

소리쟁이 (*Rumex crispus*)의 부정근과 모상근 배양에 의한 Anthraquinone 생산성

장석원¹ · 김인현 · 한태진*

¹경기도 농촌진흥원 연천을무시험장, 한림대학교 자연대학 생물학과

Anthraquinone Productivity by the Cultures of Adventitious Roots and Hairy Roots from Curled Dock (*Rumex crispus*)

CHANG, Seog Won · KIM, In Hyeon · HAN, Tae Jin*

¹Yunchon Adlay Experiment Station, Kyunggi provincial RDA, Yunchon, 486-830, Korea

Department of Biology, Hallym University, Chunchon, 200-702, Korea

ABSTRACT In order to survey anthraquinone productivity from *in vitro* root culture, transformed hairy roots of *Rumex crispus* were induced from leaf segments by infection with *Agrobacterium rhizogenes* strain A4 and compared with adventitious roots. The optimum condition of adventitious root formation from leaf segments was 5 μ M NAA added to MS medium. Mannopine was detected in the extract of hairy roots by paper electrophoresis, but not in adventitious roots. Secondary root tips of both adventitious roots and hairy roots elongated without lateral root branching in hormone free MS medium, but primary root tips showed more rapid growth with extensive lateral root branching. MS basal medium was the best for growth of the adventitious roots and hairy roots for anthraquinone content. Adventitious root tips and hairy root tips cultured in liquid MS medium supplemented with 0.05 μ M NAA and 0.1 μ M kinetin (contained 5% sucrose) showed the maximal growth and anthraquinone content. Anthraquinone content of hairy roots was increased by the culture periods, but was reduced after 25 days of culture.

Key words: Mannopine, MS medium, NAA, kinetin, sucrose

서 론

소리쟁이의 뿌리는 민간에서 방광염, 담낭질병, 담즙 분비장애, 비장 질환, 피부병, 임파절 질환을 비롯, 여러가지 종양이나 암의 보조 치료제로 사용된다. 소리쟁이의 뿌리에는 ascorbic acid, saponin, tanin, flavonoid와 emodin 등의 anthraquinone 유도체들이 존재하는데, 2차대사산물인 이러한 anthraquinone은 quinone계의 alkaloid 성분으로 항바이러스 작용 (Batnard et al. 1992), 항종양 작용 (Palu et al.

1986)을 하는 것으로 알려져 있다.

고등식물에서 anthraquinone은 여뀌과를 포함한 다양한 고등식물의 여러 부위에서 추출되고 있는데, 주로 *Cassia siamea*의 심재 (Singh et al. 1992), *Chamaecrista greggii* 뿌리와 수피 (Barba et al. 1994), *Kniphofia foliosa*의 줄기 (Yensew et al. 1994) 및 *Peganum harmala*의 종자 (Pitre and Srivastava 1987) 등에서 추출되고 있다. 또한 *Digitalis lanata* (Furuya and Kojima 1971)나 *Morinda citrifolia* (Leistner 1973)와 같은 식물의 캘러스를 이용한 기내배양에 의한 추출도 시도되었으나 이들 식물의 미분화된 캘러스에서는 만족할 만한 결과를 얻지 못하였다 (Guerche et al. 1987).

80년대부터 이루어진 토양 미생물인 *Agrobacterium*

*Corresponding author. Tel 0361-240-1436

Fax 0361-256-3420

*rhizogenes*에 의한 모상근은 그 빠른 성장 속도로 인하여 뿌리에 축적되는 2차대사산물의 기내 획득에 주목을 받고 있다 (Ogasawara et al. 1993). 모상근은 유전적으로 비교적 안정되어 있어서 (Van der Heijden et al. 1994) 모상근에서 생산되는 2차대사산물은 모식물체의 뿌리와 거의 동일하거나 (Christen et al. 1990) 현격한 증가를 나타낸다 (Payne et al. 1987). 이러한 특성 때문에 모상근의 기내배양을 통하여 약용 성분, 색소, 방향성 물질 등과 같은 유용한 2차대사산물을 얻고자 하는 연구가 많이 이루어지고 있다 (Alan et al. 1993). 모상근은 T-DNA 상에 존재하는 식물 호르몬 합성에 관여하는 효소 유전자의 발현으로 외부의 호르몬 공급 없이도 빠른 성장을 보이지만 (Knopp et al. 1988) 적절한 식물 호르몬 (Shen et al. 1990)이나 sucrose를 첨가하면 모상근 성장과 2차대사산물의 생성을 증가시킨다고 보고되어 있다 (Jung and Tepfer 1987). 뿌리에 anthraquinone을 많이 포함하고 있는 *Rumex* 속 식물에서도 모상근 유도를 위한 시도가 이루어졌으나 (Mugnier 1988) 소리쟁이가 *Agrobacterium rhizogenes* A₄ strain의 기주로 확인되었을 뿐 그 이상의 보고는 아직 없다.

