

일일초에서의 기능획득 돌연변이 모상근의 대량생산

고석민¹, 정화지², 이효연^{1,3*}¹제주대학교 아열대 원예산업연구소, ²(주)젠닥스, ³제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부**Mass Production of Gain-of-Function Mutants of Hairy Roots in *Catharanthus roseus*****Suk-Min Ko¹, Hwa-Jee Chung² and Hyo-Yeon Lee^{3*}**¹Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea²Gendocs Inc., Daejeon 305-301, Korea³Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract - This study describes conditions for the mass production of mutant hairy root lines by co-cultivation with *A. rhizogenes* harboring the activation tagging vector pHc7. Various sources of explants were subjected to genetic transformation with *A. rhizogenes* to determine optimum conditions and cultivar for the highest frequency of hairy root formation on explants. Hairy root formation also were investigated in transformed hairy roots grown in various culture media. Finally, a total of approximately 2,500 lines of hairy root mutants were produced in this study. A managing system for metabolomics in hairy root lines also were established. These hairy root lines will be useful to determine functions of genes relating biosynthesis pathway of secondary metabolites.

Key words - *Catharanthus roseus*, Hairy root, Secondary metabolite, *Agrobacterium rhizogenes*

서 언

특정 유전자의 기능을 조사하기 위하여 기능손실 돌연변이체(loss-of-function mutant)를 이용하는 연구 방법이 널리 이용되고 있다(Bouchez and Hofte 1998). 이러한 돌연변이 식물체는 주로 T-DNA를 식물염색체에 도입한 후 후대 식물체의 생리/생태적 특성을 관찰하여 모본과 다른 특성이 나타나면 식물체에 삽입된 T-DNA의 염기서열과 그 주변의 식물체 유전자 염기서열을 비교 하여 기능 손실 유전자 부위를 알아내는 방법이다. 이러한 돌연변이체의 유도방법은 지금도 많은 연구자가 새로운 기능 유전자를 찾기 위해서 많이 사용하고 있으나 일부 문제점도 알려지고 있다. 가장 많이 알려진 문제점은 열성 유전이 일어나기 쉽기 때문에 초기 형질전환 식물체에서 원하는 돌연변이형질의 선발을 어렵게 한다. 또한 insertion mutagenesis를 이용한 실험은 고효율의 형질전환기술이 확립된 식물의 경우에만 쓸 수

있기 때문에 형질전환 기술이 확립되지 않은 식물체에서는 사용하기 곤란한 기술이다. 따라서 이러한 기능 손실 돌연변이체 선별방법의 대안으로서 활성표지 선별(activation tagging system)을 이용한 유전자 탐색이 최근 많은 연구자들에 의해서 진행되고 있다(Weigel *et al.*, 2000; Tani *et al.*, 2004; Kuromori *et al.*, 2009). 이 활성표지 선별 방법은 CaMV35S(Cauliflower mosaic virus) 프로모터의 enhancer 서열이 비교적 멀리 떨어져 있는 상태에서도 주변 유전자의 전사를 활성화(transcription activation)시킬 수 있다는 점을 이용하는 것으로 기능 획득 돌연변이체(gain-of-function mutant)를 선발하는데 있어서 대단히 유리한 방법이다. 다시 말해서 enhancer 서열을 포함하고 있는 activation tagging vector를 제작한 후 *Agrobacterium* 법을 이용하여 형질전환 식물체를 만들고, 그 후 기능획득 발현 형질(표현형질)이 보이는 식물체만을 선발 한 후 염색체 DNA를 회수하여 전사 활성화된 유전자를 클로닝 하는 것이다. 이와 같이 활성표지 선별법을 이용하면 보다 효율

*교신저자(E-mail) : hyoyeon@cheju.ac.kr

적으로 식물체로부터 새로운 유전자를 찾을 수 있고, 그 유전자의 분석이 비교적 쉽기 때문에 애기장대는 물론 벼 (Jeong *et al.*, 2002), 토마토(Mathews *et al.*, 2003), 포플러(Busov *et al.*, 2010)에 이르기까지 다양한 식물종에 이용되고 있다. 또한 activation tagging을 식물 조직배양에 적용하여 이차대사물질인 terpene indole alkaloid 생합성에 관련된 ORCA3, AP2 domain 전사조절인자를 일일초로부터 분리하였다(van der Fits *et al.*, 2000). 그 외 Seki *et al.*(2005)은 rol(rooting locus) 유전자와 GFP를 탑재한 binary 벡터를 제작, 모상근을 이용한 high-throughput tagging시스템을 개발하였다.

