

인삼의 유용유전자원 확보를 위한 기능 유전체연구

양 덕 춘

경희대학교 생명과학대학 한방재료가공센터

Functional Genomics for Mass Analysis of Useful Genes in

***Panax ginseng* C.A. Meyer**

Yang, Deok-Chun

Center for Oriental Medicinal Material & Processing, College of Life
Science, Kyunghee University, Yongin 449-701, Korea

ABSTRACT

As Korean ginseng is hybrid, an individual variation is very severe, and it takes long times in new breeding because it is required 4 years to pick the seed. But, transformation technique makes the high-functional breeding in short time. The focus of these ginseng studies is to find and secure the useful gene. And it is urgent to accumulate the fundamental data for the molecular breeding and secure the useful genes. Therefore, transformation and soil acclimatization technique are necessary to molecular breeding in use of the introduction of functional genes. In this study, it add to secure of new regulation gene and useful gene as to accumulate the fundamental data for the place where it will contribute to raise the national competitive power. To analyze the useful genes in large scale, we constructed cDNA libraries with various tissues, species, and treated tissue. EST analysis of ginseng perform in large scale and build the EST database of ginseng. We perform the full length sequencing about the selected lots of clones that include the entire open reading frame of the amino acid residues and construct cDNA chip with the parental EST clones. Establishment of the transformation and a soil acclimatization system throuth the re-introduction of the selected ginseng gene that related with the secondary metabolism and anti-stress into the ginseng

서 론

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 아시아의 극동지방에서만 자생하는 식물이며, 인삼의 종주국으로 한국을 칭하고 있을 정도로 전세계적으로 알려져 있는 국가적인 자생 약용식물로서, 땅에서 생산하는 반도체로 불려질 정도로 그 부가가치가 매우 높아 지속적으로 연구를 수행해야 할 중요한 자생 약용작물이다. 고려인삼은 한때 국가의 기간산업으로서 해외 수출도 활발히 이루어졌으나 근래에 들어와서 중국 및 미국, 캐나다 등의 저가삼과의 경쟁이 매우 심해 점차로 인삼종주국으로서 이름이 퇴색되고 있다. 한국인삼은 타국삼에 비하여 품질이 우수하나 노동집약적이기 때문에 가격이 비싸 시장경쟁력이 뒤쳐지는 주된 요인이 되고 있어 생산비 절감을 위한 각종 노력이 요구되고 있는 실정이다. 이러한 문제점을 극복할 수 있는 방법중의 하나가 고기능성 인삼의 신품종을 육성하여 고품질 위주로 특성화하는 길만이 경작지가 다른 경쟁국에 비해 턱없이 부족한 인삼의 종주국-한국이 바로 살아 나아갈 길로 생각된다. 현재 재배되고 있는 고려인삼은 혼계상태로서 개체간의 형질변이가 대단히 심하며, 종자채취를 4년 후에 하기 때문에 신품종육성을 위해서는 매우 오랜 기간이 필요하다. 그러나 식물형질전환기술의 발달로 목적하는 유전자를 식물체에 재도입하여 새로운 품종을 육성할 수 있는 기술이 보급되어 유용유전자만 있다면 단시간에 고기능성 신품종을 육성할 수 있을 것이다. 현재 고려인삼의 육종목표로 가장 시급한 연구는 1) 환경 stress 내성 품종육성, 2) 유효성분(ginsenoside) 고함유 품종육성, 3) 뿌리 형태가 양호한 다수성 품종육성, 4) 병해충에 저항성이 강한 품종 및 연작가능 품종육성 등을 들 수 있는데, 이중 환경 stress, 병충해 내성 인삼품종과 유효성분(고기능성 물질) 고함유 인삼품종을 육성하여 고부가가치 품종의 토양재배 및 기내배양함으로써 재배지의 협소문제(중국, 미국, 캐나다의 광활한 면적) 등을 극복할 수 있는 일이며, 아울러 퇴색되고 있는 인삼종주국의 면모를 다시 세울 수 있는 일이라고 생각된다.

EST(expressed sequence tags)분석은 genome의 mapping, 유전자 전장(Full length)의 동정, 새로운 유전자의 탐색과 특별한 세포나 조직에서 유전자의 발현을 조사하기 위한 탐침자(probe)로서 매우 유용하다. 특히 좋은 cDNA library의 확보는 육종이나 다른 응용을 위한 유용한 유전자 분리와 그 특성을 결정하는데 강력한 도구가 되며, 생물체에 존재하는 모든 mRNA에 상응하는 cDNA가 들어 있는 cDNA library가 있다면, EST가 발현된 단백질에 대한 아미노산의 정보를 가지고 있기 때문에 합성된 단백질의 일차구조에 대한 정보를 얻일 수 있어 유용유전자원의 확보를 위한 강력한 도구이다. 이제까지의 게놈연구는 DNA의 염기배열에 기초한 structural genomics가 중심이 되었으나, 앞으로는 그 기능해석이 한층 가속화될과 동시에 생물학 및 의학에 현저한 변화를 가져오게 될 것으로 기대되는데, 이런 면에서도 EST의 중요성이 부각된다. 이것은 지속적인 산업화에의 기여가 될 것을 의미하며 그 경제적인 중요성은 날로 증가하고 있다. 이러한 면에서 우리나라의 대표적인 약용식물인 인삼으로 부터 EST분석을 실시하여 유전자 은행을 구축함으로써 인삼의 분자육종을 위한 기초자료의 축적은 물론 고기능성 유용유전자원을 확보하는 것이 아주 시급한 문제이다. 따라서 본 발표에서는 인삼의 유용유전자를 대량으로 발굴하기 위하여 인삼의 조직별, 종간 및 처리간에 의한 cDNA library을 제작하고 이들 cDNA library로부터 인삼의 유용유전자원을 확보하기 위하여 EST 20,000개를 5' 한쪽 방향에서 분석하고 이들 분석된 EST clone의 데이터는 data base화하여 많은 연구자들이 연구정보를 공유할

