

내병성 관련유전자의 운반체 재조합 및 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 형질전환

양덕춘# · 이은경 · 김무성

경희대학교 생명과학부
(2003년 1월 4일 접수)

Vector Construction and Transformation of Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) Using Disease Resistant Genes

Deok Chun Yang#, Eun Kyung Lee and Moo Sung Kim
College of Life Science, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea
(Received January 4, 2003)

Abstract : For study about introduce of gene connected with disease and transformation system of ginseng, chitinase gene cloned from soybean and disease resistant gene were carried out for expression and transformation of plant using *A. grobacterium*. The disease resistance gene(DR-49), 35S-35S-AMV, has been constructed. The disease resistance gene and chitinase gene were introduced into the binary vector pRD 400, which were mobilized into *Agrobacterium tumefaciens* strain MP 90 and LBA 4404 harboring disarmed Ti-plasmid. As a result of induce transformants using ginseng embryo and petiole, multi shoots were formed on MS medium supplemented 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l kinetin. Also transformation by cotyledon was effective on MS medium supplemented 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l kinetin, transformation percent of disease resistant gene and chitinase gene were showed 18%, 14% respectively. As transformed tissue is under pre-embryoid condition, normal shoot is required through the process of matured embryo.

Key words : Chitinase gene, cotyledon, disease resistance, embryo, petiole

서 론

인삼은 반음지성 식물로써 차광망을 설치하여, 4~6년 동안 장기간 피해를 하여야 하므로 오래동안 토양에 노출되어 있기 때문에 토양 전염성 병원균의 밀도가 현저하게 증가되고 이로 인해 근부패병이 만연하고 있다. 그러나 인삼은 농약잔류에 의한 제품의 품질 저하를 막기 위해서 일반적으로 농약 사용을 금하고 있으며, 사용한다고 하더라도 아직은 효과적으로 근부패병을 예방할 수 있는 약제를 선별하지 못하고 있다. 최근 작물 병해의 생물학적 방제방법의 개발을 목적으로 작물 근권에 서 서식하는 토양미생물을 이용하여 토양전염성 병해의 방제 및 치료의 효과를 나타내는 bacterization 방법이 세계적으로

활발히 연구되고 있다.^{1,2)} 이런 방법은 방제효과의 지속성뿐만 아니라 농약으로 인한 환경 및 식품오염, 작물에 대한 약해와 잔류 독성의 문제를 해결할 수 있는 장점을 가지고 있다. 현재 생물학적 방제에 사용되는 토양미생물은 *Streptomyces*속³⁾, *Bacillus*속⁴⁾, *Pseudomonas*속⁵⁾, *Rhizobium*속⁶⁾, *Flavobacterium*속^{6,7)}, *Agrobacterium*속⁸⁾ 등의 세균류와 *Tricoderma*속⁹⁾, *Penicillium*속⁷⁾ 등의 곰팡이가 이용되고 있는데 이들의 주요 방제기작은 효소학적 작용 즉 chitinase나 glucanase 효소의 세포벽 분해효소를 생산하는 미생물에 의한 병해의 용해 작용과¹⁰⁾ 항생물질 등의 생산으로 인한 병해의 대사장해를 일으키는 것^{11,12)}, 비병원성 사상균에 의한 교차감염^{6,13)}, 그리고 특이한 영양원에 대한 경합에 의한 방제 등으로 보고되고 있다. 그러나 최근에는 분자생물학적 기법과 식물조직배양기술의 발달로 병해에 저항성이 있는 작물을 개발하기 위해서 생물학적으로 효과가 있는 미생물로 부터 chitinase 및 glucanase 효소를 생산할 수 있는 유전자를 미생물과 식물에

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-201-2688; (팩스) 031-205-6323
(E-mail) dcyang@khu.ac.kr

