

*Agrobacterium rhizogenes*를 이용한 까마중의 形質轉換과 毛狀根 培養

고경수 · 허인옥 · 양관팔 · *이운진 · **김창민 · ***조필형
제주대학교 · *경희대학교 · **강원대학교 · ***한풍제약

Transformation and Hairy Root Culture in *Solanum nigrum* by *Agrobacterium rhizogenes*

Kyung Soo Ko, In Ok Heo, Kwan Pal Yang, *Woon Jin Lee

Chang Min Kim and *Pill Hyeong Jo

Cheju National University Cheju 690-756, *Kyung-Hee University Seoul 130-701,

**Kangwon National University Kangwon 200-701,

***Hanpoon Pharm. Co., Ltd., Junju 560-030, Korea

Abstract—The study aimed to confirm transformation, morphology, steroid alkaloidal TLC pattern and growth rate of hairy roots. The *Solanum nigrum* plantlets were inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* strain 15834. Hairy roots were induced by plasmid. Agropine and mannopine were detected in the hairy roots. The organization of hairy roots on the transectional morphology was undifferentiated. Culture on the medium containing hormone (IBA 2, kinetin 0.1 mg/l) altered hairy roots into callus. The growth rate of hairy roots on the NN30 liquid medium was 52 times heavier than in the original state and this was higher than on the other media. The results of TLC analysis indicated that the hairy roots produced steroidal alkaloids resembling those of normal roots.

Keywords—*Solanum nigrum* · *Agrobacterium rhizogenes* · transformation · steroidal alkaloid · hairy root · agropine · mannopine

Rhizobiaceae에 속하는 *Agrobacterium*은 gram 음성의 土壤細菌으로서 특정의 宿主에 腫瘍을 만드는 *A. rubi*, 病原성이 없는 *A. radiobacter*, crown gall¹⁾과 teratoma를 誘發하는 *A. tumefaciens* 및 毛狀根²⁾을 誘發하는 *A. rhizogenes*가 報告되어 있다.

*Agrobacterium*은 크기에 따라 3種類의 plasmid로 나누며, 그중에 180~240 kb의 plasmid내 Vir 領域이 acetosyringon과 같은 低分子 物質에 의해 活性化되어 T-DNA를 植物의 genome에 挿

入시키는 것으로 알려지고 있다.³⁾

Plasmid는 *Agrobacterium*의 種類에 따라 Ti (tumour inducing) plasmid와 Ri (root inducing) plasmid로 區分되고⁴⁻⁷⁾, 植物의 genome에 挿入되는 plasmid內의 T-DNA上에는 각각의 *Agrobacterium*만이 利用하는 amino acid의 일종인 opine 合成에 關與하는 部位⁸⁾와 auxin과 cytokinin의 合成에 關與하는 部位가 存在함으로서⁹⁾ *Agrobacterium*만의 病狀을 나타내게 한다.

한편 *A. rhizogenes*는 T-DNA上의 opine合成

gene에 의해 mannopine型, agropine型 및 cucupine型으로 分類하고 있으며⁹⁾ 또한 最近 NIEAES 1724 strain mikimopine型이 分離 報告 되고 있다.¹⁰⁾ 이러한 opine의 合成은 유전적 식민지화로서 Agrobacterium의 窒素原, 炭素原으로 利用된다.⁸⁾

現在까지 植物에 外來遺傳子를 挿入시키는 方法으로서 원형질체 融合과 DNA virus, RNA virus 및 CaMV 등이 導入 vector로서 報告되고¹¹⁾ 있으며, Agrobacterim이 外來遺傳子 導入 vector로서 可能性을 示唆²⁾한 이래, Ti plasmid와 Ri plasmid를 利用한 crown gall과 毛狀根의 培養은 苗木의 發根, 耐寒性 및 生長促進에 利用되고¹²⁾ 있다. 그리고 Ri plasmid에 의해 誘導되는 毛狀根 培養은 clone의 選抜이 容易하며, 2次 代謝産物의 生産性도 높다는 報告가 있다.^{13,14)}

