to this species. A gain-of-function approach is alternatively the choice and hairy root production by cocultivation of *A. rhizogenes* would be most practical to obtain a large number of mutants. Various sources of explants were subjected to genetic transformation with various strains of *A. rhizogenes* harboring the activation-tagging vector pKH01 to determine optimum conditions for the highest frequency of hairy root formation on explants. Petiole explants cocultivated with *A. rhizogenes* R1000 produced hairy roots at a frequency of 85.9% after 4 weeks of culture. Conditions for maximum growth or branching rate of hairy roots were also investigated by using various culture media. Petiole explants cultured on half strength Schenk and Hildebrandt medium produced vigorously growing branched roots at a rate of 2.6 after 4 weeks of culture. A total of 1,989 lines of hairy root mutants were established in this study. These hairy root lines will be useful to determine functions of genes for biosynthesis of ginsenosides.

#### 서 론

T-DNA insertion mutagenesis를 통해 얻어진 knock-out mutant는 유전자의 기능 연구를 위한 functional genomics의 주요한 재료로 사용되고 있다 (Bouchez and Hofte 1998). 그러나 돌연변이 유도 과정에서 T-DNA의 삽입으로 유전자의

기능이 소실되는 경우가 많고, 많은 경우 열성 유전이 일어나게 된다. 이는 초기 형질전환체에서 원하는 돌연변이체의 형질의 선별을 어렵게 한다. 또한 insertion mutagenesis를 이용한 실험은 고효율의 형질전환기술이 확립된 식물의 경우에만 쓸 수 있고, 여분의 유전자가 존재하는 경우 그 기능을 확인하기 어렵다. 따라서 인삼과 같이 형질전환을 통한 종자의 확보가 어려운 식물을 대상으로 하는 functional genomics 시스템에서 이러한 방법을 적용할 수 없다.

Activation tagging 기술은 유전자의 기능을 활성화시키는

\*Corresponding author Tel 042-860-4430 Fax 042-860-4608

E-mail: jrliu@kribb.re.kr

방법 (gain of function)으로 insertion mutation 유전자의 기능을 소실시켰던 (loss of function) T-DNA insertional mutagenesis의 약점을 극복할 수 있다 (Weigel et al. 2000). Activation tagging 시스템에서 T-DNA에는 CaMV 35S promoter의 enhancer 부분을 이용하여 식물세포의 돌연변이를 유도한다. 식물체내로 무작위로 삽입된 enhancer 부위는 삽입위치부분의 유전자를 활성화시켜 돌연변이 효과를 발생시킨다. Activation tagging을 통한 돌연변이체는 일반적으로 우성 혹은 아(亞)우성 발현을 하게 되어 돌연변이체는 실험자가 당대에 원하는 유전자에 의한 표현형질을 나타내므로 선발이 가능하다. 최근 이런 activation tagging 기술을 이용하여 일련의 유전자와 관련된 표현형질에 관한 연구가 성공적으로 수행되었다 (Weigel et al. 2000, Tani et al. 2004). 그러나 이 방법 역시 현재까지 형질전환시스템이 잘 갖추어지지 않은 일부의 식물 종에 한정되어 사용되어 왔다.

최근 activation tagging을 식물 조직배양 시스템에 적용하여, 목적으로 하는 유전자를 연구하려는 시도가 진행되고 있다. van der Fits 등 (2000)은 activation tagging된 일일초 캘러스를 이용하여 식물의 이차대사물질은 terpene indole alkaloid 생합성에 관련된 ORCA3, AP2 domain 전사조절인자를 분리하였다. 이러한 예는 activation tagging을 통한 돌연변이체는 일반적으로 우성 혹은 아(亞)우성 발현을 하게 되어 실험자가 당대에 원하는 유전자에 의한 표현형질을 관찰할 수 있고, 또한 식물의 이차대사물질은 캘러스에서도 만들어지기 때문에 형질 전환된 캘러스도 충분한 실험 재료로 사용될 수 있음을 보여준 예라 하겠다.