서 직접 cloning하여 식물에서 발현될 수 있도록 재조합한 후 *Agrobacterim*을 이용한 형질전환방법에 의해서 식물체에 재도입하여 chitinase 효소를 다량으로 생산함으로써 병해를 예방할 수 있는 방법이 개발되었다.^{8,14)}

본 연구는 주로 곰팡이에 대해 저항성을 나타내는 disease resistant gene(DR gene)과 soybean에서 cloning한 chitinase 유전자를 식물에서 발현 및 형질전환될 수 있도록 재조합하여 *Agrobacterium*에 의해서 인삼의 형질전환을 유도하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 내병성 유전자의 운반체 재조합

내병성 유전자(DR gene, chitinase gene)를 식물세포 발현 promoter에 부착시키기 위해서 DR gene과 chitinase gene cDNA를 cauliflower mosaic virus double 35S 및 mosaic virus enhancer sequence¹⁵⁾를 가지고 있는 promoter와 nopaline synthase의 polyadenylation signal을 함유하고 있는 terminator를 coding하고 있는 524-Xba cassette vector에 T4 DNA ligase을 이용하여 결합시켰으며, *E. coli*에 도입하여 다시 plasmid를 isolation하여 제한효소로 절단하여 도입 여부를 확인한 후 확인된 cassette vector를 식물형질전환용 binary vector에 도입하기 위해서 Xba1으로 절단하여 binary vector인 pRD 400¹⁶⁾과 ligation시켰다. Binary vector에 유전자가 도입된 것이 확인된 pDR과 pCH vector를 *Agrobacterium*에 다시 도입하기 위해서 disarmed Ti-plasmid¹⁷⁾를 함유하고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404 및 MP90 각각을 tri-parental mating 방법¹⁸⁾에 의해 수행하였다.

2. 삽입된 내병성 유전자 확인을 위한 PCR 조건

Soybean에서 cloning한 chitinase 유전자의 도입을 확인하기 위하여 25 ng와 50 ng의 DNA를 추출한 후 5, 10, 15 pm 농도별로 primer를 처리하여 96°C에서 2분간 pre-denaturation 한 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 그리고 extension으로 72°C에서 2분간 36cycling한 후에 post-extension 72°C에서 15분, 4°C에서 보관으로 programming하여 PCR(Perkin Elmer Cetus, Fotodyne Incorporated)로 도입 여부를 확인하였다.

3. 내병성 관련 유전자에 의한 인삼의 형질전환 및 증식

인삼의 형질전환을 유도하기 위해서 선발된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404/ pCH18과 MP90/pDR 균주를 kana-

mycin 25 µg/ml과 gentamycin 25 µg/ml이 첨가된 AB¹⁹⁾에서 2일간 배양한 후 형질전환을 위하여 인삼의 자엽과 공동배양하였다. 식물호르몬 무첨가 MS배지에서 2일간 공동배양된 인삼의 자엽 절편은 2,4-D 1 mg/l와 kinetin 0.5 mg/l가 함유된 MS배지에 kanamycin 100 µg/ml과 carbenicillin 500 µg/ml를 첨가하여 형질전환체를 선발하였다. 인삼 자엽으로부터 형질전환된 pre-embryoid는 kanamycin 100 µg/ml이 함유된 상기배지에서 계속 계대배양하여 증식시켰으며, 형질전환된 1개의 pre-embryoid로부터 더 많은 양의 pre-embryoid를 유도하고 그로부터 정상적인 shoot를 발생시키기 위하여 2,4-D 1 µg/l과 kinetin 0.5 mg/l를 첨가한 1/2 MS 배지에 casein hydrolysate, AgNO₃, gibberellic acid, active charcoal, inosine, CuSO₄ 등의 화학제를 각각의 농도별로 처리하였으며 cold treatment를 병행 실시하여 shoot 발생에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 형질전환체의 재분화에 미치는 STS 용액과 sucrose의 효과를 알아보기 위하여 각각의 농도별로 복합처리하여 처리구에 따른 생장 양상을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 내병성 유전자인 DR 유전자의 운반체 재조합

