

*Agrobacterium rhizogenes*에 의한 hairy root 형성에 대한 생리학적 연구 ;
IV. Hairy root 배양 및 배양 조건에 관한 조사

황 백·안 준 철·*이 재 혁
전남대학교 자연과학대학 생물학과, *문교부 편수관

Physiological Studies on the Formation of Hairy Root by the *Agrobacterium rhizogenes* ; IV. Culture of Hairy Root and Survey of the Culture Condition.

Baik Hwang, Jun Cheul An and Jae Hyuk Lee *
Dept. of Biol., Chonnam Natl. Univ., *Senior Coordinator of Ministry of Education.

ABSTRACT

Hairy roots of carrot were induced by *Agrobacterium rhizogenes* A₄ strain within about 2-4 weeks after inoculated from root disc. Early axenic culture is established in RCM agar medium and following is in MS rigid medium.

After 15 days culture, the hairy roots were vigorous growth in about 10 times of initial inoculum. Anthocyanin contents of hairy roots were more than of ordinary roots. 2, 4-D (10^{-4} mg / l), sucrose (5%), nitrogen source (0.03M) contained medium was optimized to growth of hairy root and contents of anthocyanin.

Phenotypic alterations of leaves are observed in transformed plants and determined the transformation of hairy roots and the transformed plants by opine assay.

서 론

그람 음성 세균인 *Agrobacterium rhizogenes*는 많은 쌍자엽 식물의 감염부위에서 소위 hairy root로 불리는 병을 일으킨다(6).

이것은, 이들 bacteria가 root-inducing(Ri) plasmid를 갖고 있으며(20, 34) 이 Ri-plasmid의 일부분인 transfer(T)-DNA가 식물세포 유전자내에 삽입되어(4, 32) T-DNA 상의 일부 유전자가 식물 호르몬인 auxin과 cytokinin의 합성에 관여하는 효소의 합성을 encode하고 있어(35) 외부에서의 호르몬 공급없이도 자체 합성된 이들 호르몬의 조성에 의하여 부정근이 유도되는 현상으로 밝혀져 있다(29). 삽입된 T-DNA의 일부 다른 유전자는 opine이라는 특이한 화합물을 형성함에 따라(25, 31) T-DNA에 대한 형질전환의 표시로서 이용하고 있다. Ri-plasmid에 의하여 형질전환된 이러한 부정근은 식물호르몬이 없는 배지에서 정상뿌리보다 훨씬 빠른 성

장속도를 보이고(8, 15, 23, 33) 세포배양에 비하여 오랜 배양기간에도 염색체 구조나 핵형에서 안정하여(1) 2차 대사산물의 형성에 있어 모식물체와 같거나 그 이상을 안정적으로 함유하게 된다(13, 15, 16, 23, 30). 최근에는 hairy root의 이러한 특징을 이용하여 in vivo 배양을 통한 약용, 방향성물질 및 색소 등의 다양한 2차대사산물을 얻고자 하는 많은 시도가 이루어지고 있다(8, 15, 23).

본 연구에서는 여러가지 유용한 2차대사 화합물을 함유하는 국내외의 유용 식물체에 대한 적용 가능성 타진 및 당근에 있어 anthocyanin의 대량 생산을 위한 예비실험의 하나로 hairy root의 배양과 배양조건에 따른 성장률 및 anthocyanin 함량의 변화를 알아보고 Ri-plasmid에 의하여 형질전환된 당근의 형태적인 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

균 배양

A. rhizogenes A₁ strain을 potato extract medium (sucrose 2%, agar 1.4%)에 2일간 사면배양(26±1°C)한 후 무균수에 희석하여 사용하였다.

균 접종 및 hairy root 유도

당근(*Daucus carota* L.)뿌리를 2% sodium hypochlorite 용액과 2% 유한락스에 각각 5분, 10분간 표면을 살균한 다음 무균수로 세척, 2-3 cm 두께로 절단하고 약 5×10¹⁰ /ml의 균을 접종하여 27±1°C 암소에서 배양하여 hairy root를 유도하였다(11).

