한국생물공학회지 제 13권 제 2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 13. No. 2, 155-161(1998)

활나물(*Crotalaria sessiliflora* L.)로부터 모상근의 유도 및 배양

김 영 준 · [1]표 병 식 · 김 광 수 · † 황 백
전남대학교 생물학과, [1]동신대학교 식품생물공학과
(접수 : 1997. 10. 22., 게재승인 : 1997. 12. 30.)

Induction and Culture of Hairy Roots of *Crotalaria sessiliflora* L.

Young-Jun Kim, Byoung-Sik Pyo[1], Kwang-Soo Kim, and Baik Hwang†
Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
[1]Department of Food and Biotechnology, Dongshin University, Naju, Chonnam 520-714, Korea
(Received : 1997. 10. 22., Accepted : 1997. 12. 30.)

The hairy roots of *Crotalaria sessiliflora* were induced from the tissue segments infected with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. The induced hairy roots were subjected to paper electrophoresis for the detection of opine-positive clones which were considered to have been transformed. Mannopine and agropine were presented in hairy root clones while mannopine was presented in two hairy root clones. Eight hairy root clones were selected and cultured in MS, B5 and WP media. Each of hairy root clones was showed a difference in branch pattern and growth rate. The best culture medium and culture conditions of hairy roots were in ½MS(3% sucrose, pH 5.7) liquid medium at 25℃, 70 rpm under dark, the growth rate in ½MS liquid medium was increased with 210-fold more than that of inoculated hairy roots and with 2-fold more than that in MS liquid medium. Also, the adequate condition for hairy root growth was such that concentration of KH_2PO_4 was 1.25mM and the ratio of NH_4^+ : NO_3^- was 1 to 3 in MS medium. The presence of pyrrolizidine alkaloids, monocrotaline, in the hairy roots was detected by TLC.

Key Words : *Crotalaria sessiliflora, Agrobacterium rhizogenes,* hairy root, opine, monocrotaline,

서 론

활나물(*Crotalaria sessiliflora* L.)은 동아시아에 분포되어 있는 콩과식물로서 항암제로 이용되고 있는 pyrrolizidine alkaloids (PAS)계인 monocrotaline을 생합성하며(1) 이와같은 PAS는 각종 암 치료에 이용되고 있는 유용한 2차대사산물이다. PAS는 마우스육종 180, 백혈병 L615, Walker 암 256 등의 치료에 외용, 내복 및 주사제로 이용되며 중국에서는 민간약으로써 피부암, 자궁경암, 음경암, 유선암, 위암, 간암, 식도암, 폐암, 만성기관지염 등의 치료에 이용되고 있다(2, 3, 4, 5). PAS는 식물의 종자 및 전초에서 생합성 되어지며(6), 식물 자체에 있어서 방어화학 물질로써 이용하는 2차대사산물로 알려져 있으며(7), 일부 곤충들은 자신의 방어화학 물질로서 식물의 PAS를 저장하기도 하고 pheromone의 전구체로도 이용한다(8). 활나물과 동속약초인 *Crotalaria assamica* Benth에는 종자에 약 3.5%의 monocrotaline이 함유되어 있다는 보고가 있다(9).

*Agrobacterium rhizogenes*는 대부분의 쌍자엽 식물에 감염되어 모상근을 유도한다. 모상근을 유도하는 Ri plasmid 중 식물세포로 전이되어 식물의 게놈 내에 삽입되는 T-DNA의 T_R-DNA에는 오옥신과 opine을 합성하는 유전자가 있으며, T_L-DNA에는 뿌리 형성을 촉진하고 잎 및 정단 분열를 억제하는 유전자를 소유하고 있다(10, 11, 12). *A. rhizogenes*에 의해 형질전환되어 유도되는 모상근은 식물생장조절제의 공급 없이도 많은 측지를 만들면서 활발하게 생장하며, 오랜 배양기간에 있어서도 유전 및 생화학적으로 안정하므로 2차대사 산물의 획득에 있어서 매우 유용하게 활용될 수 있다(13, 14), 특히 모상근에서 합성되는 일부 2차대사산물의 경우에 있어서 원식물의 뿌리와 비교해 볼 때 질적·양적인 수준에서 월등한 합성을 보여주는 경우도 보고되고 있다(15, 16). 2차대사산물의 생산에 모상근의 이용은 미분화된 세포의 배양에 비해 많은 잇점이 있다(17). PAS는 여러종의 식물에서 확인되었으나(18, 19, 20, 21), 기내에서 *A. rhizogenes*에 의해 형질전환된 모상근의 유도와 배양 및 모상근으로부터 PAS의 생산에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없다. 이와 같은 모상근 배양 기술을 이용해서 항암제로서의 약리적인 효능을 지닌 monocrotaline의 생산 가능성을 확인하는 연구가 무엇보다도 필요하다. 따라서 본 연구에서는 활나물 조직에 *A. rhizogenes*를 감염시켜 형질전환된 모상근을 유도하고, 이들의 최적 배양배지 및 배양조건을 확립하여 활나물의 모상근 배양에 관한 기초 연구를 수행하고자 하였다.

† Corresponding Author : Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
Tel : 062-530-3392, Fax : 062-530-3409
e-mail : bhwang@chonnam.ac.kr

재료 및 방법

식물 재료 및 균주

활나물(*Crotalaria sessiliflora* L.)의 종자를 70% EtOH로 3분, 2% NaOCl 용액으로 20분간 표면 살균하고 무균수로 3회 세척한 후 ½MS 고체배지에서 무균적으로 발아시킨 다음 유식물체에서 잎(0.5cm x 0.5cm)과 줄기(1cm)를 절편화하여 본 실험에 사용하였다.