DR gene은 주로 곰팡이에 대해 저항성을 나타내는 내병성 관련 유전자로서⁶⁾, 인삼 근부병을 나타내는 곰팡이에 대해서 DR gene이 저항성을 나타낼 것으로 판단하고 우선 이 유전자를 이용하여 인삼 자엽조직을 형질전환시켜 재분화된 인삼의 근부 발생균에 대해서 내성 가능성을 조사하고자 DR gene cDNA가 식물세포에서 발현될 수 있도록 재조합하였다. 우선 식물세포에서 발현할 수 있는 강력한 promoter(35S-35S-AMV)와 Tnos terminator를 가지고 있는 cassette vector 524-Xba에 내병성 유전자인 DR gene를 purification하여 ligation시킨 후 *E. coli*에 도입하고, 다시 이 plasmid를 isolation하여 같은 제한효소로 절단한 결과 5.0Kb의 ligate를 확인할 수 있었다(Fig. 1). Cassette vector를 식물형질전환용 binary vector에 도입하기 위하여 DR gene이 식물세포에서 발현될 수 있도록 조립된 cassette vector를 다시 Xba1으로 절단하였으며, 또한 식물형질전환용 binary vector인 pRD 400도 동일 제한효소로 절단한 후 ligation시켰다(Fig. 1). Ligation시켜 재조립된 pDR을 *E. coli*에 다시 도입하여 plasmid를 isolation 한 후 Xba1으로 절단한 결과 DR gene을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 내병성을 나타내는 DR gene이 식물형질전환용 binary vector에 효과적으로 도입되었음을 의미한다고 할 수 있다.

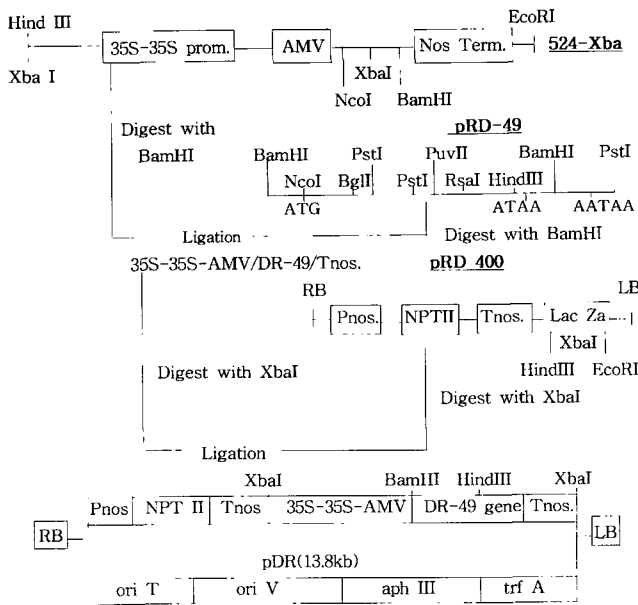


Fig. 1. Scheme for derivation of pDR. pDR is a binary type plant transformation vectors containing the double CaMV promoter, the coding sequence of disease resistant gene.

2. Chitinase gene의 운반체 재조합

세포벽 물질이 chitin으로 구성되어 있는 곰팡이 및 곤충에 효과가 있는 chitinase gene을 인삼에 도입하기 위해서 식물 핵내에서 발현될 수 있는 cassette vector와 형질전환이 가능한 binary vector를 사용하여 Fig. 2와 같이 재조합하였다.

