

Agrobacterium rhizogenes 에 의하여 유도된 도라지 (*Platycodon grandiflorum* DC.) Hairy Root 의 배양

金炳魯·李載赫*·黃 昶
(전남대학교 생물학과, *문교부 편수관)

Culture of Hairy Roots Induced by *Agrobacterium rhizogenes* in *Platycodon grandiflorum* DC. (Balloon Flower)

Kim, Byung Ro, Jae Hyuk Lee* and Baik Hwang
(Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju
*Senior Coordinator of Ministry of Education)

ABSTRACT

Induction and culture of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes* A₄ were carried out in *Platycodon grandiflorum* DC. After 2-4 weeks of inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* hairy roots were formed at root segments in the balloon flower. Optimized growth of hairy roots was obtained in hormone-free MS medium, 6% sucrose and pH 5.8. The pattern of ginsenoside in the transformed roots was not different with that in the ordinary roots.

서 론

토양 미생물인 *Agrobacterium rhizogenes* 는 chromosomal DNA 외에 Ri-plasmid 를 가지고 있으며 (Moore *et al.*, 1979) 일부 고등식물의 상처부위에 감염되면 숙주 식물세포의 nuclear genome 안으로 Ri-plasmid 의 일부인 T-DNA 가 삽입되어 (Chilton *et al.*, 1981 ; Zambryski *et al.*, 1989) 식물세포의 형질을 전환시켜 hairy root 를 형성한다 (Teper, 1984 ; Maarten *et al.*, 1985). 이와 같이 형성된 hairy root 는 T-DNA 상에 존재하는 식물 성장호르몬 합성에 관여하는 효소 유전자의 발현으로 외부의 호르몬 공급없이도 빠른 성장을 보이며 (Yoshikawa and Furuya, 1987 ; Knopp *et al.*, 1988 ; Van de Geign *et al.*, 1988), 유전적으로 안정되어 있어 계대간 배양에서도 변이를 보이지 않는 것으로 알려져 있다 (Aird *et al.*, 1988). 또한 생산하는 물질도 모식물체의 뿌리와 거의 동일하게 나타나므로 (Yoshikawa and Furuya, 1987) 이와 같은 hairy root 를 이용하여 기내배양을 통한 약용성분, 색소, 방향성 물질 등과 같은 2 차 대사산물을 효율적으로 얻고자 하는 시도가 많이 이루어지고 있다 (Hamill *et al.*, 1986 ; Kamada *et al.*, 1986 ; Mano *et al.*, 1986 ; Yoshikawa and Furuya,

1987 ; Parr *et al.*, 1988 ; Hwang *et al.*, 1989).

도라지는 초롱꽃과에 속하는 다년생 숙근초로서 saponin, platycodin, inulin, phytosterin, platycodinin, 칼슘, 인 등이 함유되어 있어 약용과 식용 등으로 이용되고 있다. 도라지의 주 약용 성분인 saponin 은 가수분해가 어렵고 식물체의 세포질에 용존되어 있으며, 조 saponin 의 함량은 0.7-1.3% 정도이나 재배조건, 지역적 특성 또는 추출과정에서의 물리화학적 조건에 의하여 성분상 많은 차이를 보이게 된다 (Do *et al.*, 1986 ; Shin and Kim, 1987).

본 연구에서는 *Agrobacterium rhizogenes* 를 이용, 도라지로부터 hairy root 를 유도하고 기내 배양의 최적조건을 규명함으로써 약리적으로 유용한 2 차 대사산물을 안정적으로 얻기 위한 기초 자료를 획득하고자 시도하였다. 현재까지 도라지에서 *Agrobacterium rhizogenes* 를 이용한 hairy root 유도 및 배양에 관한 결과는 보고된 바 없다.

