

## 인삼 모상근 유도를 위한 최적 조건

양덕춘, 김용해, 양덕조<sup>1)</sup>, 신성련<sup>2)</sup>, 최광태  
한국인삼연초연구원 유전생리부, <sup>1)</sup>충북대학교 생명과학부, <sup>2)</sup>중부대학교 원예학과

## The Optimum Conditions for Induction of Ginseng Hairy Roots

Deok-Chun Yang, Yong-Hae Kim, Deok-Cho Yang<sup>1)</sup>, Seong-Lyon Shin<sup>2)</sup> and Kwang-Tae Choi  
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345.

<sup>1)</sup>School of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763.

<sup>2)</sup>Department of Horticultural, College of Natural Sciences, Joongbu University, Kumsan, 312-940, Korea.

### ABSTRACT

The experiments were carried out to determine the optimum conditions for the induction of hairy roots in ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer) by *Agrobacterium* spp. We were examined the antibiotics resistance of *Agrobacterium* spp and various ginseng parts, and the media for induction of hairy roots. The optimum concentration of NaOCl for sterilization of ginseng root segments without tissue damage with reduce of contamination was 7% NaOCl for 15-20 min and 9% NaOCl for 5 min, respectively. The more ginseng ages, the more contamination of ginseng root segment by sterilized in 7% NaOCl for 20 min, and especially in ginseng root segments with epidermis in six-year old roots. The growth of *Agrobacterium* spp were inhibited, but ginseng root segments was death in 30mg/L tetracycline. In 500mg/L cefotaxime or 500mg/L carbenicillin, the growth of *Agrobacterium* spp were inhibited, and root segments was grown normally. The optimum conditions for induction of hairy roots were using the root segments of three-year old ginseng cultured in 1/2MS medium supplemented with 500mg/L cefotaxime, and inoculation of *Agrobacterium* to root segments were better co-culture than smear method. After 2 weeks co-culture, the callus induced in cambium of root segments cultured in 1/2MS solid medium with 500mg/L cefotaxime. And then after 2 weeks, ginseng hairy roots were induced in callus of root segments. PCR analysis of rol C gene fragment confirmed that hairy roots were transgenic tissues.

**Key words :** *Agrobacterium rhizogenes*, *Panax ginseng*, hairy roots, antibiotics resistance

### 서 언

최근 식물유전공학은 식물세포의 형질전환을 통한 유용 유전자의 도입, 생리활성물질 생산 분야가 활발하게 연구되고 있다. 이와같은 식물세포의 형질전환은 토양세균인 *Agrobacterium*의 특성이 조

사된 후, 연구의 진행속도가 가속을 더하게 되었다 (Lam, et al., 1984). *Agrobacterium*이 식물조직의 상처 부위에 감염되면 crown gall tumor(근두암종)나 hairy root(모상근)가 유도된다(Inze et al., 1984). 이것은 *Agrobacterium*이 가지고 있는 Ti, Ri-plasmid의 T-DNA상에 존재하는 식물생장 호르몬인 auxin과 cytokinin의 합성에 관여하는 유전자가 존재하여

다량의 식물호르몬을 합성할 수 있기 때문이며, crown gall tumor나 hairy root는 in vitro상태에서 식물호르몬 무첨가 배지에서도 계속 자랄 수 있게 된다(Chilton et al., 1982). *Agrobacterium*을 이용한 형질전환체로부터 유용한 이차 대사산물을 생산하기 위한 방안으로서 모상근의 배양을 통한 생리활성 물질의 대량생산을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Shimomura et al., 1991; Subroto et al., 1996). 본 연구진이 대상으로 삼고 있는 한국의 대표적인 자원식물인 인삼은 순수분리된 각 ginsenosides의 작용에 관한 연구가 진행되어 왔으며, 세포수준에서의 작용기전이 밝혀지면서 인삼의 약리학적 효능이 입증되고 있어(Chepurnov, 1994), 인삼의 유용 생리활성 물질의 대량생산이 중요하게 대두되고 있다. 하지만 인삼은 재배가 까다롭고, 장시간의 재배기간이 요구되며, 연작이 불가능하고 병충해 발생이 심하여 수요를 충족시키지 못하고 있는 실정이다(Yang et al., 1996). 따라서 인삼의 생리활성 물질을 대량 생산하고자 하는 방안으로 인삼모상근을 유도하여 인삼의 대표적인 생리활성 물질로 알려진 ginsenosides의 대량생산하고자 하는 연구가 진행되고 있다(Hwang et al., 1989; Yang et al., 1996; Yoshikawa and Furuya, 1987). 그러나 인삼으로부터 모상근의 유기는 매우 어려우며, 지금까지 인삼 모상근을 유기한 보문은 Yoshikawa와 Furuya(1987), Hwang 등(1989) 및 Yang 등(1996)의 그룹으로 한정되어 있을 정도이며, 이러한 결과도 재현성 있게 모상근이 유도되는 것을 보고하지 못하고 있다. 따라서 모상근의 대량배양을 위해서는 성장 및 생리활성 물질의 함량이 높은 우수한 세포주의 선발이 필수적이다. 우수한 세포주를 선발하기 위해서는 많은 모상근이 쉽게 유도가 되어야만 가능하다. 따라서 본 연구는 인삼 뿌리 절편으로부터 모상근 유도를 위한 최적 조건을 확립하기 위한 기초 실험을 수행하였던 바, 그 결과를 이에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 균주

