

*Agrobacterium rhizogenes*에 의한 人蔘(*Panax ginseng* C. A. Meyer)根 組織에서
의 Hairy Roots 誘導 및 培養

黃 柏·高庚珉
全南大學校 自然科學大學 生物學科

Induction and Culture of Hairy Roots from Ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer)
Roots Discs by *Agrobacterium rhizogenes*

Baik Hwang and Kyeongmin Ko
Dept. of Biology, Chonnam Natl. Univ.

ABSTRACT

Induction and culture of hairy roots from ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) roots discs by *A. rhizogenes* strain A₄ were studied.

After 6-12 weeks infected with *A. rhizogenes*, tumor and hairy roots emerged from the root discs. The ratio of hairy roots induction on roots discs was higher in 5-year old than in 3, 4, and 6-year old ginseng. On treatment with IAA, IBA, 2, 4-D and tryptophan, hairy roots formation showed a significant increase at 15-30mg/l tryptophan treated.

Subsequently, hairy roots were cultured on hormone-free RCM medium(pH 4.5, sucrose 30g/l).

緒 論

식물체가 자연상태에서 성장할때, 그들이 생산해내는 2차대사산물(pigments, perfumes, drugs, alkaloids 등)은 재배 및 기후조건등에 따라 증식속도 뿐만아니라 자체 물질대사에 의하여 영향을 받게 된다. 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위하여 기내(in vitro)에서 세포 배양 기술을 이용하여, 다량의 유용물질을 생성할 수 있게 되었으며 최근에는 생약제 및 기타 중요한 화합물들을 대량생산할 수 있는 방법에 있어 많은 진보를 하고있다(1-9).

Chromosomal DNA 외에 Ri-plasmid를 갖는 *A. rhizogenes*를 식물조직에 접종하여 유도된 hairy roots의 배양방법은 고전적인 세포배양 방법에 비해 유전적으로 안정성을 나타내며, 증식속도가 빨라 다량의 2차 대사산물의 획득에 있어 많은 잇점을 가져올 수 있다(4-5, 10-11). *A. rhizogenes*가 갖는 Ri-plasmid는 많은 쌍자엽 식물 세포의 genomio DNA 내로 자신의 T-DNA를 도입하여 세포의 형질전환을 야기시키며 형질전환된 식물체

또는 auxin과 cytokinin의 합성을 촉진시켜 hairy roots를 형성하고 opine이라는 화합물을 합성하게 된다(12-15).

생약제로 널리 알려진 인삼은 saponin 이외에 단백질, 지방산, 각종 탄수화물, 스테로이드 등이 다량 존재하고 있으며 그중 panaxadiol과 panaxatriol계의 saponin은 인삼에만 내재되어 있는 유효성분중의 하나로 밝혀져 있으나 다년생 숙근 식물로서 세대기간이 길며 재배조건이 까다로운 문제점이 있다(7, 16-17).

본 연구에서는 기내에서 인삼에 존재하는 2차 대사산물(예, saponin류) 및 hairy roots의 대량생산을 위한 기초 자료를 얻고자 인삼 근 조직 절편에 *A. rhizogenes*를 접종하여 hairy roots 유도 및 hairy roots의 배양조건을 조사하였다.

材料 및 方法

균주배양

Agrobacterium rhizogenes strain A₄ (agropine type)를 potato extracts medium (2% sucrose)에서 48시간 진탕

배양하여 사용하였다.

인삼 추출물에 의한 균의 생존력 조사

*A. rhizogenes*의 증식에 미치는 인삼추출물의 효과에 대한 조사는 Evans 등(3)의 방법을 변형하여 사용하였다. 5년근 인삼 5g과 10g (F. W)으로부터 증류수를 사용하여 조직을 균질화 한 후 3500×g에서 30분간 3회 원심분리하여 상등액을 millipore filter(pore size 0.45 μm)로 여과하여 인삼추출액 7.1 ml를 균주성장배지에 첨가시켜 시간의 경과에 따른 균체수의 증감을 Haemocytometer로 조사하였다.