Hairy root 배양

무균적인 hairy root를 얻기 위해 disc 상의 hairy root 끝 부분을 1-1.5 cm 길이로 절단하여 R. C. M. 고형 배지를 이용, 오염되지 않고 활발히 자라는 끝부분만을 다시 절취하여 2-3회 계대배양하였고 이후 MSO (sucrose 3%, pH 5.8) 액체 배지를 이용하여 rotary shaker (27±1°C, 110 rpm)에서 3주 간격으로 1년간 계대배양하였다. 형질전환된 hairy root와의 성장 비교를 위한 대조구로써의 ordinary root는 당근 callus에서 분화된 유식물체의 뿌리를 이용하였다.

Opine 분석

Mannopine과 agropine 분석은 Petit 등(24)의 방법에 의하였다. 45°C로 고정된 dry oven에서 건조된 조직 0.1 g에 증류수 1 ml를 첨가, 30분간 중탕하여 추출액 50 μl를 freeze dryer(LABCONO Co. Model 13) 하에서 감압 증발시킨 후 10 μl의 증류수로 재 용해시켜 3-5 μl를 Whatman 3MM paper에 점적하고 horizontal electrophoresis system(LKB Co. Model 2217)을 사용하여 1500 V로 50분간 전기영동하였다. 완충용액은 formic acidiacetic acid: distilled water를 30:60:910의 비율로 조성하였고 전기영동이 끝난 후 paper를 건조, 염색액 A (1g AgNO₃를 소량의 증류수에 녹인 후 200 ml의 acetone을 가한다)에 담구어 30분 정도 염색시킨 다음 다시 건조, 염색액 B (2% NaOH in 30% MeOH)에 담구어 발색 건조하여 NH₄OH로 여분의 AgNO₃를 씻고 5% Na₂S₂O₃ 용액에 고정하여 1시간 이상 흐르는 물로 세척하였다.

배지조성에 따른 성장 및 anthocyanin 함량 조사

배지별 성장 및 anthocyanin 함량을 조사하기 위하여 식물 호르몬이 첨가되지 않은 White, B₅, N₆, MS, AA 등의 배지를 사용하였으며 기타 성장물 및 anthocyanin 함량 측정을 위한 배지로는 MSO 배지 (sucrose 3%, pH 5.8)를 기본배지로 하였다. 생장조절제로는 2,4-D와 kinetin을 각각 단독처리, 조사하였으며 기타 sucrose,

질소원등의 양적변화 및 pH의 변화에 따른 성장물과 anthocyanin 함량의 변화를 조사하였다. 성장물 조사방법은 30 ml의 배지를 함유한 100 ml 삼각 플라스크에 0.5 g (F. W)의 hairy root를 접종하여 rotary shaker (27±1°C, 110 rpm)에서 15일간 액체배양한 후 여과지로 묻어 있는 배지를 충분히 제거하여 fresh weight를 측정하였다.

Anthocyanin 분석 방법은 hairy root 1g(f.w)의 조직에 extraction buffer(1% HCl/MeOH) 5 ml를 첨가하여 shaker(4°C, 40rpm)에서 24시간 동안 색소를 추출시킨 후 4000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 spectrophotometer(Gilford-Model-Response)를 사용하여 530 nm의 파장에서 O. D를 측정하였다(17). Anthocyanin 분석에 대한 대조구로써 ordinary root는 성숙한 당근 뿌리를 사용하였다.

재분화

Hairy root를 2,4-D 2mg/l, Kinetin 2mg/l로 조성된 MS 고형배지 (sucrose 3%, pH 5.8)에서 callus화한 후 호르몬이 첨가되지 않는 MSO 배지로 옮겨, 빛 (1000lux-2000 lux)하의 배양실(27±1°C)에서 재분화시켰다.

결과 및 고찰

Hairy root 유도

Disc에 균을 접종하여 2-4주 후면 형성층 부위를 중심으로 많은 hairy root가 나타나며 일부 disc에서는 hairy root가 직접 유도되는 것도 있지만 대부분의 disc에서는 tumor가 먼저 형성되고 그로부터 hairy root가 유도되었다 (Fig. 1).