한편, *Agrobacterium rhizogenes*에 의해 유도되는 모상근은 일반뿌리보다 성장속도가 빠르며 유전적으로 안정하고 식물 호르몬이 없는 배지에서도 생장이 가능하여 대량으로 독립적인 라인을 생산하는데 유리하다. 또한 모상근은 대부분의 식물 뿌리에 존재하는 이차대사산물을 합성하며, 모상근 line에 따라 합성된 이차대사산물의 양적 변이를 보인다(Mallol *et al.*, 2001; Palazon *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2004).

일일초 (*Catharanthus roseus*(L.) G. Don)는 열대와 아열대에 서식하는 협죽도과 식물로서 항암제로 알려진 모노테페노이드 인돌 알칼로이드(MIAs)인 vinblastine과 vincristine 등과 같은 의학적 가치가 높은 다양한 유용 알칼로이드를 생산한다(van der Heijden *et al.*, 2004). 그러나 이들의 식물체내에서의 함유량은 매우 낮기 때문에 의약품으로 상용화 할 경우, 상대적으로 생산단가가 높아져 고가로 유통되고 있는 실정이다(vincristine 0.9 ug/g, viblastine 5.8 ug/g ; Favretto *et al.*, 2001). 한편, 식물 형질전환에 의한 이러한 종의 대사공학은 식물체로부터 특정 알칼로이드의 생산량을 높이는 데 유용한 방법이 될 수 있다. 최근 대사관련 유전자인 ORCA3 등 다양한 유전자를 도입한 형질전환 일일초에서 알칼로이드 생산량을 높이려는 시도가 이루어지고 있지만 아직까지 상업적인 수준에 도달한 예는 없는 실정이다(Magnotta *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Jaggi *et al.*, 2011). 이러한 문제를 해결하기 위해서는 우선, 목표 이차대사산물의 생합성 경로에 대한 체계적인 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서는, 일일초의 약리성분인 indole alkaloids의 생합성 관련 유전자를 중심으로 한 이차대사의 functional genomics를 위한 효율적인 시스템 확립을 위해 activation tagging 일일초 모상근을

중심으로 대량의 모상근 라인을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

벡터제조

pCAMBIA 1300의 RB와 LacZ부분을 *SphI* 제한효소로 제거한 후 self-ligation을 시켰다. pGA2722로부터 분리한 RB부분을 *SalI/BamHI* 위치로 subcloning하여 대조구 벡터 pHC6를 제조하였다. pSKI015에서 tetramer CaMV 35S enhancer부분을 PCR로 증폭하여 pCR2.1 TOPO cloning vector(Invitrogen, USA)를 이용하여 클로닝 하였다. PCR primer는 5'-TCTAGAACTAGTGATCCCCAACATG-3', 5'-CTGCAGAATATATCCTGTCAAACACTG-3'를 이용하였다. Tetramer CaMV35S enhancer 부분을 pCAMBIA 1300의 *BamHI/PstI* site로 subcloning하여 pKH1 벡터를 제조하였다. pKH1를 *HindIII*로 자르고 Klenow enzyme으로 처리하여 blunt end로 만들었다. 그 후 *EcoRI* 제한효소로 처리하여 enhancer를 분리하여 pHC6 *EcoRI/SmaI* 위치로 subcloning하여 pHC7를 제조하였으며 이를 *A. rhizogenes* R1000 혹은 *A. tumefaciens*로 형질전환하여 모상근 유도에 사용하였다.