인삼은 가장 대표적인 약용 식물의 하나로 주로 뿌리를 약재로 사용하고 있다. 그리고 인삼 사포닌 즉 ginsenoside가

가장 중요한 약리 활성 물질로 간주된다. *Agrobacterium rhizogenes*의 감염에 의해 유도된 모상근은 대부분의 식물 뿌리에 존재하는 이차대사물을 합성하며, 모상근 line에 따라 합성된 이차대사물의 양적 변이를 보인다 (Mallol et al. 2001, Palazon et al. 2003, Woo et al. 2004). 인삼 ginsenoside도 인삼 모상근에서 합성된다. 또한 모상근은 캘러스 보다 안정한 형태로 장기간 기내에서 보관 관리할 수 있는 장점을 가지고 있다. 이러한 결과는 형질전환 시스템을 이용하여 종자의 확보가 어려운 인삼에서 ginsenoside를 중심으로 한 이차대사의 functional genomics을 위한 재료로 인삼 모상근을 사용할 수 있음을 시사한다. 따라서 본 연구에서는 인삼의 주요 약리 성분인 인삼 사포닌, ginsenoside의 생합성 관련 유전자를 중심으로 한 이차대사의 functional genomics을 위한 시스템 확립을 위해 activation tagging 인삼 모상근을 중심으로 대량의 모상근 line을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 균주

본 연구를 위한 재료로는 인삼 (*Panax ginseng*) 품종 천풍 (KG101)을 사용하였다. 천풍은 한국인삼연구소 연구원이 품종화한 open pollinated type으로 매우 균일한 생육특성과 많은 뇌두를 내는 대형종이다. 종자는 층적 처리를 통해 개갑을 유도하여 실험재료로 사용하였다.

*Agrobacterium rhizogenes*는 한국생명공학연구원 생물자원센터 KCTC로부터 분양받은 R1000, A4, CIP104786을 이용하여 모상근을 유도하였다. *A. rhizogenes*는 3 mL의 YEB 액체배지 (yeast extract 10 g/L, Bactopeptone 5 g/L, NaCl 5 g/L)에서 28°C, 180 rpm으로 진탕 배양하여 이용하였고, activation tagging vector로 형질전환된 균주는 kanamycin 50 mg/L를 액체와 고체 배지에 첨가하여 배양하였다.

### Activation Tagging Vector (pKH01)의 제조

Activation tagging vector인 pKH1는 pSKI015에서 tetramer CaMV 35S enhancer부분을 PCR로 증폭하였다. PCR primer는 5'-TCTAGAACTAGTGGATCCCCAACATG-3', 5'-CTGCAGAA TATATCCTGTCAAACACTG-3'를 이용하였다. 이후 증폭된 PCR 산물은 pCR2.1 TOPO cloning vector를 이용하여 클로닝 하였다 (Invitrogen, USA). pCAMBIA 2300 vector와 클로

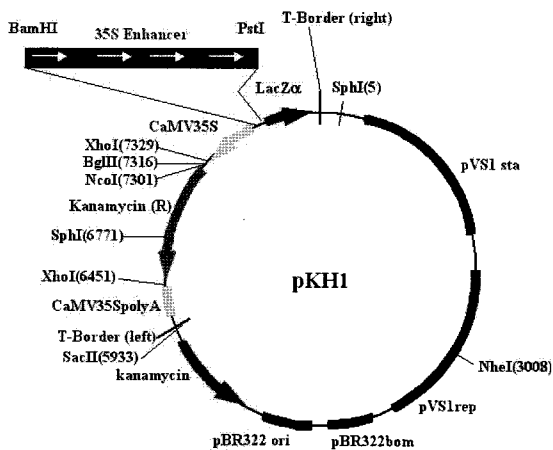


Figure 1. Activation tagging vector pKH1

닌한 tetramer CaMV 35S enhancer부분을 BamHI/PstI site를 이용하여 변형된 pKH01 벡터를 제조 하였다 제조된 pKH01는 *A. rhizogenes* R1000에 형질전환하여 사용하였다.

### 모상근의 유도

개갑된 종자는 종피를 제거한 뒤, 30초간 70% (v/v) 에탄올로 세척 후, 15분간 0.4% 상용락스 용액에 침지 후 멸균증류수로 3회 세척하였다. 살균된 종자는 1/2MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에서 발아를 유도하여 재료로 이용하였다.