Hairy root 유도

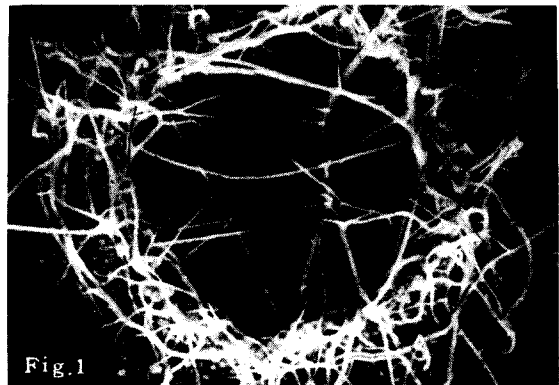


Fig. 1. Induced hairy roots on carrot discs treated with *A. rhizogenes* after 2 weeks.

Ordinary root 의 1.25배에 비하여 hairy root 에서는 약 10배 이상의 증식을 보였으며 일반적인 세포 배양과 동일한 growth curve 를 보였다(Fig. 2,3). 3주 배양하였을 때 3.75배의 증식률을 보인 *Panax ginseng*(8), 20배의 *Beta Vulgaris* 와 30배의 *Nicotiana rustica* (9), 그리고 60배의 *Atropa belladonna* (13)등의 성장률에 비하여 당근의 hairy root 는 비교적 저조한 성장을 보였고, 이러한 중간에 있어서의 성장률의 차이는 탈분화된 callus 와는 달리 뿌리로서의 형태를 갖춘 hairy root 는 본 식물의 성장에 영향을 주는 유전적 특성에 영향을 받기 때문인 것

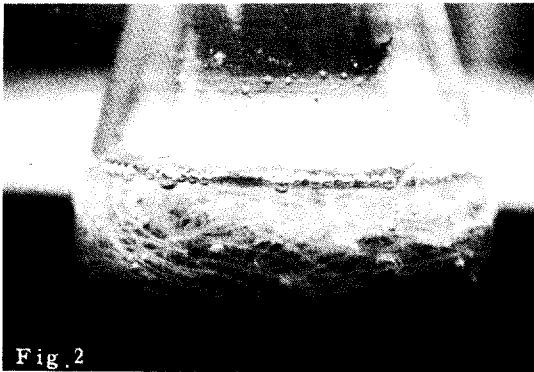


Fig. 2. Hairy roots cultured in MS medium (sucrose 3%, pH 5.8)
*The first inoculum ca. 0.5g (f.w) 15 days culture

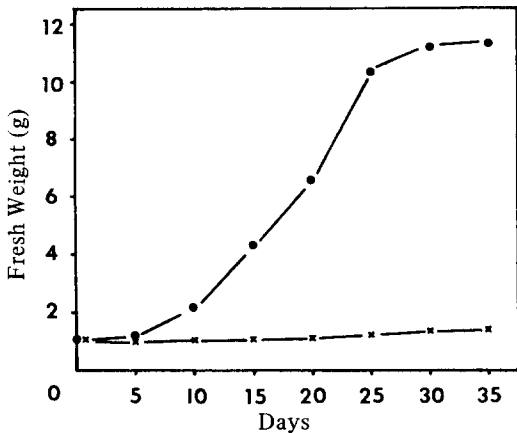


Fig. 3. Growth of transformed hairy roots and ordinary roots in MS medium (sucrose 3%, ph 5.8)
●—● transformed hairy roots
x—x ordinary roots
*The first inoculum ca. 1 g (f.w) 35 days culture.

으로 보인다.

즉 다년생 식물보다는 일년생, 특히 뿌리의 발달이 활발한 식물이 hairy root 에서도 보다 성장이 양호할 것으로 사료된다.

배지조성에 따른 성장 및 anthocyanin 분석

성장에 있어서는 AA 와 MS 배지가 가장 양호하였고 B₅ 와 MS 배지가 가장 높은 anthocyanin 함량을 보였다(Fig. 4). 이러한 결과는 *Euphorbia millii* 배양 세포의 anthocyanin 생성에 대한 Kim 등(10)의 보고와 일치하며 비교적 고농도의 무기염을 함유한 MS 배지에서