재료 및 방법

식물 재료 및 사용균주. 재배종인 도라지 (*Platycodon grandiflorum* DC.) 뿌리를 70% (v/v) ethanol 로 10 분, 5% (v/v) sodium hypochlorite 용액으로 15 분간 표면 살

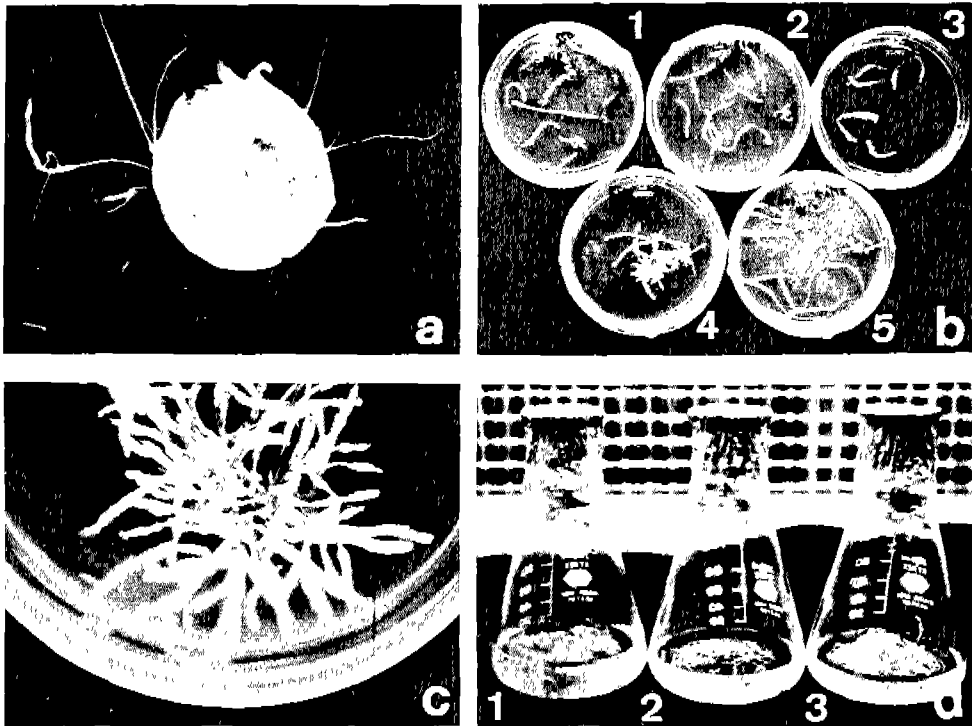


Fig. 1. a. Hairy roots induced from balloon flower after infection of *Agrobacterium rhizogenes*. b. Hairy roots cultured on MS medium supplemented with hormones. b-1,2, 1.0 mg/l kinetin + 2.0 mg/l NAA; b-3, 1.0 mg/l kinetin + 1.0 mg/l NAA; b-4,5, 2.5 mg/l kinetin. c. Hairy roots cultured on MS medium without hormones. d. hairy roots cultured in liquid medium without hormones. d-1,3, hairy roots; d-2, ordinary roots.

균하여 무균수로 3회 세척하여 사용하였다.

사용균주는 *Agrobacterium rhizogenes* strain A₄ (agropine-type)로서 이를 potato extract medium (2% sucrose, 1.5% agar)에 48시간 사면 배양(25±1°C)한 후 무균수에 회석하여 사용하였다.

Hairy root의 유도 및 배양. 표면 살균한 도라지 뿌리를 1-2cm 두께로 절단, 기부면에 10⁸-10⁹ bacteria/ml의 균을 접종하여 petri dish (15×2.5 cm)에 넣어 암소(25±1°C)에서 hairy root를 유도하였다.

뿌리 절편의 형성층 부위로부터 유도된 hairy root를 생장점 부위로부터 10mm 길이로 절취하여 식물 호르몬이 첨가되지 않은 MS (400 mg/l carbenicillin, 100 mg/l vancomycin, 3% sucrose, pH 5.8) 고체배지에서 배양하여 균을 제거한 후, 생장이 좋은 뿌리만을 선별하여 항생제가 들어있지 않은 액체 배지에서 2주 간격으로 6개월 이상 계대배양하였다.

배지조건에 따른 생장률 비교는 MS (Murashige and Skoog, 1962)와 White (White, 1954) 배지를 이용하였으며, 배지의 pH를 2에서 8까지, sucrose의 농도를 2%에서 10%까지, 그리고 kinetin과 NAA 첨가에 의한 효과를 조사하였다. 생장률 측정은 20ml의 액체배지가 들

어있는 100ml 삼각플라스크에 0.2g (fresh weight)의 hairy root를 접종하여 4주간 배양(26±1°C, 100 rpm)한 후 fresh weight를 측정하였다.