사용 균주는 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834이며, 감자 추출배지(2% potato, 1.5% sucrose, 1.5% agar)로 25℃에서 48시간 암배양한 후 사용하였다.

모상근의 유도 및 배양

기내에서 배양된 유식물로부터 잎과 줄기 절편의 절단면에 direct infection 방법에 의해 균을 접종한 후 항생제(claforan 0.3g/L)가 첨가된 ½MS 고형배지(3% sucrose)에 치상하여, 25℃ 암소에서 배양, 모상근을 유도하였다. 유도된 모상근은 생장이 활발한 근단으로부터 약 1cm 정도 절취하여 항생제(claforan 0.5g/L)가 첨가된 MS(22) 고형배지 또는 액체배지에서 배양하여 균을 완전히 제거한 다음, 항생제가 첨가되지 않은 MS 배지에서 약 2주 간격으로 계대배양하였다

모상근 선발 및 형질전환 확인

유도된 모상근 중 생장률과 외부형태에 따라 각각 따로 절취, 배양하여 선발된 순서에 따라 8개의 모상근을 획득하여 clone을 CS1(*Crotalaria sessiliflora*의 모상근 1)에서부터 CS8까지 명명하였다. 모상근의 형질전환 확인은 Petit 등(23)의 방법에 따라 paper electrophoresis를 이용하여 opine의 합성여부로 조사하였다. 즉 100mg(dry wt.)의 시료를 2mL의 70%(v/v) EtOH 용매로 균질화 한 다음 10분간 초음파 처리하고, 1,500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 freeze dryer에서 감압건조시킨 후 100μL의 증류수로 재용해 시켜 10μL를 Whatman 3MM paper에 점적하고 horizental electrophoresis system (LKB Co, Model 2217)을 사용하여 20V/cm로 전기영동하였다. 완충용액은 formic acid / acetic acid / H_2O를 1 / 3 / 16의 비율로 조성하였고, 전기영동이 끝난 후 paper를 건조하여 1%(w/v) $AgNO_3$가 든 acetone으로 염색시킨 다음, 2%(w/v) NaOH가 든 30%(v/v) MeOH에서 발색시키고, NH_4OH로 여분의 $AgNO_3$를 제거한 다음 10%(w/v) $Na_2S_2O_3$와 1.5%(w/v) $Na_2S_2O_5$ 혼합액으로 고정하고 물로 세척, 건조시켜 형질전환 유무를 확인하였다. 대조구는 무균발아된 활나물의 뿌리조직을 시료로 하였으며, 표준 mannopine은 Sigma Chem. Co.(U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

배양조건에 따른 생장률 측정

선발된 모상근의 배양조건에 따른 생장률을 조사하기 위해 MS, WP(24), B5(25) 및 White(26) 등의 배지(3% scurose, pH 5.7)에서 배양하였으며, 모상근 clone 중 분지능 및 생장이 가장 활발한 모상근 CS6만을 이용하여 각각의 배지에서 배양기간에 따른 생장곡선의 조사와 배지의 pH, 탄소원의 종류 및 농도, 인산과 질소원의 종류 및 농도 등을 달리하여 모상근의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 배양조건에 따른 모상근 배양은 100mL 플라스크(배지량 40mL)에 근단으로부터 0.5cm 길이로 절단한 10개의 모상근(2mg, dry wt.)을 접종하여 암조건, 온도 25℃±1, 회전교반기(70rpm)에서 10회 반복으로 3주간 암배양 하였다. 배양기간에 따른 생장곡선은 배양 5일 간격으로 채취한 모상근을, 각각의 배양조건에 의한 생장률은 3주간 배양한 모상근을 취하여 흡습지로 수분을 제거한 다음 freeze dryer(Eyela, FD-81)로 24시간 동안 충분히 동결건조시킨 후 초기의 모상근 접종량 2mg으로부터 증가된 건중량(dry wt.)으로 조사하였다.

Monocrotaline 분석

*A. rhizogenes*에 의해 형질전환된 활나물의 모상근 CS6에 있어서 monocrotaline의 생합성에 관한 TLC 분석은 L'Empereur(8)의 방법을 변형하여 실시하였다. 10g(dry wt.)의 모상근을 0.5%(v/v) HOAc가 든 100mL의 65%(v/v) MeOH로 4℃에서 24시간 동안 추출하여 여과하고 감압증발 시킨 다음, 100mL의 1M HCl로 용해시켜 15mL의 hexane과 15mL의 Et_2O로 세척한 후 NH_4OH를 사용하여 pH를 9로 조정한 후 $CHCl_3$로 3회 층분리로 추출하여 alkaloids 추출물은 감압증발시켜 1mL의 MeOH로 재용해시켰으며, 대조구인 활나물 종자도 동일한 방법으로 추출하였다. alkaloids 추출물, 대조구, 표준 monocrotaline(Sigma chem. Co.)을 TLC plate(silica gel $60F_{254}$, Merk)에 10μL 점적하고 전개용매($CHCl_3$: MeOH : NH_4NO_3 = 8.5 : 1.4 : 0.1)에서 전개한 후 Dragendorff(Sigma chem. Co.)시약으로 반응시켜 R_f 값을 비교 분석하여 monocrotaline의 존재 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

모상근 유도 및 배양

기내에서 무균발아된 유식물체로부터 절취된 잎과 줄기의 조직절편에 *A. rhizogenes* ATCC 15834를 direct infection 방법으로 접종하여 항생제가 첨가된 ½MS 배지에 치상, 배양 3-4주 후에 줄기 및 잎 절단면의 균 접종 부위에서 다수의 모상근