모상근 유도에 효율적인 조직을 선발하기 위해 자엽, 하배축, 잎, 엽병 등을 이용하였다. 인삼 유식물체는 개갑 인삼 종자를 1/2MS 배지에서 무균 발아시켜 이용하였고, 성체인 삼은 4년근 인삼의 잎과 엽병을 0.4% 유한락스에 15분간 침지, 살균하여 이용하였다. 시기별로 3, 5, 10, 15, 30일 후에 발아된 접합자 배를 부위별 (엽병, 자엽) 및 4년근 식물체의 잎과 줄기를 모상근 유도재료로 이용하였다. YEB 3 mL에 2일간 현탁 배양한 *A. rhizogenes* 배양액 (R1000, A4, CIP104786)을 원심분리 후 1/25 비율로 생장조절제가 첨가되지 않은 1/2농도의 MS 액체배지로 희석하여 공동배양을 위한 배지를 조성하고, 약 30분간 인삼 조직을 침지 후, 동일한 고체배지에서 2일간 공동 배양하였다. 공동배양 된 조직은 800 mg/L cefotaxime이 첨가된 1/2MS 액체배지로 세척 후 3주일 간격으로 400 mg/L cefotaxime이 첨가된 1/2MS 선택배지와 activation tagging vector를 포함하는 처리구에서는 100 mg/L kanamycin 과 400 mg/L cefotaxime을 첨가한 1/2MS 선택배지에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 각 처리 후 1달 뒤 나온 절편당 모상근 수와 모상근의 총수를 조사하였다.

### 모상근의 증식 및 현탁 배양과 성장률조사

효율적인 모상근 초기 증식 배지를 선발하기 위해 1/2 농도의 MS, SH (Schenk and Hildebrandt 1972), White (1943) 배지와 각 배지에 IBA (indole-3- butyric acid) (0.1 mg/L)를 첨가하여 초기 분지도를 조사하였다. 배양조직에서 유도된 *A. rhizogenes* R1000에 pKH1 벡터로 형질전환시킨 activation tagging된 각각 모상근을 1-1.5 cm로 절취하여 각 배지에 20-30개를 치상 후, 4주 경과후 분지된 뿌리수를 조사하였다.

모상근의 성장률 조사는 고체배지와 액체배지에서의 생중량의 증가로 측정하였다. 고체배지에서의 증식률 조사는 3차 분지 이상 잘 증식된 모상근을 종류별로, 생장조절제를

첨가하지 않은 1/2무기염 농도의 SH 고체배지에 약 0.2 g씩 각 3반복 치상하여 4주 후에 증식된 생중량을 조사하였다. 액체배지에서의 증식률 조사는 약 2 g씩 각 3반복 치상하여 10 mL의 1/2SH 배지가 담겨있는 250 mL 멸균 삼각플라스크에 넣고 100 rpm 25°C 암상태에서 진탕 배양 후 2주와 4주차에 멸균 거름종이에서 액체 배지를 제거 후 무게를 재었다. 액체 배지는 매 2주마다 새로운 배지로 교환하였다.

### 형질전환 모상근 PCR 분석

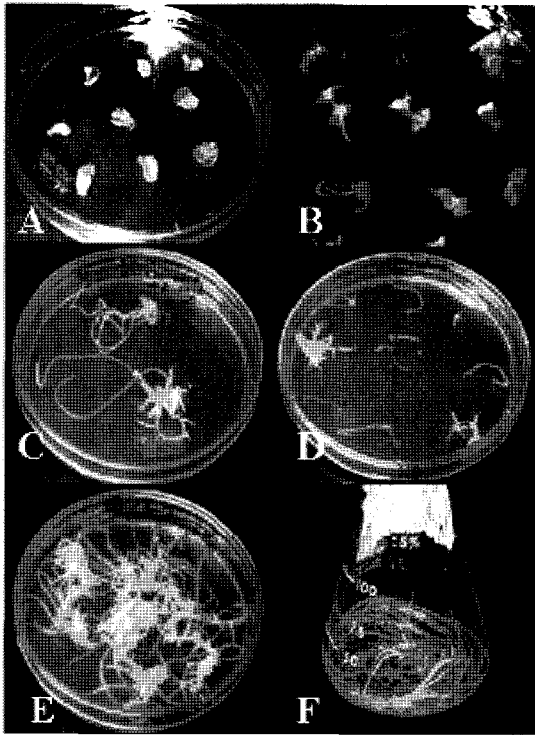
형성된 모상근의 형질전환 여부를 확인하고자 PCR 분석을 수행하였다. 모상근은 새로 생성된 모상근의 정단부위를 2-3 mm 절취 후, genomic DNA를 추출하여 분석 재료로 이용하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 predenaturation한 후, 94, 58, 72°C 각 1분씩 25 cycle을 수행 후, 72°C에서 5분간 last extension 시켰다. PCR 반응에 이용한 primer는, RolB 유전자 (5'-CCTATTCGAGGGGATCCGATTTGC-3' / 5' CCGGACGTGATATCCCCGAGGGCAT-3')와 *Agrobacterium* 오염을 확인하기 위한 VirC2 유전자 (5'-TTTTGCTCCTCAAGGGAGGTGCC-3' / 5'-GGCTTCGCCAACCAATTTGGAGAT-3') 또한 activation tagging line의 확인을 위한 35S enhancer 절편 (5'-GATCCCCAACATGGTGGAGCACGA-3' / 5'-TAGATATCA CATCAATCCACTTGC-3')과 NPTII 유전자부분 (5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG -3' / 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3')을 각각 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 인삼 조직별 모상근 유도율