3. 내병성 관련 유전자 pDR 및 pCH18 gene의 Agrobacterium 도입

DR gene과 chitinase gene은 곰팡이에 대해서 내성을 나

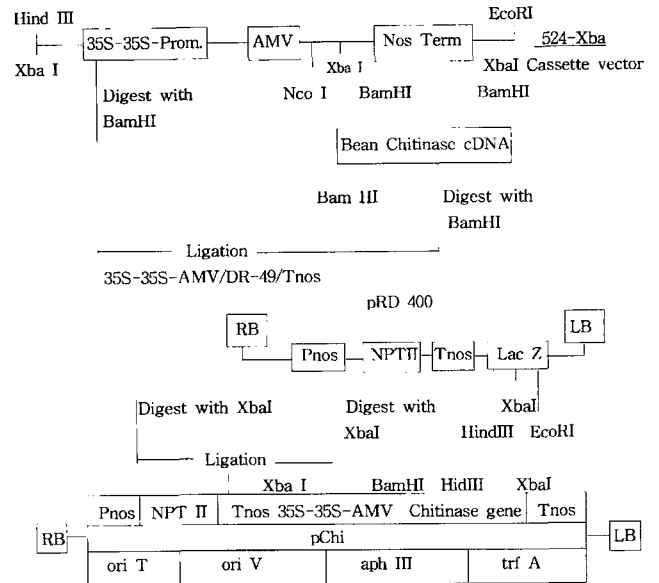


Fig. 2. The construction of chitinase gene containing cassette vector and binary vector.

타내는 유전자^{6,8)}로 식물체에 강력한 promoter를 도입하여 발현시켰을때 인삼 등에서 근부병을 유발하는 *Fusarium solani*등에 대해서 저항성을 보일것으로 사료되는 바, 본 실험은 soybean에서 cloning된 chitinase gene이 식물에서 발현 및 형질전환될 수 있도록 재조합된 pCH18 vector와 pDR vector를 식물호르몬 자가합성 유전자가 제거된 disarmed Ti-plasmid 함유 *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404 및 MP90을 tri-parental mating¹⁸⁾에 의해 실시하였다. Helper로는 *E. coli* DH5α pRK2013을 사용하였으며 특성상 LBA4404을 배양하기 위한 배지로는 2YT 및 AB배지에 kanamycin 50 µg/ml을 첨가하여 사용하였고, MP90은 gen-

Table 1. The Selection of Agrobacterium transconjugants with chitinase gene and DR gene by tri-parental method

Strains and plasmid	Selective media containing antibiotics (mg/ml)					
	2YT	2YT (Km 50)	2YT (Gm 50)	AB	AB (Km 50)	AB (KmGm 50)
Accep.or (<i>A. tumefaciens</i>)						
LBA4404 (disarmed Ti)	+	-	*	+	-	*
MP90 (disarmed Ti)	+	-	+	+	-	-
Donor (<i>E. coli</i> DH 5α)						
pCH18	+	+	-	-	-	-
pDR	+	+	-	-	-	-
Helper (<i>E. coli</i> DH 5α)						
pRK2013	+	+	-	-	-	-
Transconjugants (<i>A. tumefaciens</i>)						
LBA4404/pCH18	+	+	*	+	+	*
MP90;pDR	+	+	+	+	+	+

*: No c reck.

tamycin을 50 µg/ml 첨가하여 배양하였다. 그 결과 pDR gene과 pCH18 gene이 *Agrobacterium*에 도입된 *A. tumefaciens* MP90/pDR과 LBA4404/pCH18 2종의 transconjugants을 획득할 수 있었다(Table 1).

4. 내병성 관련 유전자에 의한 인삼의 형질전환

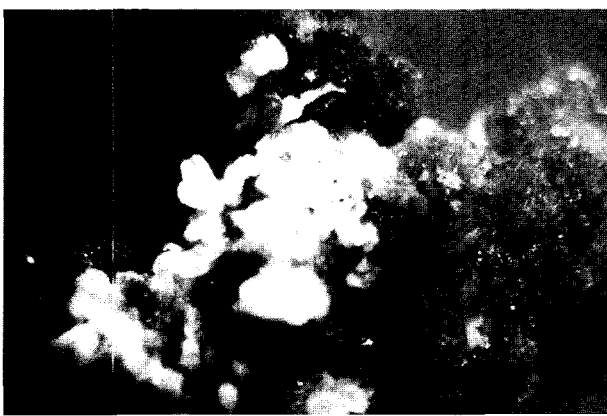
Tri-parental mating에 의해서 선발한 2종의 transconjugants *A. tumefaciens* MP90/pDR와 LBA4404/pCH18 각각을 2,4-D 1 µg/l와 kinetin 0.5 µg/l가 함유된 MS배지에 kanamycin 100 µg/ml 와 carbenicillin 500 µg/ml를 첨가한