모상근 유도 및 증식

일일초 종자를 70% 에탄올에 1분간 1차 표면살균을 한 후, 0.4% 상용 락스로 10분간 2차 소독하였으며 멸균수로 4회 수세하고 약 2시간 침적시켰다. 이 과정을 다시 1회 더 반복한 후 멸균한 여과지로 수분을 제거한 뒤 1/2MS 고체 배지에 종자를 치상하여 25°C에서 암상태로 2주간 배양하였다. 무균식물체에서 뿌리를 제거하고 배축을 7-10 mm 정도로 잘랐다. WPM(Woody Plant Medium: Lloyd and McCown 1980) 고체배지위에 준비해 놓은 배축 절편체를 1/2MS 배지에 resuspend 시킨 *A. rhizogenes* 배양액에 넣어 22°C에서 암상태로 72시간동안 공동배양 하였다. 절편체를 멸균수로 최소 10번 이상 씻어내고 50 mg/L carbenicillin을 첨가한 멸균수에 30분간 침지한 후 다시 멸균수로 수세하였다. 멸균된 여과지에 공동배양한 배축 절편을 올려놓고 물기를 제거한 후 500 mg/L carbenicillin을 첨가한 WPM 배지에 25개씩 치상하여 25°C에서 암배양 하였다. 매 4주마다 계대배양 해주며 carbenicillin 농도를 점차 낮추어 주었다. 증식된 모상근의 뿌리끝 및 분지를 제

거하고 7-10 mm 정도로 잘라서 pHc7로 형질전환 된 *A. tumefaciens* GV3101에 25°C, 암상태로 72시간동안 1/3SH (Schenk and Hildebrandt 1972)배지에서 공동배양하였다. 공동배양 후 절편체를 무균수로 최소 10번, 500 mg/L carbenicillin을 첨가한 멸균수에 30분간 이상 세척했다. 멸균된 여과지에 공동배양한 모상근 절편을 올려놓고 물기를 제거한 후 1차 선발배지(1/3SH + hygromycin 10 + carbenicillin 500 mg/L)에 모상근 절편을 치상하고 25°C에서 암배양 하였다. 그 후, 2차 선발배지(1/3SH + 10 mg/L hygromycin + 200 mg/L carbenicillin)에, 1차 선발배지에서 4-6주동안 활발하게 자란 모상근을 옮겨 2차 선발하였다. 3차 선발은 10 mg/L hygromycin + 100 mg/L carbenicillin을 포함한 1/3SH 3차 선발배지를 사용하였다. Transgenic hairy root는 1/3SH 배지에서 25°C, 암배양으로 유지 관리하였다.

형질전환 모상근의 확인

형질전환된 일일초 모상근을 확인하고자 형질전환 모상

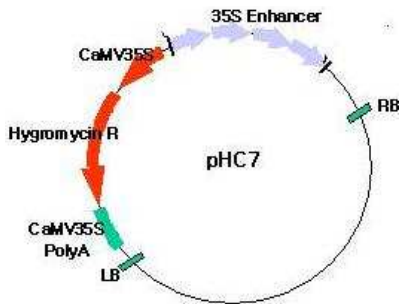


Fig. 1. Activation tagging vector pHc7.

근 또는 wild-type 일일초 뿌리로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR(Polymerase Chain Reaction) 분석을 수행 하였다. PCR 반응에 사용한 primer는 rolB(5'-CTT ATG ACA AAC TCA TAG ATA AAG GTT-3'; 5'-TCG TAA CTA TCC AAC TCA CAT CAC-3')와 *Agrobacterium* 오염여부를 확인하기 위한 Ri 플라스미드의 T-DNA의 바깥쪽 유전자인 *virC*(5'-GGC TTC GCC AAC CAA TTT GGA GAT-3'; 5'-TTT TGC TCC TTC AAG GGA GGT GCC-3') 또한 activation tagging line의 확인을 위한 35S enhancer 절편(5'-GATCCCCAACATGGTGGAGCACGA-3'/5'-TAGATATCACATCAATCCACTTGC-3')을 각각 이용하였다. PCR 수행조건은 DNA thermal cycler(GeneAmp PCR system 9700 Applied Biosystems)를 사용하여 94°C에서 5분 이어서 94°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서 2분간 30회 반복하였으며, 마지막으로 72°C에서 7분 처리하였다.

결과 및 고찰

일일초 모상근 유도 최적조건 확립

일일초 모상근의 독립적인 activation tagging line을 대량으로 확보하기 위해서는 가능한 한 모상근 유도율이 높은 최적의 품종을 선발해야 하므로 일일초의 품종별 모상근 유도율을 조사하였다. Pacifica Red를 비롯한 일일초 22 품종의 하배축 절편을 이용하여 모상근을 유도시킨 결과, 각 품종별로 8-40%의 다양한 모상근 유도율을 보였으며, 그 중 Cooler Coconut 품종(Fig. 2, No.3)이 7.3%로 가장 낮았고, Pacifica Deep Orchid 품종과 Cooler Orchid