효율적인 모상근 유도를 위하여 *A. rhizogenes* R1000, A4, CIP104786균주에 의한 인삼 종자의 발달 시기별 모상근의 유도율을 조사한 결과, 인삼 접합자 배 발아 유도 후 14일과 28일에서 자엽과 엽병 모두 우수한 모상근 유도율을 보였다. 유도된 모상근은 고체 및 액체배지에서 각각 성공적으로 증식 할 수 있었다. (Figure 2). 모상근은 발아 28일후의 엽병에서 67.7%로 가장 많이 발생하였다. 또한 종자의 발아에 의해 상대적으로 조직이 커짐에 따라 발아 28일 경의 인삼 엽병은 8-10개의 절편을 만들 수 있어, 모상근 유도의 재료 준비에 유리함이 확인되었다 (Table 1).

인삼 각 조직 별 모상근 유도율을 조사한 결과는 Table 1



**Figure 2.** Production of hairy roots transformed with *A. rhizogenes* R1000 harboring pHK1 in ginseng. A: Cotyledon explants; B, C: Hairy root formation; D: Secondary hairy root formation; E: Proliferation of hairy roots on solid medium; F: Proliferation of hairy roots in liquid medium.

**Table 1.** Frequency of hairy root formation in various tissues of ginseng.

	Frequency of hairy root formation	
	No./explant	Frequency (%)
Cotyledon	2.4±0.8	36.5±30.4
Petiole <sup>1</sup>	3.5±1.3	68.8±23.3
Cotyledonary node	2.3±1.3	44.4±26.3
Leaf segment <sup>2</sup>	2.6±0.1	66.0±21.3

<sup>1, 2</sup> Petiole and leaf explants were obtained from seedlings. Seeds germinated into seedlings on half strength MS basal medium after 3 to 28 days of culture.

에 나타낸 바와 같다. 각 모상근은 *A. rhizogenes*로 접종 후 모든 조직에서 모상근의 유도를 확인할 수 있었고, 대부분의 경우 2-4주 사이에 모상근이 유도됨을 확인하였다. 인삼 종자의 엽병에서 68.8%의 모상근 유도가 확인되었으며, 또한 각 절편별 모상근 유도율 역시 평균 3.5개로 가장 많은 모상근을 생산함을 확인하였다. 이는 자엽과 자엽절의 모상근 유도율에 비해 상대적으로 높았다. 따라서 다량의 모상근

생산에 엽병이 가장 효율적임을 확인하였다. 인삼종자 유래 잎의 경우도 역시 66.0%의 높은 모상근 유도율을 보였다.

Yang 등 (1998)은 인삼 모상근의 생산에 뿌리 조직을 이용하며 줄기 및 엽병에서 모상근 유도는 가능하나 모상근의 초기 발생과정에서 *A. rhizogenes* 오염에 의해 계대배양이 안된다고 하였다. 본 연구에서는 뿌리절편을 이용한 모상근 유도시 *A. rhizogenes*과 기타 오염에 의한 생산을 저하를 제거 할 수 있어서 각각 독립적인 모상근의 계획 생산이 가능하다는 것을 알 수 있었다. 또한 접합자배의 엽병은 상대적으로 여러 절편의 확보가 수월하여 현재까지 주로 사용된 뿌리절편의 모상근 유도에 비해 매우 효율적이라 사료된다. 인삼의 최대 문제점인 초기 모상근의 대량 확보를 인삼 종자를 이용함으로써 보다 체계적인 모상근 생산 시스템을 구축할 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서 자엽 및 엽병을 배지 면에 세워 놓는 것이 눕혀 놓는 것보다 모상근 생산에 효율적이었다.

