

제초제 저항성 유전자에 의한 인삼의 형질전환

양계진*

중부대학교 생명자원학부

Genetic Transformation of *Panax ginseng* with Herbicide Resistant Gene

YANG, Kye-Jin*

College of life Science, Joongbu University, Kumsan, 312-800, Korea

ABSTRACT Transformation of ginseng plants was achieved by biolistic system with cotyledon explants and callus using phosphinothricin acetyl-transferase (PAT) gene resisting to a herbicide of Bialaphos. The binary vector for transformation was constructed with disarmed Ti-plasmid and with double 35S promoter. The introduced NPT II and PAT genes of the transgenic ginseng plants were successfully identified by the PCR, and the survival test on the medium with basta. The transgenic ginseng plants were propagated using repetitive secondary embryogenesis. The transgenic ginseng plantlets had normal structures of roots and shoots, and dormant buds for new year sprouting. We transferred the transgenic plants to greenhouse and observed the continuing growth until a new year.

Key words: Biolistic system, Bialaphos, PAT, secondary embryogenesis

서 론

한국인삼은 일복을 설치해 주어야 하고, 윤작이 불가능하며, 근부병 등의 피해가 커서 재배가 까다로운 작물로 알려져 있으며, 품종개량이 전혀 이루어지지 않은 채 수백년 동안 재래종만을 사용하여 왔다. 그 원인은 종자를 맺는 기간이 최소 3년 이상으로 육종기간이 길며, 다양한 형질을 지닌 야생산삼을 구할 수 없어 고전적인 교배육종이 이루어지지 못한 원인으로 해석할 수 있다. 따라서 최근에 활발히 연구되고 있는 유용 유전자 도입방법을 이용하는 것이 인삼에 있어서는 획기적인 육종 방법이 될 수 있다 (Abel et al. 1987; An 1987). 유전자 도입을 이용한 새로운 형질전환 인삼 식물체의 개발에 있어서 기본적으로 재분화 시스템의 완성이 선행되어야 한다. 일반적으로 인삼은 기내에서 식물체 재분화 과정이 매우 까다로운 것으로 알려져 있으나 (Butenco et al. 1968; Chang et al. 1980), 최근 식물호르몬 무첨가 배지에서 인삼 단일배를 유도하여 성공적으로 토양에서 순화시킨 바 있으며

(Choi et al. 1996), 또한 인삼을 재료로 한 형질전환 연구로서도 표지 유전자로서 GUS 유전자가 도입된 형질전환 인삼을 개발한 바 있었지만 (Lee et al. 1995), 유용유전자의 도입을 통한 형질개량은 전혀 이루어지지 않았다.

본 연구에서 사용한 유전자는 비선택성 제초제인 bialaphos (DeBlock et al. 1987)에 대한 내성을 갖게 하는 PAT (phosphinothricin acetyl-transferase) 유전자이다. 본 유전자는 bialaphos에 강력한 비선택성 제초제로서 L-phosphinothricin이 주성분이며, glutamine synthetase (GS) 효소의 활성을 억제시키는 역할을 하는데, GS는 L-glutamic acid와 ammonium을 결합시켜 L-glutamine으로 변환시키는 작용을 하는 바, 조직 내에 생성된 암모니아를 분해시켜 식물체의 독성을 감소시킨다. 그러나 L-phosphinothricin에 의해서 glutamine synthetase 효소의 활성이 억제되면 암모니아가 축적되어 식물체가 죽게 되는 제초효과를 나타나게 된다 (DeBlock et al. 1987). 인삼의 경우 연간 약 3~4회의 제초작업을 해야 하므로 bialaphos에 내성을 나타내는 인삼을 개발한다면 제초에 들어가는 노력과 경비가 크게 절약될 것으로 생각된다.

본 실험은 한국인삼의 새로운 품종을 개발하기 위해서 제초제 저항성 유전자인 phosphinothricin acetyl-transferase

*Corresponding author. Tel 041-710-6721
E-mail kjyang@joongbu.ac.kr

(PAT) gene를 인삼에 도입하여 비선택성 제초제인 bialaphos에 내성을 나타내는 인삼을 개발코자 수행하였던 바, 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물재료 및 균주

수확 직후 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 종자를 모래에 약 3달간 증적처리하여 개갑시킨 후, 다시 4°C의 냉장고에 옮겨 저온처리하여 휴면 타파시켰다. 인삼접합자배의 장축이 약 6 mm 정도 되었을 때 사용하였으며, callus는 2,4-D 2 mg/L 첨가된 MS배지에서 유도 및 증식된 callus를 사용하였다.

