

# 염류내성관련 유전자 Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene의 인삼 체세포 배발생을 통한 형질전환

윤영상, 배창휴<sup>1)</sup>, 송원섭<sup>1)</sup>, 윤재호<sup>2)</sup>, 양덕춘<sup>3)\*</sup>

공주대학교 식물자원학과, <sup>1)</sup>순천대학교 농업생명과학대학, <sup>2)</sup>구례야생화 연구소,

<sup>3)</sup>경희대학교 생명과학부

## Ginseng Transformation of Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene Relative Salt Resistant through Somatic Embryogenesis

Young-Sang Yoon, Chang-Hyu Bae<sup>1)</sup>, Won-Seob Song<sup>1)</sup>, Jae-Ho Yoon<sup>2)</sup>, Deok-Chun Yang<sup>3)\*</sup>

College of Industrial Sciences, Kongju National University, Kongju 340-802, Korea

<sup>1)</sup>College of Agriculture and Life Sciences, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

<sup>2)</sup>Institute of KuRae Wild Flower, Kurae 542-800, Korea

<sup>3)</sup>College of Life Science, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

### ABSTRACT

Korean ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer) is very difficult to obtain stable production of qualified ginseng roots because of variable stresses in soil environments. In transformation of ginseng with betain aldehyde dehydrogenase gene, compounds synthesized for controlling osmotic pressure such as proline, glycine, betaine, polyols and sugar were accumulated in cell for salt resistance in transgenic plants. 2 *Agrobacterium* conjugants were acquired with *bet A* and *bet B* genes for salt resistant plants. *A. tumefaciens* MP90/*pBetA* and *A. tumefaciens* MP90/*pBetB* were recombined for increasing the tolerance to salt stress. To confirm the transformation of the binary vector, tobacco plant was transformed, and the transformant can grow on media containing high concentration of kanamycin. To identify *NPT II*, *BetA* and *BetB* genes of the transformants, the band on the agarose was confirmed by PCR and RT-PCR techniques. The transformants of ginseng with *bet A* and *bet B* genes were acquired on the phytohormone free basic MS media containing only antibiotics and 1 M mannitol used for selection of transgenic plant, but the transformation efficiency for *BetA* and *BetB* was very low.

**Key words :** *Bet A*, *Bet B*, mannitol, *Embryo culture*, *Panax ginseng*, salt resistance

---

\* 교신저자 : E-mail : dcyang@khu.ac.kr

## 서언

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 반음지성 약용식물로써 해가림시설하에서만 재배가 가능하며 노동력이 많이 들고 생육이 늦어 3~6년간 한 곳에 머물게 되므로 뿌리썩음병과 같은 지하부 병해, 한발, 생육에 부적합한 토양환경 등의 자연재해에 의한 피해가 많으며, 토양환경 stress 때문에 품질 좋은 인삼의 안정된 수량확보가 대단히 어렵다(배, 1979). 또한 인삼은 비교적 다른식물에 비해 영양요구도가 낮아 인삼포의 예정지 관리시 사용되는 미숙청초, 미숙부엽토등의 남용으로 인하여 현재 재배하고 있는 인삼포장은 특정 무기질의 함량이 너무 많아 생육장애현상이 뚜렷하고 인삼의 품질마저도 나빠져 가는 결과를 초래하고 있다(김 등, 1984; 오 등, 1979). 따라서 매년 수확량의 감소등이 현저하게 나타나는 이런 나쁜 환경조건에 견디는 염류내성유전자의 도입에 의한 인삼의 신품종개발이 절실히 필요한 상황이다. 그러나 인삼은 장기간 재배해야 하며 타가수분을 하기 때문에 염류내성 인삼개발을 포장에서 직접 수행하기에는 많은 어려움이 뒤따르고 있다(배, 1979; 김 등, 1984). 따라서 기내배양을 통하여 단시간내에 염류내성 인삼의 신품종을 선발할 수 있는 기술개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 인삼에서 염류내성품종을 개발하기 위해서는 기존의 육종방법을 적용하게 되면 장기간이 소요되나 새로운 유전자를 찾거나 이미 알려진 유전자를 조작하여 형질전환시키면 단시간에 염류 stress 내성 신품종 인삼을 육성할 수 있으므로 이들에 관한 기술개발 또한 대단히 중요하다(김 등, 1984). 염류내성 식물은 염류농도의 변화에 따라 세포내의 삼투압을 유지하기 위한 화합물을 합성하는 기작을 가지고 있는데 이런 화합물은 주로 proline, glycine, betaine, polyols 및 sugar 등으로 체내에 축적함으로써 고농도의 염류에 견디는 것으로 알려져 있다(Nabors *et al.*, 1980; Gabriele *et al.*, 1990; Ryu *et al.*, 1991; Heinz-U *et al.*, 1993). 그 중 betaine은 미생물에서 2단계 반응을 통해 choline에서 합성되는데, 그 첫 단계는 choline dehydrogenase(CDH)에 의해서 촉매되고(*BetA* gene),