선행의 실험에 의해 인삼종자의 자엽과 엽병이 모상근 유도에 유리한 재료임을 확인한데 이어서 각각의 *A. rhizogenes* 균주의 종류에 의한 모상근 유도율 조사결과, R1000균주가 엽병을 사용시 85.9%로 가장 우수하였다. 또한 A4 strain에 의해서 엽병에서 65.32%의 빈도의 모상근이 유도되었다 (Table 2). 이는 뿌리 절편에서 A4 strain이 65%의 모상근 유도를 보인다는 논문 (Mallol et al. 2001)과 일치하였다. 다만 CIP15834의 경우 오염에 의해 정량적인 데이터를 수집하는데 어려움이 있었다. 이는 사용한 cefotaxim외의 다른 항생제를 함께 사용하는 방법 등을 향후 고려해 볼 수 있을 것이다. *A. rhizogenes* R1000에 pHK1 vector가 포함된 경우 60.0%의 모상근 유도율을 보여, wild type의 *A. rhizogenes* R1000에 비해 모상근 발생 효율이 약간 감소하는 것으로 나타났다. 이는 상대적으로 선발 배지에 추가로 첨가된 kanamycine의 농도가 모상근 발육 및 증식에 영향을 미친 것으로 사료되며, 또한 모든 *A. rhizogenes* 균주의 종류와 관계없이 엽병의 모상근 유도가 자엽보다 우수함을 재차 확인하였다.

#### 모상근 분지를 위한 최적 배지 조사

효율적인 모상근 초기 증식 배지를 선발하기 위해 1/2 농도의 MS, SH, White (1943) 배지와 IBA 0.1 mg/L를 이용하여 초기 분지도를 조사하였다 (Table 3). 조사 배지 중 1/2White 배지의 분지율이 3.36으로 가장 우수하였다. 다만

**Table 2.** Frequency of hairy root formation on explants induced by various *A.rhizogenes* strains.

Agrobacterium strain	Cotyledon <sup>1</sup>		Petiole <sup>2</sup>	
	NO./ explant	Frequency (%)	NO./ explant	Frequency (%)
R1000 + AT	2.3±0.6 (391/168)	31.9±30.7 (168/526)	4.3±0.3 (1214/285)	60.0±20.4 (285/476)
R1000	2.9±1.5 (182/62)	60.2±29.9 (62/103)	2.8±0.9 (224/79)	85.9±11.3 (79/92)
A4	3.0±0.8 (78/26)	36.1±36.1 (26/72)	3.0±1.1 (241/81)	65.3±2.3 (81/124)
CIP 104786	1.7±0 (7/4)	9.5±0 (4/42)	1.0±0 (1/1)	1.2±0 (1/85)

<sup>1,2</sup> Cotyledon and petiole explants were obtained from seedlings. Seeds germinated into seedlings on half strength MS basal medium after 3 to 28 days of culture. AT: Activation tagging vector (pKH1)

**Table 3.** Numbers of branched roots on hairy roots cultured on various culture media.

Medium	Number of branching roots/explant
1/2 MS basal	1.2
1/2MS basal + IBA 0.1 mg/L	1.4
1/2SH basal	2.6
1/2SH basal + IBA 0.1 mg/L	1.2
1/2White basal	3.4
1/2White basal + IBA 0.1 mg/L	2.3

1/2White 배지에서는 매우 가는 섬유상의 모상근이 분지되어 상대적으로 초기 생장이 저조하였다. 이에 반하여 1/2SH 배지는 상대적으로 분지율도 우수하고 새로 나온 뿌리의 생장 정도도 우수하여 1/2SH 배지를 증식 배지로 선발하였다. 이는 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>가 제거된 배지에서 인삼세포의 생장이 우수하다는 Zhang 등 (1996)의 연구결과와 유사하였다. 또한 배지에 0.1 mg/L의 IBA의 첨가는 선행 연구결과 (Wendy et al. 1999)와는 달리 분지율 및 증식에서 상대적으로 효과가 없음을 확인하여 배지선발에서 제외하였다.

**모상근의 고체 및 현탁 배양과 생장률조사**

인삼 모상근의 증식을 유도하기 위해서 고체배양과 액체 배양을 수행하였다. 모상근의 최적 조건의 배지로 선발된 1/2SH 배지를 이용하여 *A. rhizogenes* R1000을 형질전환 시킨 각각의 모상근들의 형태 및 생장률을 조사하였다. Figure 3에서 나타난 바와 같이 각각의 모상근의 색과 형태가 매우