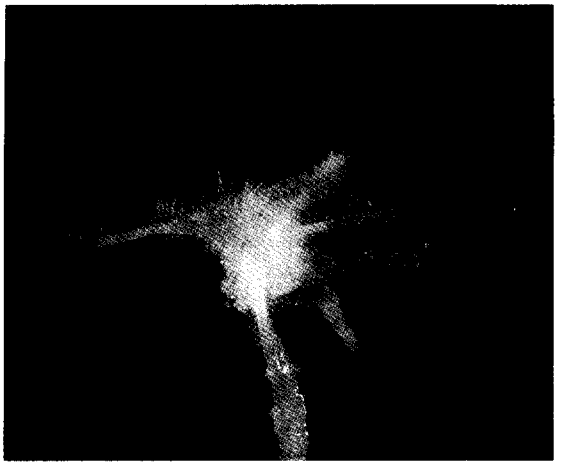

Figure 1. Hairy roots induced from tissue sections of *Crotalaria sessiliflora* treated with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834.

이 형성되었다(Figure 1). 유도된 모상근 각각의 근단으로부터 1cm 가량을 절취하여 항생제가 함유된 ½MS 배지에서 2주씩 3회 계대배양하므로써 균을 완전히 제거할 수 있었으며, 이후 균이 제거된 모상근은 항생제가 첨가되지 않은 MS 배지에서 암배양하였다. 모상근의 분지능과 생장은 양호하였으나 균이 완전히 제거되지 않은 모상근에서는 생장이 저조하였다.

모상근의 선발 및 형질전환의 확인

*A. rhizogenes*의 Ri plasmid에 의하여 형질전환된 조직은 opine이라는 아미노산 유도체를 합성한다(23). *A. rhizogenes*에 의해 활나물로부터 유도된 8개의 clone에 있어서 형질전환 여부를 확인한 결과, CS1, 3, 4, 5, 6 및 7에서는 mannopine과 agropine의 band를 확인할 수 있었으며, CS4, 5, 7에서는 CS1, 3, 6에 비하여 agropine의 양이 상대적으로 적게 검출되었다. 반면 CS2와 CS8에서는 mannopine만이 검출되었고 agropine은 전혀 검출되지 않았으며, 형질전환 되지않은 대조구인 활나물 뿌리 추출물에서는 opine이 전혀 나타나지 않았다(Figure 2). Manner 등(27)의 *Stylosanthes humilis*의 모상근에서 mannopine과 agropine이 검출되는 clone과 mannopine의 미량검출 및 agropine이 검출되지 않은 clone이 있다는 보고와 같은 결과를 보여 주었다.

모상근 clone의 선발은 유용한 2차대사산물의 다량 생산에 있어서 매우 중요한 단계이기 때문에(16) 생장이 빠르고 2차대사산물의 고생산능을 지닌 모상근 clone의 확보가 중요하다. 따라서 활나물에서도 유도된 모상근 중 2차대사산물인 monocrotaline 고생산능 clone의 선발은 필수적이다. 따라서 조직절편으로부터 유도된 모상근 clone 각각을 임의적으로 CS1~CS8로 명명하였고 이들을 MS 액체배지에서 3주간 암배양한 다음 모상근의 분지능 및 형태를 관찰한 것으로, CS4는 분지능은 양호하였으나 매우 짧은 다수의 모상근이 뭉쳐진 형태로 생장하였고, CS5는 분지능이 낮은 반면 길이생장이 좋게 나타났고, CS6는 분지능, 길이 및 비대생장이 좋았으며, CS8는 분지능과 길이생장은 좋으나 비대생장이 좋지 않아 생장률 만으로 볼 때는 CS6가 가장좋은 것으로 나타났다(Figure 3). 배지의 종류에 따른 모상근의 분지능과 생장의 형태를 관찰하기 위하여 생장률이 가장 좋은 CS6의 root tip(0.5cm) 5개를 MS, B5, WP 및 White 고체배지에서 3주간 암배양하여 본 결과, B5 배지에서는 분지능 및 생장은 양호하였으나 배양 3주 이후부터 갈변 현상이 급격히 일어났으며, WP 배지에서는 다른 배지에서의 모상근과는 대조적으로 상당히 가늘고 긴 분지능을 지닌 하얀색의 모상

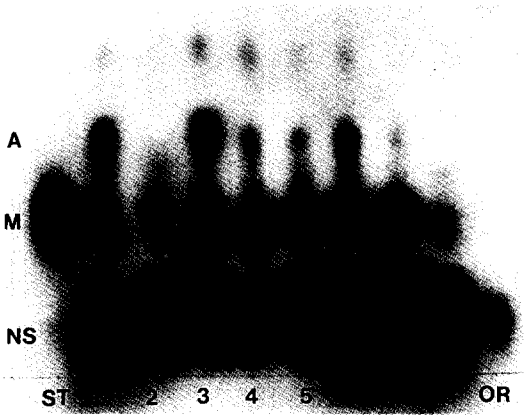

Figure 2. Detection of mannopine and agropine in the extracts of *Crotalaria sessiliflora* hairy roots. The spots were detected by staining with alkaline silver nitrate after the separation by paper electrophoresis.
A, Agropine; M, Mannopine; NS, Neutral Sugar; ST, Standard
Lane 1~8, Transformed hairy roots clone CS1~CS8; OR, Ordinary root