Opine 분석. 유도된 hairy root의 형질전환 여부를 확인하기 위하여 Petit 등 (1986)의 방법을 이용하였다. 1g (fresh weight)의 hairy root를 1% (v/v) HCl 1ml를 첨가하여 마쇄한 후 30분간 중탕하여 원심분리한 후 상등액을 50μl 정도로 농축시킨 후 5μl를 Whatman 3mm paper에 점적하고 horizontal electrophoresis system (LKB Co. Model 2217)을 사용하여 1000V로 약 50분간 전개하였다. 완충용액은 formic acid : acetic acid : water를 30 : 60 : 90 (v/v/v)의 비율로 조성하였고 전개 후 paper를 건조시켜 염색액 A (1g AgNO₃를 소량의 증류수에 녹인 후 200ml의 acetone을 가함)에 염색시킨 후 염색액 B (30% methonal에 2% NaOH를 가함)에서 발색시킨 후 NH₄OH로 여분의 AgNO₃를 씻어내어 5% Na₂S₂O₃ 용액에 고정하여 1시간 이상 흐르는 물로 세척하였다.

Ginsenoside pattern 비교. Hairy root와 모식물체 뿌리의 ginsenoside pattern 비교는 Shibata (1966)와 Yoshikawa와 Furuya (1987)의 방법을 병행하여 사용하였다. Hairy root 10g (fresh weight)를 80% (v/v) meth-

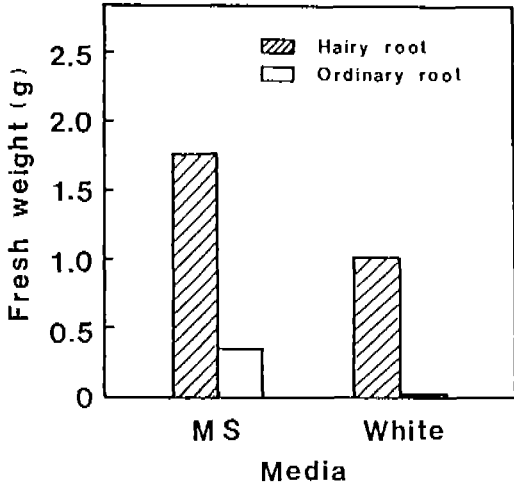


Fig. 2. Fresh weight of transformed hairy roots and ordinary roots grown on different media. About 0.2g (F.W.) of roots was inoculated into and cultured on media for 4 weeks in darkness.

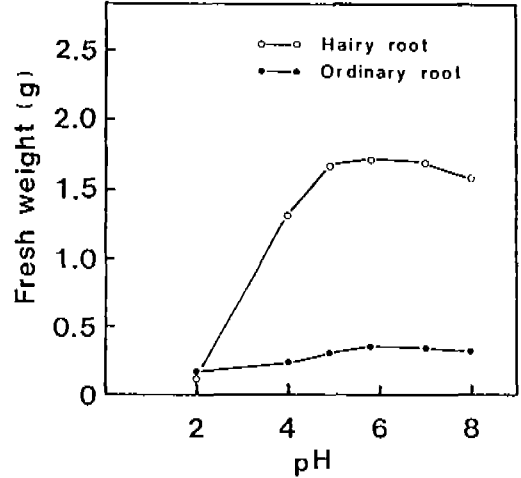


Fig. 4. Effect of pH on the growth of transformed hairy roots and ordinary roots. Cultured on MS medium (6% sucrose) without hormones.