식물재료는 1, 3, 6년생 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)을 공시하였으며, 모상근을 형성하기 위한 균주는 *Agrobacterium rhizogenes* 8196, 13257, 13264, 15834를 사용하였으며, 미국 ATCC에서 구입하였다(Shen et al., 1988). 또한 *A. rhizogenes* A4(Jouanin et al., 1987)는 전남대학교 황백교수로 부터 분양받았으며, *A. rhizogenes* R1000(Nicoll et al., 1995)은 캐나다 UBC에서 구입하였다.

### NaOCl 처리한 인삼 뿌리절편의 오염도

인삼 뿌리 절편을 멸균하기 위한 sodium hypochlorite (NaOCl)의 최적농도 및 처리 시간을 조사하기 위하여, NaOCl의 처리농도는 1, 3, 5, 7, 9%로 하였으며, 처리 시간은 5, 10, 15, 20, 25분으로 하여 조합처리한 후 1/2MS배지에서 3일간 암상태, 28°C에서 배양한 후, *Agrobacterium*의 증식 정도를 조사하였다. 인삼 년근별 및 뿌리 부위별 오염정도를 측정하기 위하여 cambium, cambium+pith, cambium + pith + epidermis 부분으로 나누어 7% NaOCl에서 20분간 멸균하여, 위와 동일한 조건에서 배양한 후 절편의 오염 정도를 측정하였다.

### *Agrobacterium spp*의 생육에 대한 각종 항생제의 효과

항생제는 cefataxime, carbenicillin, kanamycin, tetracycline을 사용하였고, 처리농도는 cefotaxime과 carbenicillin은 25, 50, 100, 250, 500 mg/L로 하였으며, kanamycin은 15, 30, 45, 60, 75mg/L 그리고 tetracycline은 5, 10, 20, 30, 40mg/L로 하였다. 항생제는 membrane filter를 통과시켜 멸균한 후 autoclave된 2YT배지(16g tryptone, 10g yeast extract, 5g NaCl, 1L H<sub>2</sub>O, pH 7.0)가 약 55°C정도 되었을때 첨가하여 3일 동안 28°C의 암상태에서 배양한 후 colony 형성 여부를 조사하였다.

### 인삼 각 부위 절편의 생육에 대한 각종 항생제의 영향

1/2MS배지를 121° C(15 PSI)에서 15분간 멸균한 후 약 55° C정도 식었을 때 filtration된 항생제(500mg/L cefotaxime, 500mg/L carbenicillin, 100mg/L cefotaxime+30mg/L kanamycin, 100mg/L cefotaxime+10mg/L tetracycline, 250mg/L carbenicillin+30mg/L kanamycin, 250mg/L carbenicillin+10mg/L tetracycline, 75mg/L kanamycin, 40mg/L tetracycline)을 첨가하여 흔들여 준 후, 신속히 Petri dish에 분주하였다. 3년생 인삼의 뿌리는 7% NaOCl 용액에서 20분, 줄기는 2%에서 15분, 그리고 종자는 5%에서 20분 각각 표면 살균한 후, 멸균 증류수로 3회 세척하여 항생제가 첨가된 1/2MS 배지에서 2주 배양한 후 생력을 측정하였다.

### 모상근 유도배지에서 *Agrobacterium spp* 및 인삼 뿌리 절편의 반응

Cefotaxime이 500mg/L 첨가된 여러 모상근 유도배지에서 인삼절편의 생력을 조사하기 위하여, *Agrobacterium*과 인삼 뿌리 절편을 동시배양한 후 1/2MS 및 1/4MS 배지(0.8% agar, 3% sucrose), 그리고 1/2MS(0.8% agar, 3% sucrose) 배지와 water agar(0.8% agar, 3% sucrose) 배지위에 인삼 절편을 치상한 후, *Agrobacterium*을 인삼절편위에 도말하여 2주간 암상태, 25° C에서 배양하여 *Agrobacterium*의 증식과 인삼절편의 생력을 측정하였다.