*BetB* 유전자의 산물인 betaine aldehyde dehydrogenase(*BADH*)에 의해 수행되었다(McCue and Hanson, 1992). 따라서 본 연구에서는 염류농도가 높은 우리나라 인삼재배지에서 품질이 양호한 고려인삼을 안정적으로 생산하고자 염류내성관련 유전자를 활용하여 인삼 신품종을 육성코자 수행하였던 바, 이에 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 운반체 재조합 및 *Agrobacterium*에 도입

식물세포에서 발현용 promoter는 발현정도가 높은 35S/35S/AMV promoter와 단일 35S promoter를 사용하고 terminator는 Tnos를 사용하였다. 식물세포 형질전환용 binary vector는 border sequence를 가지고 있는 pRD400 binary vector를 사용하였고, 인삼형질전환에 사용할 *Agrobacterium*은 disarmed Ti-vector를 가지고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* MP 90을 사용하였다. 사용한 유전자는 *BetA* 및 *BetB* 유전자(McCue and Hanson, 1992)로 binary vector에 재조합하여 *Agrobacterium*에 도입한 후 새로운 conjugants 2종을 획득하였다.

### 재조합 운반체의 연초에 도입 및 확인

재조합된 binary vector가 식물에서 발현 및 형질전환되는지 여부를 조사하기 위해서 우선 담배에 형질전환을 시켰다. *BetA* 및 *BetB* 유전자에 의하여 형질전환된 담배에서는 고농도의 kanamycin배지에서 생장이 가능하였으며 PCR에 의하여 NPT II, *BetA*, *BetB* gene를 조사하였다. 이때 PCR를 위해서 NPT II (5'-GAG-GCT-ATT-CGG-CTA-TG-ACT-G-3', 5'-ATC-GGG-AGC-GGC-GAT-ACC-GTA-3', 700BP), *BetA*(5'-GAG-TTT-GAT-ATT-CCG-CTG-GTG-C-3', 5'-GGG-TGA-TGC-GAA-TTG-CGT-CG-3', 457BP) 및 *BetB*(5'-GGC-AAT-ATC-TGA-CCG-AGC-ATC-C-3', 5'-GTT-AGT-TTG-CGG-ATC-GAA-AAC-G-3' 335 BP) primer를 사용하였다.

### 연초 형질전환체의 전사여부 확인

형질전환 담배에서 RNA isolation kit를 이용하여 total RNA를 추출한 후 cDNA 합성하여 PCR을 수행하였다. 이때 cDNA 합성 반응액은 reverse transcriptase, RNAsin, DTT를 사용하였으며, 42℃에서 45분 반응시켜 cDNA를 합성하였다. PCR 조건은 Taq polymerase를 이용하여 최초 96℃에서 2분간 pre-denaturation 후, 96℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 2분간 40회 반응시킨 후에 최종적으로 72℃에서 15분간 post-extension시켜 PCR를 종료하였다.