사용유전자 및 균주

인삼에 제초제 저항성 유전자를 도입하기 위해서 사용한 유전자는 phosphinothricin acetyltransferase (PAT) gene 유전자이며 (DeBlock et al. 1987), 본 유전자가 식물에서 발현될 수 있도록 35S-35S promoter (Odell et al. 1985)로 재조합되었으며 표지유전자로 NPT II gene이 함유되어 있다.

인삼세포에 PAT 유전자의 도입

형질전환시킬 재료는 인삼접합자배의 자엽과 callus을 이용하였으며, 성숙한 인삼종자를 무균처리한 후 접합자배를 나출시킨 다음 자엽을 배양재료로 사용하거나 접합자배를 발아시킨 후 유식물로 키운 다음 자엽을 배양재료로 사용하였다.

NPT II와 PAT 유전자를 가진 plasmid DNA를 코팅하기 위하여 tungsten 입자 60 mg을 70% Et-OH로 세척하고 50% glycerol 1 mL로 현탁하였다. 현탁액을 진탕하여 잘 섞은 다음, 새 튜브에 50 µL씩 분주하고 plasmid DNA 5 µL (1 µg/µL), CaCl₂ (2.5 M) 50 µL, spermidin (0.1M) 20 µL를 차례로 넣어 각각의 입자에 코팅하였다. 70% Et-OH로 세척하고 100% Et-OH 48 µL를 첨가하여 현탁한 다음 microcarrier에 1회에 8 µL씩 도말하여 사용하였다. PAT 유전자의 인삼자엽으로의 형질전환은 tungsten 10으로 코팅한 다음 1,100 psi의 helium 압으로 사출거리를 9 cm로 하여 실시하였다. 사출 후 chamber 내의 vacuum을 제거하고 sample을 꺼내어 2일간 배양한 후 인삼자엽과 callus를 MS 배지에 250 µg/L 세포탁심과 100 µg/L 가나마이신이 첨가된 배지에서 옮겨 형질전환 배의 발생을 유도하였다.

형질전환된 인삼식물체의 특성검정

형질전환된 인삼식물체에서 PAT 및 NPT 유전자의 존재 여부를 확인하기 위해서 PCR을 수행하였다. PCR을 위한 DNA 추출방법은 Edwards 등 (1991)의 방법에 준하여 수행하였으며 PCR 조건은 96°C에서 2분간 predenaturation 한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분으로 하여 36 cycle을 반응시켰으며 이어서 72°C에서 15분간 post-extension 시켰다. 이때 사용한 primer의 염기서열은 5'-AGGACAGAGCCACAAACACC-3' (20 mer)과 5'-ATGCTTGTATCCAGCTGCG-3' (19 mer)이다.

결과 및 고찰

인삼의 형질전환을 위한 접합자배로부터 multi-shoot 생산

인삼의 효율적인 형질전환을 위해서 callus 형성과정을 걸치지 않고 직접 형질전환된 재분화체를 획득할 목적으로 기내에서 접합자배를 배양하여 많은 shoot를 형성하고자 수행하였다. 멸균된 종자에서 접합자배를 직출하여 식물호르몬으로서 CPA와 BA을 단독 및 조합첨가된 배지에서 직접 multi shoot의 형성을 조사하였던 바, CPA 및 BA 단독처리구와 CPA 3 mg/L에서는 전혀 shoot가 형성되지 않고 둥근 형태의 callus만 형성되었다 (Table 1). 그러나 CPA 0.1, 0.5, 1.0

Table 1. The effect of CPA and BA on the growth of ginseng zygotic embryo and phenotype.