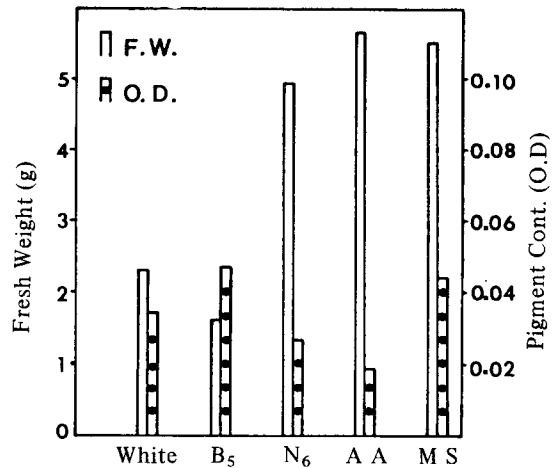


Fig. 4. Effects of various media (sucrose 3%, pH 5.8, White ph 4.8) on growth and anthocyanin contents in transformed roots.
*The first inoculum ca. 0.5 g (f.w) 15 days culture.

성장 및 색소함유가 가장 양호하였다.

2,4-D 가 1 ml / 1 이상 첨가된 배지에서는 성장이 거의 정지되었고 저농도인 10⁻⁴ ml / 1에서는 호르몬이 첨가되지 않은 대조구에 비해 상당한 증가를 보였으며 anthocyanin 함량에는 증감을 보이지 않음(Fig. 5) auxin 의 일종인 IBA (2ml / 1)의 첨가로 *Panax ginseng* hairy root 의 성장률을 증가 시킨 Furuya 등(8)의 보고와 유사하였다. Kinetin 을 1 ml / 1 이상 처리하였을 때는 callus 가 유기되기 시작하였으며 1 ml / 1 이하에서는 대조구에 비해 성장률, 색소함유에 별다른 영향을 미치지 못하였다(Fig. 6). 한편 Ozeki 등(22)은 당근 세포배양에서 2, 4-D 가 anthocyanin 합성의 억제에 관여한다고 보고한 반면에 Matsumoto 등(19)은 poplar 에서 2,4-D 가 촉진의 역할을 한다고 보고한 상반된 결과에 비하여 본 실험

험에서는 2,4-D의 첨가로 증가되는 성장률에 비하여 anthocyanin 함량에는 증·감을 보이지 않았다. 이는, 세포 배양에 비하여 뿌리의 형태가 유지되는한 2차 대사물의 생성에 있어 외부호르몬의 영향을 크게 받지 않은 것으로 생각된다.

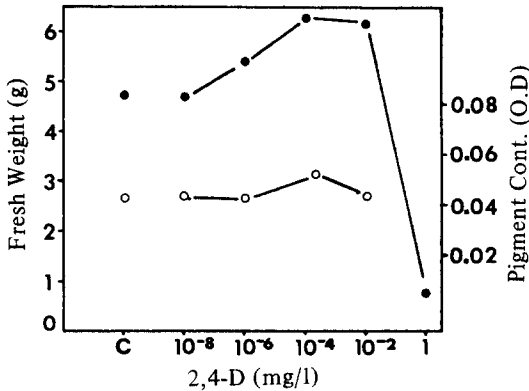


Fig. 5. Effects of 2,4-D on growth and anthocyanin contents in transformed roots on MS medium (sucrose 3%, pH 5.8)

●—● fresh weight
○—○ anthocyanin contents
C: control

*The first inoculum ca. 0.5 g (f.w) 15 days culture.

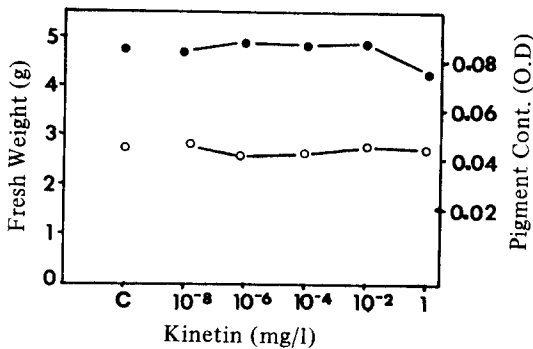


Fig. 6. Effects of kinetin on growth and anthocyanin contents in transformed roots on MS medium (sucrose 3%, pH 5.8).