수 있게 하고자 하였으며 EST clone 중에서 완전한 단백질의 유전정보를 포함하고 있는 clone을 선발하여 전장의 염기서열(full length sequence)을 분석하고 data base를 구축하고 parental clone을 선발하여 cDNA chip을 제작하였으며, EST clone 중에서 기능성 및 내재해성 유용유전자를 선발하여 전염기서열분석(full length sequencing)을 한 후 인삼에 재도입하여 고기능성 및 내재해성 인삼의 분자유종을 비교적 단시간내에 할 수 있는 형질전환 및 재분화 시스템을 개발하고 토양순화 시스템을 확립하고자 한다.

본 론

인삼 EST의 대량발굴 및 Database 구축

인삼의 종내(자경종, 황숙종, 청경종), 종간(미국삼, 중국삼), 년근별(천풍 4년근, 14년근) 등으로부터 생체중 10g을 사용하여 Shirras 등(1984) 방법을 약간 변형하여 total RNA를 추출하였다. 각각의 시료로부터 출한 total RNA는 mRNA Purification Kit(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 mRNA만을 분리·정제하였으며, 그 중 5 µg을 ZAP-cDNA Synthesis Kit(STRATAGENE)을 이용하여 cDNA library를 제작하였다. 인삼의 꽃봉오리, 잎과 배발생 캘러스(embryogenic calli)의 경우에는 동일한 방법으로 mRNA를 분리·정제한 후 pTripl EX(Clontech) Kit를 이용하여 full length cDNA library를 제작하였다(Fig. 1). 이들 cDNA library로부터 선발된 EST clone을 분석한 결과 70% 이상이 full length cDNA인 것으로 나타났다.

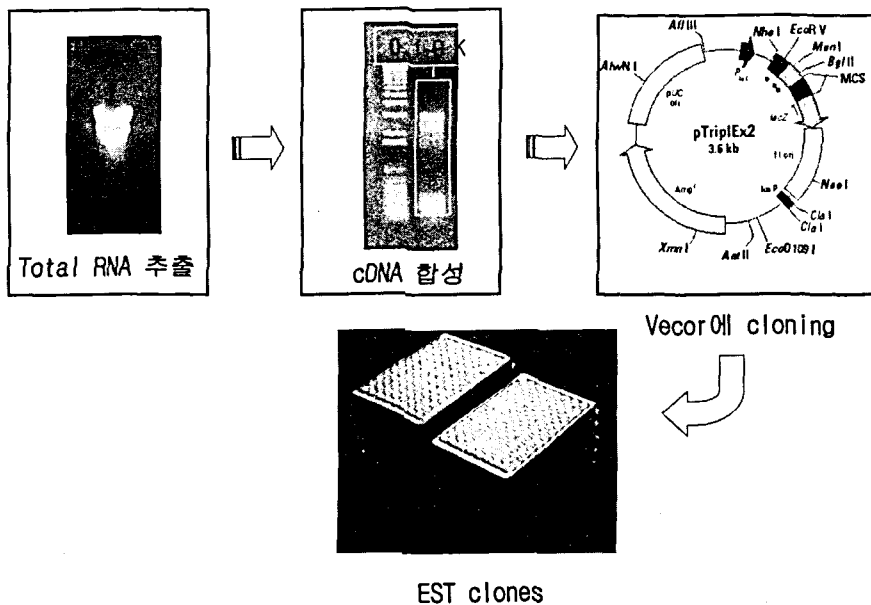


Fig. 1. Full length cDNA construction of *Panax ginseng*.

인삼 유용유전자의 대량 확보를 위하여 인삼 모상근(DC01), 14년근 인삼(DC02), 4년근 천풍(DC03), 꽃봉우리(DC04), 잎(DC05), 배발생 켈러스(DC06)로부터 무작위로 single colony를 선발하였으며 이들을 LB 액체배지에서 하루밤 진탕배양한 후 plasmid purification kit(Bioneer)을 사용하여 핵산을 정제하였다(Fig. 2). 이들 선발된 EST clone 들은 한쪽방향(5')에서만 sequencing을 실시하여 총 20,000개의 EST clone을 분석하였다. 염기서열이 분석된 인삼 EST clone의 길이 분포를 조사하여 본 결과 긴 것은 750bp정도 까지 존재하였으며, 300bp 이상되는 EST clone들이 90% 이상으로 나타났다(Fig. 3).