CPA (mg/L)	BA (mg/L)	Ratio of growth (%)	Phenotype
0	0	1/35 (3)	Round type callus
0	1	1/35 (3)	Round type callus
0	3	1/35 (3)	Round type callus
0	5	1/35 (3)	Round type callus
0.1	0	11/35 (31)	Round type callus
0.1	1	5/35 (14)	Growth of single shoot
0.1	3	5/35 (14)	Growth of single shoot
0.1	5	5/35 (14)	Growth of single shoot
0.5	0	31/35 (89)	Round type callus
0.5	1	25/35 (71)	Growth of single shoot
0.5	3	24/35 (69)	Growth of single shoot
0.5	5	15/35 (43)	Growth of single shoot
1.0	0	5/35 (14)	Round type callus
1.0	1	8/35 (23)	Growth of single shoot
1.0	3	9/35 (26)	Growth of single shoot
1.0	5	10/35 (29)	Growth of single shoot
3.0	0	4/35 (11)	Round type callus
3.0	1	21/35 (60)	Round type callus
3.0	3	15/35 (43)	Round type callus
3.0	5	12/35 (34)	Round type callus

mg/L와 BA 조합처리 간에는 single shoot가 형성되는 경향을 보였으며, 특히 BA 1.0 mg/L에서는 약간의 multi-shoot가 형성되는 현상을 보였으나 형성된 shoot에서는 전혀 뿌리가 발생되지 않았다 (Table 1).

상기 실험에서 auxin과 cytokinin의 혼합처리에서 효과가 관찰되었으므로 다시 2, 4-D와 kinetin을 조합처리하여 접합자배의 성장과 multi shoot의 생성 정도를 조사하였던 바, 2, 4-D 1 mg/L 및 0.5 mg/L 처리구 공히 kinetin이 0.1 mg/L보다 0.5 mg/L에서 접합자배의 생장이 양호하였다. 또한 이 호르몬 조건에서는 multi-shoot가 형성되는 것이 많이 관찰되었으나 전혀 뿌리가 형성되지 않았다. 특히 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0.5 mg/L에서 multi-shoot의 형성이 양호하였으며 한 개의 접합자배 당 4~6개의 shoot도 관찰할 수 있었다 (Table 2).

인삼 자엽의 형질전환을 위한 항생제 내성 조사

형질전환 실험에 앞서 형질전환체의 선발을 위해서 우선 인삼자엽이 항생제인 가나마이신에 대해서 어느 정도 내성을 나타내는지를 조사하기 위해서 MS배지에 가나마이신을 농도별로 첨가하여 생존율을 조사한 결과, 가나마이신 75 mg/L에서 100% 고사하였지만 형질전환체의 선발에 안정성을 고려하여 100 mg/L의 가나마이신의 농도를 사용하는 것이 효율적일 것으로 사료되었다 (Table 3).

Biolistic system에 의한 인삼의 형질전환

인삼의 자엽을 이용할 경우에는 *Agrobacterium* spp에 의해서 비교적 형질전환이 잘 되지만 callus를 이용해서 형질전환은 전혀 보고가 없다. 따라서 biolistic system에 의해서 인

Table 2. The effects of 2,4-D and kinetin on the multi-shoot formation from ginseng zygotic embryo.

2, 4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Ratio of growth (%)	Phenotype	Shoots/embryo (No)
0.1	0.1	26/38 (68)	Multi shoots	1-2
0.1	0.5	21/29 (72)	Multi shoots	4-6
0.5	0.1	21/33 (64)	Multi shoots	1-2
0.5	0.5	26/36 (72)	Multi shoots	3-5

Table 3. The effect of kanamycin on the survival ratio of ginseng cotyledon on the MS medium.

Conc. of kanamycin (μg/ml)	Survival ratio (%)
0	86/86 (100)
25	52/86 (60)
50	5/86 (6)
75	0/86 (0)
100	0/86 (0)

삼의 자엽과 callus로부터 형질전환을 유도하고자 수행하였던 결과, 자엽의 경우에는 오히려 형질전환율이 매우 약하게 나타났으며 callus에서 형질전환율이 더 높게 나타났다. 특히 callus의 형질전환의 경우 target distance 9 cm, rupture disk-macrocarrier gap distance를 1/3"로 했을 때 가장 양호한 결과를 보였다 (Table 4).