●—● fresh weight
○—○ anthocyanin contents
C: control

*The first inoculum ca. 0.5 g (f.w) 15 days culture.

pH3 이하에서는 hairy root의 성장이 정지되었으며 pH 4~8까지의 넓은 범위에서는 성장률에 커다란 변화를

보이지 않았고 pH 8에서는 anthocyanin 함량에 있어 다소 감소를 보여 (Fig. 7) pH의 고·저 처리에 의한 성장 및 색소함량의 증가 효과는 나타나지 않았다.

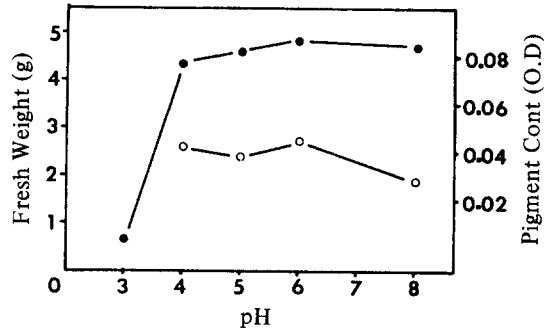


Fig. 7. Effects of pH on growth and anthocyanin contents in transformed roots in MS medium (sucrose 3%).

●—● fresh weight
○—○ anthocyanin contents

*The first inoculum ca. 0.5 g (f.w) 15 days culture.

기본배지의 3%에 비하여 sucrose 농도를 5%로 증가 하였을때 성장률에 있어서 상당한 촉진효과가 나타났으나 anthocyanin 함량은 상대적으로 증가되지 않았고 성장률이 낮은 sucrose 1%, 9%처리구에서는 색소함량이 오히려 단위 무게당 증가함을 보여주었다 (Fig. 8). *Catharanthus roseus* (14)와 poplar (19)의 세포배양에서는 높은 sucrose 농도(8%)하에서 anthocyanin 생성의 촉진효과를 보고하였고 *Dimorphotheca sinuata* (2)에서는 오히려 억제작용을 보고하였다. 본 실험에서는 sucrose 농도(탄소원)의 적절한 함유가 hairy root의 성장속도에 있어 중요하게 작용하며 9%에서는 물론 저농도인 1%에서도 색소함량에서 증가를 보여 성장속도의 감소에 따른 상대적인 색소형성의 증가 및 고농도(9%)에서는 성장률 감소이상의 색소함량 증가를 보여 Knobloch 등(14)의 결과에 어느 정도 유사함을 나타내었다.

2차 대사물의 생성에는 배지내의 질소농도 및 질소원에 따라 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있는데 본 실험에서는 0.05 M, 0.03 M의 농도(NH₄NO₃:KNO₃를 동일한 몰 비로 조성)에서 각각 최대 성장 및 최대 색소함량을 보여주었고 (Fig. 9) NO₃⁻에 대한 NH₄⁺비의 증가에 따라 성장은 감소 되었으며 anthocyanin의 함량은 오히려 증가를 나타내었다 (Fig. 10). 0.03 M 이상에서는 농도의 증가에 따라 성장은 감소되었으며 색소함량은 크게 증감을 보이지 않았다. 본 실험에 있어 NH₄⁺의 적절한 함유가 색소형성에 유리한 점은 *Euphobia*

milli 배양 세포에서의 anthocyanin 형성에 관한 Kim 등 (10)의 보고와 일치하였으나 Fujita(7)는 *Lithospermum erythrorhizon* 의 shikonin 생성에 있어 NH_4^+ 를 제거한 배지에서 최대 색소형성을 보고하여 배양조건이나 재료에 따라 차이를 시사하였다.

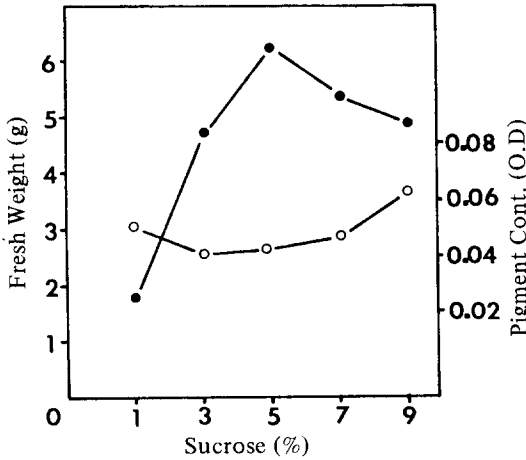


Fig. 8. Effects of sucrose concentration on growth and anthocyanin contents in transformed roots on MS medium (pH 5.8).