### 모상근 유기

인삼 뿌리로부터 모상근 유도를 위한 disc를 만들기 위하여 70% ethanol에 10분간 침적하고 7% NaOCl 용액에서 20분간 표면 살균한 후 멸균 증류수로 3회 세척하여 멸균하였다. *A. rhizogenes* R1000를 2YT배지에서 2일간 현탁배양한 후 600nm에서 optical density가 0.8(cell density 109/mL)로 조절하여, 2시간 동안 clean bench에서 건조시킨 인삼 뿌리 절편과 24시간 동시배양하였다. 뿌리 절편은 멸균된 filter paper에서 1시간 건조시킨 후 cefotaxime이 500mg/L 첨가된 1/2MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지(3% sucrose, 0.8% agar)에 치상하여 배양하였

다. 배양4주 후 뿌리 절편으로부터 유기되는 모상근 근단을 절단하여 carbenicillin이 250mg/L 첨가된 1/2MS배지에서 모상근에 남아 있는 균을 완전히 제거하였다.

### 형질전환체 확인

유도된 인삼 모상근으로 부터 형질전환시 사용된 *A. rhizogenes* R1000의 T-DNA상에 있는 *rol C* 유전자(540 bp)의 존재여부를 확인하기 위하여 PCR (Thermal cycler, Perkin Elmer Cetus)를 사용하였다. 모상근으로 부터 DNA의 추출은 Edwards 등(1991)의 방법에 준하였으며, Taq polymerase, dNPT, MgCl<sub>2</sub>, buffer, dye등이 혼합되어 있는 Premix(Bioneer, Korea)에 추출한 DNA 50ng, primer 20pmol을 첨가하여 총량을 20μl로 하였다. PCR을 위한 반응 조건은 Yang 등(1998)의 방법에 준하였으며, PCR 반응시 사용한 primer는 *rol C* 유전자의 증폭을 위하여 Oono등(1993)이 사용한 5' -ATGGCTGAAGACG-ACCTGTT-3', 5' -TTAGCCGATTG-CAAACCTTGCAC-3' 등 각각 22mer를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### NaOCl 처리한 인삼 뿌리 절편의 오염도

인삼 뿌리를 멸균하기 위하여 NaOCl의 최적농도 및 멸균시간을 조사하기 위하여 농도와 처리시간을 조합처리한 결과는 Table 1 과 같다. 3% NaOCl 농도로 25분간 처리하여 3일 간 암배양하였을 때, 오염 정도가 매우 높았으며, 인삼 절편의 가장자리만 탈색되었을 뿐, NaOCl에 의한 조직 손상은 일어나지 않았다. 5% NaOCl에서 5분간 처리시에도 3% NaOCl에서 25분간 처리시와 오염 정도가 유사하였으나 10분에서 20분까지 다소 오염 정도가 감소하긴 하였지만 높은 수준이었고, 조직의 손상은 가장자리가 탈색되었을 뿐 큰 손상은 일어나지 않았다. 7% NaOCl, 15-20분 처리시 부터 균의 오염 정도가 현저히 감소하였지만 조직 약간의 손상이 나타나기 시작하였고 모상근을 유기하기 위한 절편으로 사용하기 어려운 정도는 아니었다. 7% NaOCl, 25

**Table 1.** Contamination rate of ginseng root explants after sterilization with various concentration of NaOCl. Root explants were cultured on 1/2 MS medium at 28° C for 2 weeks on dark condition.

Time(min.) NaOCl(%)	5	10	15	20	25
1	+++	+++	+++	+++	+++
3	+++	+++	+++	+++	+++
5	+++	++	++	++	+
7	++	++	+	+	-
9	+	-	-	-	-

+++ : very high and explants was normal,  
 ++ : high and explants was normal,  
 + : low and explants was small damage,  
 - : none and explants was death.

분, 9% NaOCl, 10분부터 오염이 전혀 일어나지 않았지만 인삼 조직이 죽었다. 이와같이 인삼 뿌리 절편은 높은 농도의 NaOCl로 멸균시에도 오염이 심하게 나타나므로 멸균을 위한 NaOCl의 농도 및 처리시간이 매우 중요하다. 일반적으로 사용되는 NaOCl의 농도 및 처리시간은 식물체에 따라서 차이는 있지만 대체로 0.5-2 %에서 10-20 분간 멸균하는 것을 감안할 때(Nin, et al., 1997), 인삼은 매우 높은 NaOCl로 장시간 멸균하여야만 한다. 하지만 장시간 처리시에는 균의 오염 정도는 감소하지만 조직의 손상이 매우 심하여 시료로서 사용할 수 없는 상태가 되기 때문에 많은 문제점을 가지고 있다. 따라서 3년생 인삼 뿌리 절편으로 부터 모상근을 유기하기 위한 NaOCl의 살균은 7% NaOCl, 15-20분 혹은 9% NaOCl, 5분 정도가 적절할 것으로 사료된다.