한편, *Solanum nigrum*의 毛狀根 培養에 關한 研究는 Wei¹⁵⁾ 등이 Co-Culture法에 의해 毛狀根이 誘導되었으나 毛狀根의 배양 條件 등에 關한 研究가 未洽하여 本 研究에서는 Ri plasmid를 직접 感染시켜 毛狀根을 誘導하고, 毛狀根의 形態 및 MS培地和 NN培地에서 sucrose濃도와 호르몬 添加에 따른 毛狀根 生長을 檢討함으로서 解熱, 利尿¹⁶⁾ 및 消炎劑¹⁷⁾로 사용되는 *S. nigrum*의 steroidal alkaloid의 大量 生産에 基礎 資料로 하고자 하였다.

實驗 方法

種子發芽

S. nigrum 種子를 中性洗劑에 5~10分間 씻고, tween 20이 2~3방울 添加된 1% sodium hypochlorite 溶液에서 15分間 消毒한후, 滅菌水로 씻었다. 1차 滅菌된 種子是 70% 에탄올에서 15分間 浸漬시킨 후, 滅菌水로 3回 反復하여 에탄올을 除去하여 완전히 表面 殺菌된 種子를 MS (30 g sucrose/l, Murashige and Skoog medium, 1962) 培地에 移植하고 25°, 6,000 lux, 16 h light/8 h dark의 條件하에서 無菌發芽시켰다.

毛狀根의 誘導

發芽시킨 幼植物의 줄기에 유병침으로 傷處를

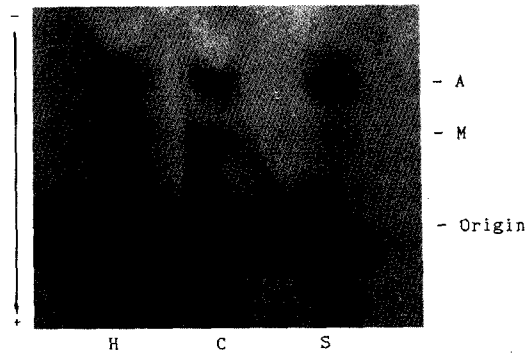


Fig. 1. Detection of agropine and mannopine in the extracts of callus(C) and hairy roots(H). A: agropine, M: mannopine, S: standard marker

내어, 傷處 部位에 YEB培地, 25°, 暗條件에서 3日間 靜置培養 시킨 *A. rhizogenes* 15834를 직접 感染시켜 毛狀根을 誘導하였다.

形質轉換의 確認

Opine分析은 培養한 毛狀根 100 mg을 0.1 N HCl 100 μ l를 effendorf관에 취하고 粉碎한 후, 20,000 xg에서 원심분리하고 상정액을 電氣泳動하였다.⁸⁾ 電氣泳動은 상정액과 standard opine을 3 MM Whatman 濾過紙에 2~10 μ l spot한後, formic acid : acetic acid : H₂O(30 : 60 : 910)을 pH 2.8로 調整하여 緩衝液으로 하고 methylene blue를 maker로 하여 400 volt에서 實施하였고 다음과 같은 方法에 의해 染色하였다.

(1) 0.5 g AgNO₃를 0.5 ml 물에 녹여 250 ml acetone에 混合한다.

(2) 20% NaOH 50 ml과 에탄올 450 ml를 使用 전에 混合한다.

(3) 10% sodium thiosulfate와 1.5% sodium dimetasulfate를 混合한다. 電氣泳動한 Whatman 濾過紙는 위의 1), 2), 3)의 順으로 1分, 10分, 20分 담구어 染色하였다(Fig. 1).