●—● fresh weight
○—○ anthocyanin contents
*The first inoculum ca. 0.5 g (f.w) 15 days culture.

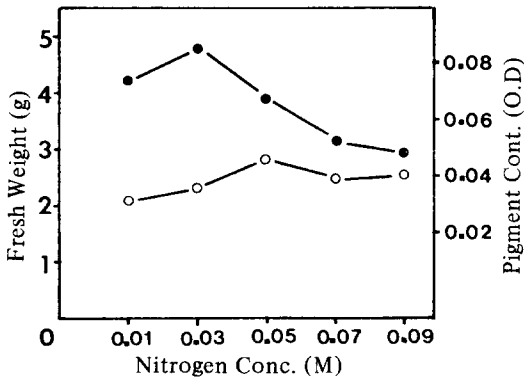


Fig. 9. Effects of nitrogen (NH_4NO_3 : KNO_3 = 1:1) concentration on growth and anthocyanin contents in transformed roots on MS medium (sucrose 3%, pH 5.8).

●—● fresh weight
○—○ anthocyanin contents
*The first inoculum ca. 0.5 g (f.w) 15 days culture.

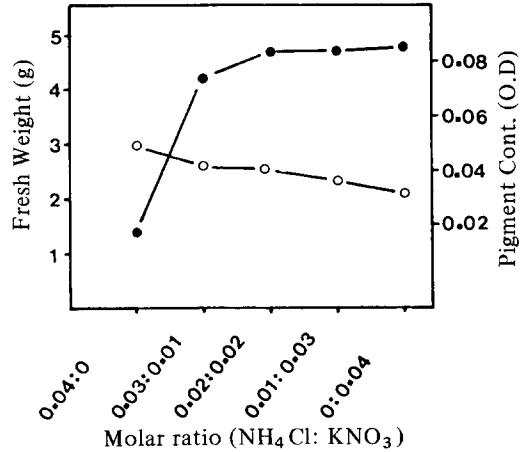


Fig. 10. Effects of ammonium (NH_4^+) as nitrogen source on growth and anthocyanin contents in transformed roots on MS medium (sucrose 3%, pH 5.8).

●—● fresh weight
○—○ anthocyanin contents
*The first inoculum ca. 0.5 g (f.w) 15 days culture.

재분화

일단 callus 로 전환시킨 후에서만 재분화가 가능하였다. 이러한 결과는 Tepfer 등(31)의 당근 hairy root 재분화에 대한 연구에서도 이미 확인된 바 있다. Matsui 등 (18)은 horse radish 를 재료로 빛하의 hairy root에서 직접 부정아를 형성시켜 재분화가 가능하다는 것을 보여 주었다. 정상 당근에 비하여 재분화된 당근의 형태적 차이는 다른 보고(18,29,20)와 일치하여 잎이 주글주글하고 엽맥이 짧으며 잔뿌리가 많이 형성되는 특징을 보인다 (Fig. 11).

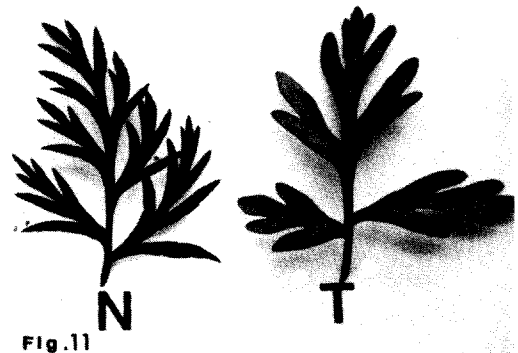


Fig. 11. Leaves of normal (N) and A.rhizogenes transformed (T) carrot plants.