### 인삼 년근 및 부위별 오염정도

7% NaOCl에서 20분간 인삼 뿌리 절편을 살균하여도 완전히 균이 제거되지 않아 cambium, cambium+pith, cambium+pith+ epidermis 부분으로 나누어 1/2MS배지에서 배양한 후 오염 정도를 측정 한 결과는 Table 2와 같다. 인삼 년근에 따른 오염 정도를 비교할 때 년수가 증가할 수록 오염정도가 증가하는 경향을 나타내었다. 인삼 뿌리 표피

를 제거하지 않은 상태에서 NaOCl로 표면 살균한 후 배지에 치상하였을 경우 1년근의 오염도는 24.5%, 3년근은 33.3% 였으며, 6년근은 49.5%로 치상한 절편의 절반 정도가 오염된 결과를 나타내었다. 멸균 후 표피를 제거한 후 배지에 치상하였을 경우에는 오염도가 현저히 감소하였지만 6년근 처리구에서는 15.2%로 1, 3년근에 비하여 높은 정도였다. 따라서 모상근 유기를 위한 인삼 뿌리 절편으로는 년수가 낮은 것이 바람직할 것으로 사료되나, 1년생 묘삼의 경우 표면 살균에 의한 표피의 손상 부위를 제외하고 나면 남아 있는 조직이 얼마되지 않아 시료로는 적절하지가 못하다고 생각된다. 인삼의 생리활성 물질인 사포닌의 생성이 3년근 부터 함량이 증가하는 것을 감안할 때 모상근 유기를 위한 재료로 3년근 인삼을 7% NaOCl로 20분간 멸균한 후 표피를 제거하여 사용하는 것이 가장 적절할 것으로 판단된다.

**Table 2.** Contamination rate according to parts and ages of ginseng after sterilization with 7% NaOCl for 20min. Root explants were cultured on 1/2 MS medium at 28° C for 2 weeks on dark condition.

Parts Ages(years)	(unit:%)		
	Cambium	Cambium <sup>+</sup> Cambium+Pith	Pith + Epidermis
1	-	3.0	24.5
3	11.1	3.4	33.3
6	16.5	15.2	49.2

- : no treatment

### Agrobacterium spp의 생육에 대한 각종 항생제의 효과

인삼 뿌리 절편 으로 부터 모상근을 유기하기 위해서는 Ri-plasmid를 지니고 있는 Agrobacterium의 T-DNA를 식물체로 전이하기 위해서 절편위에 균을 발라 주던가 아니면 균과 일정기간 공동배양한 후 항생제 배지에서 균 제거를 통한 모상근 유도가 일반적인 방법이다. 따라서 조직내에 부착되어 있거나 세포간극에 존재하는 Agrobacterium을 제거하기 위한 항생제의 종류와 농도를 달리하여

**Table 3.** Minimum inhibitory concentration of *Agrobacterium rhizogenes* strains on the media with various concentration of antibiotics.

Antibiotics(mg/L)	Strains					
	8196	13257	13264	15834	R1000	A <sub>4</sub>
<b>Cefotaxime</b>						
25	+++	+++	+++	+++	+++	+++
50	++	++	++	++	++	++
100	-	+	+	-	+	-
250	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-
<b>Carbenicillin</b>						
25	+++	+++	+++	+++	+++	+++
50	++	+++	++	++	+++	++
100	+	++	+	+	++	+
250	-	+	+	-	+	-
500	-	-	-	-	-	-
<b>Kanamycin</b>						
15	++	+++	++	++	+++	++
30	+	++	+	+	++	+
45	-	+	-	-	+	-
60	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-
<b>Tetracycline</b>						
5	++	+++	++	+++	+++	++
10	+	++	+	++	++	+
20	-	+	-	+	+	-
30	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-

*Agrobacterium rhizogenes* strains were cultured in 2YT medium at 28°C for 3 days on dark condition. Growth of *Agrobacterium* spp : +++; well growth, ++; good growth, +; slight growth, -; negative growth.