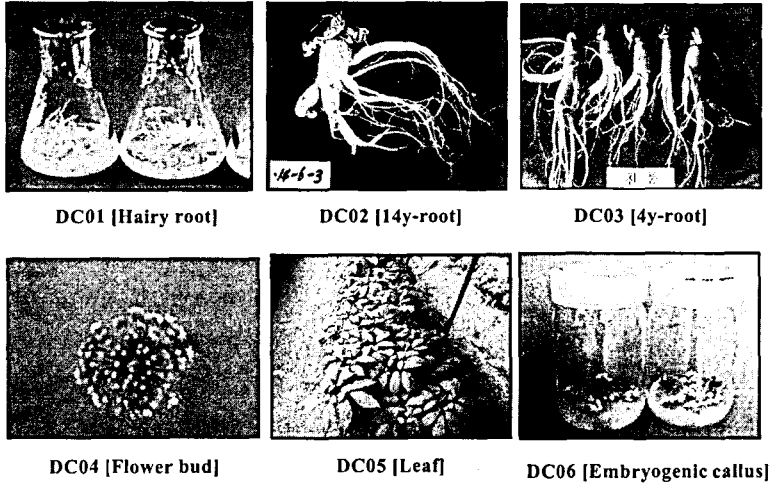


Fig. 2. *Panax ginseng* cDNA libraries used for EST(expressed sequence tags) analysis.

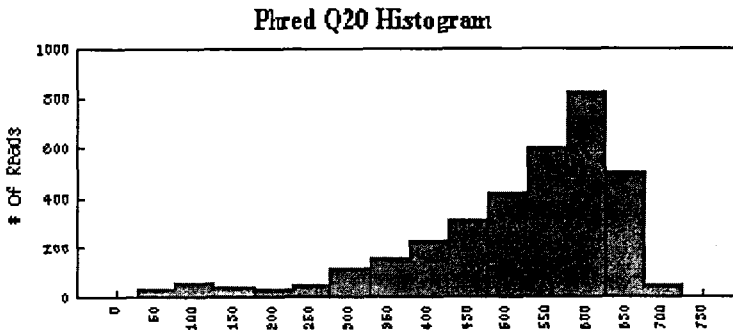


Fig. 3. Distribution of ginseng EST clones analyzed with singleton sequence

이들 분석된 EST clone들은 contig하여 분석한 결과는 Table 1에서 보는바와 같이 parent clone의 비율이 56-74% 정도로 나타났으며, 모상근(DC01)의 EST clone들에서 가장 높게 나타났고 광합성 관련유전자가 다발현된 잎(DC05)에서 가장 낮게 나타났다. Redundant clone을 제거한 후 parent clone만을 선별하여 blastx 검색을 하여 homology 검색을 하여 유전자를 동정한 결과 전혀 상동성을 나타내지 않는 비율이 3.8-10.3%로 나

타났으며, 특히 모상근(DC01)이 가장 많이 존재하는 것으로 나타났다(Table 1). 모상근은 *A. rhizogenes*에 의하여 외래유전자가 도입되어 왕성한 생리적인 활성을 나타내고 있어 유용물질의 생산계로서 주목을 받고 있다. 그러나 현재까지 모상근에서의 EST 분석에 대한 보고는 아직 없는 실정으로 본 연구에서 처음으로 시도한 것으로서 물질생산을 위한 유용한 자료가 될 것이다.

Table 1. EST analysis of six different cDNA libraries of *Panax ginseng*.

DC01	High-quality	2640 (93.5)	DC02	High-quality	2838(95.4)
	Low-quality	182 (6.5)		Low-quality	137(4.6)
	Parent seq.	1960 (74.2)		Parent seq.	1991(70.2)
	No hits found	273 (10.3)		No hits found	114(3.8)
	Redundancy	680 (25.8)		Redundancy	847(29.8)
DC03	High-quality	3209(83.5)	DC04	High-quality	3081(91.6)
	Low-quality	632(16.5)		Low-quality	279(8.4)
	Parent seq.	2056(64.0)		Parent seq.	1844(59.9)
	No hits found	358(9.3)		No hits found	187(5.5)
	Redundancy	1153(36.0)		Redundancy	1237(40.1)
DC05	High-quality	2898(91.5)	DC06	High-quality	3229(96.1)
	Low-quality	272(8.5)		Low-quality	130(3.8)
	Parent seq.	1624(56.1)		Parent seq.	1910(59.1)
	No hits found	178(5.6)		No hits found	233(6.9)
	Redundancy	1272(43.9)		Redundancy	1319(40.9)

또한 분석된 EST clone을 MIPS를 기준으로하여 기능별로 각 cDNA별로 분류하여본 결과 각 라이브러리간 특징적인 유전자의 발현양상을 관찰할 수 있었다. 특히 같은 뿌리 조직인 14년근과 4년근의 경우에는 예상과는 달리 낮은 redundancy보였으며, catalase의 경우에는 14년근의 경우에만 17개의 EST clone이 관찰되었으며, metallothionein의 경우에는 오히려 4년근에서 36개의 EST이 관찰되어 5개의 14년근 보다 월등히 많이 발현하고 있을 알 수 있었다. 이는 인삼의 경우 포장재배에서 6년이상의 재배가 어려운 현상을 극복할 수 있는 실마리를 제공하고 있을 가능성을 시사하고 있다. 이에 반하여 사포닌 생합성에 있어서 key enzyme인 squalene synthase와 squalene epoxidase의 경우 4년근에서는 각각 1개와 2개가 존재하였으나, 14년근의 경우에는 전혀 관찰이 되지 않았다. 그러나 14년근에는 sesquiterpene synthase가 4개 관찰이 되어 4년근에서는 전혀 없어 구근 식물인 인삼의 경우 년근에 따라서도 발현하는 유전자가 다양함을 관찰할 수 있었다.