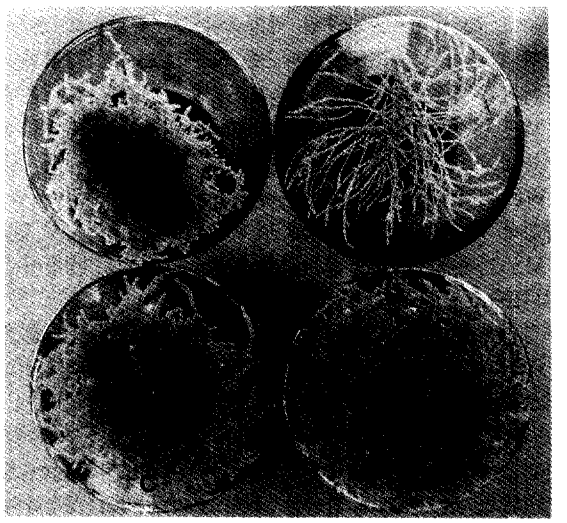

Figure 3. Morphological differences according to hairy roots clones cultured in MS liquid medium at 25℃ in the dark for 3 weeks.
A, CS4; B, CS5; C, CS6; D, CS8

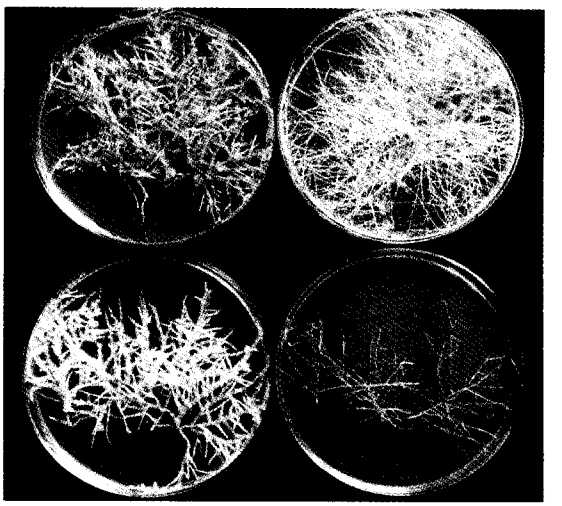

Figure 4. Growth of hairy root CS6 cultured in various culture medium. Five root tips(0.5cm) were cultured on the solid medium at 25℃ in the dark for 3 weeks.
A, B5 medium; B, WP medium; C, MS medium; D, White medium

근을 형성하였으며 4주 이상의 배양에서도 갈변 현상은 많이 나타나지 않았다. MS 배지에서는 분지능과 생장이 양호한 연노랑색의 모상근을 형성하였고, White 배지에서는 생장이 상당히 저조하여(Figure 4), 배양배지에 따라 모상근의 생장패턴도 달라짐을 보였다.

배양조건에 따른 생장률 측정

Figure 4의 경시적 관찰 결과와 실제 생장률과의 관련성을 살펴보기 위하여 clone CS1~CS8과 대조구로써 형질전환 되지 않은 재배근의 0.5cm 크기의 근단 10개(2㎎, dry wt.)를 40mL의 MS, B5, WP 액체배지가 들어있는 100mL 삼각플라스크에 접종하고 70 rpm으로 3주간 배양하여 건조중량으로 생장률을 측정한 결과, CS2, CS5와 재배근은 모든 배지에서 생장이 거의 이루어지지 않았으나 CS1, CS3, CS4, CS6, CS7, CS8은 MS, B5, WP 배지에서 보편적으로 생장이 잘 이루어졌지만 B5 배지에서는 Figure 4에서와 마찬가지로 모상근의 갈변현상이 나타났고, WP 배지에서는 MS와 B5 배지에 비해 clone별로 생장률의 다양성이 나타났으며 모상근의 비대 생장이 이루어지지 않았지만, MS 기본배지에서는 모상근의 굵기, 분지능 및 생장이 탁월하였다(Figure 5).

배양기간에 따른 모상근의 생장은 CS6의 근단 10개를 MS, B5, WP 액체배지에 접종하여 70 rpm으로 암배양하면서 5일 간격으로 이들의 건조중량을 측정하였다. 대부분의 배지에서 5일 이후부터 생장률은 증가하여 25일 경에 가장 높은 생장률을 나타냈고 이후 부터는 감소되는 생장패턴을 보였다(Figure 6).

한편 MS 기본배지에 있어서 pH의 변이에 따른 생장률의 경우 pH 3에서는 모상근의 생장이 억제되었으며, pH 5-6 범위에서 가장 양호한 생장을 보여(Figure 7), Hwang 등(28)의 당근 모상근의 경우 pH 4-7, Kim 등(29)의 도라지 모상근 배양시 pH 5~6에서 최적 생장을 보인 것과 비슷한 결과를 나타내었으나, Mano 등(16)의 *Scopoloa japonica*의 모상근 배양시 pH 7

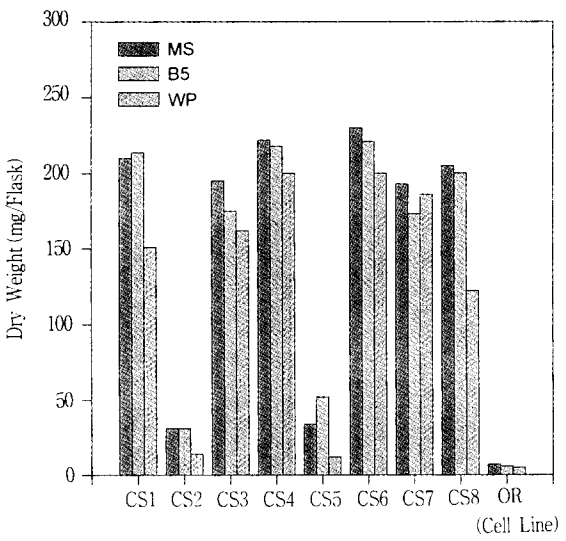

Figure. 5. Growth of *Crotalaria sessiliflora* hairy roots in various medium at 25℃ in the dark for 3 weeks culture. CS1-CS8, Transformed hairy roots clone; OR, Nontransformed ordinary root