Table 2. Transformation of ginseng cotyledon by DR and Chitinase genes

A. tumefaciens	Genes	Ratio of transformation (%)	Type of transformant
MP90/pDR	DR-49 gene	18	pre-embryoid
LBA4404/pCH18	Chitinase gene	14	pre-embryoid



A



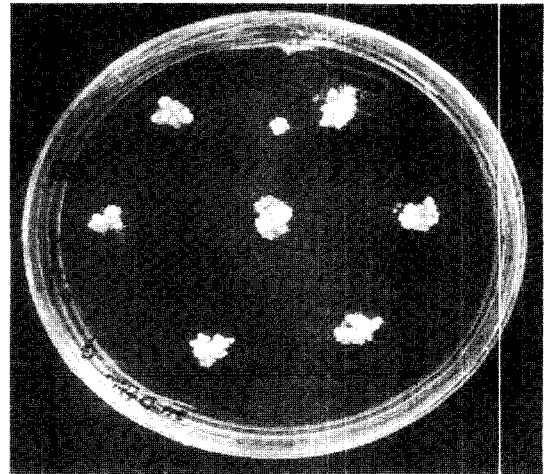
B

Fig. 3. Pre-embryoid formed from ginseng cotyledon on the MS medium supplemented 100 µg/ml kanamycin. A : DR gene, B : Chitinase gene.

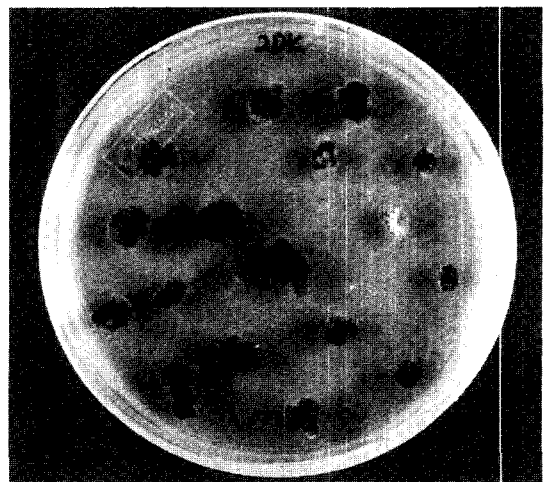
선발배지에서 동시배양법에 의하여 인삼 조직의 형질전환을 유도한 결과 성공적으로 형질전환이 가능하여 각각의 형질전환율은 MP90/pDR의 경우에는 18%, LBA4404/pCH18의 경우에는 14%을 나타내었다(Table 2). 그러나 형질전환된 조직이 모두 pre-embryoid(Fig. 3)상태였기 때문에 성숙배의 과정을 걸쳐 완전한 shoot의 형성이 필요하였다.

5. 인삼 형질전환체(pre-embryoid)의 증식

형질전환된 인삼 pre-embryoid로 부터 shoot의 형성을 유도하기 위하여 우선 preembryoid의 대량증식이 요구되었다. 따라서 형질전환된 pre-embryoid 1개를 절취하여 2,4-D 1 mg/l와 kinetin 0.1 mg/l가 함유된 MS 배지에 겨대배양하여 1개월 간 암 및 광상태에서 배양한 결과 많은 양의 pre-



A



B

Fig. 4. The growth of transgenic pre-embryoid on the MS medium supplemented 2,4-D 1 mg/l and kinetin 0.5 mg/l for 1 month under the dark(A) and light(B) condition.