염기서열이 분석된 EST clone들은 data base(http://www.pdrc.re.kr/new_korea/genepool/DC/index.html)로 구축이 되어 현재 누구나 접속하여 연구에 이용할 수 있게 공유되어 있다(Fig. 4). 이 인삼 database에는 6개의 인삼 cDNA library로부터 무작위로 선발된 20,000여개의 EST clone에 대한 염기서열정보가 보관되어 있으며, 아울러 blastx 검색을 통한 유전자의 기능분석이 되어있다. 그리고 바이오피아 자체적으로 두개의 database를 구축하고 있다. 인삼의 주요한 성분은 인삼식물체에만 특이적으로 존재하는 담마렌계열 사포닌(ginsenoside)으로서, 이들 사포닌은 isoprenoid pathway에서 합성되어 진다. 분석된 인삼 EST 중에서 isoprenoid pathway에 관련된 유용 유전자만을 별도로 선발한 후 인삼 isoprenoid database http://www.ibiopia.com/zboard/zboard.php?id=Isoprenoid_Pathway를 자체적으로 구축하여 운영하고 있다(Fig. 5).

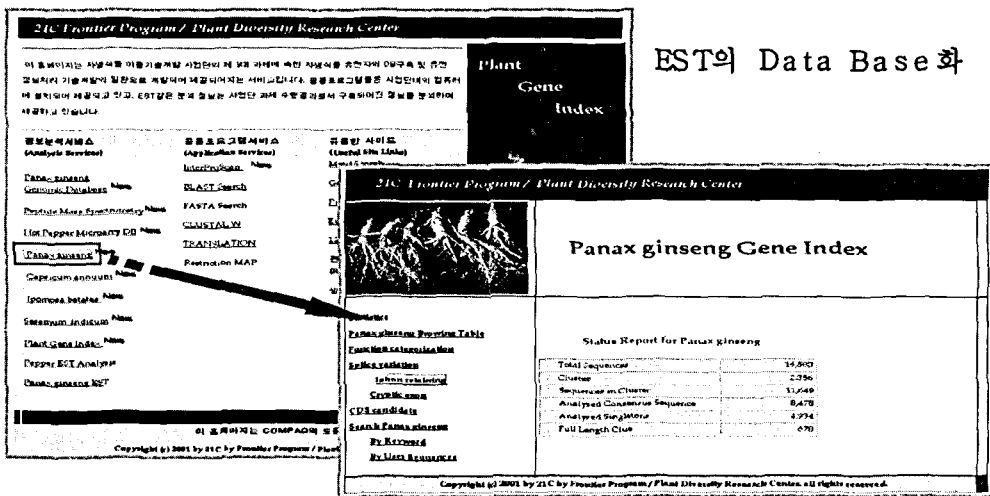


Fig. 4. EST database building of *Panax ginseng*.

Fig. 5. Isoprenoid pathway database building of *Panax ginseng*.

인삼 cDNA 유전자의 Full length sequencing 및 database 구축

Blastx 검색을 통하여 기존에 동정되어 있는 유전자와 상동성을 나타내는 EST clone 중에서 단백질 code영역인 ORF가 확보되어 있는 cDNA clone을 선발하여 5'과 3' 양쪽에서 primer working을 하여 염기서열분석을 실시하여 full length sequencing을 하였다. 분석된 인삼 EST clone 중에서 단백질의 완전한 유전정보를 포함하고 있는 full length EST clone을 선발(Table 2)하여 primer working으로 full sequencing을 하여 data base http://www.ibiopia.com/zboard.php?id=full_length를 구축하였다(Fig.6).