毛狀根을 形成한 뿌리의 形態 觀察

毛狀根을 形成한 뿌리와 一般뿌리에서 채취한 시료를 freezing microtomes에서 25 μ m 두께로 橫斷面의 절편을 채취, 광학현미경 100배로 관찰하였고 毛狀根의 外部形態는 해부현미경 64배로 觀察하였다(Fig. 2).

毛狀根의 培養과 生長量 測定

誘導된 毛狀根이 2~5 cm 伸長한 후, A.

*rhizogenes*를 除去하기 위하여 毛狀根을 잘라내어 抗生劑 Claforan 300 mg/l을 包含하는 MS 30 培地에 移植하여 1週 間隔으로 2回 繼代培養하였다.

*Agrobacterium*이 완전히 除去된 毛狀根을 호르몬이 없는 MS 30 固體培地, 25°, 暗狀態에서 繼代培養하여 安定化 시켰다.

誘導된 毛狀根의 生長量은 培地의 種類와 sucrose 및 hormone첨가에¹⁸⁾ 따라 靜置培養과 振湯培養(90 strokes/min)을 하여 接種量과 比較하여 生長量을 測定하였다.

Steroidal alkaloid의 成分 確認

毛狀根을 形成한 뿌리와 一般뿌리의 乾량 各 5 g을 1 N HCl 50 ml로 3시간 加熱 抽出한 후, 클로로포름으로 2회 진탕 추출하였다.¹⁹⁾ 클로로포름층을 減壓濃縮하여 1 ml 클로로포름으로 溶解시켜, silica gel TLC(Merck Kieslgel 60 F254)에 點적하여 전개용매(ethylacetate:benzene = 1:1)로 전개하였다.