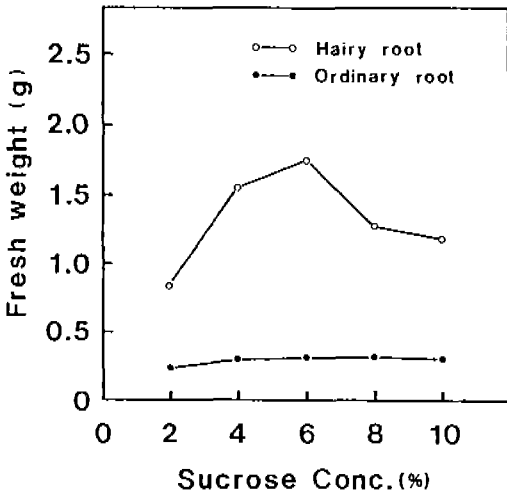


Fig. 3. Effect of sucrose on the growth of transformed hairy roots and ordinary roots. Cultured on MS medium (pH 5.8) without hormones.

을 분무하여 100°C에서 10분간 건조, 발색시켜 조사하였다. 표준시료는 한국인삼연초연구소로부터 제공받은 순품 saponin을 사용하였다.

결과 및 고찰

Hairy root의 유도 및 배양. 도라지 뿌리절편에 *Agrobacterium rhizogenes*를 접종한 후 2-4주 후에 형성층 부위를 중심으로 hairy root가 유도되었으며 (Fig. 1a), 유도된 hairy root를 각기 다른 조성의 배지에서 액체배양 하였을 때 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지에서 White 배지보다 높은 생장률을 나타내는 것을 확인하였다 (Fig. 2). Fig. 3은 탄소원으로서 sucrose 농도가 hairy root 생장에 미치는 영향을 본 것으로 6% 농도에서 최적 생장을 보였다. Fig. 4는 배지의 pH에 따른 hairy root의 생장 정도를 조사한 것으로 pH 5-6 사이에서 최적 생장을 보였으나, Hwang 등(1989)은 당근의 hairy root 배양시 pH 4-8 사이에서, Mano 등(1986)은 *Scopolia japonica*의 hairy root 배양시 pH 7에서 최적 생장을 나타낸다고 하였다.

anol에 24시간 냉침하여 용액을 추출하고 80% methanol에 3시간 간격으로 3회 재추출하여 얻어진 상정액을 감압 농축하여 증류수를 가하고 ethyl ether를 사용하여 지용성 물질을 제거하였다. 여기에 수포화된 n-butanol를 가하고 증류수로 2-3회 세척한 후 감압 농축하여 crude saponin을 얻었다. Crude saponin를 표준시료와 함께 TLC plate (Merck silica gel 60 F₂₅₄)에 점적하여 수포화 n-butanol과 CHCl₃ : MeOH : H₂O = 65 : 35 : 10 (v/v/v)을 사용하여 전개시킨 후 건조시켜 10% (v/v) 황산 methanol 용액

Fig. 5는 Hairy root 생장에 있어서 외부 호르몬의 영향을 알아본 것으로 kinetin과 NAA를 첨가하였을 때에 비하여 외부 호르몬이 제거된 조건에서 생장이 높게 나타났다 (Fig. 1b, c). 이는 Hwang 등(1989)의 당근의 경우와 Yoshikawa와 Furuya (1987)의 인삼의 hairy root 배양에서 외부 호르몬 첨가시 생장이 촉진된다는 보고와 다른 결과이나 일반적으로 *Agrobacterium rhizogenes*의 T-DNA에 의해 형질전환된 조직은 T-DNA 상의 auxin과 cytokinin 합성에 관여하는 효소 유전자의 발현으로 배지에 외

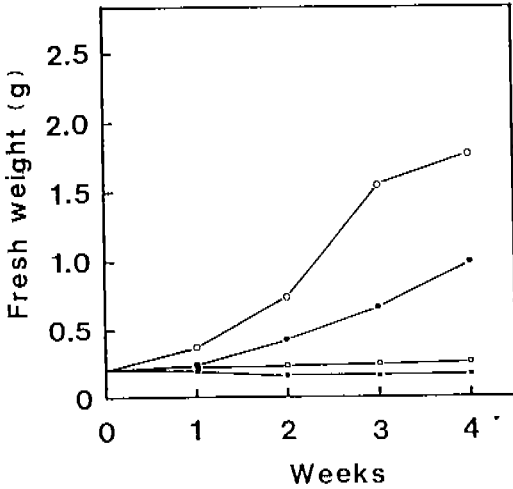


Fig. 5. Effect of hormones on the growth of transformed hairy roots and ordinary roots. Cultured on MS medium (6% sucrose, pH 5.8) without hormones. -●-, 2.5 mlll Kinetin; -□-, 1.0 mlll Kinetin + 2.0 mlll NAA; -■-, 1.0 mlll Kinetin + 1.0 mlll NAA; -○-, hormone free.