No.	Clone	Library	E-value	Hit ID	Blast Blast hit	Members Count
1	DC10049	CC-01	5e-40	gi 55205 gb CA32091.1	amphiphilic vesicle coat (AV) binding protein [Lycopersicon esculentum]	4
2	DC10019	CC-01	1e-39	gi 55205 gb CA32091.1	spermine lyase (Males + domestic)	1
3	DC10010	CC-01	4e-40	gi 55205 gb CA32091.1	ubiquitin-like protein S27a fusion protein - white lupine	2
4	DC10009	CC-01	3e-39	gi 55205 gb CA32091.1	Protein glutathione S-transferase [Nicotiana glauca]	3
5	DC10004	CC-01	9e-38	gi 55205 gb CA32091.1	ribosomal CoA reductase (Arabidopsis thaliana subsp. stricta)	4
6	DC10012	CC-01	6e-38	gi 55205 gb CA32091.1	40S ribosomal protein L16 [Arabidopsis thaliana]	3
7	DC10001	CC-01	2e-38	gi 55205 gb CA32091.1	chaperonin [Arabidopsis thaliana]	2
8	DC10012	CC-01	1e-38	gi 55205 gb CA32091.1	pollen receptor protein [Arabidopsis thaliana]	2
9	DC10006	CC-01	5e-40	gi 55205 gb CA32091.1	acetylcholinesterase protein [Arabidopsis thaliana]	2
10	DC10002	CC-01	1e-38	gi 55205 gb CA32091.1	Dis-2 homolog [Sida glauca]	4
11	DC10016	CC-01	4e-40	gi 55205 gb CA32091.1	cell wall protein [Cucurbitur. pepurum]	1
12	DC10007	CC-01	3e-39	gi 55205 gb CA32091.1	ubiquitin-like protein S27a fusion protein - white lupine	2
13	DC10004	CC-01	3e-39	gi 55205 gb CA32091.1	p. commercial substrate 3' hydroxylase domain 1 [Oryza sativa]	17
14	DC10004	CC-01	2e-39	gi 55205 gb CA32091.1	α-disulfide isomerase [Arabidopsis thaliana]	4
15	DC10002	CC-01	2e-38	gi 55205 gb CA32091.1	oligomeric protein [C. rosea unshii]	2
16	DC10010	CC-01	4e-39	gi 55205 gb CA32091.1	calretinin [Arabidopsis thaliana]	3
17	DC10019	CC-01	3e-39	gi 55205 gb CA32091.1	ribosomal protein S20 [Nicotiana glauca]	17
18	DC10008	CC-01	4e-38	gi 55205 gb CA32091.1	Actin-depolymerizing factor 2	6

인삼의 Full length DB의 구축

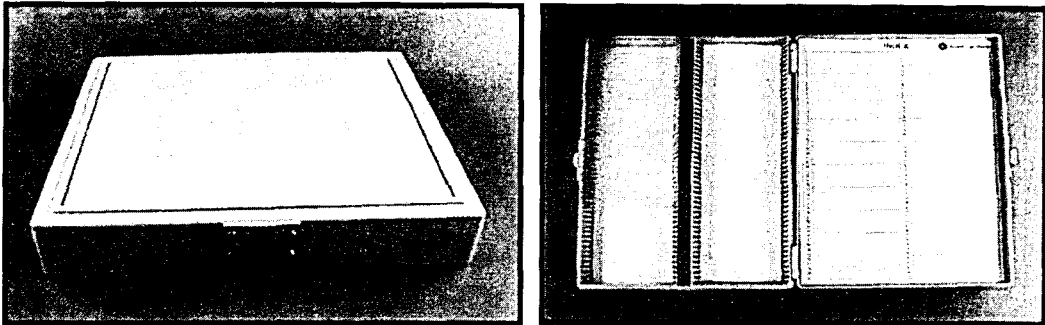
Fig. Fig. 6. Full length database building of EST clone contained with the entire open reading frame of amino acid residues in *Panax ginseng* ESTs.

Table 2. List of EST clones determined full length sequence by primer work.

Clone	DB	Acc. No.	Putative Identification
dc06001c10	TREMBL	AF079104_1	14-3-3 family protein
dc01005a10	trembl	AP000413_9	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase
dc04002e07	pir	S20510	3-isopropylmalate dehydrogenase precursor
dc06002c11	TREMBL	AF227626_1	40S ribosomal protein S11
dc06001a09	TREMBL	AF161704_1	40S ribosomal protein S17
dc05004a03	trembl	AB015477_14	40S ribosomal protein S3
dc06004d08	TREMBL	AF528526_1	40S ribosomal S4 protein
dc04001b08	trembl	AB013395_16	50S ribosomal protein L29
dc03001h07	trembl	AF183904_1	actin-depolymerizing factor 2
dc02005a04	trembl	AF083950_1	acyl carrier protein
dc06003g06	PIR	S14874	ADP,ATP carrier protein ACC
dc02002g02	pir	T52341	ADP-ribosylation factor
dc06001g04	TREMBL	AF363286_1	aluminium induced protein
dc02003g10	trembl	NTAQP1_1	aquaporin 1
dc05003c01	trembl	PTR306829_1	aux/IAA protein
dc05004a12	trembl	CAR012693_1	basic blue copper protein
dc04002a04	trembl	ATAB5244_15	beta tubulin
dc05005g01	pir	E86388	chaperonin
dc06004b05	PIR	S65597	chaperonin groES homolog

인삼 EST의 cDNA chip 제작

우선 유전자의 expression profile을 분석하기 위하여 우선 모상근 EST 중에서 parental clone 1,000개를 선발하였고 pBluescript vector 영역의 SK primer(5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3')와 KS primer(5'-CTA TGG CAG CTG GAG CT-3')로 PCR premix(Bioneer)를 사용하여 PCR 증폭을 하였다. 증폭된 산물은 spin column(Takara)을 사용하여 정제한 후에 유리 slide 글라스 위에 점적하여 cDNA chip을 제작하여 분석에 이용하였다(Fig. 7).



Chip 보관 상자

1K cDNA Chip

Fig. 7. cDNA chip construction using 1,000 parent clone of hairy root (DC01).