實驗結果 및 考察

*S. nigrum*의 毛狀根 誘導는 表面殺菌된 種子를 25°, 6,000 lux, 16 h light/8 h dark 條件에

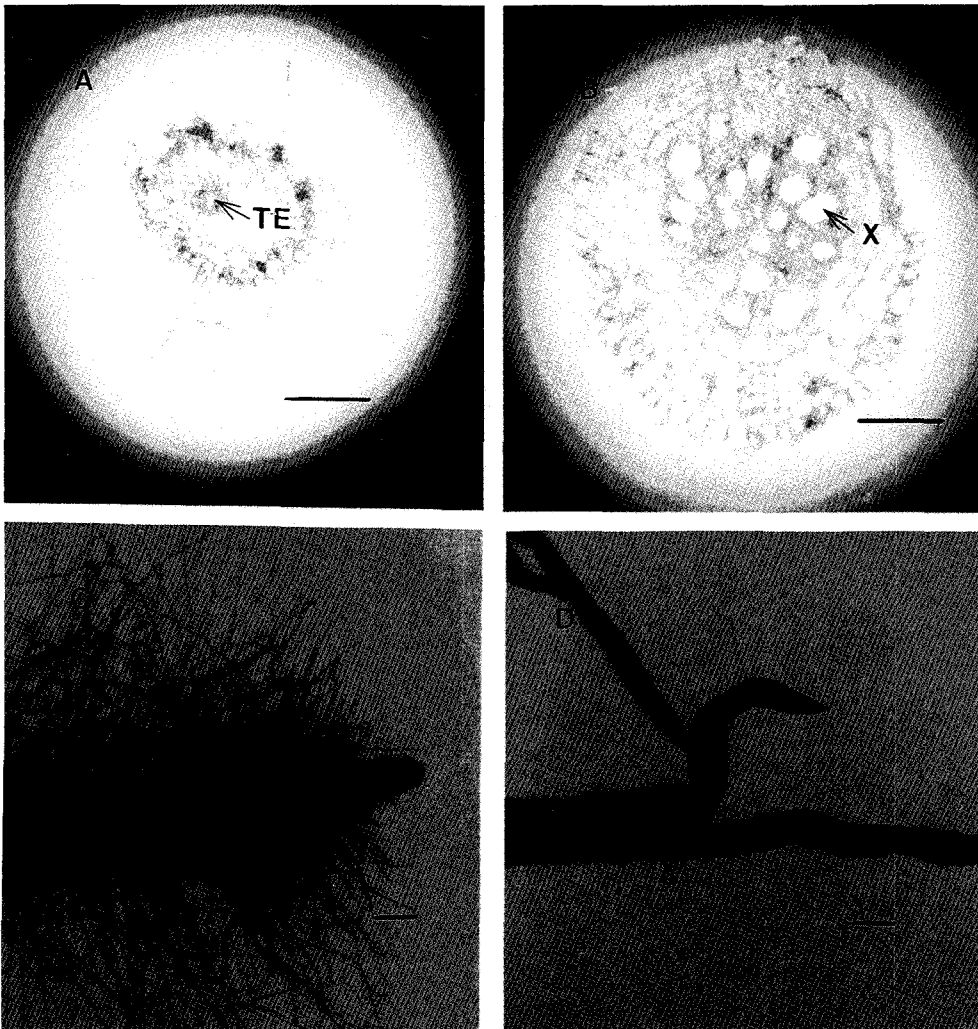


Fig. 2. Photographs of hairy root(A,C) and normal root(B,D). (A,B: Transverse section, C,D: Outer morphology, TE: Tracheary element, X: Xylem, Scale: 100 μ m)

서 2週間 培養하여 幼植物體를 얻었고, 發芽된 幼植物를 4週 培養한 後 YEB培地에서 3日間 培養한 *A. rhizogenes* 15834를 幼植物의 傷處部位에 感染시켜 光條件下에서 培養한 結果 균을 치리한 傷處部位에서 tumor組織이 형성되고 균처리 3週 後에 毛狀根이 誘導되었다.

誘導된 毛狀根은 抗生劑培地에서 1週 間隔으로 2回 繼代培養하여 *A. rhizogenes*를 除去하고, 3週 間隔으로 6回 繼代培養하여 安定하게 生長하는 毛狀根을 얻었다.

形質轉換을 確認하기 위하여 *S. nigrum*의 毛狀根 抽出液을 電氣泳動한 結果, Fig. 1과 같이

mannopine과 agropine의 spot를 確認할 수 있었다. 이러한 結果는 植物이 生産하지 않는 아미노산이 Ri plasmid에 의해 形質轉換된 毛狀根에서 生産되는 것으로서⁸⁾ 外來遺傳子, 즉 Ri plasmid의 T-DNA가 插入되어 그 形質을 發現하는 것을 確認할 수 있었다.

毛狀根을 形成한 뿌리와 一般뿌리의 形態를 비교한 結果(Fig. 2) 일반뿌리에 비해 毛狀根은 分열이 왕성하며 기관분화가 완전히 이루어지지 않았다. 이러한 조직의 형태는 黃 등²⁰⁾의 당근 毛狀根에서 分裂組織體와 基本組織 사이에는 부정형의 작은 통도요소들이 分化되어 分열조직과