이에 따라 본 연구는 소리쟁이가 A₄ strain의 기주가 된다는 보고를 근거로 A₄ strain을 이용하여 소리쟁이 잎 절편에서 모상근을 유도하여 호르몬에 의하여 유기된 부정근과 함께 성장 및 anthraquinone 함량을 비교하고 식물 호르몬과 sucrose가 모상근의 성장과 anthraquinone 함량에 미치는 영향을 조사하여 소리쟁이의 모상근을 이용한 anthraquinone 생산 가능성을 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 균주배양

소리쟁이 (*Rumex crispus* L.) 종자를 호르몬이 없는 MS배지를 이용, 명소에서 무균 발아시켜 4주 된 유식물의 잎을 부정근과 모상근 유도 실험에 사용하였으며, 모상근 유도를 위한 *Agrobacterium rhizogenes*는 agropine type인 A₄ strain (ATCC 15834)을 YEP 액체배지 (Stanton et al. 1991)에서 48시간 배양 (27±1°C)하여 사용하였다.

부정근 형성 조사

모상근에 대한 대조구로 사용하기 위한 부정근을 얻기 위하여 소리쟁이 유식물 잎의 약 5 mm 절편을 NAA와 kinetin이 각각 0~50 µM 및 0~1.0 µM 범위에서 처리된 MS 한천배지 (sucrose 3%)에 치상, 25±1°C 암소에서 배양하여 4주 후 부정근 형성 정도를 조사하였다.

모상근 유도

모상근은 *Agrobacterium rhizogenes* A₄ strain 균주를 소리쟁이 잎 절편에 접종한 후 cefatoxime (500 mg/L)이 첨가된 MS 호르몬 결제 배지 (sucrose 3%)에서 3~5회 계대배양하여 *Agrobacterium*을 제거하면서 유도하였다.

Opine 분석

모상근의 진위를 확인하기 위하여 MS 액체 기본배지에서 30일간 배양한 부정근과 모상근을 Petit 등 (1986)의 방법을 수정하여 opine 분석을 시행하였다. Opine 분석은 3 mm 여과지를 이용한 paper electrophoresis 방법으로 1500 V에서 50 분간 전기영동하였다. 표준 opine으로는 mannopine (Sigma)을 사용하였으며, 전개액 (pH 9.8)은 formic acid: acetic acid: distilled water (30 : 60 : 910)로 조성하고 전기영동이 끝난 후 여과지를 건조시켜 AgNO₃와 NaOH를 이용하여 발색시켰다.

기본배지 조사

부정근과 모상근 배양을 위한 적정 기본배지를 조사하기 위하여 호르몬이 첨가되지 않은 1/2 MS, MS, B₅, White 액체배지 (sucrose 3%)에서 부정근과 모상근의 1 cm 근단을 5개씩 접종하여 2주간 배양한 다음 뿌리의 성장 정도를 조사하였다.

호르몬 영향 조사

부정근과 모상근의 호르몬에 대한 성장 효과를 조사하기 위하여 호르몬 결제시 뿌리 생육이 가장 좋았던 MS 한천배지 (sucrose 3%)를 이용하였다. 호르몬은 NAA와 kinetin을 0~5 µM 범위에서 처리, 25±1°C 암소에서 1차근의 근단을 배양하여 4주 경과 후 부정근과 모상근의 측근수와 총길이를 조사하였다.

Sucrose 효과 조사

부정근 및 모상근의 성장과 anthraquinone 함량 증대에 대한 sucrose의 효과 조사는 근단 성장에 가장 효과적이었던 0.05 µM NAA와 0.1 µM kinetin으로 조성된 액체배지에 1~10%까지의 sucrose 농도에서 부정근과 모상근의 1 cm 근단을 각각 플라스크당 5개씩 처리하여 4주 후 신선중과 anthraquinone 함량 변화를 조사하였다. 또한 이 결과를 바탕으로 신선중과 anthraquinone 함량이 가장 높았던 5% sucrose 첨가 배지로 배양 일수에 따른 신선중과 anthraquinone 함량 변화를 조사하였다.

Anthraquinone의 추출 및 정량

Anthraquinone의 추출과 정량은 List와 Horhammer (1971)의 방법을 변형하여 추출, 정량하였다. 각 실험구에서 배양한 뿌리의 세분말 30 mg을 플라스크와 냉각관을 이용하여 초산과 ether로 추출, 10 M NaOH 용액으로 발색시킨 다음, NaOH · NH₄OH 용액으로 희석하여 530 nm에서 흡광도를 측정하여 anthroquinone 함량을 산출하였다.

결 과

부정근과 모상근 형성

호르몬 처리에 의한 소리쟁이 잎 절편에서의 부정근 형성은 호르몬 결제시에는 1개 정도 형성되었으며, 호르몬 처리시에는 회색이나 갈색 혹은 검은색의 캘러스가 형성된 후 부정근이 유기되었다. 호르몬 처리시에는 5 μM NAA와 0.01 ~ 0.1 μM 범위의 kinetin을 조합 처리하는 경우 약 33~34개의 부정근이 형성되었으나 kinetin 없이 5 μM NAA 단독 처리시 약 51개로 가장 많이 형성되었다 (Figure 1). 한편 *Agrobacterium rhizogenes* strain A₄를 감염시킨 경우에는 약 3주 사이에 잎의 기부 쪽에서 작고 검푸른 세포괴가 형성된 다음 1~3개의 모상근이 형성되었다.