제조제 저항성 유전자에 의한 인삼의 형질전환

제조제 저항성 인삼 형질전환 식물체를 개발하고자 basta 내성유전자가 들어 있는 binary vector를 biolistic system에 의해서 인삼의 callus와 자엽을 이용하여 형질전환을 유도하였다. 자엽의 경우에는 배양기간이 경과할수록 배의 색깔이 갈변되어 생존할 수 없었고, 형질전환되지 않은 자엽도 갈변되어 형질전환된 배만이 황백색을 지녔다 (Figure 1-A, 1-B). 형질전환 배의 자엽을 절취하여 계속적인 이차배를 유도한 후 형질전환 배를 증식하였다 (Figure 1-C). 자엽단계로 성장된 형질전환배를 10 mg/L GA₃가 첨가된 배지에 옮겨 발아시킨 후 단일 배로 각각 분리하였다 (Figure 1-D). 분리된 배는 암모늄염이 절제된 MS배지에서 약 2개월간 성장시켰더니 뿌리와 줄기가 잘 발달된 식물체로 성장되었다 (Figure 1-E).

외부유용유전자를 식물세포에 삽입하여 형질전환시킬 수 있는 방법이 개발되고 많은 유용유전자가 개발됨으로써 작물의 특성에 맞게 외래유전자를 식물세포 속에 도입시켜 육종할 수 있게 되었다. 본 실험에서 사용한 제조제는 bialaphos로서 이 제조제는 phosphinothricin에 2분자의 alanine이 첨가된 tripeptide이며 *Streptomyces* species에서 생산된다 (DeBlock et al. 1987). 이 tripeptide는 일본 Meiji Seika회사에서 "Herbiace"이란 상표로 판매되고 있으며, Phosphinothricin은 독일 Hoechst사에서 "Basta"란 상품명으로 판매되고 있다. 또한 한국에서는 (주)경농에서 독일 Hoechst사의 원액을 공급받아 희석하여 판매하고 있으나 강력한 비선택성 제조제이기 때문에 식물체의 크기가 적어 살포하기 어려운 채소류 등에는 사용이 제한되어 있고 주로 과수나무의 제조시 사용되고 있다. 그러나 만일 바스타에 내성을 나타내는 작물을 개발할 수 있다면 비선택성이지만 작물에 구애됨이 없

Table 4. The effect of gap distance and target distance of biolistic system on the transformation of ginseng callus.

Gap distance (inch)	Target distance (cm)	Transformation	
		Callus	Cotyledon
1/2	6	-	-
	9	-	-
	12	-	-
1/3	6	+	-
	9	++	+
	12	+	-

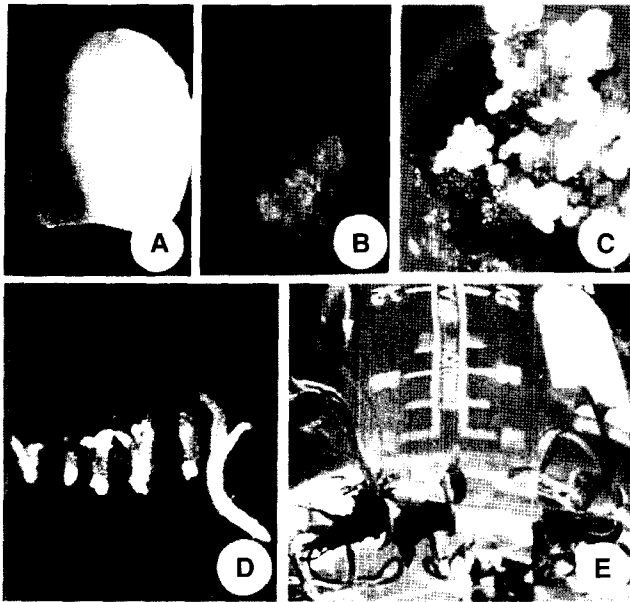


Figure 1. Acquisition of ginseng transgenic plants using biolistic system harboring herbicide-resistant gene (PAT). A, Nodular tissues formed on the surface of ginseng cotyledons harboring PAT gene; B, Browned cotyledon explants on the 100 mg/L kanamycin; C, Secondary somatic embryogenesis from cotyledon explants of transgenic ginseng somatic embryos; D, Small transgenic plantlets germinating on MS medium with 10 mg/L GA₃; E, Transgenic plants with well developed roots.