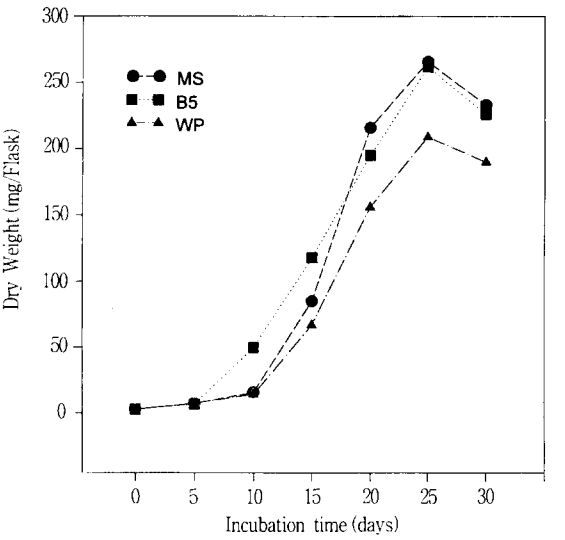

Figure 6. Growth curve of hairy root CS6 according to time course in various liquid medium(3% sucrose, pH 5.7) at 25℃ in dark. 2mg(dry wt.) of hairy roots was inoculated.

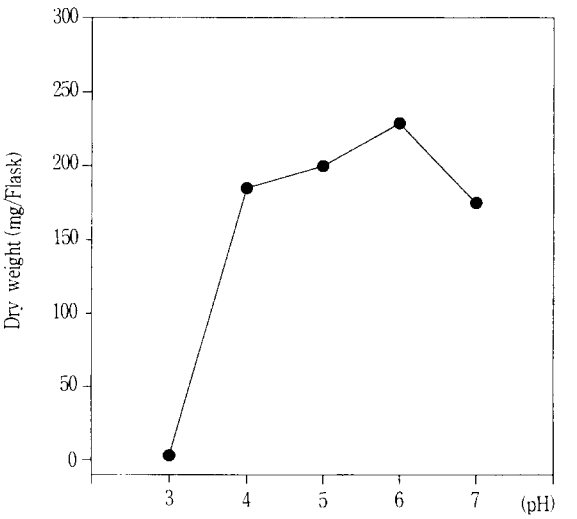

Figure 7. Effects of pH on growth of hairy root CS6 in MS liquid medium(3% sucrose). 2mg(dry wt.) of hairy roots was inoculated and cultured for 3 weeks.

에서 최적 생장을 보였다는 결과도 있어 식물 종에 따라 최적 pH가 다르게 나타남을 알 수 있었다.

탄소원 종류에 따른 생장을 알아보기 위해 탄소원으로서 3%의 sucrose, galactose, glucose 및 fructose를 첨가하여 배양한 결과, sucrose가 생장에 가장 효과적 이였고 glucose와 fructose가 첨가된 처리구에서는 생장률이 낮았으며, galactose 첨가 처리구에서는 생장이 거의 일어나지 않아(Figure 8), Paek 등(30)의 *Centella asiatica*에서 sucrose와 fructose에서 동일한 생장을 보여 주었다는 보고와 차이를 보였다.

또한 탄소원의 농도에 따른 생장률을 알아보기위해 ½MS, MS, B5, WP 액체배지의 sucrose를 1-8%의 농도별로 첨가하여 배양한 결과, 3%의 sucros가 첨가된 MS, B5, WP 배지에서

는 약 200㎎으로, sucrose의 농도가 3% 보다 낮아지거나 높아질수록 생장률은 감소하였다. 한편 macro salts 농도를 ½로 낮춘 ½MS 배지에서는 2%와 5% sucrose에서 약 285㎎(dry wt.), 4%에서 372㎎(dry wt.)으로 MS, B5, WP 배지에서 보다도 생장률이 상당히 높았으며, 특히 3% sucrose가 첨가된 ½ MS 배지에서의 425㎎(dry wt.)은 3% sucrose의 MS 배지의 213㎎(dry wt.)에 비해 2배의 생장률을 보였으며, 배양 초기의 접종량 2㎎(dry wt.)에 비하여 배양 3주만에 210배에 달하는 생장량을 나타냈다(Figure 9). 이와같이 기내 배양시 일반적으로 사용하는 sucrose 농도는 3%이나, Kim 등(29)의 도라지 모상근 배양에서 6% sucrose 농도에서 최대 생장률을 보인 경우도 있었다. 위의 실험을 종합하여 보면 활나물의 모상근 배양에 있어서 최적의 배지 및 배양조건은 3% sucrose가 첨가된 ½ MS(pH 5.7) 배지에서 25℃, 70rpm의 암배양이 가장 좋은 생장률을 보였다.