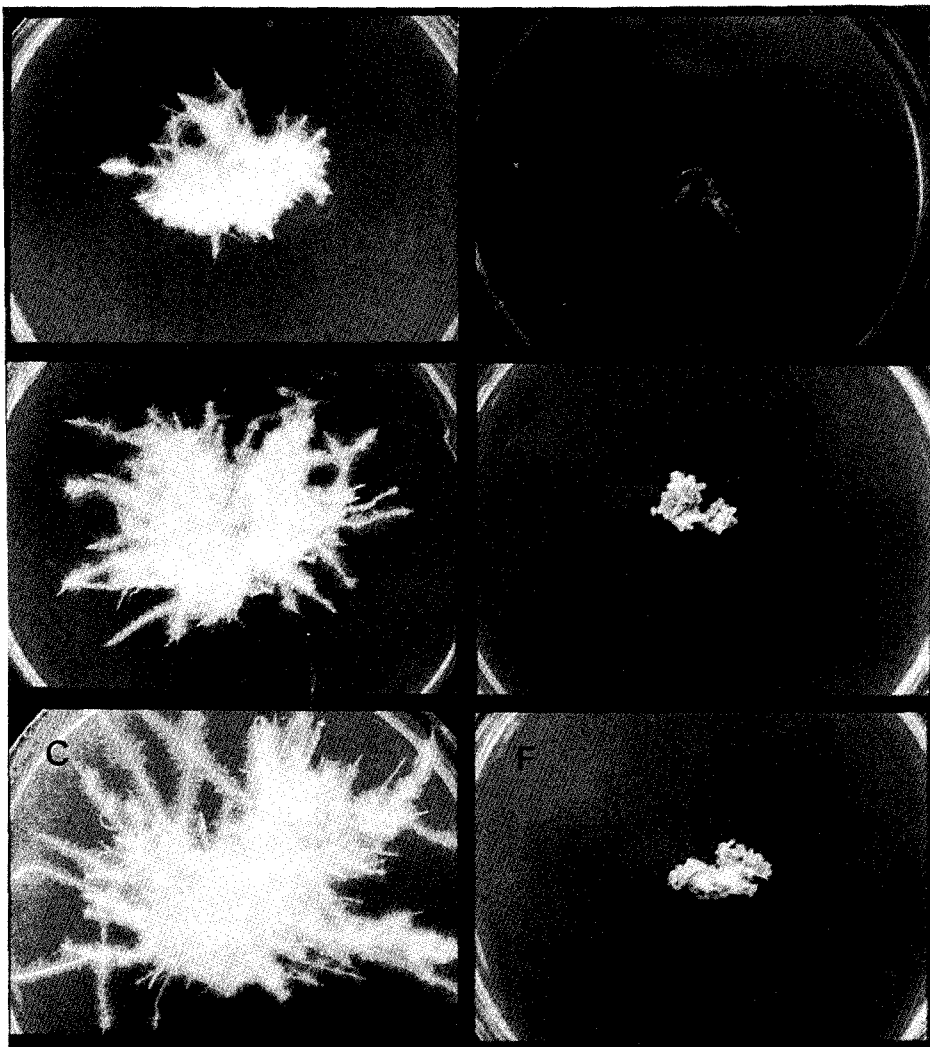


Fig. 3. Petridish culture of *S. nigrum* hairy roots for 20 days. A: MS30, B: NN30, C: NN 15, D: NNO, E: MSH, F: NNH

Table I. Petridish culture of *S. nigrum* hairy roots

Days	Medium	MS30	NN30	NN15	NN0	Fresh weight(g)	
						MS30 H	NN30 H
0		0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
10		0.10±0.027	0.11±0.013	0.13±0.012	inhibition	callus	callus
20		0.18±0.021	0.33±0.048	0.59±0.044			
30		0.45±0.024	1.30±0.295	0.99±0.081			
40		1.60±0.110	2.17±0.075	1.41±0.023			

Table II. Liquid culture of *S. nigrum* hairy roots

Days	Medium	MS30	NN30	Fresh weight(g)	
				MS30 H	NN30 H
0		0.10	0.10	0.10	0.10
10		0.96±0.034	1.28±0.170	callus	callus
20		1.75±0.032	3.29±0.015		
30		3.13±0.110	4.75±0.041		
40		4.05±0.046	5.19±0.055		

연결시킨다는 것과 일치하였다.