이 쉽게 살포함으로써 인건비가 크게 절약될 것으로 생각된다. 제초제 바스타의 주성분은 L-phosphinothricin으로서 이 성분은 glutamine synthetase (GS) 효소의 활성을 억제시키는 역할을 하며, GS는 L-glutamic acid와 ammonium 결합시켜 L-glutamine으로 변환시키는 작용을 하는 바, 이때 photorespiration, nitrate reduction, direct uptake 및 amino acid metabolism에 의하여 생성된 암모니아를 분해시켜 식물체의 독성을 감소시킨다. 그러나 L-phosphinothricin에 의해서 glutamine synthetase 효소의 활성이 억제되면 암모니아의 축적과 L-glutamine이 생성되지 않아 식물체가 죽게 되어 제초효과를 나타내게 된다 (DeBlock et al. 1987). 본 실험에서 사용한 유전자는 phosphinothricin 및 bialaphos에 저항성인 phosphinothricin acetyl-transferase (PAT) gene으로서 담배 등에서 강력한 제초효과가 있는 것으로 보고되고 있다 (Yang et al. 1998).

한편 본 재분화 시스템에 의해서 유도된 재분화체가 진정 형질전환체인가 여부를 확인하기 위해서 형질전환 인삼 유식물체에서 DNA를 추출하여 PCR에 의해 PAT 및 NPT II을 확인해 본 결과 (Figure 2) 형질전환체 모두에서 PAT (약 300 bp)와 NPT (약 800 bp) gene의 product를 확인할 수 있었다. 그러나 정상 식물체에서는 전혀 PCR product가 형성되지 않았다. 이로서 일차적으로 본 방법에 의해서 유도된 재분화체는 PAT 및 NPT II gene이 도입된 형질전환체임을 확인할 수 있었다.

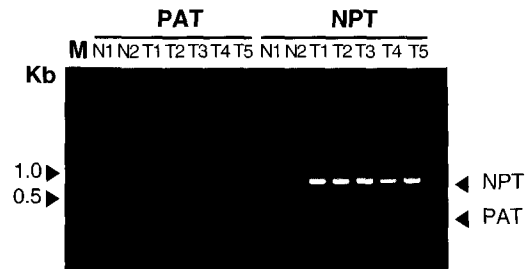


Figure 2. PCR products of PAT (A) and NPT (B) gene from transgenic ginseng plant.

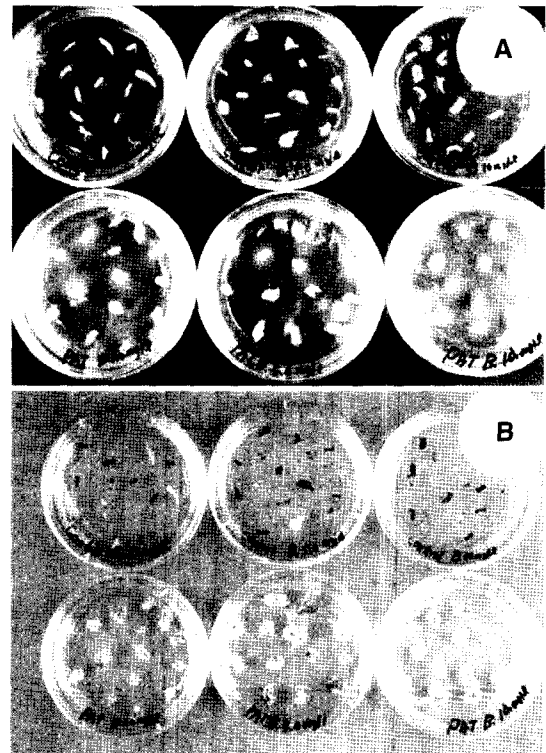


Figure 3. The effect of concentration of basta on the growth of transgenic (PAT) and normal (control) ginseng leaves and petioles for 15 days (A) and 30 days (B) after inoculation of explants.