Opine 분석

대조구에 비하여 disc 상의 hairy root와 1년 이상 배양된 hairy root 및 hairy root로부터 재분화된 식물체만이 표준시료로 사용한 mannopine 과 같은 위치에서 band 를 확인할 수 있었다(Fig. 12). 대조구인 ordinary root에서도 mannopine 의 위 아래 위치에 미지의 물질이 확인되지만 표준 시료인 mannopine 과 다소 틀린 Rf 값을 보여 mannopine 이 존재하지 않는 것으로 확인된다. 이 결과는 *A. rhizogenes* 를 이용하여 당근 조직에의 형질전환에 대한 Hwang 등(12)의 결과 및 *Calystegia sepium* 의 형질전환된 hairy root에서 mannopine 의 존재만을 확인한 Tepper 등(30)의 결과와 일치하였다. Kamada 등(13)과 Tepfer (29)는 T-DNA 의 존재하에서도 오랜 배양에 따른 Opine 합성 유전자의 불안정을 보고하였으나 본 실험에서는 1년이상 배양된 hairy root 및 재분화된 식물체에서도 안정된 mannopine 형성을 보여 재분화된 식물체에서도 확인할 수 있었던 Rech 등(26)과 Tempe 등(28)의 보고와 동일한 결과를 나타내었다.

요 약

*Agrobacterium rhizogenes*에 의하여 유도된 당근(*Daucus carota* L.)의 hairy root를 배양하였으며 opine 유무에 대한 형질전환 확인 및 배지조성을 달리하여 성장물에 따른 색소함량을 비교하였고, 재분화된 식물체의 형태적 차이를 관찰하여 몇가지 결론을 얻었다.

Hairy root는 균 접종 2-4주 후에 형성층 부위를 중심으로 유도되었다. 유도된 hairy root의 초기 배양에는 R. C. M. 배지가 적합하였으며 MSO (2, 4-D 10⁻⁴ ml / 1, pH 6, sucrose 5%, 질소원 0.03 M 등)에서 최대 성장을 보여주었고 성장의 증가에 따른 색소의 형성은 비교적 안정하였다. 재분화된 식물체는 정상 식물체에 비하여 형태적으로 차이를 나타내었으며 형질전환된 hairy root 및 재분화된 식물체에서 mannopine 분석으로 Ri-plasmid에 의한 형질전환이 이루어졌음을 확인하였다.

감 사

본 연구는 1988년도 문교부 기초과학 연구조성비 일부의 지원에 의한 것임.

Abbreviations.

- RCM - Root Culture Medium(after White, as modified by Street and Mcgregor, 1952).
- MSO - MS Medium not contained plant hormone.

참 고 문 헌

1. E.L.H. Aird, J. D. Hamill & M. J. C. Rhodes(1988) *Plant cell tissue organ culture*, **15**; 47-57.
2. E.A. Ball & J. Arditti(1974) *Am. J. Bot.***61**, Suppl. 5.33.
3. D.N. Butcher & H. E.Street(1964) Excised root culture. *Botanical Review*, **30**; 513-86.
4. M. Chilton, D. A. Tepfer, A. Petit, C. *Nature* **295**; 432-434.
5. P. Christen, M. F. Roberts, J. D. Phillipson & W. C. Evans(1989) *Plant Cell Reports*, **8**; 75-77.
6. C. Elliot(1951) *Manual of Bacterial of Bacterial plant pathogens* 2nd rev. edl Chronica Botanica, Walton, Mass.
7. Y. Fugita(1985) *ph. D. Thesis*, Gyungi collage.
8. T. Fugita, & T. Yoahikawa(1987) *Plant Cell Report*, **6**; 449-453.
9. J. D. Hamill, A. J. Parr, R. J. Robins, & M. J.

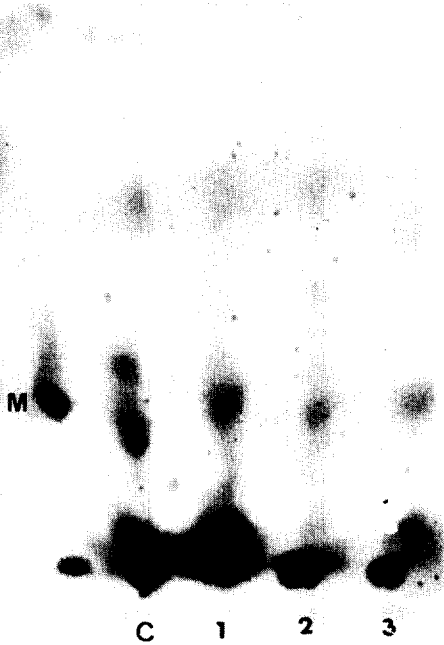


Fig. 12. Paper electrophoresis analysis of extracts from transformed roots and plant of carrot