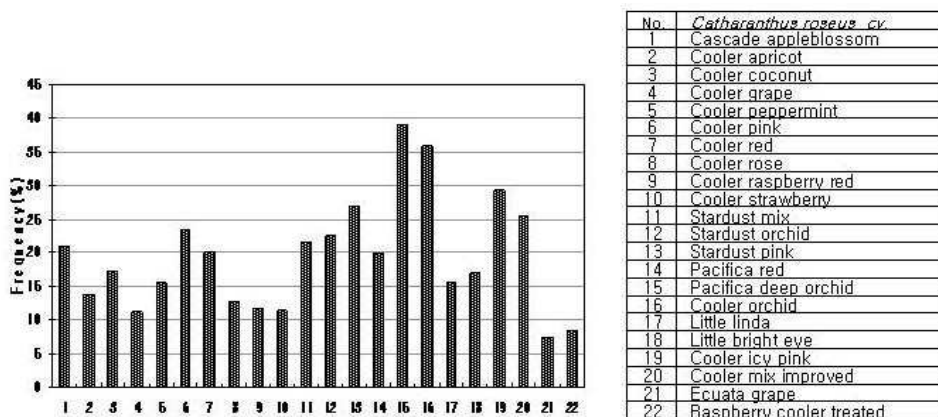


Fig. 2. Rate of hairy root induction from hypocotyl explants of various cultivar in *C. roseus*.

품종으로부터의 모상근 유도율이 각각 39%와 35%로 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 2). Bhadra *et al.* (1993)이, 일일초에서 모상근을 유도하여 알칼로이드 생산에 대한 논문을 보고한 이래, 현재까지 보고된 일일초 모상근에 대한 논문은 그다지 많지 않은 편인데, 발표된 논문 중에 모상근 유도에 사용한 일일초 품종은 주로 Little Bright Eye를 사용하였으며(Bhadra *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 1995), Prabal 품종을 사용한 예도 있다(Jaggi. *et al.*, 2011). 그러나, 보고된 대부분의 논문에서는 모상근 유도에 사용한 품종명이 기재가 되어 있지 않은 경우가 많으며, 다수의 품종에 있어서의 모상근 유도율에 대한 실험결과는 지금까지 제시된 예가 없다. 따라서 본 실험의 일일초 품종별 모상근 유도율의 결과는 향후 일일초로부터 대량의 독립적인 모상근 라인을 유도할 경우에 유용한 자료로 활용될 것이다.

한편, 일일초 성숙 식물체에서의 식물 조직별 모상근 유도율을 조사하기 위하여, Figure 2에서 모상근 유도율이 가장 높게 나타난 Pacifica Deep Orchid 품종을 이용하여 배측, 자엽, 잎 등 각 조직에서의 모상근 유도율을 조사하였다(Fig. 3). 그 결과 잎에서는 13% 정도의 모상근 유도율을 보인 반면, 배측에서는 38% 이상의 모상근 유도를 보였다. 한편, 자엽을 이용한 실험에서는 3% 이하의 지극히 저조한 유도율을 보였다. 이들 결과로부터, 일일초 모상근의 효율적인 대량생산에 있어서는 배측을 재료로 이용하는 것이 유효하다는 것을 알 수 있었다.

한편, 효율적인 모상근 초기 유도 배지를 선정하기 위하여, MS(Murashige and Skoog 1962), SH medium(Schenk and Hildebrandt, 1972) 등 8종류의 다양한 식물 배지에서 모상근 유도율을 조사하였다(Table 1). 그 결과, 배지의 종류에 따라 모상근의 유도율에 큰 차이가 나타남을 알 수 있었다. 즉, LS(Linsmaier and Skoog, 1965) 배지에서는 모상근 유도율이 4.7%로 저조하였고 절편 당 모상근 수도 1.3개로 나타났다. 그러나, WPM(Woody Plant Medium) 배지에서는 모상근 유도율이 43%로 가장 높았고, 절편 당 모상근 수도 3.3개로 가장 높았다. 일반적으로 모상근 유도시 가장 많이 쓰이는 배지는 식물 호르몬 무첨가의 Gamborg's B5 또는 1/2 B5(Gamborg *et al.* 1968)배지로, 본 실험에서는 B5배지를 사용했을 때의 유도율(27%)보다 WPM배지를 사용했을 때의 유도율(43%)이 더 높게 나타났다. 이들 결과로부터 일일초 모상근의 초기 유도에 있어서는 WPM이 유효하다는 것을 알 수 있었다.