*Agrobacterium*을 배양하여 그 생육정도를 조사하였던 바, Table 3과 같다. 실험에 사용한 항생제중 tetracycline이 30mg/L 농도에서 kanamycin은 75mg/L에서 균의 생육을 완전히 억제하였으며, cefotaxime은 250mg/L, carbenicillin은 500mg/L에서 균의 성장을 억제하는 농도로 확인되었다. Liao 등(1978)은 carrot root disk에서 *A. tumefaciens*를 죽이기 위해 kanamycin의 농도를 30mg/L를 사용하여 효과를 얻

었으며, Bryan 등(1982)은 70mg/L의 고농도를 사용하였다. 이러한 결과는 본 실험에서와 유사한 결과이다. 그러나 tetracycline과 kanamycin은 식물조직과 미생물 공히 죽일수 있는 항생제이며, cefotaxime과 carbenicillin은 미생물은 모두 죽일수 있으나 식물의 성장에는 영향을 크게 미치지 않은점을 감안할 때, cefotaxime이나 carbenicillin을 사용하는 것이 바람직하지만 tetracycline과 kanamycin에 비해 월등히 가격이 고가이기 때문에 식물세포의 성장에는 영향이 없이 이 두 종류의 항생제를 조합해서 사용하는 것이 바람직할것으로 사료된다. 또한 *Agrobacterium* strains 8196, 15834, A<sub>4</sub> 균주는 조사된 다른 균주에 비하여 다소 낮은 항생제 농도에서 균의 성장이 억제되는 경향을 나타내어 *A. rhizogenes*의 strains에 따라 차이를 나타내었다. 이러한 결과에서 조사된 항생제의 균의 성장억제 농도에서 인삼 뿌리 절편의 생육억제 효과를 보이지 않는다면, 인삼 모상근 유도에서 균제거 항생제 및 농도로 사용 가능할 것으로 사료된다.

#### 인삼의 절편 생육에 미치는 항생제의 영향

앞의 실험에서 확인된 각 항생제에 대한 *Agrobacterium*의 성장억제 농도가 인삼의 각 부위 절편에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같다. *Agrobacterium*의 성장에 낮은 농도로 효과적이었던 항생제인 tetracycline(30mg/L), kanamycin(75mg/L)은 인삼의 뿌리, 줄기의 성장을 크게 억제하였으며, 접합자 배의 성장을 완전히 억제하여 조직이 죽었다. 반면 cefotaxime (500mg/L), carbenicillin(500mg/L)은 *Agrobacterium*의 성장 억제 농도보다 높은 농도에서도 인삼 뿌리 절편의 성장에 아무런 영향을 미치지 않았다. 항생제의 낮은 농도로 복합처리시에도 cefotaxime(500mg/L), carbenicillin(500mg/L)의 단독처리와 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 접합자 배의 성장은 다소 억제하는 경향을 나타내 접합자 배를 이용한 인삼 모상근 유도를 위해서 보다 낮은 농도로 사용함을 시사하는 결과로 생각된다. 본 실험과 같이 모상근 유도를 위하여 항생제에 대한 식물체의 반응을 조사한 연구는 거의

**Table 4.** Vitality of ginseng explants infected by *A. rhizogenes* R1000 on the media with various antibiotics.

Antibiotics	Ginseng parts			
	Roots	Stem	Embryo	R1000
Cefotaxime(500mg/L)	+++	+++	+++	-
Carbenicillin(500mg/L)	+++	+++	+++	-
Cefotaxime(100mg/L) <sup>+</sup>	+++	+++	+++	-
Kanamycin(30mg/L)				
Cefotaxime(100mg/L) <sup>+</sup>	+++	+++	+++	-
Tetracycline(10mg/L)				
Carbenicillin(250mg/L)	+++	+++	++	-
Kanamycin(30mg/L)				
Carbenicillin(250mg/L) <sup>+</sup>	+++	+++	++	-
Tetracycline(10mg/L)				
Kanamycin(75mg/L)	+	+	-	-
Tetracycline(30mg/L)	+	+	-	-

+++ ; very high, ++ ; high, + ; low, - ; death.

없는 실정이며, 다만 항생제 내성 세포주를 선발하기 위하여 고농도의 항생제를 처리한 실험 결과가 있고(Menzel et al., 1983), Choi 와 Yang(1987)이 연초 crown gall tumor 조직의 생육에 미치는 항생제의 영향을 조사한 바 있다. 이들의 실험에서는

strepto-mycin 및 kanamycin에 국한되어 있다. 따라서 본 실험에서와 같이 여러 항생제의 각각의 농도에서 *Agroba-cterium* 및 모상근을 유도하고자 하는 식물체의 부위별 생육정도를 조사함으로써 모상근 유기를 위한 항생제 및 적절한 농도를 조사할 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 결과에서 인삼 3년근 뿌리로부터 모상근 유기에 사용되는 항생제 및 그의 농도는 cefotaxime 및 carbenicillin으로 효율적인 농도는 250-500mg/L 범위가 적절할 것으로 판단되며, 혼용으로 처리시 100mg/L cefotaxime 및 250mg/L carbenicillin 과 10mg/L tetracycline 및 30mg/L kanamycin의 복합처리도 가능할것으로 판단된다.