Opine 분석

모상근의 형질전환 여부를 확인하기 위하여 30일간 MS 액체배지에서 배양한 부정근 (Figure 2A₁)과 모상근 (Figure 2A₂)을 paper electrophoresis를 이용, opine 분석을 한 결과 (Figure 2B) 대조구로 사용한 부정근의 경우는 mannopine이 확인되지 않았으나 모상근의 경우는 표준 opine으로 사용한

mannopine과 같은 선상에 spot가 나타나 *Agrobacterium rhizogenes* strain A₄에 의하여 유도된 모상근이 형질전환이 되었음을 확인되었다.

기본배지 설정

모상근 배양을 위한 배지선발 실험에서 MS 배지가 플라스크당 약 26.2 mg의 신선중을 나타내 플라스크당 각각 18.5 mg, 17.5 mg 및 17 mg 신선중을 나타낸 1/2MS, B₅ 및 White 배지에 비하여 가장 높은 신선중을 나타내었다 (Figure 3). MS배지의 경우 모상근이 부정근보다 63.8%의 신선중 증가를 나타내었으며, 기타 배지에서는 모상근과 부정근의 신선중

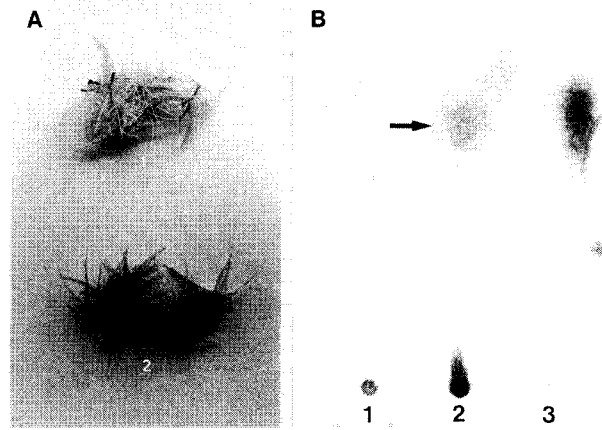


Figure 2. Photographs of primary root tip cultures and paper electrophoresis of root extracts of *Rumex crispus* in liquid MS hormone-free medium for 4 weeks. A: Morphological views of adventitious roots (1) and transformed roots (2); B: Paper electrophoresis of extracts from root tip cultures. Lane 1, adventitious roots; lane 2, transformed roots; lane 3, mannopine marker. Arrows indicate mannopine spots.

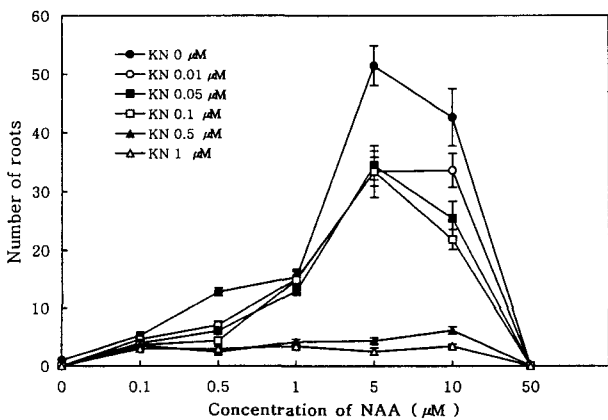


Figure 1. Effect of NAA and kinetin on adventitious root formation from leaf segments of *Rumex crispus* for 4 weeks. Bars represent standard errors.

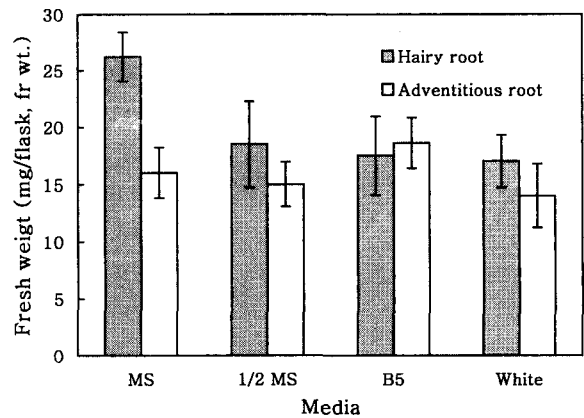


Figure 3. Effect of various media (sucrose 3%, pH 5.8) on the growth of primary root tips of adventitious roots and transformed roots of *Rumex crispus* for 2 weeks. Bars represent standard errors.

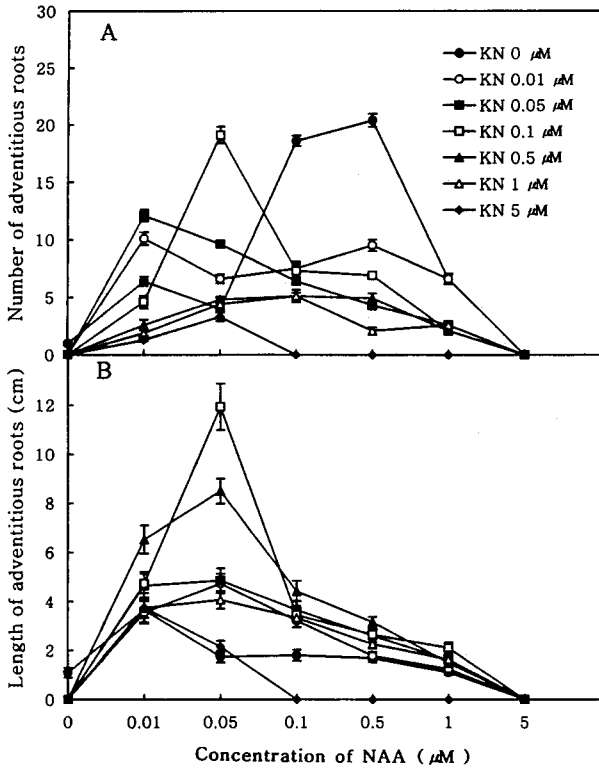


Figure 4. Effect of NAA and kinetin on lateral root formation from adventitious primary root tips of *Rumex crispus* for 4 weeks. A: Lateral root number. B: Total length of lateral roots. Bars represent standard errors.