### 재조합 운반체의 인삼에 형질전환

인삼의 형질전환을 유도하기 위해서 선발된 *A. tumefaciens* MP90/p*BetA*. *A. tumefaciens* MP90/p*BetB* 균주를 25µg/ml kanamycin과 25µg/ml gentamycin이 첨가된 AB 배지에서 2일간 배양한 후 형질전환을 위하여 발아 직전의 인삼자엽과 공동 배양하였다. 식물호르몬 무첨가 MS배지에서 2일간 공동 배양된 인삼의 자엽 절편은 MS 기본배지에 250µg/ml cefotaxime과 100µg/ml kanamycin을 첨가한 선발배지로 인삼 자엽을 옮겼다. 특히 선발배지에는 식물호르몬을 첨가하지 않고 대신 mannitol의 농도를 1 M 처리하여 배양하였다. 배양 7일 후에는 다시 mannitol이 함유되지 않은 선발배지로 계대배양한 후 체세포배의 발생 여부와 생육 상태를 조사하였다. 항생제 배지에서 유도된 인삼 체세포배는 *BetA* 및 *BetB* 유전자의 PCR을 통해 형질전환 여부를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### *Bet* 유전자의 연초에 도입 및 확인

pRD400 binary vector를 이용 *BetA*와 *BetB* 유전자를 *Agrobacterium*에 도입하여 새로운 접합체 2종을 획득하였으며 (*A. tumefaciens* MP90/p*BetA*, *A. tumefaciens* MP90/p*BetB*), 재조합된 binary vector가 도입된 식물체에서 제대로 발현되는 지 여부를 조사

하기 위해서 담배에 형질전환을 시켰다. *BetA* 및 *BetB* 유전자를 도입한 형질전환 담배는 고농도의 kanamycin 배지에서 생장이 가능하였으며, PCR에 의하여 *NPT II*, *BetA*, *BetB* 유전자를 조사한 결과 담배 유식물체 모두 gel 상에서 특정 band를 나타내어 형질전환체임을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그러나 형질전환 담배의 유식물체는 공동배양 시 사용한 *Agrobacterium* 이 감염되어 특정 밴드가 나타날 수 있기 때문에 *Agrobacterium* 감염시 나타나는 *VirG* (primer, 5'-TTA TCT GAG TGA AGT CGT CTC AGG-3', 5'-CGT CGC CTG AGA TTA AGT GTC-3', 965 bp) 유전자의 유무를 확인한 바, 형질전환체에서는 *VirG* 밴드가 나타나지 않고 *Agrobacterium*에서만 형성됨을 확인할 수 있어 *BetA*, 및 *BetB* 유전자가 담배에 형질전환 되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

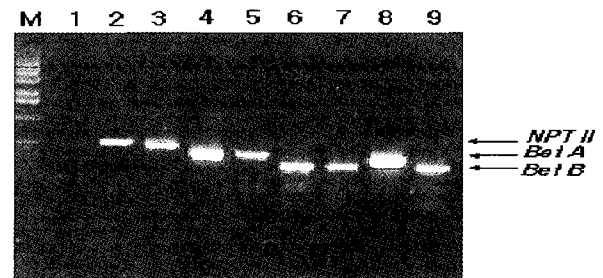


Fig. 1. Confirmation of transgenic tobacco plant with *BetA* and *BetB* genes. PCR product of various concentration (50 ng, lane 4 and 6 : 25 ng, 5 and 7) of *NPT II* (lane 1-3), *BetA* (lane 4-5 and 8) and *BetB* gene (lane 6-7 and 9) in non-transformed control plants (lane 1), transgenic plants (lane 2-7) and *Agrobacterium*. PCR products of *NPT II*, *BetA* and *BetB* gene are 500, 457 and 335 bp, respectively.