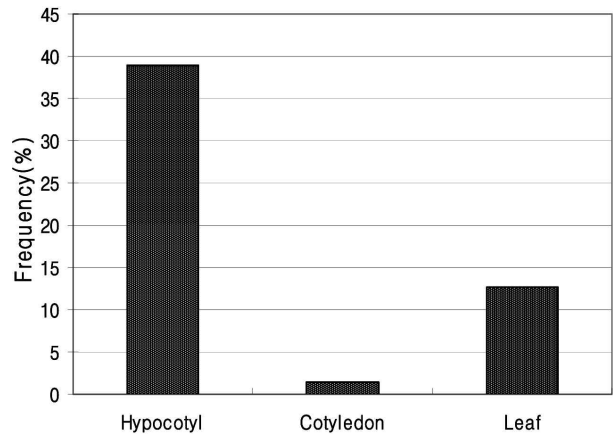


Fig. 3. Rate of hairy root induction of various tissues of *C. roseus* cv. Pacifica Deep Orchid.

Table 1. Effect of various media for induction of hairy root formation from leaf explants of *C. roseus*.

	Frequency (%)	No. of hairy root/ex
SH	21.7	1.93 ± 0.3
LS	4.7	1.30 ± 0.4
MS	8.7	1.25 ± 0.3
Nitch	18.0	1.55 ± 0.5
Knudson	6.8	1.25 ± 0.3
B5	27.0	1.68 ± 0.2
White	29.7	2.47 ± 0.5
WPM	43.3	3.33 ± 0.6

형질전환 모상근의 확인

형질전환된 일일초 모상근에서 도입 유전자를 확인하고자 형질전환 모상근 또는 wild-type 일일초 뿌리로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR 분석을 수행하였다(Fig. 4). PCR 분석 결과, 도입한 유전자, 즉, HPTII, CaMV 35S promoter, rolB 유전자에 대해서 모든 형질전환 모상근 개체로부터 특이적인 밴드의 증폭을 확인하였으며, 형질전환을 하지 않은 wild-type 일일초 뿌리에서는 특이적인 밴드의 증폭은 볼 수 없었다(Fig. 4A, B, D). 또한 *Agrobacterium*의 VirC 유전자의 특이적인 밴드가 증폭되지 않은 것으로 보아(Fig. 4C) 상기의 증폭된 밴드는 잔류 *Agrobacterium*에 의한 것이 아닌 형질전환된 모상근에 의해 특이적으로 증폭된 밴드임을 확인할 수 있었다.

결론적으로 본 연구로 안정적인 activation tagging된 일일초 모상근의 대량생산 시스템을 확립할 수 있었다. 최

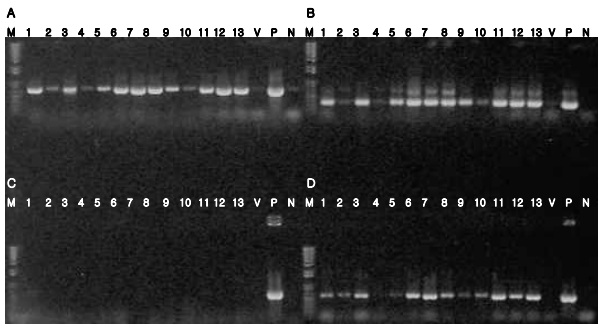


Fig. 4. Hairy roots induced by *A. rhizogenes* were confirmed using primers for amplifying. A: HPT II; B: CaMV 35s promoter; C: VirC 2; D: rol B genes. M; 1Kb ladder, 1-13 ; putative hairy roots, V; normal roots, P; positive control, N; negative control.

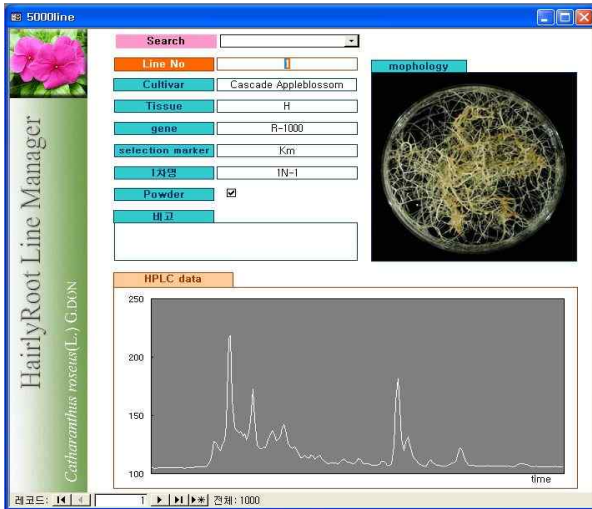


Fig. 5. Database and managing system of hairy root lines.