또한 생존력조사는 Gahan과 Kalina(18)의 방법에 의하였다. 위의 배양조건에서 성장한 균 100 mg (F. W)을 0.2% INT [2-(p-iodophenyl)-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium choride] solution으로 염색하여 30분간 incubation (27°C) 시킨후 80°C에서 95% ethanol로 색소를 추출, 15,000×g로 10분간 원심분리하여 상등액을 spectrophotometer (Gilford-Model-Response)를 사용하여 530 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

인삼조직절편에서의 균 접종

產地로부터 구입한 인삼을 70% ethanol로 15분, 7% sodium hypochlorite로 20분간 표면 살균하여 무균수로 3회 세척한뒤 1-1.5 cm 두께로 절단하여 48시간 액체 배양한 균(2×10⁸ bacteria/ml)을 뿌리의 한쪽면에 접종하여 agar plate가 들어있는 petri dish (15×2.5 cm)에서 암배양하였다(26±1°C).

Hairy roots의 유도 및 배양

균 접종후 10-12주가 지나 발근되는 hairy roots를 생장점 부위로부터 0.5-1 cm를 절단하여 400 mg/l Carbenicillin, 100 mg/l Vancomycin, 100 mg/l Ampicillin이 첨가되어 있는 hormone-free MS RCM (modified White medium) 배지에 배양시켰으며, 6주후 항생제가 첨가되어 있지 않은 동일한 배지로 옮겨 배양하였다.

Hairy roots 유도에 미치는 식물호르몬의 영향

Hairy roots 유도율을 향상시키기 위한 방법으로 식물 호르몬인 2,4-D, IAA, IBA 및 진주물질인 tryptophan을 각각 농도별로 agar plate에 첨가하여 hairy roots의 유도에 미치는 영향을 보았다.

Opine 분석

Hairy roots의 형질전환확인인 Petit 등(19)의 방법을 변형하여 사용하였다. 0.5g (F. W)의 hairy roots를 경

시적으로 채취하여 70% ethanol 3ml로 마쇄한 후 15,000×g, 10분간 원심분리하여 상등액을 freeze dryer (LABCONO Co. Model 13)하에서 감압 증발시킨 후 10μl의 증류수로 재 용해시켜 5μl를 Whattman 3 MM paper에 점적하고 horizontal electrophoresis system (LKB Co. Model 2217)을 사용하여 1500 V, 40분간 전기영동 하였다. 완충용액은 formic acid; acetic acid; D. W를 30; 60; 910의 비율로 조성하였고, 전기영동이 끝난 후 paper를 건조, 염색액 A (1g AgNO₃ in 200 ml acetone)에 담구어 30분간 염색시킨 후, 염색액 B (2% NaOH in 30% Methanol)에 담구어 발색, 건조하여 6N NH₄OH로 여분의 AgNO₃ 용액에 고정하여 1시간 이상 흐르는 물로 세척하였다.

結果 및 考察

인삼 추출물에 의한 균의 생존력 측정

Fig. 1은 인삼 根 추출물(7.1 ml / 25 ml)이 포함된 균주 배양배지에 3.8×10⁷ bacteria/ml를 배양하여(26±1°C) 시간별 균체수의 증감을 비교하여 본 것으로 배양 초기인 24시간후 균의 증식이 다소 억제됨을 알 수 있었다. Fig. 2는 위의 배양조건에 따른 생존력 조사를 하기 위해 INT를 처리하여 흡광도를 비교하여 본 것으로 배양초기의 균체수 증식 억제와는 상관없이 대사활성은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Evans 등(3)은 ginseng callus extracts에 의한 미생물의 활성조사에서 *Bacillus subtilis* (strain 7198 & 1604)와 *Bacillus*

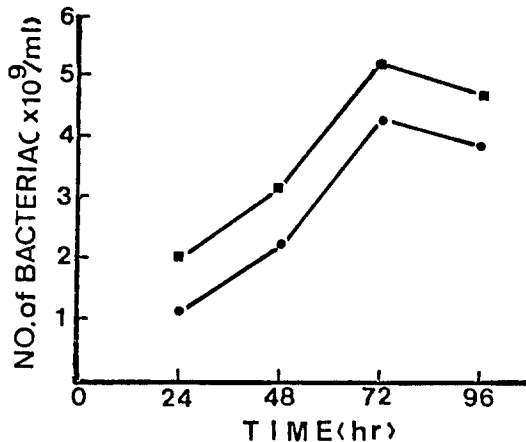


Fig. 1. Effect of ginseng extracts on growth of *A. rhizogenes*.

■ : potato extracts medium, ● : potato extracts medium containing ginseng extracts.