은 현저한 차이가 나타나지 않아 MS배지를 모상근 배양 기본배지로 설정하였다.

호르몬의 영향

부정근의 경우 NAA 농도가 높을수록 부정근의 캘러스화가 촉진되었다 (Figure 4). 측근은 배양 3일부터 근단 전 부분에 걸쳐 고르게 형성되었으며, 2주 후부터 급격히 성장

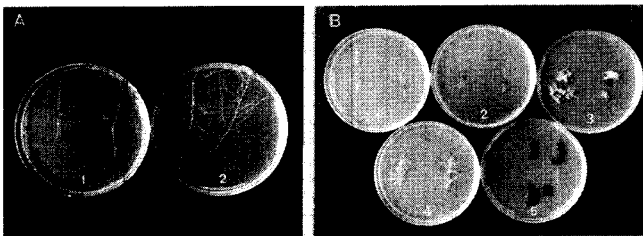


Figure 5. Various views of transformed root tip cultures of *Rumex crispus* for 2 weeks. A: Morphological growth characteristics of lateral root tips (1) and primary root tips (2) in MS hormone-free medium; B: Effects of NAA and kinetin on lateral root formation from primary root tips cultured in hormone free (1), 0.1 μM kinetin (2), 0.1 μM NAA (3), 0.05 μM NAA and 0.1 μM kinetin (4), 5 μM NAA and 0.1 μM kinetin (5).

하였다. NAA 0.1 μM 이상 처리시에는 검게 캘러스화한 후 배양 5일부터 측근이 형성되었다. NAA 0.5 μM 처리시 약 20개로 가장 많은 측근이 형성되었지만 (Figure 4A), 0.5 cm 이하의 모용 형태를 나타내었고, 0.05 μM NAA와 0.1 μM kinetin 혼용 처리구에서 측근 약 19개, 총길이 약 12 cm로 가장 좋은 분지능과 성장을 나타내었다 (Figure 4B).

모상근의 경우 배양일 경과에 따라 측근인 2차근의 근단은 길이생장만 한 반면 (Figure 5A₁) 1차근인 주근의 근단은 측지를 형성하며 생장이 왕성하였다 (Figure 5A₂). 또한 모상근은 호르몬 결제구 (Figure 5B₁)의 경우 약간의 신장이 있었으나 0.1 μM kinetin을 단독 처리하는 경우 (Figure 5B₂) 측근 형성 없이 호르몬 결제구보다 생장이 억제되었다. 0.1 μM NAA 단독 처리시에는 모용이 형성되었으나 (Figure 5B₃) NAA와 kinetin을 각각 0.05 μM, 0.1 μM 혼용 처리하는 경우에는 부정근성의 측근이 다량 형성되었다 (Figure 5B₄). 5 μM NAA와 0.1 μM kinetin을 혼용 처리한 경우에는 검게 변하면서 캘러스가 형성되었으며 (Figure 5B₅), 측근이 가장 많이 형성되었던 0.05 μM NAA와 0.1 μM kinetin 혼용 처리시에는 약 22개의 측근이 형성되었고 (Figure 6A) 총길이도 약 54 cm에 달하였다 (Figure 6B).

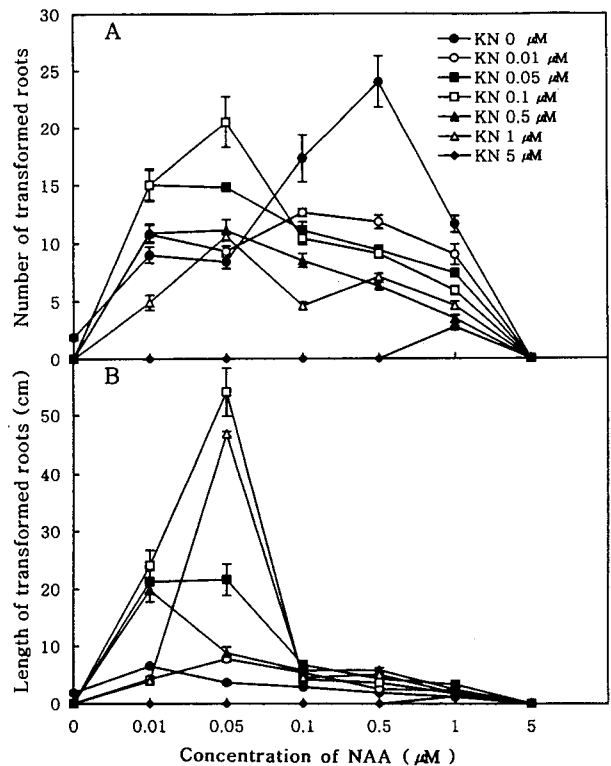


Figure 6. Effect of NAA and kinetin on lateral root formation from transformed primary root tips of *Rumex crispus* for 4 weeks. A: Lateral root number. B: Total length of lateral roots. Bars represent standard errors.