다양하게 나타남을 확인 할 수 있었다. 또한, 1/2SH 고체 배지에 치상 후 약 30일 경과하였을 때 증식률을 조사한 결과 2-8배까지 생체량이 증가하였다 (Figure 4). 가장 생장률이 높은 모상근 line은 31번으로, 분지율과 뿌리털의 정도도 다른 line보다 우수하였다. 가장 생장률이 저조한 23번은 표현형에서도 섬유상의 모양을 하며 분지정도도 저조하여 전체적으로 낮은 증식을 나타내었다. 매우 다양한 모상근 증가는 각각의 모상근의 표현형적인 차이와 관련된 것으로 이는 독립적인 모상근의 line임을 증명하는 결과로도 여겨질 수 있다. 지금까지의 연구에서 초기의 모상근의 증식은 모상근 생산에서 가장 어려운 단계로 여겨져 왔다. 많은 경우 초기의 모상근은 증식이 되지 않는 경우가 있으며 배지내의 암모늄이온이 제거된 1/2SH 배지에서 안정적인 증식이 가능함을 확인 할 수 있었으며, 이는 현탁배양에 1/2MS IBA 1 mg/L 이용시 증식이 우수함을 밝힌 결과와 달리, 초기 증식된 모상근을 기존에 이용하던 0.05 g에서 2 g 이상을 사용함으로써 식물 생장조절제의 첨가 없이도 초기 액체 배양 증식에 문제가 없음을 확인하였다 (Yang et al. 1999). 따라서 액체배양 적응 시 초기 치상량을 2 g 으로 증가시킴으로써 안정적인 액체배양시스템을 구성할 수 있었다.

한편, 고체배지의 증식률과 액체배지의 증식률은 서로 차이가 있음을 확인하였다. 즉, 고체배지에서 증식률이 저조한 25번 line의 경우 액체배양에서는 한 달 뒤 가장 증식률이 우수함을 확인 할 수 있었다. 또한 2주차의 생장률에 비하여 4주차에는 각각의 생장정도가 상이함을 확인 할 수 있었다 (Figure 5). 일반적으로 인삼 모상근의 액체 배지에서의 적응 기간은 약 2주 정도이며 4주 이후 본격적인 증식이 시작된다. 앞으로 보다 정밀한 증식률 조사를 통하여 배지의 소비 정도와 생장과의 상관관계를 밝힘으로써 선발 모상근의 액체배양 최적조건의 확립이 필요할 것이다.

**Activation Tagging 모상근의 PCR분석**

*A. R1000*에 pKH1 vector가 포함된 형질전환 모상근을 확인함과 아울러 *Agrobacterium* contamination을 초기에 확인한 결과 내부에 포함된 NPTII gene, *rolB* 유전자의 도입을 확인할 수 있었다 (Figure 6). 본 연구에서, *A. rhizogenes* R1000 등을 이용한 activation tagging 된 모상근은 초기에는 kanamycin이 첨가된 배지에서 모상근을 유도한 후에 kanamycine의 모상근 발달에 있어서의 영향을 고려하여 계대 배양 시에는

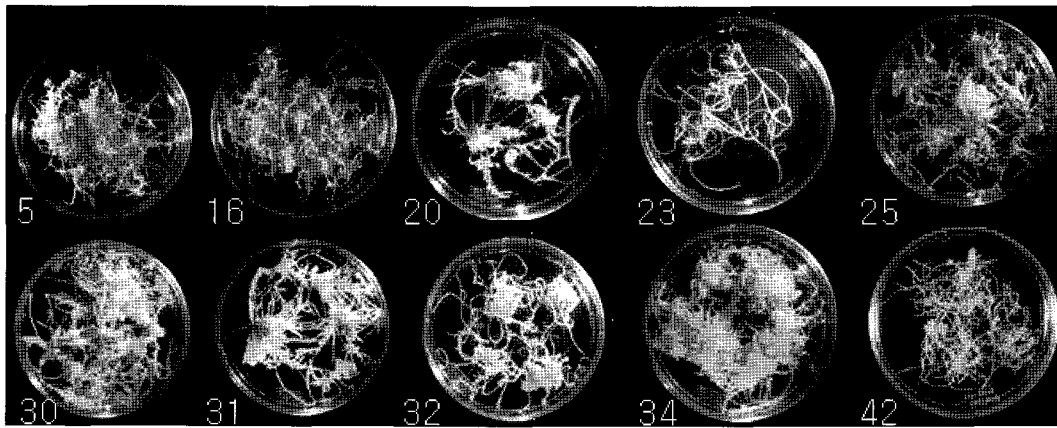


Figure 3. Various phenotypes of hairy roots transformed with *A. rhizogenes* R1000