*BetA* 및 *BetB* 유전자가 도입되었더라도 전사가 되지 않으면 형질전환체로서의 기능을 할 수 없으므로 RT-PCR을 이용하여 도입된 유전자의 전사여부를 확인하였다. cDNA 합성 및 PCR 반응 동안에 처음부터 *NPT II*, *BetA* 및 *BetB* primer를 반응액에 첨가하여 바로 사용하였다. RT-PCR이 완료된 후에는 1.2% agarose gel 상에서 전기영동한 후에 EtBr 에 의해 염

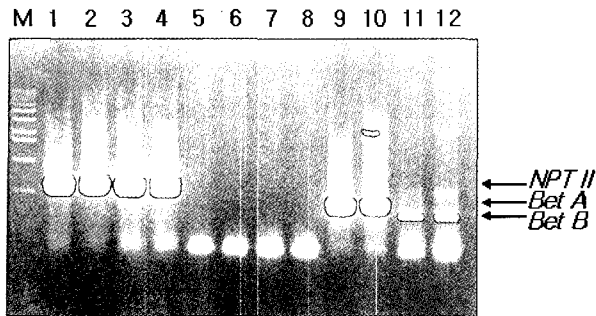


Fig. 2. Confirmation of various genes by PCR in tobacco transgenic plants. M: marker, Lanes 1-4: *NPT II*, Lanes 5-8: *VirG*, Lanes 9, 10: *BetA* and Lanes 11, 12: *BetB* gene.

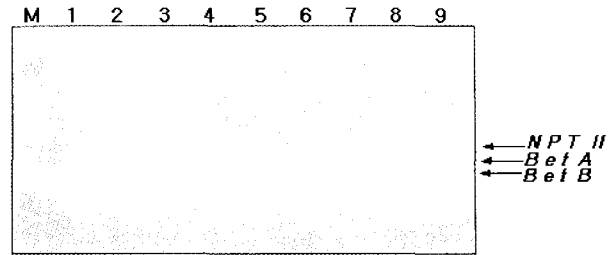


Fig. 3. Confirmation of *NPT II* (lanes 1-3), *BetA* (lanes 4-6) and *BetB* (lanes 7-9) RNA from non-transformed control plants (lanes 1, 4, 7), *BetA* (lanes 2, 5, 8) and *BetB* (lanes 3, 6, 9) transgenic tobacco plants.

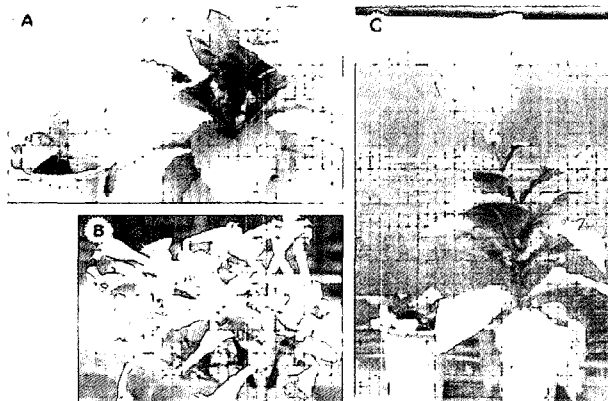


Fig. 4. Transgenic tobacco plant flowered with *BetA* and *BetB*. (A) Regenerated whole tobacco plant introduced *Bet* gene (left; *BetB*, right; *BetA*). (B) Flowering transgenic plants with *BetA*. (C) Seed capsules on a transgenic tobacco plants.