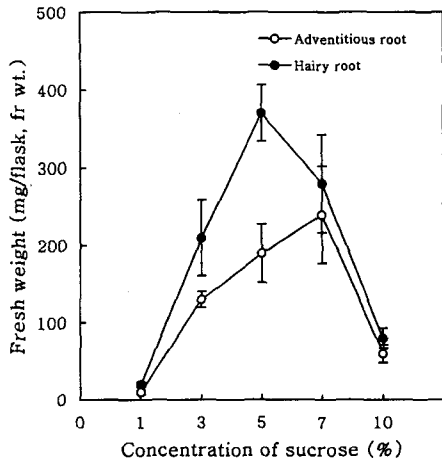


Figure 7. Effect of sucrose on the growth of adventitious roots and transformed roots of *Rumex crispus* in MS liquid medium (0.05 μ M NAA + 0.1 μ M kinetin) for 3 weeks. Bars represent standard errors.

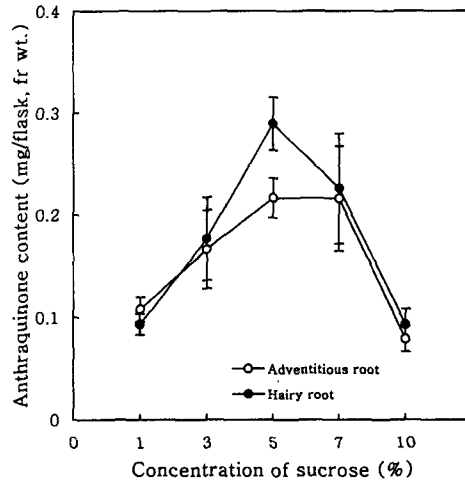


Figure 9. Effect of sucrose on anthraquinone content in adventitious roots and transformed roots of *Rumex crispus* in MS liquid medium (0.05 μ M NAA + 0.1 μ M kinetin) for 3 weeks. Bars represent standard errors.

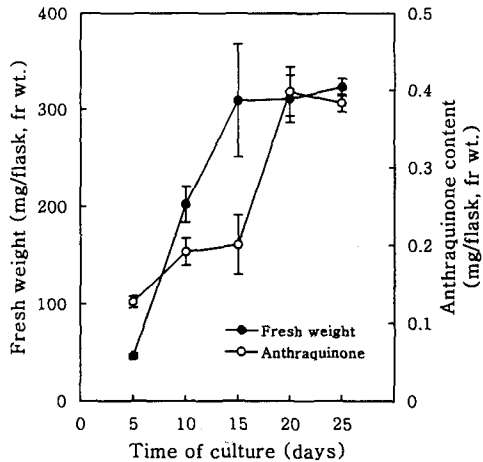


Figure 8. Time course of growth and anthraquinone production in transformed roots of *Rumex crispus* in MS liquid medium (0.05 μ M NAA + 0.1 μ M kinetin) during 25 days of culture. Bars represent standard errors.

Sucrose의 영향

부정근과 모상근의 생장에 미치는 sucrose의 영향을 조사한 실험에서 부정근의 경우 sucrose의 농도가 증가함에 따라 신선중도 증가하여 7%시 240 mg으로 가장 좋은 생장을 보였으며 그 이후 급격히 감소하였다. 모상근의 경우도 sucrose의 농도 증가에 따라 신선중이 증가하여 5%시 370 mg으로 부정근보다 약 54% 증가되었다 (Figure 7).

Anthraquinone의 함량 변화

모상근의 배양 시기별 신선중과 anthraquinone의 함량 변화는 신선중의 경우 배양 5일부터 15일까지 약 6배 증가하여

플라스크당 309 mg을 나타내었으며, 그 이후에는 생장이 둔화되었다. Anthraquinone 함량은 배양 15일과 20일 사이에 급증하여 배양 15일에 비하여 약 2배 증가하여 플라스크당 약 0.4 mg을 나타내었으며, 그 이후는 다소 감소하였다 (Figure 8).

Sucrose 농도에 따른 anthraquinone의 함량은 부정근과 모상근 모두 대체로 생장에 비례하는 결과를 나타내었다. 부정근의 경우 sucrose의 농도에 따라 anthraquinone 함량이 증가하다가 5%시 플라스크당 약 0.22 mg을 정점으로 감소하였다. 모상근의 경우도 anthraquinone 함량이 생장에 비례하였으며, 5%시 플라스크당 약 0.29 mg을 정점으로 급감하였다 (Figure 9).

고 찰

*Agrobacterium rhizogenes*를 이용하여 유도한 모상근은 그 성장 속도와 2차대사산물의 높은 생산성 때문에 식물공학의 재료로 이용되고 있다. Anthraquinone은 여러 가지 약리 작용이 있는 2차대사산물인데 소리쟁이의 뿌리에 많이 함유되어 있는 것에 착안하여 *Agrobacterium rhizogenes*를 이용, 모상근을 유도한 다음 부정근을 대조구로 하여 anthraquinone의 생산량을 높일 수 있는 방법을 모색하고자 하였다.