유용유전자 선발 및 형질전환벡터 제작은 인삼의 EST 분석을 통하여 분리된 EST clone 중에서 사포닌 생합성계가 속한 isoprenoid pathway 관련 유전전자와 환경내성관련이 있는 유전자를 선발하였다(Table 3). Table 1-20에서 보는 바와 같이 사포닌 생합성의 key enzyme 이라고 할 수 있는 squalene synthase는 모상근(DC01), 4년근 천풍(DC03), 잎(DC05)에서 각각 1개씩 발견되었고, squalene epoxidase의 경우에는 4년근 천풍뿌리, 꽃봉오리에서 각각 2개씩 그리고 잎에서 가장 많은 4개가 발견되었다. Beta Embryogenic callus(DC06)에서는 이들 유전자는 전혀 발견되지 않았으며, 14년근(DC02)의 경우에는 장기간에 걸쳐서 포장에서 재배된 것으로 오히려 사포닌의 함량이 높을 것으로 기대되었고 또한 그에 따라 유전자의 관련 유전자의 발현이 높을 것으로 기대되었으나 이들 두 유전자는 발견되지 않았다.

Table 3. Isoprenoid pathway related EST clones in in *Panax ginseng*

	DC01	DC02	DC03	DC04	DC05	DC06
Acetyl-CoA synthase	-	6	-	-	1	4
H M G R	2	2	1	-	-	-
GPP	-	-	-	2	1	-
F P P	-	1	2	3	-	-
Sesquiterpene synthase	-	4	-	-	-	-
Squalene synthase	1	-	1	-	1	-
Squalene epoxidase	-	-	2	2	4	-
Beta-Myrin Synthase	1	1	-	1	2	-

환경내성관련 유용유전자를 선발하여 각 library간을 비교하여 본 결과 특징적으로 14군에서는 catalase가 17개로 다른 library에서보다 많이 발견되는 것을 관찰할 수 있었는데 특히 4년근 천풍(DC03)에서는 catalase 유전자를 전혀 발견할 수 없었다(Table 4). 같은 뿌리 조직인 모상근과 4년근 천풍에서는 미토콘드리아에 주로 분포하는 Mn SOD가 전혀 관찰되지 않았는데 14년근에서는 3개가 발견되어 년근에 따른 유전자의 발현차이가 있음을 제시하고 있다.

Table 4. Environmental stress related EST clones in *Panax ginseng*

	DC01	DC02	DC03	DC04	DC05	DC06
Cu/Zn - SOD	1	1	8	2	4	1
Fe - SOD	-	-	-	-	1	1
Mn - SOD	-	3	-	2	1	1
Ascorbate peroxidase	5	8	9	5	6	4
Peroxidase	-	7	7	7	5	-
Catalase	1	17	-	3	2	1
GST	1	6	6	4	5	2
Metallothionein	2	5	36	15	7	8

유전자의 기능분석

식물 형질전환벡터에 도입하는 유전자로 isoprenoid pathway에 속하는 사포닌 생합성관련 유전자 HMGR, FPP, terpene synthase, squalene synthase, squalene epoxidase 등의 5종을 선발하였고, 환경내성관련 유전자로는 SOD(Cu/Zn, Mn), ascorbate peroxidase, peroxidase, catalase, glutathione synthase, metallothionein 등 7종 그리고 흥미있는 auxin repressed gene, auxin induced protein, cysteine synthase, aluminium induced protein, nucleotide diphosphate kinase 유전자 5종 등 총 17종의 인삼 유전자를 선발하였다. 이들 유전자는 각각 ORF 특이적인 primer를 제작한 후 각 유전자의 특성에 맞추어 PCR 반응을 통하여 증폭한 후 cartridge column(Takara)을 사용하여 정제한 후 pGEM T easy 벡터에 subcloning한 후 sequencing하여 염기서열을 확인하였다. 이들 유전자들은 35S double 프로모터와 AMV enhancer가 부착된 524XbaI vector에 subcloning한 후 형질전환벡터인 pRD400 벡터에 도입하여 형질전환벡터를 구축하였다(Fig. 8).

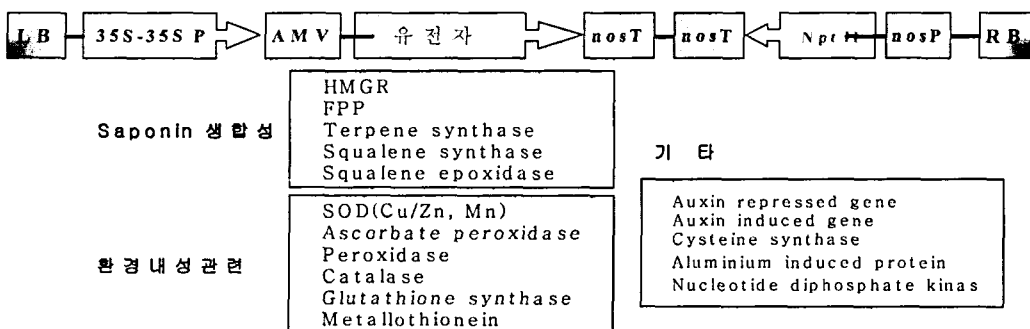


Fig. 8. Vector construction for function analysis through gene transformation into tobacco and ginseng plants.