색하여 UV하에서 밴드의 형성여부를 확인한 결과 형질전환체에서는 모두 밴드가 형성되었으나 대조구에서는 전혀 밴드가 형성되지 않아 형질전환체는 정상적으로 RNA를 합성하고 있음을 확인하였다 (Fig. 3). 담배에서 형질전환이 확인된 유식물체를 토양에 이식하여 생장을 조사한 결과 *BetB*가 도입된 형질전환체는 생장이 잘 안되었으나 (Fig. 4-A, left), *BetA*가 도입된 형질전환체는 정상적으로 성장하는 모습 (Fig. 4-A, right)을 보였으며, 특히 *BetA* 형질전환체의 경우에는 정상적으로 개화결실이 되었다 (Fig. 4-B,C). *BetB* 도입 형질전환체의 경우 생장에

이상을 가져오는 지에 대해서는 추후 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

#### Bet 유전자에 의한 인삼의 형질전환

일단 담배에서 형질전환이 확인되어 다시 인삼에 형질전환을 유도하고자 단일배 발생 방법에 의해서 형질전환체를 획득하였으나 형질전환체의 빈도가 매우 낮아 원형질분리방법을 통한 배발생 방법에 의하여 계속적으로 형질전환율을 증대하였다 (Fig. 4). 즉 발아 직전에 있는 인삼 자엽을 멸균된 필터페이퍼에 올려놓아 잔여 배지를 제거한 다음 성장 호르몬이 첨가되지 않고 1 M의 mannitol이 첨가된 MS 기본배지에서 3일간 전배양하였다. 전배양 후 MS 기본배지에 250 µg/ml cefotaxime과 100 µg/ml kanamycin을 첨가한 선발배지에 인삼 자엽을 옮겼다. 약 14일 간격으로 2회의 계대배양을 통해 약 12%의 인삼 자엽에서 형질전환 체세포배가 발생되었으며 나머지 형질전환 되지 않은 자엽은 황색 또는 적갈색을 띠며 괴사하였다 (Fig. 4). 항생제 배지에서 유도된 체세포배의 형질전환 여부를 확인하기 위해서 다시 PCR을 수행한 바, 인삼 형질전환체에서는 *BetA* 및 *BetB* 유전자가 확인되었으나 대조구에서는 전혀 밴드가 형성되지 않아 인삼에서도 동일 유전자에 의한 형질전환이 되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). *BetA* 및 *BetB* 유전자에 의하여 형질전환된 인삼 체세포배로부터 shoot를 형성하기 위해서 GA<sub>3</sub> 50mg/l를 첨가한 1/2 MS 배지에 접종한 결과 shoot가 형성되는 것을 확인할 수 있었으나 (Fig. 6), 기형

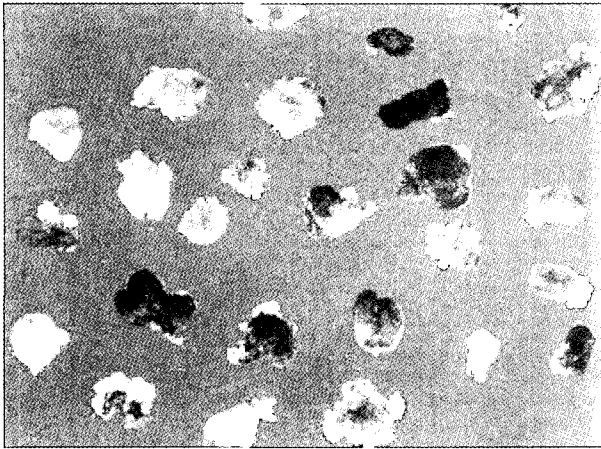


Fig. 4. Somatic embryos of the ginseng transformants with *BetA* and *BetB* gene on the phytohormone free MS media with 1 M mannitol.

의 shoot가 많이 관찰되었다. 따라서, 이후 정상적인 shoot 유도 효율을 높이는 방법을 개발해야 할 것이다.