形質轉換된 毛狀根은 培地의 種類와 sucrose 濃度 및 호르몬 添加에 따라 靜置培養과 振湯培養의 最適條件을 設定하기 위하여 毛狀根의 生長率을 檢討한 結果는 Fig.3과 같이 毛狀根은 호르몬을 添加한 培地에서 callus化하며 또한 生體量의 증가가 微小 하였다. 그러나 호르몬이 없는 培地에서는 毛狀根의 形態를 維持하며 生長하였다. 毛狀根의 靜置培養결과, 호르몬 添加

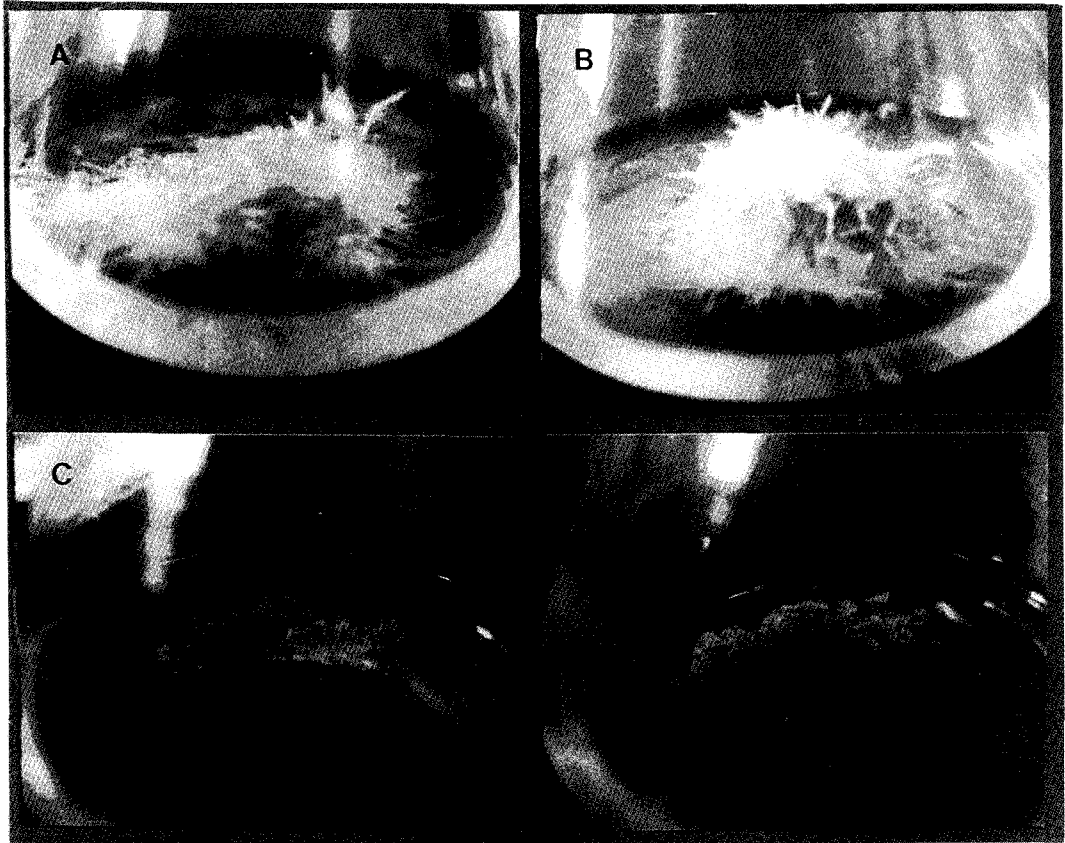


Fig. 4. Liquid culture of *S. nigrum* hairy roots for 20 days. A: MS30, B: NN30, C: MSH, D: NNH