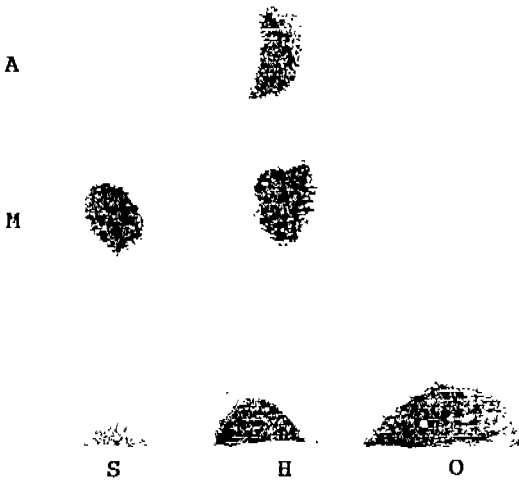


Fig. 6. Paper electrophoretic analysis of extracts from hairy roots of *Platycodon grandiflorum* DC. Lane S: standard mannopine (M, mannopine; A, agropine), Lane H: hairy roots, Lane O: ordinary roots.

부 호르몬의 공급없이도 생장을 지속할 수 있다는 사실 (Knopp *et al.*, 1988 ; Parr *et al.*, 1988)과 일치되는 것이 다.

유도된 hairy root 는 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지 (6% sucrose, pH 5.8)에서 최적 생장을 나타내어, 처음 0.2g (fresh weight)를 접종하여 4주간 액체배양 후 약 10 배 정도의 생장 정도를 보였다 (Fig. 1d). 이러한 생장은 인

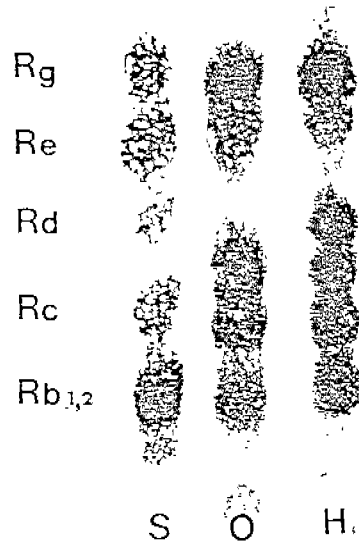


Fig. 7. Thin layer chromatogram for ginsenoside pattern of transformed hairy roots and ordinary roots. Lane S: standard saponine (Ginseng), Lane H: hairy roots, Lane O: ordinary roots.

삼에서 3 배 (Yoshikawa and Furuya, 1987), 당근에서 10 배 (Hwang *et al.*, 1989), 그리고 *Beta vulgaris* 에서 20 배와 *Nicotiana rustica* 에서 30 배 (Hamill *et al.*, 1986) 등과 비교할 때 유의할만한 생장 정도를 보여줌으로써 hairy root 배양에 있어서 최적 조건 (배지성분, 물리적 요인 등)의 확립이 hairy root 의 대량 증식 및 유용한 물질을 안정적으로 얻는데 필요하리라 사료된다.

Opine 분석. *Agrobacterium rhizogenes* 의 Ri-plasmid 의 T-DNA 에는 opine 이라는 식물체에서 합성되지 않는 것으로 알려진 특이한 화합물을 합성하는 유전자를 포함하고 있으므로 형질이 전환된 hairy root 는 T-DNA 의 발현에 의하여 opine 이 합성된다고 알려져 있다 (Petit *et al.*, 1986). 따라서 도라지에서 유도된 hairy root 의 형질 전환 여부를 확인한 결과 agropine 과 manopine 이 검출되어 형질이 전환되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