인삼은 종자를 통하여 번식할 수 있으나 채종하는데 3-4년이 소요됨과 동시에 1회 채종량이 대단히 적은 작물로서 타식물에 비하여 우수품종 육성에 장구한 세월이 필요하며, 또한 우수품종을 육성하였다 하더라도 동일한 유전자형을 지닌 개체수 증식에도 상당한 시일이 요구되므로 이러한 불편하고 어려운 점을 해결하기 위하여 인삼의 조직배양기술이 개발 확립되어 단시일내에 homologous gene을 지닌 개

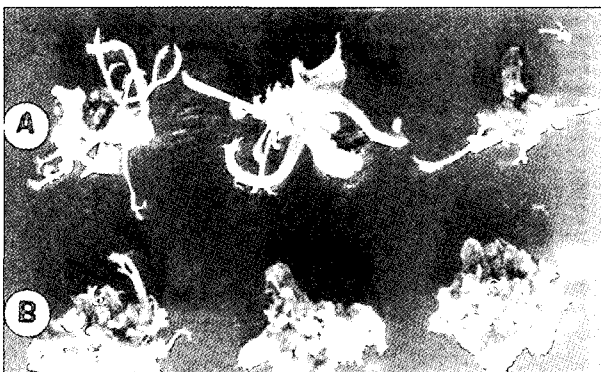


Fig. 6. Shoots derived from transgenic ginseng somatic embryos with *BetA* (A) and *BetB* (B) on the 1/2MS medium with GA<sub>3</sub> 50mg/l .

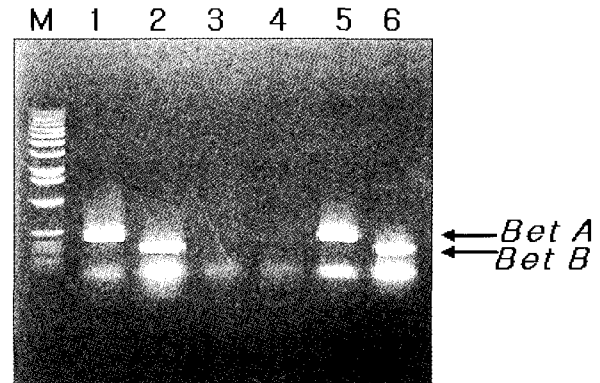


Fig. 5. Confirmation of introduced gene by PCR in the ginseng transgenic plants with *BetA* (lanes 1, 3, 5) and *BetB* gene (lanes 2, 4, 6). Lanes 1, 2: transgenic ginseng, lanes 3, 4: non-transgenic plant, lanes 5, 6: *Agrobacterium* used for induction of transgenic plants.

체수를 대량으로 증식할 수 있는 기반이 구축되어야 할 것이다. 최근 식물유전공학기법의 발달로 유전자조작에 의한 많은 유전자들이 cloning되었으며, cloning된 유전자를 다시 강력한 promoter로 재조합 후 식물세포에 형질전환시킴으로서 새로운 식물체를 개발하고 있다. 염류관련 유전자는 Huraki et al.(1993), Jolley et al.(1996), York et al.(1996), Hiraga et al.(1996)에 의하여 methicillin resistant gene, dihydrolipoamide dehydrogenase, angiotensin I-converting enzyme gene 등이 개발되었으며, 이미 genebank에 수백편의 관련 논문들이 보고되고 있다. 본 실험에서 사용된 betaine은 미생물에서 2단계 반응을 통해 choline에서 합성된다. 그 첫 단계는 choline dehydrogenase(CDH)에 의해서 촉매되고 (*BetA* gene), *bet B* 유전자의 산물인 betaine aldehyde dehydrogenase(BADH)에 의해 수행된다(McCue and Hanson, 1992). 최근까지 염류내성의 식물체를 선발하기 위해서 식물의 조직세포를 배양하여 고농도의 염류 첨가배지에서 선발하였으나, 대부분의 선발세포주는 생리적 현상에 의한 영향으로 판명되어 졌다. 그러나 본 실험과 같이 외부유전자를 직접 도입하여 형질전환체를 유도하여 획득된 조직은 생리적인 현상이 아닌 유전적인 변환이므로 지속적인 유전이 가능하지만 추후 염류내성 신품종의 육성을 위해

서는 선발계통의 안정성 검토, 염류 내성기작의 신호전달체계, 재분화 형질전환식물체의 후대 검정 및 대량증식 등에 관한 연구가 계속적으로 수행되어야 할것으로 판단 된다.