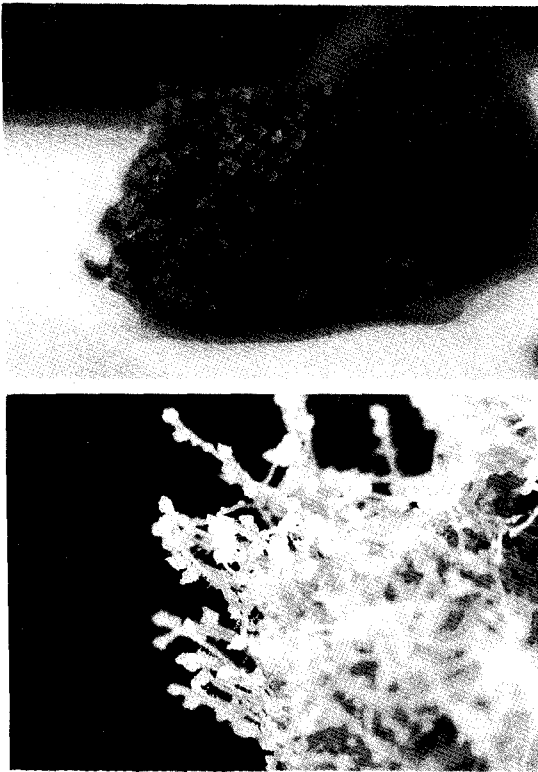


Fig. 5. Liquid culture of *S. nigrum* hairy roots for 50 days. A: MS30, B: NN30

배지보다 호르몬이 없는 배지에서 높은 생장률을 나타내어 高²¹⁾의 *Panax ginseng*의 毛狀根은 호르몬이 없는 培地에서 잘 分枝하며 生長한다는 結果와 일치하였다. 호르몬 첨가 배지에서 毛狀根의 callus화는 毛狀根에 挿入된 식물 호르몬 遺傳子에 의해 合成되는 auxin과 cytokinin⁹⁾이 添加된 호르몬과 相互作用에 기인된다고 사료된다.

MS 30배지와 NN 30배지 및 sucrose농도에 따른 毛狀根의 靜置培養결과(Table I) MS 30배지에 비해 NN 30培地에서 배양기간에 관계없이 良好하게 生長하였고 특히 40일 배양에서 MS 30배지에서 32배의 生長率에 비교하여 NN 30배지에서는 약 43배로 높은 生長率을 보였다. 또한 NN배지에서 20日 培養한 結果, 培地内の sucrose 濃度에 따른 生長率은 NN 15培地에서 NN 30배지보다 2배가량 높은 生長率을 보였고 30일과 40일 배양에서는 NN 30배지에서 각각 26배, 43배로 높은 生長率을 보였다. 이러한 결



Fig. 6. TLC pattern of the steroidal alkaloid fraction. A: Hairy roots, B: Normal roots, S1: Rf=0.16, S2: Rf=0.27

과로 보아 毛狀根의 維持는 20일 간격으로 繼代培養할 경우 NN 15배지에서, 30일과 40일 간격으로 繼代培養할 경우에는 NN 30배지가 적합하다고 사료된다.

毛狀根을 MS 30培地와 NN 30培地에서 振湯培養한 結果(Table II; Fig. 4), 40日 培養에서 MS 30培地는 40배의 生長率을 보였고, NN 30培地는 52배의 生長率을 보여 MS 30培地보다 높은 生長率을 보였다. 그러나 50일 이상 培養은 Fig. 5와 같이 毛狀根이 callus화와 暗褐色으로 괴사하는 경향을 보여 振湯培養에서는 40일 이내 배양이 적합하다고 사료된다. 따라서, 毛狀根의 振湯培養은 NN 30배지에서 배지 1l당 生體量 104 g을 생산할 수 있어 가장 양호하게 生長하였다(Table II).

또한 毛狀根과 一般뿌리를 steroidal alkaloid 抽出法에 의해 추출하여 TLC로 確認한 結果(Fig. 6) 일반뿌리에서 주성분으로 보이는 반점 Rf 0.16의 S1과 Rf 0.27의 S2중 毛狀根에서는 S2반점만이 주성분으로 확인되었으며 微量성분

으로 보이는 반점에서 다소 차를 보이거나 대체적으로 유사하게 나타났다. 이러한 성분의 분석에 대하여는 추후 자세한 검토가 있어야 할 것으로 보인다.