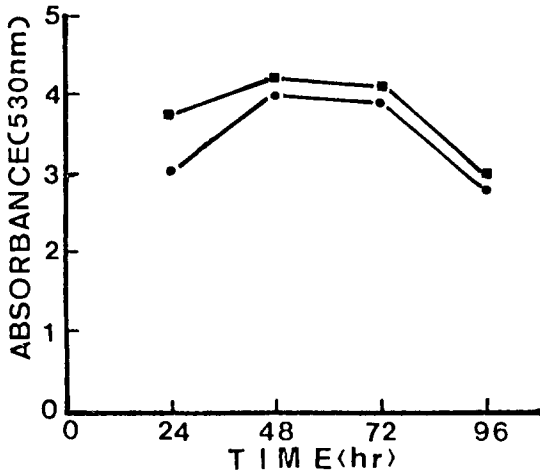


Fig. 2. Metabolic activity of *A. rhizogenes* cultured in ginseng extracts media.
 ■ : potato extracts medium, ● : potato extracts medium containing ginseng extracts.

megaterium (strain 7581)의 경우 억제활성을 나타낸다고 하였고 *Agrobacterium tumefaciens* (strain B 6)의 경우에는 억제활성이 없다고 보고하였는데 본 실험결과 인삼조직 추출물에 의한 *A. rhizogenes* strain A₄의 억제활성은 거의 없는것으로 보여졌다.

根 年別 hairy roots 형성을 비교

Fig. 3-a는 인삼조직절편에 *A. rhizogenes*를 접종하여 6-7주후 형성된 tumor이며, Fig. 3-b는 굳 처리 10-12주후 tumor로부터 형성된 hairy roots를 보여주고 있다. Tepfer (20)의 보고에 의하면 *A. rhizogenes*에 의한 hairy roots의 유도는 이미 형성되어 있는 tumor로부터 유도되는 경우와 tumor의 형성없이 감염된 부위로부터 직접적으로 유도되는 경우가 존재한다고 하였는데, 본 실험결과 인삼의 경우 이미 형성된 tumor로부터 hairy roots가 유도됨을 알 수 있었다. Table 1은 根 年別에 따른 hairy roots 형성율을 살펴본 것이다. 3년근의 경우 hairy roots가 유도되지 않았으며, 5년근이 4, 6년근에 비하여 hairy roots의 높은 유도율을 보였다. Lee와 Ahn (16, 17)은 인삼의 생육과 무기양분의 계절적 변화에 대한 조사에서 5월 하순까지 根重이 감소되었다가 이후 다시 증가되어 9월 이후에도 根重 증가가 안정된다고 하였는데 본 실험결과 인삼근조직의 생육 상태가 hairy roots의 형성에 영향을 주는것으로 보여졌다.

Hairy roots 유도에 미치는 식물호르몬의 영향

Table 2는 식물호르몬인 2, 4-D, IAA, IBA 및

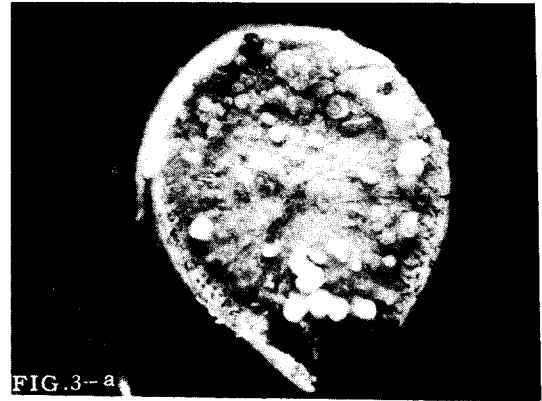


Fig. 3-a. Tumors in root discs of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) after 6 weeks infected with *A. rhizogenes*.

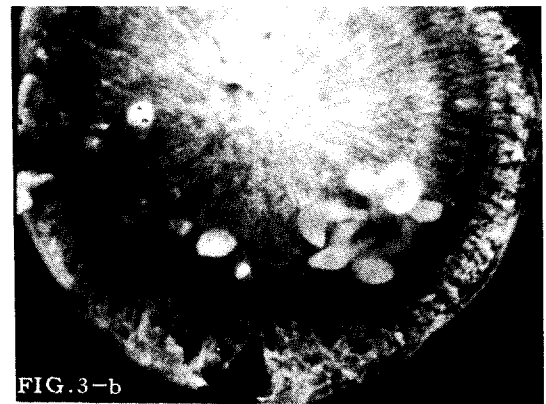


Fig. 3-b. Hairy roots in root discs of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) after 12 weeks infected with *A. rhizogenes*.