Macro salts 중 인산의 농도 변화에 따른 모상근의 생장률은 MS 기본배지의 인산 농도인 1.25mM KH_2PO_4 농도의 0.5, 1, 2, 3배 농도에서 생장률은 큰 차이를 보이지 않았으나 0.25배의 농도에서는 생장량이 감소하였다(Figure 10). 질소원인 NH_4^+와 NO_3^-의 조합이 모상근의 생장과 물질생산에 영향을 주는 것으

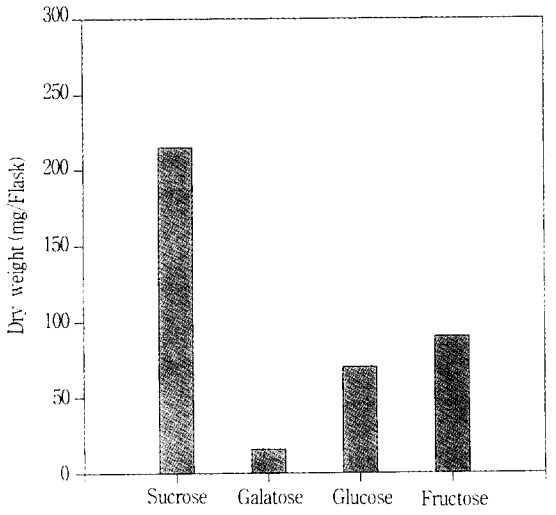

Figure 8. Effects of carbon source on growth of hairy root CS6 in MS liquid medium(3% carbon source, pH 5.7). 2mg (dry wt.) of hairy roots was inoculated and cultured for 3 weeks.

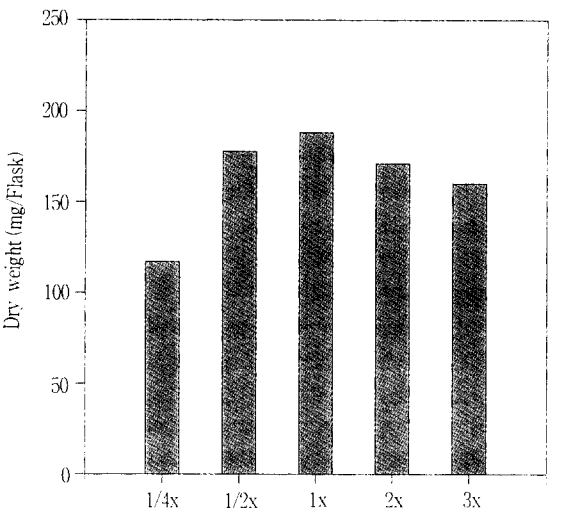

Figure 10. Effects of potassium phosphate concentration on growth of hairy root CS6 in MS basal medium (x=1.25mM KH_2PO_4). 2mg(dry wt.) of hairy roots was inoculated and cu ltured for 3 weeks.

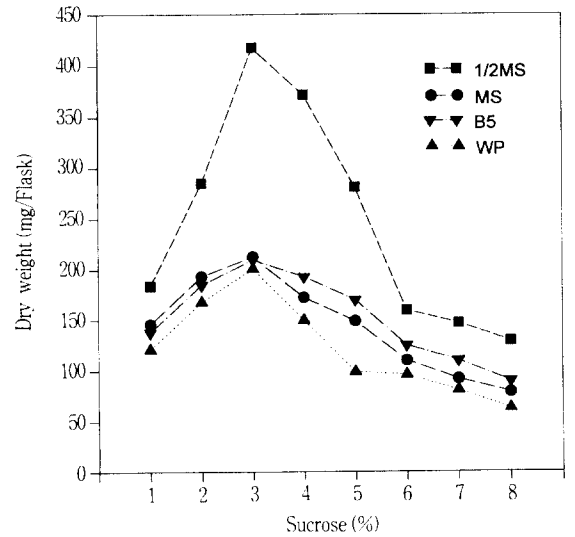

Figure 9. Growth of hairy root CS6 according to sucrose concentration in various culture medium. 2mg(dry wt.) of hairy roots was inoculated and cultured for 3 weeks.
Lane 1-8, 1%-8% Sucrose.

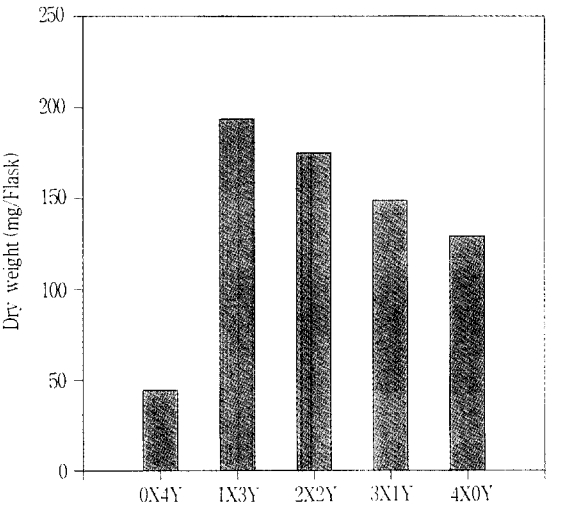

Figure 11. Effects of nitrogen source on growth of hairy root CS6 in MS basal medium(X=20.6mM NH_4NO_3, Y=18.8mM KNO_3). 2mg(dry wt.) of hairy roots was inoculated and cul tured for 3 weeks.