#### 모상근 유도 배지에서 *Agrobacterium spp.* 및 인삼 뿌리 절편의 반응

*Agrobacterium rhizogenes*를 이용한 인삼 뿌리 절편으로 부터 모상근의 유기를 위한 최적배지를 선발하기 위한 실험결과는 Table 5와 같다. 배지는 크게 1/2MS(Murashige and Skoog, 1962), 1/4MS 및 0.8% water agar배지에 3% sucrose와 500mg/L cefotaxime을 첨가한 배지를 사용하였으며, 인삼 뿌리 절편에 균의 접종은 현탁배양과 절편위에 도말하는 두가

**Table 5.** Contamination rate and vitality of ginseng root explants infected by *A. rhizogenes* strains on various medium.

<i>A. rhizogenes</i> strains		8196	13257	13264	15834	R1000	A <sub>4</sub>
Media Response							
1/2 MS(L)	Contamination rate(%)	0	0	12.5	0	0	0
	Vitality	++	++	++	++	+++	+++
1/4 MS(L)	Contamination rate(%)	13.6	0	38.5	25.8	25	13.2
	Vitality	+	+	-	++	++	++
WA(S)	Contamination rate(%)	0	0	0	6.4	0	13.7
	Vitality	-	-	+	-	+	+
1/2MS(S)	Contamination rate(%)	10	11.1	5.0	2.5	0	2.1
	Vitality	+	+	-	-	+	++

1/2MS(L) : liquid co-culture, 0.8% agar+3% sucrose+500 mg/L cefotaxime

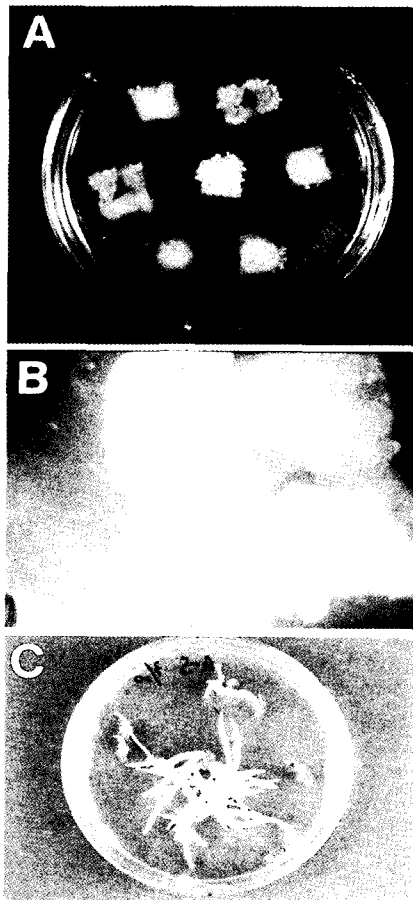
1/4MS(L) : liquid co-culture, 0.8% agar+3% sucrose+500 mg/L cefotaxime

WA(S) : solid co-culture, 0.8% agar+3% sucrose+500 mg/L cefotaxime

1/2MS(S) : solid co-culture, 0.8% agar+3% sucrose+500 mg/L cefotaxime

Vitality of root explants : +++ ; very high, ++ ; high, + ; low, - ; death.

지 방법을 사용하였는데, 균을 직접 인삼 절편위에 발라준 것 보다는 *Agrobacterium*과 공동 배양한 후 항생제 배지에서 배양할 때가 절편의 생력이 가장 좋은 것으로 나타났다. 특히 1/2MS 배지에서 *Agrobacterium*과 절편을 공동 배양한 후 뿌리 절편 배양할 때가 가장 좋은 절편의 생력을 유지하였다. *A. rhizogenes* strains의 종류에 따른 인삼 절편의 생력이 양호한 처리구는 *A. rhizogenes* R1000 및 A<sub>4</sub> 처리구가 제일 양호한 인삼 뿌리 절편의 생력을 유지하였다. 따라서 인삼 뿌리 절편으로부터 모상근 유기를 위한 배지는 1/2MS배지에 500mg/L의

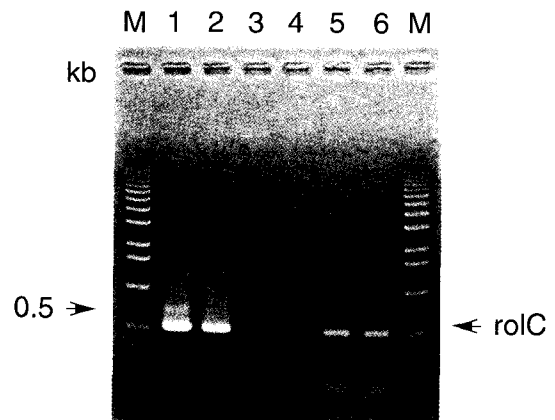


**Fig. 1.** Hairy roots induced from root explants by *Agrobacterium rhizogenes* R1000 in *Panax ginseng* C.A. Meyer. A; Root explants after 2 weeks culture, B; Hairy roots after 4 weeks culture, C; Hairy roots cultured in hormone-free 1/2MS solid medium(3% sucrose) for 3 weeks on dark condition.

cefotaxime이 첨가된 배지가 적절 하며, 균주로는 *A. rhizogenes* R1000 및 A<sub>4</sub>가 가장 좋은 균주일 것으로 판단 된다.