Table 1. Effect of explants on induction of hairy roots in ginseng root discs by *A. rhizogenes*.

Explants (Years)	3	4	5	6
Formation of Hairy Root	-	+	++	+

-: none, +: rare, ++: good.

tryptophan을 농도별로 첨가하여 hairy roots 유도에 있어 영향을 살펴본 것으로, IAA, IBA를 첨가하였을때는

hairy roots 의 형성을 관찰할 수 없었으며, 15-30 mg / 1 tryptophan 이 첨가된 배지에서 hairy roots 가 비교적 빠르게 (8-9주) 형성되었다. 또한 2, 4-D 를 1 mg / 1 첨가하였을 때도 얼마간의 hairy roots 형성을 관찰할 수 있었다. Hansen 등(21)은 tobacco crown gall 에 외부적으로 auxin 을 공급하면 내재되어 있는 cytokinin 의 축적을 방해한다고 하였고, Beiderbeck (22)는 *A. rhizogenes* 에 의한 hairy roots 유도에 있어서 exogenous cytokinin 을 첨가하면 root 의 형성이 억제되고 대신에 tumor 의 형성이 더욱 증가한다고 하였는데 본 실험결과 IAA 합성의 전구물질인 tryptophan 을 첨가함으로써 Ri-plasmid 의 T-DNA 발현에 의한 IAA 함량 증가를 더욱 촉진시켜주는 것으로 사료되었다.

Table 2. Effect of various phytohormones on induction of hairy roots in 5-year-old ginseng root discs by *A. rhizogenes*.

Phytohormone (mg/l)	Tryptophan		IAA		IBA			2,4-D				
	10	15	30	1	3	5	1	3	5	1	3	5
Formation of Hairy Root	-	++	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-

-: none, +: rare, ++: good.

Hairy roots 의 배양 및 Opine 분석

유도된 Hairy roots 를 배양하기 위해 각기 배지 조건을 달리하여 배양하였을때 (Table 3), hormone-free RCM 배지 (sucrose 3%, pH 4.5)에서 배양 7일후 hairy roots 의 성장을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). Fowler 등(1)은 형질 전환 조직인 hairy roots 의 성장에 배지

Table 3. Effect of media on growth of hairy roots induced from ginseng root discs by *A. rhizogenes*.

MEDIA	MS	modified ^a MS	modified ^b White Medium
Growth of Hairy Root	-	-	+

a: Refaat et al., (1984)(23), b: Butcher et al., (1964)(24). -: none, +: good.

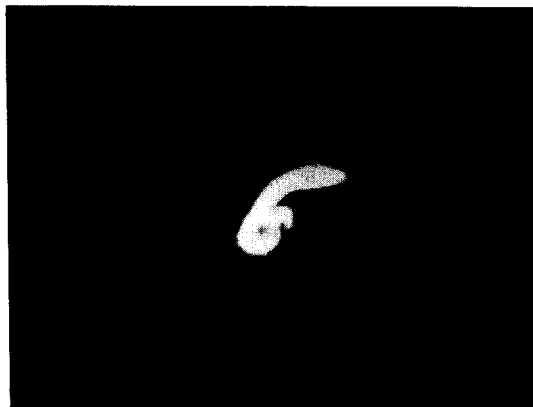


Fig. 4. Cultured hairy root grown in modified White medium for 7 days.



Fig. 5. Paper electrophoretic analysis of extracts from hairy roots of ginseng. lane S: standard mannopine (M) lane C: ordinary root lane H: hairy root

의 조성이 조직의 성장뿐 아니라 2차 대사산물의 합성에 영향을 준다고 보고하였는데 본 실험결과 hairy roots 의 최초 성장은 MS 에 비해 낮은 무기염을 함유하는 RCM 배지가 적합함을 알 수 있었다. Fig. 5는 paper electrophoresis 에 의해 hairy roots 에 있어 opine 합성 유무를 본 것으로 Ri-plasmid 의 T-DNA 의 발현에 의해 식물조직에 opine 합성이 이루어진다는 보고등(7)에 의해 본 실험결과 인삼조직의 형질전환이 이루어졌음을 알 수 있었다.