- M) mannopine standard**
- 1) ordinary roots**
- 2) transformed roots**
- 3) transformed plants**

- Rhodes(1986) *Plant Cell Reports*, **5**; 111-114.
10. H. R. Kim, J. H. Seon, S. Y. Ha, P.S. O & H. W. Suh(1988) *Korean J. Plant Tissue Culture*, **2**; 111-120.
 11. B. Hwang, D. Y. Cho, & S.S. Hong(1986) *Korean J. Bot.* **29(4)**; 2274-283.
 12. B. Hwang, Y. H. Kang, I. S. Whi, U. B. LIM, H. S. Cheong, & B. S. Pyo(1986) *Korean S. Plant Tissue culture*, **16(1)**; 25-32.
 13. H. Kamada, N. Okamura, M. Satake, H. Harada, & k. Shimomura(1986) *Plant Cell Reports*, **5**; 239-242.
 14. K. H. Knobloch, G. Bast, & J. Berlin(1982) *Medium and light induced formation of serpinine and anthocyanin in phytochemistry*, **21**; 591-594.
 15. E. Knopp, A. Strauss, & W. Wehrili(1988) *Plant Cell Reports*, 7590-5.
 16. Y. Mano, S. Nabehsima, C. Masui, & H. Obekawa(1986) *Agri. biol, Chem.*, **50(11)**; 2715-2722.
 17. N. Masayuki, & Y. Hitoshi(1985) *Plant Cell Reports*, **4**; 252-255.
 18. C. Matsui, t. Noda, N. Tanka, Y. Mano, S. Nabeshima, & H. Ohkawa(1987) *Plant Cell* **6**; 283-286
 19. T. Matsumoto, K. Nishida, M. Noguchi, & E. Tamaki(1973) *Agri. Biol. Chem.*, **37**; 561-567.
 20. L. Moore, G. Warren, & G. Strobel(1979) **2**, 167-626.
 21. T. Murashige, & F. Skoog(1962) *Physiol. Plant*, **15**; 473-479.
 22. Y. Ozeki, & *Plant Cell physiol* **27(7)**; 7731-1368.
 23. A. J. Parr, A. C. J. Peeress, J. D. Hamill, N. J. Walton, R. J. Robins, & M. J. C. Rhode (1988) *Plant Cell Reports*, **7**; 309-312.
 24. A. Petit, A. Berkaloff, & J. Tempe(1986) *Mol. Gen. Genet.*, **202**; 388-393.
 25. A. Petit, C. David, G. A. Dahl, J. G. Ellis, P. Guyon(1983) *Mol. Gen. Genet.*,
 26. E. L. Rech, T. J. Golds, N. Hammatt, B. J. Mulligan & M. R. Davey(1988) *J. of Exp. Bot.* **206**; 1275-128.
 27. H.E. Street & S. M. Megregor(1952) *Annals of Botany*, **16**; 185-205.
 28. J. Tempe, M. H. Brillanceau, & C. David(1989) *Plant Cell Reports*, **8**; 63; 66.
 29. D. Tepfer(1984) *Cell* **37**; 957-967.
 30. D. Tepper & G. Jung(1987) *Plant Sci*, **50**; 145-151.
 31. D. Tepper, & J. Tempe(1981) *Production d agropine par des se ances de l Academie des sciences*. Pairs, **292**; 153-6.
 32. M. F. Thomashow, R. Nutter, A. L. Montoya, M. P. Gorden & E. W. Nester(1980) *Cell*, **19**; 729-739.
 33. S. C. Van De Geign, J. Helder, H. G. Van Hooren & CH. H. Hanishch Tencate(1983) *Plant and soil* **11**; 283-28.
 34. F. F. White, & White, & E. W. Nester(1980) *J. Bacteriol.*, **141**; 1134-1141.
 35. F. F. White, B. H. Taylor, G. A. Huffman, M. Gorden, & E. Nester(1985) *J. Bacteriol*, **141**; 1134-1141.

(Received November 20, 1989)