대조구로 사용할 부정근을 얻기 위하여 소리쟁이의 잎 절편을 NAA와 kinetin을 이용하여 부정근 유기를 위한 적정 농도를 규명하였다. Kinetin 단독 처리시는 어느 농도에서도 부정근이 형성되지 않았는데, 0.1 μ M 농도에서는 아무 변화가 없었으며, 0.5 μ M 처리시에는 캘러스가 형성되었고 그 이상의 농도에서는 아무 변화가 없거나 괴사하였다. NAA를 혼

용한 경우에도 NAA 단독 처리보다 kinetin을 혼용 처리한 경우는 부정근 형성 정도가 낮아 소리쟁이 잎 절편의 경우 5 μM NAA 단독 처리가 부정근 형성에 가장 적당한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Ha 등 (1991)과 Fabijan 등 (1981)의 부정근 형성에 외생 cytokinin이 필수적이라는 결과와는 일치하지 않지만 부정근 형성에 auxin과 조직 절편 내 cytokinin이 대부분 관여하는 것으로 미루어 (Bridglall and Van Staden 1985), 소리쟁이 잎 절편의 경우 조직 내에 부정근 형성에 충분한 cytokinin이 존재하는 반면 auxin은 상대적으로 부족한 것으로 추측된다.

*Agrobacterium rhizogenes*에 의한 모상근의 형질전환 여부는 opine 검출로 확인할 수 있는데, A₄ strain에 의하여 형질전환된 조직에서는 agropine과 mannopine이라는 opine을 합성한다 (Hiroshi et al. 1990). 본 실험 결과 소리쟁이 잎에서 유도된 모상근에서는 mannopine이 검출되었으나 대조구로 사용한 부정근에서는 검출되지 않았으므로 본 모상근은 A₄ strain에 의하여 형질전환된 것임을 확인할 수 있었다.

부정근 및 모상근의 배양을 위한 배지 선발 실험에서 B₅ 배지나 White 배지에 비하여 비교적 고농도의 무기염을 함유한 MS 배지가 다소 성장 우세를 보여 MS 배지를 부정근과 모상근 배양을 위한 기본배지로 사용하였다.

모상근의 성질을 알아보기 위한 실험중 호르몬 결제 배지에서 모상근의 근단을 배양한 결과 2차근인 측지의 근단은 길이 성장만 하였으나 1차근의 근단은 분지능이 있어서 많은 측지가 형성되었다. 또한 모상근의 호르몬 영향을 알아 본 실험에서는 호르몬이 결제되거나, kinetin을 단독 처리하는 경우에는 측지가 형성되지 않았으나 0.1 μM NAA 단독 처리시에는 모용이 형성되었으며, 또한 NAA와 kinetin을 각각 0.05 μM , 0.1 μM 혼용 처리하는 경우에는 부정근성의 측지가 가장 많이 형성되었는데, 이러한 결과는 근단의 분지능은 내생 또는 외생 auxin과 cytokinin의 종류와 농도에 좌우된다는 Wightman과 Thimann (1980)의 견해와 일치되는 것이었다.

부정근과 모상근 모두에서 측근은 0.5 μM NAA 단독 처리구가 각각 약 20개와 24개로 모상근의 측근 형성이 더 많았으며, 전체 측근의 길이는 각각 약 12 cm와 54 cm로 모상근이 약 4.5배 생장이 촉진되었다. *Bryophyllum calcinum*의 근단 배양시에는 (Robins and Hervey 1978) 측근수와 총길이가 cytokinin과 auxin을 함께 처리하였을 때 가장 효과적이었으나, 본 실험에서는 Torrey (1967)의 실험 결과대로 측근 형성은 kinetin이 저해하였으나 측근의 생장은 0.05 μM NAA와 0.1 μM kinetin 혼용 처리구가 가장 양호하여 소리쟁이의 측근 성장에는 radish (Webster and Radin 1972)에서처럼 cytokinin이 필요한 것으로 나타났다. 비록 소리쟁이 모상근 근단의 최적 측근 형성 및 성장에는 부정근과 같은 호르몬 농도를 나타내었으나 모상근 근단의 경우 측지의 분지능과 성장능이 부정근에 비하여 현저히 높은 것을 알 수 있었다. 이로써 모상근의 최적 성장과 anthraquinone 생산 조사를 위

한 sucrose와 배양일에 따른 모상근 배양 실험은 가장 모상근 생장이 좋았던 0.05 μM NAA와 0.1 μM kinetin 혼용 처리구에서 시행하였다.

모상근은 보통 뿌리에 비하여 2차대사산물의 함량이 비슷하거나 (Hamill et al. 1986) 높다고 (Ogasawara et al. 1993) 보고되어 있다. 배양체를 이용한 2차대사산물의 생산성은 생장조절물질, 배지조성 등의 배양조건에 따라 다른데, 특히 sucrose의 농도에 따라 크게 좌우되는 것으로 알려져 있다 (Toivonen and Rosenqvist 1995). Street와 McGregor (1952)는 tomato 근단 배양시 측근수 및 성장에 sucrose가 영향을 미치며, 뿌리 직경, 외피 두께, 도관 수 등이 적정 sucrose 농도까지 비례하여 증가한다고 하였다. 본 실험에서도 부정근의 경우 7%, 모상근의 경우는 5% sucrose 농도에서 가장 높은 성장을 나타내었으며, 부정근의 경우는 3% sucrose 처리구에 비하여 농도가 높아질수록 근단이 흑갈색으로 변하였다. Sato 등 (1991)에 따르면 적정 호르몬 하에서 모상근은 비교적 sucrose 이용율이 높으나 6~18%에서는 생장이 저해된다고 하였는데, 소리쟁이 모상근의 경우 5% sucrose에서 최적 성장을 보였고 그 이상에서는 생장이 저해되는 것으로 나타났다. 이상과 같이 부정근은 7%, 모상근은 5%에서 가장 생장률이 높았으나 모상근의 경우 부정근에 비하여 약 54% 신선중이 증가하여 모상근이 sucrose 요구성은 낮으나 생장은 촉진하는 것으로 나타났다.