로 알려져 있다. 따라서 질소원의 비율에 따른 모상근의 생장률을 조사한 결과 NH_4^+와 NO_3^-의 비율이 1X/3Y(20.6 mM NH_4^+/56.4 mM NO_3^-)일 때 생장률이 가장 높았으며, NO_3^-가 결여된 경우(4X/0Y)보다 NH_4^+가 결여된 경우(0X/4Y)에 생장률은 상당히 저조하였다(Figure 11). 한편 madder 모상근은 NO_3^-단독처리에서 생장률이 좋고, 당근, red beet, madder의 모상근 배양에서 NH_4^+가 NO_3^-의 흡수를 억제하여 모상근의 생장을 저해하였다는 Kino-Oka 등(31)의 보고와 다른 결과를 보여 주었다.

Monocrotaline 분석

배양 중인 활나물 모상근에서 2차 대사산물 pyrrolizidine alkaloids계의 monocrotaline 생합성을 확인하고자 변형된 L'Empereur 등(8)의 방법으로 건조된 모상근으로부터의 추출물을 TCL plate에 점적, 전개하여 Dragendorff로 염색하였는데, 활나물의 모상근 CS6와 종자의 추출물에서 monocrotaline의 spot가 *Rf* 0.5 부근에서 확인되어 L'Empereur 등(8), Roeder 등(18), Hartman 등(21)의 유식물체와 부정근에서 monocrotaline이 합성된다는 보고와 유사하게 형질전환된 활나물 모상근 CS6에서도 monocrotaline이 생합성 됨을 확인할 수 있었다(Figure 12). 결과적으로 *Agrobacterium rhizogenes*에의해 활나물로부터 유도되어 배양된 다수의 모상근 clone을 확보하였고, 3% sucrose가 첨가된 ½MS(pH 5.7) 배지에서 25℃, 70rpm의 암배양이 모상근 배양에 가장 효과적인 것으로서 이들의 최적 배양조건을 확립하였으며, 대표적으로 선발하여 배양한 모상근 clone CS6에 있어서 2차 대사산물인 monocrotaline의 생합성 여부를 TLC를 이용한 정성실험으로 확인되었는바, 이를 기초로하여 각각의 clone과 각각의 배양조건에 따른 monocrotaline의 정량실험으로서 금후 HPLC 및 NMR 등을 이용한 정밀분석이 필요하다고 사료된다.

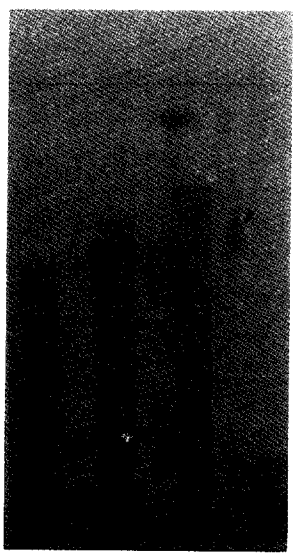

Figure 12. Thin layer chromatogram of monocrotalaine extracted from transformed hairy root CS6 and seeds of *Crotalaria sessiliflora*.
M, Monocrotalaine; ST, Standard; S, Seed; H, Hairy root

요 약

Agrobacterium rhizogenes ATCC 15834를 활나물(*Crotalaria sessiliflora* L.)의 조직 절편에 접종하여 모상근을 유도, 선발하고 이들의 배양조건 및 monocrotalaine의 합성에 관하여 조사하였다. 유도된 모상근에서 mannopine이나 agropine이 검출되어 형질전환을 확인하였다. 선발된 8가지의 모상근 clone 각각은 MS, B5, WP 배지에서 배양되었으며, 분지능과 생장률에 있어서 다양한 양상을 나타내었다. 모상근의 최적 배양배지와 배양조건은 3% sucros가 첨가된 ½MS(pH 5.7) 액체배지에서 25℃, 70 rpm의 암배양이었으며, 모상근의 생장률은 ½MS 액체배지에서 배양 3주 후에 배양 초기의 접종량 2mg(건조 중량)에 비해 210배의 생장 증가을 보였고, MS 액체배지에서의 배양에 비해 2배의 생장 증가를 나타내었다. 또한 MS배지에서 인산(KH_2PO_4)은 1.25mM 농도에서, 질소원의 비율에 있어서는 NH_4^+/NO_3^-가 1/3인 경우에 생장이 양호 하였다. TLC에 의해 활나물 모상근에서 pyrrolizidine alkaloids인 monocrotaline이 합성됨을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 교육부 기초과학 연구 조성비(BSRI-96-4424)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Anon, Res. Group Shan Dong Province (1975), *Res. Chin. Mat. Med.*, **6**, 95.
2. Ribeiro, L. R., A. R. Silva, A. R. P. L Bautista, S. L. Costa, L. A. Sales, A. C. C. Rios, and D. M. F. Salvadori (1993), Clastogenic Effect of Extracts Obtained from *Crotalaria retusa* L. and *Crotalaria mucronata* Desv. on Mouse Bone Marrow Cells, *Mutation Research*, **300**, 253-258.
3. Anon, Anticencer Res. Group, J. L. Nun, Shan Dong Province (1977), *Zhong Cao Tong Sin.*, **11**, 5.
4. Atal, C. K. and R. S. Sawhney (1973), The Pyrrolizidine Alkaloids from Indian Crotalarias, *Indian J. Pharm.*, **35**, 1-12.
5. Scbaeffer, S. T., L. H. Zalkow, and A.S. Teja (1989), Extraction of Monocrotaline from *Crotalaria spectabilis* Using Supercritical Carbon Dioxide and Carbon Dioxide-Ethanol Mixtures, *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1357-1365.
6. Langer, T., E. Mostl, R. Chizzola, and R. Gutleb (1995), A Competitive Enzyme Immunoassay for the Pyrrolizidine Alkaloids of the Senecionine Type, *Planta Medica*, **62**, 267-271.
7. Rodriguez, E. and D. A. Levin (1976), In: Wallace JW, Mansell RL (eds), Plenum, New York. *Recent Adv. Phytochem.*, **10**, 214-270.
8. L'Empereur, K. M., Y. Li, and F. R. Stermitz (1989), Pyrrolizidine Alkaloids from *Hackelia Californica* and