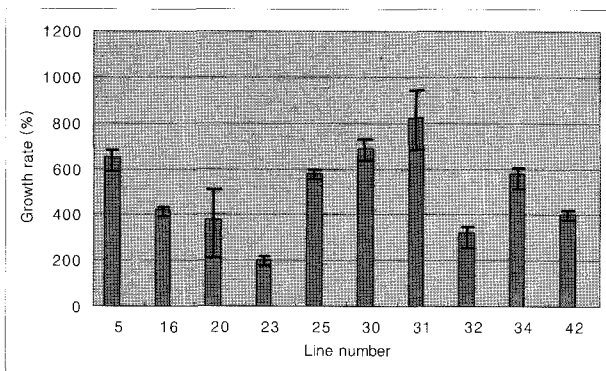


Figure 4. Comparison of growth rates of hairy root lines. Lines were established after transformation with *A. rhizogenes* R1000 and were maintained on 1/2SH solid medium.

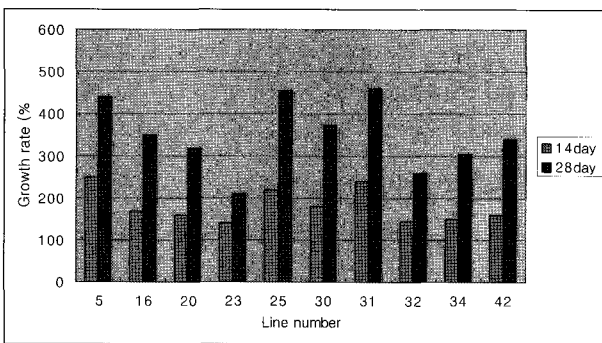


Figure 5. Comparison of growth rates of hairy root lines after 14 day and 28 days of culture in ginseng. Lines were established after transformation with *A. rhizogenes* R1000 and were maintained on 1/2SH liquid medium.

kanamycin이 첨가되지 않은 배지에서 증식을 유도하였다. 따라서 일부 모상근 line에서는 enhancer element가 없을 수도 있다. 이는 *A. rhizogenes*가 tagging vector와 내부적으로 이미 가지고 있는 Ri-Plasmid를 동시에 가지고 있기 때문에 불

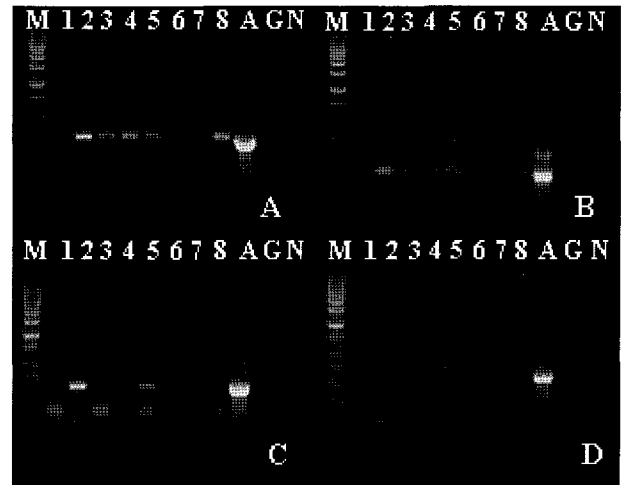


Figure 6. PCR detection of the NPTII gene (A, B, C) or VirC2 (D) in established hairy root lines of ginseng. M: 1 kb ladder; Lane 1-8: transformants of independent lines; A: pKH1 plasmid as a positive control; G: Seedling root; N: Negative control.

안정 할 수 있기 때문이다. 따라서 본 실험에서는 독립적으로 증식된 1,100개의 line 중 무작위로 재차 44개의 모상근 line을 선발하여 PCR을 통해 rolB 와 35S enhancer 절편의 존재 유무를 확인한 바 37 line (84.1%)에서 35S enhancer 절편이 존재함을 알 수 있었다. 나머지 7 개 line에서는 rolB 유전자만을 확인 할 수 있어서 초기 PCR 분석치인 88%와 유사함을 확인하였다 (데이터 미제시).

본 연구에서 안정적인 activation tagging된 인삼 모상근의 대량생산 시스템을 확립할 수 있었다. 이들 돌연변이체들은 metabolomics의 도움으로 metabolic mutant의 종류별로 분류되고 genome에서 tag된 부위를 찾아서 해당 유전자의 기능을 유추하는 functional genomics의 수단으로 이용될 수 있을 것이다.