종적으로 약 2,500개의 독립적인 형질전환 일일초 모상근 line을 생산하였으며, 이들 모상근 line은 일일초 인돌알칼로이드 생합성 관련 유전자의 발굴 및 기능해석에 유용하게 쓰일 것이다. 또한, 일일초의 모상근의 경우 완전한 식물체로의 재생이 가능하므로(Choi *et al.* 2004) 필요에 따라 특정한 mutant line의 식물체 수준의 형태적 변화도 확인할 수 있는 이점이 있다.

일일초 모상근 생산 관리 시스템 및 database 구축

본 연구를 통해 개발한 대량의 모상근 라인의 효율적인 생산관리를 위하여 GMP(Good Manufacturing Practice) 즉, 의약품 제조 및 품질관리 기준방식을 적용하여 activation-tagged 모상근 라인 관리시스템을 구축 하였다. 이 시스템

에서는, Figure 5에 나타난 바와 같이, 품종명, 도입유전자, PCR 분석, plate 수, 시료무게 등 다양한 정보를 입력할 수 있도록 구성하였다. 한편, 생산된 대량의 모상근 라인의 라이브러리를 구축하기 위하여, 계대배양 후 3주 경과된 시점에서 모상근을 harvest하여 동결건조 시킨 후 ‘powder library’로 제작하였다. 이 powder library는 FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectrometry), PyMS(pyrolysis-mass spectrometry), NMR(Nuclear magnetic resonance) 등으로 다양하게 metabolic profiling을 하는데 이용하였다(data not shown). 또한 powder library는 향후 해당 모상근 mutant line의 DNA, mRNA, protein 분석에도 이용할 수 있을 것이다. 그리고 유도, 안정화된 모상근 라인들은 일련번호, 모상근 형태사진, 선발마커, HPLC 분석 결과 등과 함께 database를 작성하여 효율적인 관리 시스템을 구축하였다(Fig. 5). 그러므로, 이러한 관리 시스템에서는, activation-tagged 모상근을 powder library로 보존하면서 각 모상근 별로 분석 스펙트럼에 기초하여 metabolic DB를 구축함으로써, 분석 스펙트럼의 비교를 통하여 2차 대사산물의 생합성 과정에서 특정 대사산물의 생산이 매우 높거나 또는 현저한 감소를 보이는 metabolic mutants의 식별이 간단하게 이루어 질 수 있다는 것을 시사한다.

적 요

본 연구는 아그로박테리움을 이용한 기능획득 일일초 모상근의 대량생산을 위한 조건 확립에 대한 것이다. 본 연구에서는, 효율적인 형질전환 일일초 모상근 생산에 있어서의 최적의 일일초 품종의 선발과 최적의 일일초 조직을 결정하였으며, 또한 다양한 배지에 있어서의 모상근 유도를 조사 하였다. 최종적으로 약 2,500개의 독립적인 형질전환 일일초 모상근 line을 생산하였으며, 또한 이들을 이용하여, 대사체 연구를 위한 효율적 관리 시스템을 구축하였다. 이들 모상근 line은 일일초 인돌알칼로이드 생합성 관련 유전자의 발굴 및 기능해석에 유용하게 쓰일 것이다.

사 사

본 연구는 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업(2010-0029630)과 농촌진흥청 공동연구사업(PJ008078)의 지원으로 수행된 연구임.