Gnophaela Latipennis, an *H. californica*-hosted Arctiid Moth, *J. Nat. Prod.*, **52**, 360-366.
9. Cheng, D., Y. Liu, and T. Chu (1989), Assamicadine, a New Pyrrolizidine Alkaloid from *Crotalaria assamica*, *J. Nat. Prod.*, **52**. 1153-1155.
10. Camilleri, C. and L. Jouania (1991), The T_R-DNA Region Carrying the Auxin Synthesis Genes of the *Agrobacterium rhizogenes* Agropine-Type Plasmid pRiA4: Nucleotide Sequence Analysis and Introduction into Tobacco Plants, *Mol. Plant-Microbe. Int.*, **4**, 155-162.
11. Sun, L. Y., G.Touraud, C. Charbonnier, and D. Tepfer (1991), Modification of Phenotype in Belgian Endive (*Cichorium Intybus*) through Genetic Transformation by *Agrobacterium rhizogenes*: Conversion from Biennial to Annual Flowering, *Transgenic Research*, 1, 14-22.
12. Durand-Tardif, M., R. Broglie, J. Slightom, and D. Tepfer (1985), Structure and Expression of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in *Nicotiana tabacum*: Organ and Phenotypic Specificity, *J. Mol. Biol.*, **186**, 557-564.
13. Hamill, J. D., A. J. Parr, R. J. Robins, and M. J. C. Rhodes (1986), Secondary Product Formation by Cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* Transformed with *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Cell Report*, **5**, 111-114.
14. Aird, E. L., 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 Cult.*, **15**, 47-57.
15. Knopp, E., A. Strauss, and W. Wehrli (1988), Root Induction on Several *Solansceae* Species by *Agrobacterium rhizogenes* and Determination of Tropane Alkaloid Content, *Plant Cell Report*, **7**, 590-593.
16. Mano, Y., and M. Michio (1995), A Novel Life Cycle Arising from Leaf Segments in Plants Regenerated from Horseradish Hairy Roots, *Plant Cell Reports*, **14**, 370-374.
17. Aoki, T., H. Matsumoto, Y. Asako, Y. Matsunaga, and K. Shimomura (1997), Variation of Alkaloid Productivity Among Several Clones of Hairy Roots and Regenerated Plants of *Atropa belladonna* Transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834, *Plant Cell Reports*, **16**, 282-286.
18. Roeder, E., T. Sarg, S. El-Dahmy, and A.A. Ghani (1993), Pyrrolizidine Alkaloids from *Crotalaria aegyptiaca*, *Phytochem.*, **34**, 1421-1423.
19. Wiedenfeld, H., E. Roeder, and E. Anders (1985), Pyrrolizidine Alkaloids from Seeds of *Crotalaria scassellatii*, *Phytochem.*, **24**, 376-378.
20. Roeder, E., X. T. Ling, and K. J. Kabus (1992), Pyrrolizidine alkaloids from the Seeds of *Crotalaria sessiliflora*, *Planta Med.*, **58**, 283.
21. Hartmann, T. and G. Toppel (1987), Senecionine N-oxide, the Primary Product of Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis in Root Cultures of *Senecio vulgaris*, *Phytochem.*, **26**, 1639-1643.
22. Murashige, T. and F. Skoog (1962), A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
23. Petit, A., C. David, G. A. Dahl, J. G. Ellis, and P. Guyon (1983), Further Extension of the Opine Concept: Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* Co-operate for Opine Degradation, *Mol. Gen. Genet.*, **190**, 204-214.
24. Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. (1968), Nutrient Requirements of Suspension Culture of Soybean Root Cells, *Exp. Cell Res.*, **50**, 151-158.
25. Lloyd, G. B. and B. H. McCown (1980), Commercially Feasible Micropropagation of Mountain Laurel (*Kalmia Latifolia*) by Use of Shoot Tip Culture, *Comb. Proc. Intl. Plant Propagators Soc.*, **30**, 421-427.
26. White, P. R. (1963), The Cultivation of Animal and Plant Cells, 2nd ed., p.228, Ronald Press, New York.
27. Manners, J. M. and H. Way (1989), Efficient Transform ation with Regeneration of the Tropical Pasture Legume *Stylosanthes humilis* Using *Agrobacterium rhizogenes* and a Ti Plasmid-binary Vector System, *Plant Cell Repotrs*, **8**, 341-345.
28. 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, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **4**, 246-252.
29. Kim, B.R., J.H. Lee, and B. Hwang (1990), Culture of Hairy Roots Induced by *Agrobacterium rhizogenes* in *platycodon grandiflorum* DC.(Balloon Flower), *Korean J. Bot.*, **33**, 183-188.
30. Paek, Y. W., S. J. Hwang, D. H. Park, and B. Hwang (1996), Multiplication and Transformation of Medicinal Plants for Production of Useful Secondary Metabolites II. Establishment of Hairy Root Cultures of *Centella asiatica*, *J. Plant Biol.*, **39**, 161-166.
31. Kino-Oka, M., M. Taya, and S. Tone (1993), Evaluation of Inhibitory Effect of Ammonium Ion on Cultures of Plant Hairy Roots, *J. Chemical Engineering of Japan*, **26**, 578-580.