인삼의 경우 재분화시키는데 최소 3개월이 소요되는데 비하여 모델 식물인 담배는 보통 1개월이면 재분화된 식물체를 볼 수가 있다. 본 연구팀은 우선적으로 인삼의 EST로부터 선발한 유전자들을 인삼에 도입하기 전에 담배에 도입하여 유전자의 발현분석을 하여 제작된 형질전환벡터의 이상유무를 확인하였다. 유전자가 도입된 아그로박테리움과 co-culture한 후 항생제(kanamycin)가 첨가된 재분화배지에 옮긴 후 보통 4주후에는 재분화가 되었다(Fig. 9-A). 이들 각각을 새로운 배지에 옮긴 후 샘플당 1개의 잎을 채취하여 DNA를 추출 한 후 도입된 유전자와 항생제 마커 primer를 이용하여 PCR반응시켜 유전자의 도입여부를 확인하였다(Fig. 9-B). 확인된 형질전환체들은 순차적으로 유전자의 발현분석을 실시하였고 일부는 토양에 순화시켜서 종자를 채취하여 후대검정을 통한 유전자의 발현분석을 지속적으로 수행할 것이다.

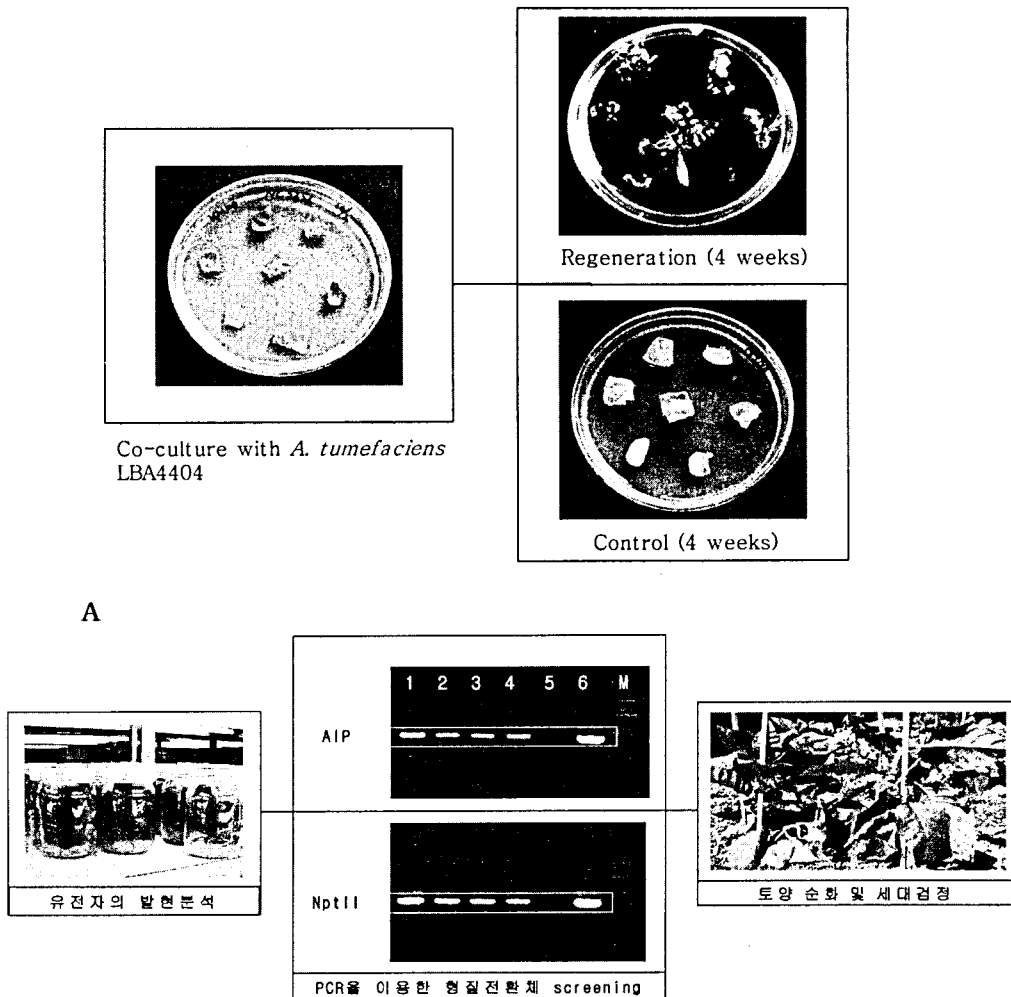


Fig. 9. Expression analysis of transgenic tobacco plant and soil transfer for seed collection. A : transformation into tobacco mediated *A. tumefaciens* LBA4404, B : gene expression analysis and soil transfer.