### 적요

염류내성 식물은 염류농도의 변화에 따라 세포내의 삼투압을 유지하기 위한 화합물을 합성하는 기작을 가지고 있는데 이런 화합물은 주로 proline, glycine, **betaine**, polyols, sugar 등으로 체내에 축적함으로써 고농도의 염류에 견디는 것으로 알려져 있다. **Betaine**은 미생물에서 2단계 반응을 통해 choline에서 합성되는데, 첫단계는 choline dehydrogenase (CDH)에 의해서 촉매되고(Bet A gene), bet B 유전자의 산물인 betaine aldehyde dehydrogenase(BADH)에 의해 수행된다. 본 실험에서는 Bet A, Bet B 유전자를 아그로박테리움에 도입하여 새로운 conjugants 2종을 획득하였으며(*Agrobacterium tumefaciens* MP90/pBet A, *Agrobacterium tumefaciens* MP90/pBet B), 먼저 재조합된 binary vector가 식물에서 발현 및 형질전환되는지 여부를 조사하기 위해서 이미 담배에 형질전환을 시켰으며, 형질전환된 담배에서는 고농도의 kanamycin배지에서 생장이 가능하였고, PCR에 의하여 NPT II, Bet A, Bet B gene를 조사한 결과 담배 유식물체 모두 band가 형성되어 형질전환체임을 확인할 수 있었다. 인삼에 Bet A, Bet B gene의 도입은 1M의 mannitol이 함유된 식물호르몬 무첨가 MS 배지에서 단일배 발생방법에 형질전환체를 획득하였으나, 형질전환체의 발생빈도(12%)가 매우 낮았다.

### 감사의 글

본 연구는 경희대학교 2004년 자유공모과제의 연구지원금에 의해서 수행되었으며 이에 대해 심심한 감사를 표하는 바이다.

### LITERATURE CITED

- Gabriele, M., M.S. Jurgan and J.B. Hans. 1990. Direct screening of a small genome: Estimation of the magnitude of plant gene expression changes during adaptation to high salt. *Mol. Gen. Genet.* 224:347-356.
- Heinz-U. G., D. Thomas, R. Gaxiola, F. Montrichard, S. K. Yolande and R. Serrano. 1993. Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *The EMBO Journal* 12(8): 3105-3110.
- Hiraga, H., T. Oshima, M. Ishida and G. Kajiyama. 1996. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 27:569-572.
- Huraki, C., K. Taishi, K. Yamashita and S. Kagawa. 1993. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using PCR and non-radioactive DNA probes. *Rinsho Byori* 41:1159-66.
- Jolley, K.A., E. Rapaport, D.W. Hough and M.J. Danson. 1996. Dihydrohaloamide dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*: homology over expression of the cloned gene. *J. Bacteriol* 178: 3044-3048.
- McCue, K.F. and Hanson A.D. 1992. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Molecular Biology* 18:1-11.
- Nabors, M.W., S.E. Gibbs, C.S. Bernstein and M.E. Meis. 1980. NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 97.:13-17.
- Ryu J.H., T.H. Kwon, S.Y. Choi. 1991. Tissue culture for the selection salt tolerant lines in Alfalfa(*Medicago sativa* L.) *Korean J. Plant Tissue Culture* 4:239-246.
- York, M.K., L. Gibbs, F. Chehab and G.F. Broohs, 1996. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determining

- methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. J. Clin Microbilo 34:249-253.
- 김명수, 이종화, 이태수, 백남인. 1984. 인삼 생리장해 방제에 관한 연구. 인삼연구보고서(재배분야). 한국인삼연초연구소 p. 1-96.
- 배효원. 1979. 고려인삼. 고려인삼연구소 p. 238-256.
- 오승환, 박창석, 김영인. 1979. 적변삼 원인연구. 인삼연구보고서(재배분야). 고려인삼연구소 p. 3-15.
- (접수일 2004. 7. 30)  
(수락일 2004. 10. 02)