인용문헌

- Bhadra, R., S. Vani and J.V. Shanks. 1993. Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* 41:581-592.
- Bouchez, D. and H. Hofte. 1998. Functional genomics in plants. *Plant Physiol.* 118:725-732.
- Busov, V., Y. Yordanov, J. Gou, R. Meilan, C. Ma, S. Regan and S. Strauss. 2011. Activation tagging is an effective gene tagging system in *Populus*. *Tree Genet. Gen.* 7(1):91-101.
- Choi, P.S., Y.D. Kim, K.M. Choi, H.J. Chung, D.W. Choi and J.R. Liu. 2004. Plant regeneration from hairy root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* 22:828-831.
- Favretto, D., A. Piovan, R. Filippini, R. Caniato. 2001. Monitoring the production yields of vincristine and vinblastine in *Catharanthus roseus* from somatic embryogenesis. Semiquantitative determination by flow-injection electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15:364-369.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50:151-158.
- Jaggi, M., S. Kumar and A.K. Shinha. 2011. Overexpression of an apoplastic peroxidase gene CrPrx in transgenic hairy root lines of *Catharanthus roseus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:1005-1016.
- Jeong, D.H., S. An, H.G. Kang, S. Moon, J.J. Han, S. Park, H.S. Lee, K. An and G. An. 2002. *Plant Physiol.* 130:1636-1644.
- Jung, K-H., S-S. Kwak., C.Y. Choi and J.R. Liu. 1995. Regulation of growth and catharanthine production by the intracellular phosphate level in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Korean J. Plant Tiss. Cul.* 22(4):183-187.
- Kuromori, T., S. Takahashi, Y. Kondou, K. Shinozaki and M. Masui. 2009. Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. *Plant Cell Physiol.* 50:1215-1231.
- Linsmaier E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:100-127.
- Lloyd, G.B. and B.H. McCown. 1980. Commercial-feasible micropropagation of mountain laurel-*Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 30:421-427.
- Magnotta, M., J. Murata, J. Chen and V. De Luca. 2007. Expression of deacetylvinoline-4-O-acetyltransferase in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Phytochemistry* 68:1922-1931.
- Mallol, A., R.M., Cusido, J. Palazon, M. Bonfill, C. Morales and M.T. Pinol. 2001. Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. *Phytochemistry* 57(3):365-371.
- Mathews, H., S.K. Clendenne, C.G. Coldwell, X.L. Liu, K. Konnors, N. Mathesis, D.K. Schuster, D.J. Menasco, W. Wagoner, J. Lightner and D.R. Wagner. 2003. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* 14:1689-1703.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Palazon, J., A. Mallol, R. Eibl, C. Lettenbauer, R.M. Cusido and M.T. Pinol. 2003. Growth and ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax ginseng* using a novel bioreactor. *Planta Med.* 69:344-349.
- Schenk. R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian J. Bot.* 50:199-204.
- Seki, H., T. Nishizawa, N. Tanaka, Y. Yasuo, S. Yoshida and T. Muranaka. 2005. Hairy root-activation tagging: a high-throughput system for activation tagging in transformed hairy roots. *Plant Mol. Biol.* 59:793-807.
- Tani, H., X. Chen, P. Nurmberg, J.J. Grant, M. SantaMaria, A. Chini, E. Giloy, P.R.J. Birch and G.J. Loake. 2004. Activation tagging in plants: a tool for gene discovery. *Funct. Integr. Genomics* 4:258-266.
- van der Fits, L. and J. Memelink J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289:513-521.
- van der Heijden, R., D.I. Jacobs, W. Snoeijer, D. Hallard and R. Verpoorte. 2004. The *Chatharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr. Med. Chem.* 11:607-628.
- Wang, C-T., H. Liu, X-S. Gao and H-X. Zhang. 2010. Overexpression of *G10H* and *ORCA3* in the hairy roots of *Catharanthus roseus* improves chatharanthine production. *Plant Cell Rep.* 29:887-894.
- Weigel, D., J.H. Ahn, M.A. Blazquez, J.O. Borevitz, S.K. Christensen, C. Fankhauser, C. Ferrandiz, I. Kardailsky, E.J. Malancharuvil, M.M. Neff, J.T. Nguyen, S. Satio,

Z.Y. Wang, Y. Xia, R.A. Dixon, M.J. Harrison, C.J. Lamb, F. Yanofsky and J. Chory. 2000. Activation Tagging in Arabidopsis. Plant Physiol. 122:1003-1013.

Woo, S.S., J.S. Song, J.Y. Lee, D.S. In, H.J. Chung, J.R. Liu and D.W. Choi. 2004. Selection of high ginsenoside producing

ginseng hairy root lines using targeted metabolic analysis. Phytochemistry 65:2751-2761.

(접수일 2011.7.14; 수정일 2011.8.8; 채택일 2011.8.23)