모상근의 배양 시기별 anthraquinone 함량 변화는 대체로 성장에 따라 증가하였다. 신선중은 배양 5일부터 15일까지 약 7배 증가한 후로 생장이 정지되었으나 anthraquinone 함량은 배양 15일까지는 크게 증가하지 않다가 배양 20일에 급증하여 배양 15일에 비하여 약 2배 증가하였으며 그 이후 다소 감소하였다. 이러한 경향은 *Nicotiana* 속 (Parr and Hamill 1987)이나 *Rubia tinctorum* (Van der Heijden et al. 1994)의 모상근 배양시 2차대사산물 함량이 양적 성장에 따라 증가한다는 결과와 유사하며, 배양 기간 경과에 따른 anthraquinone 함량 감소는 배양체의 노화 (Norton and Towers 1986)에 의한 것으로 추정된다.

Sucrose 농도에 따른 anthraquinone의 함량 변화는 부정근과 모상근 모두 대체로 성장량에 비례하여 부정근과 모상근 모두 5%시 가장 많은 anthraquinone 함량을 나타내었다. 부정근의 경우 1% 처리구가 10% 처리구에 비하여 생장은 낮았으나 anthraquinone 함량은 다소 높아서 다른 연구자들의 보고 (Sauerwein et al. 1993)와 비슷한 경향이였다. 모상근의 경우는 1%에 비하여 10%시 생장은 높았으나 anthraquinone 함량은 유사하여 부정근과 모상근은 그 성장과 anthraquinone 생산에 대한 sucrose의 이용도가 서로 다른 것을 알 수 있었다.

이상의 고찰을 통하여 소리쟁이 모상근에서의 anthraquinone 생산을 위하여서는 sucrose 5%에서 배양 20일에 추출하는 것이 가장 효율적인 것을 알 수 있으나 보다 경제적

인 anthraquinone 획득을 위하여서는 anthraquinone 함량이 많은 우수한 클론의 선발, 증식 및 유지에 대한 연구가 수행되어야 하며, sucrose 이외의 요소를 이용하여 anthraquinone 함량을 높힐 수 있는 배지의 개발이 필요하다.

적 요

형질전환된 소리쟁이 모상근의 기내 배양시 그 생장 특성과 anthraquinone 생산성을 조사하기 위하여 소리쟁이의 모상근을 *Agrobacterium rhizogenes* strain A₄ 접종에 의하여 잎 절편으로부터 유기하여 부정근과 비교하였다. 잎 절편에서의 부정근 형성은 5 µM NAA를 첨가한 MS배지에서 가장 양호하였다. Paper electrophoresis를 통한 opine 분석 결과 모상근에서만 mannopine이 검출되고 부정근에서는 검출되지 않았다. 부정근과 모상근 모두에서 2차근인 측근 근단은 호르몬을 첨가하지 않은 배지에서 신장만 할 뿐 분지하지 않았으나, 1차근인 주근의 근단은 많은 측지를 내며 빠르게 생장하였다. Anthraquinone 함량 증대에 따른 부정근과 모상근의 생장에는 MS 기본 배지가 가장 양호하였다. 부정근과 모상근 배양시 생장량과 anthraquinone 함량은 5% sucrose를 포함한 0.05 µM NAA와 0.1 µM kinetin으로 조성된 MS 액체 배지에서 가장 높은 것으로 나타났으며, 모상근의 anthraquinone 함량은 배양 일수에 따라 증가하다가 배양 25일 이후에는 감소하였다.

사사 - 본 연구는 1997년도 한림대학교 학술연구비에 의한 결과입니다.