적 요

현재 재배되고 있는 고려인삼은 혼계상태로서 개체간의 형질변이가 대단히 심하며, 종자 채취를 4년 후에 하기 때문에 신품종육성을 위해서는 매우 오랜 기간이 필요하다. 그러나 식물형질전환기술의 발달로 목적하는 유전자를 식물체에 재도입하여 새로운 품종을 육성할 수 있는 기술이 보급되어 유용유전자만 있다면 단시간에 고기능성 신품종을 육성할 수 있을 것이다. 본 과제에서는 인삼의 유용유전자를 대량으로 발굴하기 위하여 인삼의 조직별, 중간 및 처리간에 의한 cDNA library 총 10종 이상을 제작하고 이들 cDNA library로부터 인삼의 유용유전자원을 확보하기 위하여 EST 20,000개를 5' 한쪽 방향에서 분석하고 이들 분석된 EST clone의 데이터는 data base화 하여 많은 연구자들이 연구정보를 공유할 수 있게 하였다. 그리고 EST clone 중에서 완전한 단백질의 유전정보를 포함하고 있는 clone을 100개 선발하여 전장의 염기서열(full length sequence)을 분석하고 data base를 구축하고 parental clone을 선발하여 cDNA chip을 제작하였다. 특히 EST clone 주에서 기능성 및 내재해성 유용유전자를 선발하여 전염기서열분석(full length sequencing)을 한 후 인삼에 재도입하여 고기능성 및 내재해성 인삼의 분자육종을 비교적 단시간내에 할 수 있는 형질전환 및 재분화 시스템을 개발하고 토양순화 시스템을 확립하고자 하였다.

참 고 문 헌

- Adams MD, Kelly JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Kerlavage AR, McCombine WR, Venter JC (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project.
- Chang WC, Hsing YI (1980) In vitro flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*). Nature 284:341-342
- Chen WP, Punja ZK (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of American ginseng with a rice chitinase gene. Plant Cell Reports 20: 1039-1045
- Choi YE, Yang DC, Park JC, Soh WY, Choi KT (1998) Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. Plant Cell Rep 17:544-551
- Choi YE, Yang DC, Yoon ES, Choi KT (1999) High efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from pre-plasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. Plant Cell Rep 18: 493-499
- Choi YE, Yang DC, Kusano T, Sano H (2001) Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation by plasmolyzing pretreatment of cotyledons in *Panax ginseng*. Plant Cell Reports 20: 616-621
- Covitz PA, Smith LS, Long SR (1998) Expressed sequence tags from a

- root-hair-enriched *Medicago truncatula* cDNA library. *Plant Physiol* 117: 1325-1332
- Datla RS, Hammerlindl JK, Pelcher LE, Crosby WL, Selvaraj G (1991) A bifunctional fusion between beta-glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene* 101: 239-246
- Datla RS, Bekkaoui F, Hammerlindl JK, Pilate G, Dunstan D, Crosby W (1993) Improved high-level constitutive foreign gene expression in plants using an AMV RNA4 untranslated leader sequence. *Plant Sci* 94: 139-149
- Fennell A, Hauptmann RM (1992) Electroporation and PEG delivery of DNA into maize microspores. *Plant Cell Rep* 11:567-570
- Hofte H, Desprez T, Amselem J, Chiapello H, Caboche M, Moisan A, Jourjon MF, Charpentreau JL, Berthomieu P, Guerrier D, Giraudat J, Quigley F, Thomas F, Yu DY, Mache R, Ryanal M, Cooke R, Grellet F, Delseny M, Parmentier Y, de Marcillac G, Gigot C, Fleck J, Philips G, Axelos M, Bardet C, Tremousaygue D, Lescure B (1993) An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by
- Inomata S, Yokoyama M, Gozu Y, Shimizu T, Yanagi M (1993) Growth pattern and ginsenoside production of *Agrobacterium*-transformed *Panax ginseng* roots. *Plant Cell Rep* 12:681-686
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- Kikuchi K, Niwa Y, Yamaguchi T, Sunohara H, Hirano HU, Umeda M (1998) A rapid and easy-handling procedure for isolation of DNA from rice, *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Biotechnol* 15:45-48
- Lee HS, Kim SW, Lee KW, Eriksson T, Liu JR (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of ginseng (*Panax ginseng*) and mitotic stability of the inserted beta-glucuronidase gene in regenerants from isolated protoplasts. *Plant Cell Rep* 14:545-549
- Lim CO, Kim HY, Kim MG, Lee SI, Chung WS, Park SH, Hwang IH, Cho MJ (1996) Expressed sequence tags of Chinese cabbage flower bud cDNA. *Plant Physiol* 111: 557-588
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol Plant* 15:473-497
- Shoyama Y, Kamura K, Nishioka I (1988) Somatic embryogenesis and clonal multiplication of *Panax ginseng*. *Planta Med* 54:155-156
- Uchimiya H, Kidou S, Shimazaki T, Takamatsu S, Hashimoto H, Nishi R, Aotsuka S, Matsubayashi Y, Kidou N, Umeda K, Kato A (1992) Random sequencing of cDNA libraries reveals a variety of expressed genes in cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J* 2:1005-1009
- Yamamoto K, Sasaki T (1997) Large-scale EST sequencing in rice. *Plant Mol Biol* 35: 135-144
- Yang DC, Choi YE (2000) Production of transgenic plants of *Panax ginseng* from *Agrobacterium*-transformed hairy roots. *Plant Cell Rep* 19:491-496
- Yoshikawa T, Furuya T (1987) Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* 6:449-453.