結 論

*Solanum nigrum*의 종자를 無菌的으로 發芽시킨 幼植物에 *A. rhizogenes* 15834를 感染시켜 毛狀根을 誘導하고, 毛狀根의 形質轉換, 形態, steroidal alkaloid樣相 및 培養條件을 檢討하였다.

*S. nigrum*의 모상근 抽出物에서 mannopine과 agropine이 檢出되어 形質轉換을 確認할 수 있었고, 毛狀根의 形態는 一般뿌리와 달리 器官分化가 未熟하였다. 또한 毛狀根의 生長率을 檢討한 結果 호르몬(IBA 2, kinetin 0.1 mg/l)이 含有되어 있는 培地에서 振湯培養과 靜置培養에서 모두 callus化하는 傾向을 보였으나 호르몬이 含有하지 않은 培地에서는 生長이 良好하여 NN 30배지에서 30일간 振湯培養하여 約 52배의 生長을 誘導할 수 있었다. 또한 毛狀根과 一般뿌리를 steroidal alkaloid 抽出法에 의해 抽出하여 TLC로 確認한 結果 대체적으로 類似하게 나타났다.

감사의 말씀—이 논문의 일부는 과기처 연구비(1989~91)의 지원에 의하여 연구되었음을 감사드립니다.

〈1991년 2월 21일 접수 : 3월 2일 수리〉

文 獻

- Smith, J.F. and Townsend, C.O.: *Science* 25: 671, (1907).
- Riker, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H. and Sagen, H.E.: *J. Agric Res.* 41:507 (1930).
- Eckes, P., Donn, G. and Wengenmayer, F.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26:382 (1987).
- White, F.F. and Nester, E.W.: *J. Bacteriol.* 141, 1134 (1980).
- Moore, L., Warren, G. and Strobel, G.: *Plasmid* 2, 617 (1979).
- Van Larebeke, N., Engler, G. Van den Elsacker, E., Zaenen, I. Schilperoort R.A. and Schell. J.: *Nature* 252, 169 (1974).
- Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton M.D. and Nester. E.W.: *J. Bacteriol.* 123, 255 (1975).
- Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, J.G., Guyon, P., Casse, F., and Tempe. J.: *Mol. Gen. Genet.* 190, 204 (1983).
- Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spano, L., Capone L. and Costantino, P.: *Mol. Gen. Genet.* 209, 475 (1987).
- 鎌田宏. 第11回 植物組織培養學會. Symposium, 227 (1989).
- Murphy, T.M. and Thompson, W.E.: *Molecular plant development.* Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 174, 198 (1988).
- Rugini, E. and Wang, X.S.: Abstract in VI IUPAC Congress. University of Minnesota. 374 (1986).
- Saito, K., Murakoshi, I., Izne, D. and Montagu, V.: *Plant Cell Reports* 7, 607 (1989).
- Christen, P., Roberts, Phillipson, J.D., and Evans, W.C.: *Plant Cell Reports* 8, 75 (1989).
- Wei, Z.M., Kamada H., and Harada, H.: *Plant Coll Reports* 5, 93 (1986).
- Reiko, S., Kotaro, Toshihiro, N., Toshiaki, T., Akihiko, S., and Kyoko, M.: *Yakugaku Zasshi* 102, 300 (1982).
- Genjiro, K., Takahashi, A., Sugiyama K., and Nozoe, S.: *Chem. Pharm. Bull.* 35, 4862 (1987).
- Yoshikawa, T. and Furuya, T.: *Plant Cell Report*, 6, 449 (1987).
- Chandler, S. and Dodds: *J. Plant Cell Reports* 2, 69 (1983).
- 黃柏, 趙德以, 洪性式: *Korean J. Bot.* 29, 275 (1986).
- Ko, K.S.: Study on the secondary products formation and plant transformation using *Agrobacterium rhizogenens*. Graduation thesis pp.53-64 (1989).