인용문헌

- Alan IK, Deans SG, Svoboda KP, Gray AI, Waterman PG (1993) Volatile oils from normal and transformed root of *Artemisia absinthium*. *Phytochemistry* 32:1449-1451
- Barba B, Diaz JG, Herz W (1994) Cassanes and anthraquinones from *Chamaecrista greggii*. *Phytochemistry* 37: 837-845
- Batnard DL, Huffman JH, Morris JLB, Wood SG, Hughes BG, Sidwell WR (1992) Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus. *Antiviral Res*: 63-77
- Bridglall SS, Van Staden J (1985) Effects of auxin on rooting and endogenous cytokinin levels in leaf cutting of *Phaseolus vulgaris* L. *J Plant Physiol* 117: 287-292
- Christen P, Margaret F, Phillipson JD, Evans WC (1990) Alkaloids of hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Rep* 8:250-252
- Fabijan D, Talor JS, Reid DM (1981) Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Heliantus annuus*) seedling. Action of gibberellins, cytokinin, auxin and ethylene. *Physiol Plant* 53: 569-577
- Furuya T, Kojima H (1971) 4-hydroxydigitolutein, a new anthraquinone from callus tissue of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry* 12(5):1607-1611
- Guerche P, Jouanin L, Tepfer D, Pelletier G (1987) Genetic transformation of oilseed rape (*Brassica napus*) by the TR-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and analysis of inheritance of the transformed phenotype. *Mol Gen Genet* 206:382-386
- Ha KS, Han TJ, Jo SH (1991) Effects of nitrogen sources and auxin on the formation of adventitious root and callus in soybean (*Glycine max. L.*) tissue culture. *Kor J Plant Tiss Cult* 18:33-37
- Hamill JD, Parr R, Robins J, Rhodes MJ (1986) Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* 5: 111-114
- Hiroshi Y, Shimomura K, Satake M, Mochida S, Tanaka M, Endo T, Kaji A (1990) Lobeline production by hairy root culture of *Lobelia inflata* L. *Plant Cell Rep* 9:307-310
- Jung G, Tepfer D (1987) Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown *in vitro*. *Plant Sci* 50:145-151
- Knopp E, Strauss A, Wehrli W (1988) Root induction on several *Salanaceae* species by *Agrobacterium rhizogenes* and determination of tropane alkaloid content. *Plant Cell Rep* 7:590-593
- Leistner E (1973) Biosynthesis of morindone and alizarin in intact plants and cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Phytochemistry* 12:1669-1674
- List PH, Horhammer L (1979) Hagers handbuch der pharmazeutischen praxis. Vol 6. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 95-113
- Mugnier J (1988) Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* 7:9-12
- Norton RA, Towers GHN (1986) Factors affecting synthesis of polyacetylenes in root cultures of *Bidens alba*. *J Plant Physiol* 122:41-53
- Ogasawara T, Chiba K, Tada M (1993) Production in high-yield naphthoquinone by a hairy root culture of *Sesamum indicum*. *Phytochemistry* 33:1095-1098
- Palu G, Palumbo M, Antonello G, Meloni GA, Marciani-Magno S (1986) A search for potential antitumor agents: Biological effects and DNA binding of anthraquinone derivatives. *Mol Pharm* 29: 211-217
- Parr A, Hamill J (1987) Relationships between biosynthetic capacities of *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy roots and intact, uninfected *Nicotiana* plants. *Phytochemistry* 26:3241-3245
- Payne J, Michael J, Rhodes C, Robins RJ (1987) Quinoline alkaloid

- production by transformed cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Planta Med* **53**:367-372
- Petit A, Berkaloff A, Tempe J** (1986) Multiple transformation of plant cells by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organization of T-DNA in crown gall and hairy root. *Mol Gen Genet* **202**:388-393
- Pitre S, Srivastava SK** (1987) Two new anthraquinones from the seeds of *Peganum harmala*. *Planta Med.* **53**:106-107
- Robins WJ, Hervey A** (1978) Auxin, cytokinin and growth of excised roots of *Bryophyllum calycinum*. *Amer J Bot* **65**:1132-1134
- Sato K, Yamazaki T, Okuyama E, Yoshihira K, Shimomura K** (1991) Anthraquinone production by transformed root cultures of *Rubia tinctorum*: Influence of phytohormones and sucrose concentration. *Phytochemistry* **30**:1507-1509
- Sauerwein M, Shimomura K, Wink M** (1993) Incorporation of 1-¹³C-acetate into tropane alkaloid production by hairy roots cultures of *Hyoscyamus albus*. *Phytochemistry* **32**:905-909
- Shen W, Davioud HE, David C, Barbier-Brygoo H, Tempe J, Guern J** (1990) High sensitivity to auxin is a common feature of hairy root. *Plant Physiol* **94**:554-560
- Singh V, Singh J, Sharma JP** (1992) Anthraquinones from heartwood *Cassia siamea*. *Phytochemistry* **31**:2176-2177
- Stanton BG, Schilperoort AR, Verma DP** (1991) Binary vectors. In: An G, Ebert PR, Mitra A, (eds). *Plant Molecular Biology Manual*, 4th edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp A3/5
- Street HE, McGregor SM** (1952) The carbohydrate nutrition of tomato. III. The effects of external sucrose concentration on the growth and anatomy of excised roots. *Ann Bot* **62**:185-195
- Toivonen L, Rosenqvist H** (1995) Establishment and growth characteristics of *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* **41**:249-258
- Torrey JG** (1967) Root hormones and plant growth. *Ann Rev Plant Physiol* **27**:437-459
- Van der Heijden R, Verpoorte R, Hoekstra SS, Hoge HJC** (1994) Nordamnanthal, a major anthraquinone from an *Agrobacterium rhizogenes* induced root culture of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol Biochem* **32**:399-404
- Webster BD, Radin JW** (1972) Growth and development of cultured radish roots. *Amer J Bot* **59**:744-751
- Wightman F, Thimann KV** (1980) Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots. 1. Source of primordia-inducing substances in the primary root of pea seedling. *Physiol Plant* **49**:13-20
- Yensew A, Dagne E, Muller M, Steglich W** (1994) An anthrone, an anthraquinone and two oxanthrone from *Kniphofia foliosa*. *Phytochemistry* **37**:525-528

(접수일자 1998년 7월 24일)