### 모상근 유기

앞의 실험 결과를 종합한 방법(재료 및 방법 참조)으로 *A. rhizogenes* R1000에 의하여 3년근 인삼의 뿌리 절편으로부터 유기된 인삼 모상근은 Fig. 1과 같다. Fig 1-A는 균과 인삼 뿌리 절편을 24시간 공동 배양한 후 500mg/L cefotaxime이 첨가된 1/2MS에치상하여 2주 배양한 모습이며, 인삼 뿌리 절편의 cambium부위에서 callus가 형성되는 것을 육안으로 식별이 가능하였다. 인삼 뿌리 절편으로부터 모상근 유기는 먼저 callus가 유기된 후, 약 1주 지나면 root tip이 발달하기 시작하였다. 그후 1주가 지나면 뿌리 형태가 뚜렷한 모상근이 분화되었으며(Fig. 1-B), 분화된 모상근을 1/2MS배지에 치상하였을 때, 모상근의 특성인 굴지성이 상실한 뿌리가 왕성한 성장을 보였다(Fig. 1-C). 일반적으로 당근 뿌리 절편에서 *Agrobacterium rhizogenes* A<sub>4</sub>에 의하여 11-13일 만에 모상근이 유도되었고(Hwang, et al., 1986), 독말풀에서 *A. tumefaciens* A<sub>4</sub>T에 의하여 7-10일 사이에 모상근이 유도됨(Yang et al., 1997)을 감안할 때, 인삼 뿌리 절편으로부터



**Fig. 2.** PCR products of rol C(540 bp) from *Agrobacterium*, normal and hairy root of *Panax ginseng* C.A. Meyer. M: Marker, Lane 1-2: *A. rhizogenes* R1000, Lane 3-4: normal roots, 5-6; hairy roots.

모상근의 유도는 오랜 시간이 소요되는 특성을 나타내었다.

### 형질전환체 확인

유도된 인삼 모상근을 250mg/L carbenicillin에서 남아 있는 균을 완전히 제거한 후, 식물호르몬 무첨가 배지에서 성장하여 모상근의 특성을 나타내었지만, 확실한 형질전환체인지 확인하고자 유전된 인삼 모상근에서 rol C 유전자가 존재하는지 확인한 결과(Fig. 2)와 형질전환되지 않은 인삼 뿌리에서는 rol C가 유전자가 없는 반면, 모상근에서는 rol C가 확인된 것으로 보아 *Agrobacterium*에 의한 형질전환체임을 확인하였다.

### 적 요

인삼 뿌리 절편으로 부터 모상근 유기를 위한 최적 조건을 확립하고자 *Agrobacterium rhizogenes* 와 인삼 뿌리 절편의 항생제 내성 조사 및 최적의 모상근 유도 배지를 조사하기 위하여 수행하였다. NaOCl로 인삼 뿌리를 멸균하였을 때, 오염 정도가 감소하면서 조직의 손상이 일어나지 않는 NaOCl의 농도는 7% NaOCl에서 15-20분, 9% NaOCl에서 5분으로 나타났다. 인삼근은 년수가 증가할수록 오염 정도가 심하였으며, 특히 6년근중 표피가 있는 처리구는 오염 정도가 매우 높았다. *Agrobacterium*의 성장억제를 위한 항생제는 tetracycline이 가장 효과적이었으며, 30mg/L 이상의 농도에서 균의 성장이 억제되었다. 하지만 30mg/L tetracycline에서 인삼 조직이 고사하였으며, cefotaxime(500mg/L), carbenicillin(500mg/L)에서 균의 성장을 완전히 억제하였으며, 조직의 손상이 일어나지 않았다. 3년근 인삼에서 모상근 유도를 위한 배지로는 1/2MS 배지에 500mg/L의 cefotaxime이 첨가된 배지가 가장 좋았으며, 인삼 뿌리 절편에 *Agrobacterium*을 발라주는 것 보다는 균과 공동배양할때가 절편이 좋았다. *Agrobacterium* 접종 2주 후부터 callus가 유기되기 시작한 후, 다시 2주 후에 모상근이 유도되었다. 유도된 hairy roots는 PCR에 의하여 rol C 유전자를 조사함으로써 형질전환체임을 확인하였다.