## 적 요

본 연구는 아그로박테리움 공동배양법을 이용한 기능획득 인삼 모상근의 대량생산을 위한 조건 확립에 대한 것이다. 일반적으로, 인삼과 같이 형질전환을 통한 종자의 확보가 어려운 식물에서는 loss-of-function을 이용한 기능유전체 연구에 한계가 있다. 한편, 유전자의 기능을 활성화 시키는 방법 (gain-of-function)인 activation tagging 기술은 이러한 문제점을 극복할 수 있는 대안이 될 수 있으며, *Agrobacterium rhizogenes*를 이용한 모상근 생산 시스템은 대량의 돌연변이체를 안정적으로 용이하게 얻을 수 있다는 점에서 최적의 시스템이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 activation-tagging된 효율적인 형질전환 모상근 생산에 있어서의 최적의 아그로박테리움 균주 및 인삼조직, 배지조성 등에 대한 조건을 확립하였으며, 다양한 배지에서의 형질전환 모상근의 생장률 및 분지율, 표현형 등을 조사하였다. 엽병 절편을 activation-tagging vector pKH01을 가지고 있는 *A. rhizogenes* R1000와 공동배양하였을 때 배양 4주후 85.9%의 빈도로 모상근이 생산되었다. 모상근의 최대 생장과 분지도를 나타내는 배양 조건을 조사한 바 엽병절편을 1/2 SH 배지에서 4주 배양하였을 때 왕성하게 생장하였으며 2.6의 분지도를 보여주었다. 최종적으로 1,989개체의 독립적인 형질전환 모상근 line을 생산하였으며, 이들 모상근 line은 인삼 진세노사이드 생합성 관련 유전자의 발굴 및 기능해석에 유용하게 쓰일 것이다.

## 사 사

본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어연구개발사업의 자생식물이용기술개발사업단과 농촌진흥청 바이오그린21사업, 과학재단 SRC의 경희대 식물대사연구센터의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

## 인용문헌

- Bouchez D, Hofte H (1998) Functional genomics in plants. *Plant Physiol* 118:725-732
- Mallol A, Cusido RM, Palazon J, Bonfill M, Morales C, Pinol MT (2001) Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. *Phytochemistry* 57(3):365-371
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Palazon J, Mallol A, Eibl R, Lettenbauer C, Cusido RM, Pinol MT (2003) Growth and ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax ginseng* using a novel bioreactor. *Planta Med* 69: 344-349
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can J Bot* 50:199-204
- Tani H, Chen X, Nurmberg P, Grant JJ, SantaMaria M, Chini A, Giloy E, Birch PRJ, Loake GJ (2004) Activation tagging in plants: a tool for gene discovery. *Funct Integr Genomics* 4: 258-266
- Van der Fits, Hilliou F, memelink J (2001) T-DNA activation tagging as a tool to isolate regulators of a metabolic pathway from a genetically non-tractable plant species. *Transgenic Res* 10: 513-521
- Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil E J, Neff MM, Nguyen J T, Satio S, Wang ZY, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb C J, Yanofsky F, Chory J (2000) Activation Tagging in Arabidopsis. *Plant Physiol* 122: 1003-1013
- Wendy S, Yosimura K, Yamaguchi H, Shimomura K (1999) High production of ginsenoside by transformed root cultures of *Panax ginseng*. Effect of basal medium and *Agrobacterium rhizogenes* strains. *Bull Natl Health Sci* 117:148-154
- White PR (1943) Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for culture of excised tomato roots. *Growth* 7: 53-65
- Woo SS, Song JS, Lee JY, In DS, Chung HJ, Liu JR, Choi DW (2004) Selection of high ginsenoside producing ginseng hairy root strains using targeted metabolic analysis. *Phytochemistry* 65: 2751-2761
- Yang DC., Kim YH, Min BH, Shin SL, Choi KT (1998) Selection of active growth root strains in ginseng. *Korean J Plant Tiss Cult* 25: 525-530
- Yang DC, Kim YH, Yang DC, Shin SL, Choi KT (1999) The optimum conditions for induction of ginseng hairy roots. *Korean J Plant Res* 12: 1-9
- Zhang YH, Zhong JJ, Yu JT (1996) Effect of Nitrogen Source on Cell Growth and Production of Ginseng Saponin and Polysaccharide in Suspension Cultures of *Panax notoginseng*. *Biotech Prog* 12: 567 -571

(접수일자 2007년 10월 8일, 수리일자 2007년 11월 5일)