Table 3. The formation of shoot by chemical and cold treatment on transformed ginseng pre-embryoid

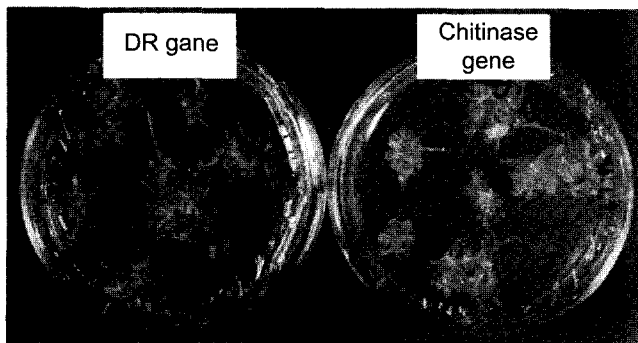
Chemical	Treatment concentration	Formation of shoot
Casein hydrolysate	0, 1.0, 2.0, 5.0, 10g	-
AgNO ₃	0, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20 mM	+(10 mM)
Gibberellic acid	0, 50, 100, 150, 200 mg/l	-
Active carbone	0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0%	-
Inosine	0, 40, 80, 120, 160 mM	-
CuSO ₄	0, 1.0, 10, 50, 100 mM	-
Cold treatment	0, 10, 20, 30days	+(20days)

embryoid(Fig. 4)를 증식시킬 수 있었다. 그러나 암상태에서는 pre-embryoid 수는 적었지만 embryoid 상태에 가까웠으나, 광상태에서는 암상태보다 더 많은 량의 pre-embryoid가 형성되었고, 녹색을 띄우고 있었으나, 암상태보다는 embryoid에 가까운 것이 더 적은 편이었다. 따라서 추후 대량형성된 pre-embryoid를 이용하여 성숙된 embryoid를 유기한 후 정상적인 shoot를 발생시켜야 할 것으로 사료된다.

형질전환된 pre-embryoid에서 shoot 형성을 유도하기 위하여 각종 화학물질을 첨가하여 성장 양상을 조사한 결과 AgNO₃ 10 µM과 10일간의 cold 처리에서만 생장이 가능했을 뿐 다른 처리구에서는 거의 shoot 형성을 관찰 할 수 없었다. 그러나 AgNO₃ 10 µM과 10일간의 cold 처리에서도 뿌리 형성은 전혀 나타나지 않았다(Table 3).

6. 형질전환체의 재분화에 미치는 STS 용액 및 Sucrose의 영향

상기 chemical 처리에서 shoot의 생장이 용이하지 않았기 때문에 STS 및 sucrose 용액을 몇가지 농도별로 처리하여 pre-embryoid의 성장을 조사한 결과 STS solution 6 mM과 sucrose 60 g/l 복합처리에서 양호한 경향을 보였으며(Fig. 5), shoot의 분화에도 효과가 있었다(Table 4).

**Fig. 5.** The shoot formation from transgenic pre-embryoid on the MS medium treated with STS solution for 1 month.**Table 4.** The effects of STS solution and sucrose on regeneration of ginseng transformants.

STS soln(mM)*	Sucrose(g)		
	40	60	80
3.0	+	+	++
6.0	+	+++	++
9.0	+	++	+

*STS stock solution 6 mM(1.5 g/l§), 12 mM AgNO₃, 96 mM Na₂SeO₃ H₂O(filteration 4°C, storage), Use mix 1:1 ratio
**Medium; 1/2 MS medium +2,4-D 1 mg/l§+kinetin 0.5 mg/l+ gelite 0.3%

사 사

본 연구는 21세기 프론티어 사업인 자생식물 사업단의 연구비지원(PF003101-01)에 의해 수행되었습니다.