### 인용문헌

- Bryan, J., Saeed, N., Fox, D., Sastry, G.R.X. 1982. R68.45 mediated chromosomal gene transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Arch. Microbiol. 131: 271-277.
- Chepurnov, S.A., Chepurnova N.E., Park, J.K., Buzinova, E.V., Lubimov, I.I., Kabanova, N.P., Nam, K.Y. 1994. The central effects of saponin components and polysaccharides fraction from Korean red ginseng. Korean J. Ginseng Sci. 18(3): 165-174.
- Chilton, M.D., Tepfer, D.A., Petit, A., Tempe, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. Nature(Lond) 295: 432-434.
- Choi, K.T., Yang, D.C. 1987. Effects of antibiotics and brilliant green on the growth of *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor tissue of tobacco. Lorean J. Plant Tissue Culture. 14(2): 131-136.
- Edwards, K.C., Johnson, C., Yhompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res 19: 1349.
- Hwang, B., Cho, D.Y., Hong, S.S. 1986. Physiological studies on the formation of hairy root by the *Agrobacterium rhizogenes* : I. Relationships between IAA content and morphological characteristics in carrot infected by *A. rhizogenes*. Korean J. Bot. 29(4): 275-283.
- Hwang, B., Ko, K.M. 1989. Induction and culture of hairy roots from ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer) roots discs by *A. rhizogenes*. Kor J Biotechnol Bioeng 4: 288-292.
- Inze, D., Lijsebettens, M.V., Simoens, C., Genebello, C., Montagu, M.V., Schell, J. 1984. Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens* : further evidence that two genes are involved in indol-3-acetic acid synthesis. Mol Gen Genet 194: 265-274.
- Jouanin, L., Vilaine, F., Tourneur, J., Tourneur, C., Pautot, V., Muller, J.F., Caboche, M. 1987. Transfer of a 4.3-kb fragment of the TL-DNA of *Agrobacterium*



- rhizogenes* strain A<sub>4</sub> confers the pRi transformed phenotype to regenerated tobacco plants. *Plant Sci* 53(1): 53-63.
- Lam, S., Lam, B., Harrison, L., Stobel, G. 1984. Genetic information on the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* determines host specificity. *Plant Sci. Letters* 34: 345-352.
- Liao, C.H., Heberlein, G.H. 1978. A method for the transfer of tumorigenicity between strains of *Agrobacterium tumefaciens* in carrot root disks. *Phytopathology* 68: 135-137.
- Menzel, L., Nagy, F., Lazar, G., Maliga, P. 1983. Transfer of cytoplasmic male sterility by selection for streptomycin resistance after protoplast fusion in *Nicotiana*. *Mol. Gen. Genet.* 189: 365-369.
- Nicoll, S.M., Brigham, L.A., Wen, F., Hawes, M.C. 1995. Expression of transferred genes during hairy root development in pea. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 57-66.
- Nin, S., Bennici, A., Roselli, G., Mariotti, D., Schiff, S., Magherini, R. 1997. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. (worm-wood) and production of secondary metabolites. *Plant Cell Reports* 16: 725-730.
- Oono, Y., Suzuki, T., Toki, S., Uchimiya, H. 1993. Effects of the over-expression of the *rol C* gene on leaf development in transgenic periclinal chimeric plants. *Plant Cell Physiol.* 34(5): 745-752.
- Shen, W.H., Petit, A., Guern, J., Tempe, J. 1988. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(10): 3417-3421.
- Shimomura, K., Sudo, H., Saga, H., Kamada, H. 1991. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep* 10: 282-285.
- Subroto, M.A., Kwok, K.H., Hamill, J.D., Doran, P.M. 1996. Coculture of genetically transformed roots shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites. *Biotechnol Bioeng.* 49(5): 481-494.
- Yang, D.C., Choi, H.Y., Kim, Y.H., Yun, K.Y., Yang, D.C. 1996. Growth and ginsenosides production of hairy root (*Panax ginseng* C.A. Meyer) via light energy. *Korean J. Ginseng Sci.* 20(3): 318-324.
- Yang, D.C., Kang, H.M., Lee, K.S., Kim, Y.H., Yang, D.C. 1997. Effects of pH, sucrose and vitamins on the growth and tropane alkaloid production of hairy roots of *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. *Korean J. Plant Tissue culture.* 24(3): 143-148.
- Yang, D.C., Park, T.E., Yoon E.S., Min, B.H., Chung, H.J. 1998. Growth characteristics of transgenic potato using wild-type *Agrobacterium* spp. *Korean J. Plant Res.* 11(2): 179-187.
- Yoshikawa, T., Furuya, T. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* 6: 449-453.
- (접수일:1998.12.3)  
(수리일:1999. 3.5)