PCR에 의해서 PAT 및 NPT 양성반응을 보인 식물체의 제초제에 대한 저항성 여부를 조사하기 위해 형질전환 식물체 또는 형질전환 식물체의 잎 또는 엽병절편을 제초제로인 basta의 농도를 1, 5, 10 mg/L로 달리한 MS 배지에 배양하였다. 그 결과 형질전환되지 않은 식물체의 조직은 100%가 황갈색으로 변하면서 괴사되었지만 형질전환식물체의 조직은 basta의 농도에 관계없이 생장에 영향을 받지 않았다 (Figure 3). 또한 형질전환된 유식물체를 basta가 10 mg/L 함유된 배지에 접종하여 배양한 결과 역시 형질전환되지 않은 조직은 모두 고사하였지만 형질전환된 인삼유식물체는 모두 성장하였다 (Figure 4). 이런 결과는 인삼조직에 제초제 저항성 유전자인 PAT gene이 완전하게 도입되어 성공적으로 발현되고 있음을 의미한다. 따라서 본 형질전환 인삼 식물체를 토양 활착 정도를 확인한 후 정상적인 종자를 획득하여 후대전이 여

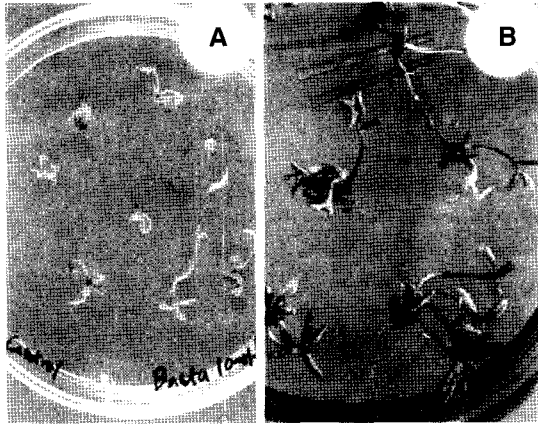


Figure 4. Phenotype of normal (A) and transgenic (B) ginseng plantlets cultured on the media with basta 10 mg/L.

부를 조사해야 할 것으로 생각된다.

적 요

인삼의 자엽과 callus에 Biolistic system을 이용한 비선택성 제초제인 bialaphos에 대한 내성을 갖게 하는 PAT 유전자의 형질전환효율 향상 및 형질전환체의 유전분석에 관한 실험을 수행하였다. 자엽의 경우에는 형질전환율이 약했지만 callus의 경우에는 target distance 9 cm, rupture disk-macrocarrier gap distance를 1/3로 했을 때 가장 양호한 형질전환 결과를 보였다. 형질전환된 인삼식물체에서 PAT 및 NPT 유전자의 존재 여부를 확인하기 위해서 PCR을 수행한 결과 정상 식물체에서는 전혀 PCR product가 형성되지 않은 반면 형질전환체 모두에서 PAT (약 300 bp)와 NPT (약 800 bp) 유전자의 band를 확인하여 각각의 유전자가 삽입되어 PAT 및 NPT II gene이 도입된 형질전환체임을 확인할 수 있었다.

인용문헌

Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Shah DM (1987) Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato

plants. *EMBO J* 6:1181-1188

An G (1987) Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology* 153:292-305

Butenco, RG, Brushwitzky I and Slepian L (1968) Organogenesis and somatic embryogenesis in the tissue culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Bot Zh* 7: 906-913

Chang WC, Hising YI (1980) Plant regeneration through somatic embryogenesis in root-derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Theor Appl Genet* 57:133-135

Choi YE, Yang DC, Park JC, Soh WY, Choi KT (1996) Regenerative ability of somatic poly- and single embryos from ginseng cotyledons. *Plant Cell Reports* 17 (6):584-551

DeBlock M, Herrera-Estrella L, Montagu MV, Schell J, Zambryski P (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* 3:1681-1689

Edwards K, Johnston C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349

Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179-180

Hoekema A, Van Haaren MJJ, Fellingner AJ, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1986) Non-oncogenic plant vectors for use in the *Agrobacterium* binary vector system. *Plant Molecular Biology* 5:85-89

Lee, HS, Kwon SY, Paek KH, Kim SW, Lee KW, Liu JR (1995) Introduction of bean chitinase gene into Korean ginseng by *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean J Plant Tissue Culture* 22:95-99

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol Plant* 15:473-497

Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812

Sanford JC (1990) Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant* 79:206-209

Yang DC, Min BH, Choi KT, Woo IS, Park EK (1998) Development of basta resistant tobacco using artificial phosphinothricin acetyltransferase gene. *Korean J Plant Res* 11:188-194

(접수일자 2001년 11월 21일)