요 약

인삼의 형질전환 시스템의 개발과 내병성관련 유전자의 도입에 관한 연구의 일환으로 soybean에서 cloning한 chitinase 유전자와 내병성 관련유전자(DR gene)가 식물에서 발현 및 형질전환될 수 있도록 운반체를 제조합하여 *Agrobacterium*을 이용해서 인삼에 형질전환시키고자 수행하였다. 식물 세포에서 발현될 수 있는 promoter(35S-35S-AMV)에 내병성 유전자인 DR-49 gene을 부착한 후 다시 식물형질전환용 binary vector에 도입하여 인삼에 도입되어 발현될 수 있도록 제조합하였으며, Disarmed Ti-plasmid 함유 *Agrobacterium*에 내병성유전자인 chitinase(pCH18)와 disease resistant gene(pDR)가 도입되었다. 인삼 callus 배양 과정을 거치지 않고 바로 multi-shoots를 생산하여 형질전환체 획득에 사용하고자 인삼 embryo와 petiole를 이용하여 direct shoots 생산을 유도한 결과 2,4-D 1 mg/l와 kinetin 0.5 mg/l 복합처리 구에서 multi-shoot가 형성되었다. 또한 인삼 자엽을 이용한

형질전환에서도 MS 기본배지에 2,4-D 1 mg/l와 kinetin 0.5 mg/l를 첨가한 복합처리구에서 가장 효과적이었으며, diseases resistant와 chitinase 유전자에 의한 형질전환율은 각각 14%, 그리고 18%를 나타내었다. 자엽으로부터 유기된 형질전환된 조직은 pre-embryoid 상태이기 때문에 성숙배의 과정을 거쳐 정상적인 shoot의 형성이 필요하였다.

인용문헌

- Ahmad, J. S. and R. Baker. *Phytopathol.* **77**, 182-189 (1987).
- Baker, K. F. and R. J. Cook. W. H. Freeman and Company, San Francisco (1974).
- Kim, D. W., D. H. Park and S. K. Park. *Proc. Mol. Biol. & Genet.* **3**(2), 129-134 (1988).
- Baker, R. and F. M. Scher. John Wiley and Son, New York, p.1-18 (1987).
- Kraus, J. and J. E. Loper. *Phytopathol.* **82**, 264-271 (1992).
- Cook, R. J. Soil borne Crop disease in Asia. FFTC, Taiwan, p.206-214 (1984).
- Cook, R. J., D. M. Weller and L. S. Thomashow. Enhancement of root crop protection. Alan Liss Inc. p. 125-134 (1987).
- Yoshihisa, H.拮抗微生物에 의한 토양병해의 생물학적 방제. *화학과학* **29**(8), 503-509 (1991).
- Park, J. H. and H. K. Kim. *Kor. J. Plant Pathol.* **5**(1), 1-12 (1989).
- Donald, M. R. and L. R. Berger. *Biochemica Et Biophysica Acta* **29**, 522-534 (1958).
- Backman, P. A. and R. Rodrigues-Kabana. *Phytopathol.* **65**, 819-821 (1975).
- Baker, K. F. and R. J. Cook. The American Phytopathological Soc., St. Paul, Minnesota. p.433 (1982).
- Bryant, J., S. Trends Biotechnol. **10**, 274-275 (1992).
- Barnes, C. L., C. Russel, C.D. Poster and R. W. McNew. *Plant disease* **65**, 423-424 (1981).
- Odell, J. T., F. Nagy, N. H. Chua. *Nature* **313**, 810-812 (1985).
- Datla R. S. S., J. K. Hammerlindl, B. Panchuk, L. E. Pelcher, W. Keller. *Gene* **211**, 383-384 (1992).
- Hoekema A, M. J. J. Van Haaren, A. J. Fellingner, P. J. J. Hooykaas, R. A. Schilperoort. *Plant Molecular Biology* **5**, 85-89 (1986).
- Ditta G, S. Stanfield, D. Corbin, D. R. Helinski. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 7347-7351 (1980).
- An, G. *Methods in Enzymology* **153**, 292-305 (1987).