Ginsenoside pattern 비교. Fig. 7 은 형질전환된 hairy root 와 모식물체 뿌리로부터 추출한 saponin 의 ginsenoside pattern 을 비교하기 위해 수포화 n-butanol 을 전개용매로 TLC 를 실시한 것으로 hairy root 와 모식물체 뿌리의 Rg₁-group 을 중심으로 한 ginsenoside pattern 에는 큰 변화가 없었다. 이와 같은 결과는 Yoshikawa 와 Furuya (1987) 의 인삼으로부터 유도된 hairy root 배양에서 모식물체와의 ginsenoside pattern 에 있어서 차이가 없 이 계대간 지속된다는 보고와 일반적으로 *Agrobacterium rhizogenes* 에 의해 형질전환된 조직은 함유하는 물질에 있어서 모식물체의 뿌리와 거의 동일하다는 결과 (Aird *et*

al., 1988)와 일치된다.

적 요

도라지 (*Platycodon grandiflorum* DC.) 뿌리 절편에 *Agrobacterium rhizogenes* strain A4를 접종하여 암소로부터 2-4주 후에 절편의 형성층 부위를 중심으로 hairy root가 유도되었다. 유도된 hairy root는 opine 분석을 통해 agropine과 mannopine이 검출되어 형질이 전환되었음을 확인하였으며, 배지, sucrose 농도, pH, 식물 호르몬 등의 배양조건을 달리하여 hairy root의 생장률을 조사한 결과 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지(6% sucrose, pH 5.8)에서 최적 생장을 보여 10배 정도 생장증가를 보였다. 또한 형질전환된 hairy root와 모식물체 뿌리의 성분상의 차이를 조사하기 위해 TLC에 의해 saponin의 ginsenoside pattern을 비교해본 결과 큰 차이가 없었다.

REFERENCES

- Aird, E.L.H., J.D. Hamill and M.J.C. Rhodes. 1988. Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant cell. Tissue and Organ culture* **15**: 47-57.
- Chilton, M., D.A. Tepfer, A. Petit, C. David and J. Tempe. 1981. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into genome of the host plant root cells. *Nature*. **295**: 432-434.
- Do, J.H., J.G. Jang, K.S. Lee and H.S. Sung. 1986. Effect on stability of ginseng saponins by various physical and chemical treatments. *Kor. J. Ginseng Sci.* **10**(2): 369-375.
- Hamill, J.D., A.J. Parr, R.J. Robins and M.J. Rhodes. 1986. Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* **5**: 111-114.
- Hwang, B., J.C. An and J.H. Lee. 1989. Physiological studies on the formation of hairy root by the *Agrobacterium Rhizogenes*; VI. Culture of hairy root and survey of the culture condition. *Kor. J. Biotech. Bioeng.* **4**(3): 246-252.
- Kamada, H., N. Okamura, M. Satake, H. Harada and K. Shimomura. 1986. Alkaloid production by hairy root culture in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep.* **5**: 239-242.
- Knopp, E., A. Strauss and W. Wehrli. 1988. Root induction on several *Solanaceae* species by *Agrobacterium rhizogenes* and determination of tropane alkaloid content. *Plant Cell Rep.* **7**: 590-593.
- Shibata, S., T. Ando and O. Tanaka. 1966. Chemical studies on oriental plant drugs: Prosapogenin of the ginseng saponin. *Chem. Pharm. Bull.* **14**(10): 115-116.
- Sin, D.Y. and H.J. Kim. 1987. Studies on the effects of water, pH, soil, growth regulator on seed germination of Bell flower plant. (*Platycodon grandiflorum* DC.). *J. Agric. Sci. Res. of Sinchon Natl. Univ.* **1**: 45-65.
- Van de Geign, S.C., J. Helder, H.G. Van Horden and CH. H. Hanisch Tencate. 1988. Growth root respiration and phosphorous utilization of normal and *Agrobacterium rhizogenes* transformed potato plants. *Plant and Soil* **11**: 283-288.
- White PR. 1954. In "The cultivation of animal and plant cells". The Ronald Press, New York.
- Yoshikawa, T. and T. Furuya. 1987. Spoin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* **6**: 449-453.
- Zambryski, P., J. Tempe and J. Schell. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* **56**: 193-201.

(1990. 7. 6 接受)