요 약

人蔘根組織에 *Agrobacterium rhizogenes* strain A₄를 접종하여 hairy roots 유도과 유도된 hairy roots의 배양 조건을 조사하였다. 48시간 배양된 균(2×10^9 bacteria/ml)을 접종하여 암조건($26 \pm 1^\circ\text{C}$)하에서 배양하였을때 6-7주후 tumor가 형성되었으며, 10-12주후 hairy roots가 유도되었다. 根年別 hairy roots 유도율은 5년근이 4, 6년근에 비하여 높았으며, 배지에 IAA, 2, 4-D, IBA 및 tryptophan을 각각 첨가시켰을때 15-30 mg/l tryptophan에서 tumor 및 hairy roots 유도율이 증가됨을 나타내었다. 또한 유도된 hairy roots를 hormone-free인 RCM 배지(sucrose 3%, pH 4.5)에서 배양하였다.

참 고 문 헌

1. M. W. Fowler(1982), *J. of Chem. Tec. & Biotech.*, **32**, 328-46.
2. H. Kamada, N. Okamura, M. Satake, H. Harada and K. Shimomura(1986), *Plant Cell Rep.*, **5**, 239-242.
3. J. S. Evans, E. Paltinson and P. Morris(1986), *Secondary metabolism in plant cell cultures*, ed. by P. Morris, A. H. Soragg, A. Strfford and M. W. Fowler, 1-53, Cambridge University Press.
4. Y. Mano, S. Nabeshima, C. Matsui and H. Ohkawa(1986), *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2715-2722.
5. M. J. C. Rhodes, R. J. Robins, J. D. Hamill, A. J. Parr and N. J. Walton(1987), *Plant Tissue Culture*, **1**, 2-11.
6. R. J. Robins, J. D. Hamill, A. J. Parr, K. Smith, N. J. Walton and M. J. C. Rhodes(1987), *Plant Cell Rep.*, **6**, 122-126.
7. T. Yoshikawa and T. Furuya(1987), *Plant Cell Rep.*, **6**, 449-453.
8. E. L. H. Aird, J. D. Hamill, and M. J. C. Rhodes(1988), *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, **15**, 47-57.
9. P. Christen, M. F. Roberts, J. D. Phillipson and W. C. Evans(1989), *Plant Cell Rep.*, **8**, 75-77.
10. B. Hwang, D. Y. Cho, S. S. Hong(1986), *Kor. J. Bot.*, **29(4)**, 275-283.
11. J. Mugnier(1988), *J. of Exp. Bot.*, **39**, 1057-1064.
12. L. Moore, G. Warren and G. Strobel(1979), *J. of Plasmid.*, **2**, 617-626.
13. A. J. Parr and J. D. Hamill(1987), *Phytochem.*, **26(12)**, 3242-3245.
14. S. Z. Pang, J. C. Sanford(1988), *J. Amer. Sci. Hort. Sci.*, **113**, 287-291.
15. M. Brillanceau, C. David and J. Tempe(1989), *Plant Cell Rep.*, **8**, 63-66.
16. S. D. Ahn, C. M. Chung, W. S. Kwon(1985), *Kor. J. Crop. Sci.*, **30**, 352-358.
17. J. C. Lee, D. J. Ahn and J. S. Byen(1988), *Kor. J. Crop. Sci.*, **32**, 471-475.
18. P. B. Gahan M. Kalina(1965), *J. of Biochem.*, **96**, 11-12.
19. A. Petit, A. Berkalloff and J. Tempe(1986), *Mol. & Gen. Genet.*, **202**, 388-393.
20. D. Tepfer(1983), *Genetic engineering in eukaryotes*, ed. by P. F. Lurguin & A. Kleinhofs, 61, 153-164, Plenum, New York.
21. C. E. Hansen, J. F. Meins and A. Milani(1985), *Differentiation*, **29**, 1-6.
22. R. Beiderbeck(1973 a), *Z. Pflanzenphysiol.*, **68**, 460-467.
23. D. N. Butcher and H. E. Street(1964), *Bot. Rev.*, **30**, 513-86.
24. M. Refaat, L. Rossignol and Y. Demarly(1984), *Z. Pflanzenzucht*, **93**, 137-146.

(Received November 25, 1989)