

494  
02823

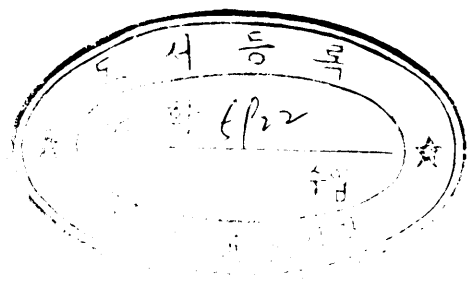
碩士學位論文

*Agrobacterium rhizogenes*를 이용한 *Solanum nigrum*의  
形質轉換과 모상근 培養에 관한 研究

濟州大學校 大學院



梁 寬 八



1990年 12月

*Agrobacterium rhizogenes*를 이용한 *Solanum nigrum*의  
形質轉換과 모상근培養에 관한 研究

指導教授 許 仁 玉

梁 寬 八

이 論文을 理學碩士學位 論文으로 提出함.

1990年 12月



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

梁寬八의 理學碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長

金 文 浩

委

員

鄭 忠 德

委

員

許 仁 玉

濟州大學校 大學院

1990年 12月

The study of transformation and Hairy Root  
culture in *Solanum nigrum* by *Agrobacterium rhizogenes*

Koan-Pal Yang

(Supervised by Professor In-Ok Heo)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF NATURAL SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1990. 12

# 目 次

Summary	_____	1
I. 緒 論	_____	2
II. 材料 및 方法	_____	4
III. 結果 및 考察	_____	8
IV. 摘 要	_____	18
參 考 文 獻	_____	19

## Summary

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.

## I. 緒 論

Rhizobiaceae 에 속하는 *Agrobacterium*은 gram음성의 土壤細菌으로서 특정의 宿主에 腫瘍을 만드는 *A. rubi*. 病原성이 없는 *A. radiobacter*. crown gall(Smith and Townsend, 1907)과 teratoma를 誘發하는 *A. tumefaciens* 및 毛狀根(Riker et al., 1930)을 誘發하는 *A. rhizogenes*가 報告되어 있다.

*Agrobacterium*은 크기에 따라 3 種類의 plasmid로 나누며, 그 중에 180-240kb의 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 알려져 있다(Eckes et al., 1987).

Plasmid는 *Agrobacterium*의 種類에 따라 Ti(tumour inducing) plasmid와 Ri(root inducing) plasmid로 區分되고(White and Nester, 1980; Moore et al., 1979; Van Larebeke et al., 1974 ; Watson et al., 1975), 植物의 genome에 挿入되는 plasmid内の T-DNA上에는 각각의 *Agrobacterium*만이 利用하는 opine이라 불리는 agropine과 mannopine의 合成에 關與하는 部位(Petit et al., 1983)와 auxin과 cytokinin의 合成에 關與하는 部位가 存在함으로써(Cardarelli et al., 1987) *Agrobacterium*만의 病狀을 나타내게 한다.

한편 *A. rhizogenes*는 T-DNA上的 opine 合成 gene에 의해 mannopine型, agropine型 및 cucumopine型으로 分類하고 있으며(Petit et al., 1983) 또한 最近 NIEAES 1724 strain mikiopine型

이 分離 報告되고 있다(鎌田, 1989). 이러한 opine의 合成은 *Agrobacterium*의 窒素原, 炭素原으로 利用된다(Petit et al., 1983).

現在까지 植物에 外來遺傳子를 挿入시키는 方法으로서 원형질 體 融合과 DNA virus, RNA virus 및 CaMV등이 導入 vector로서 報告되고(Murphy and Thompson, 1988) 있으며, *Agrobacterium*이 外來遺傳子 導入 vector로서 可能性을 示唆(Riker et al., 1930)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되고(Rugini and Wang, 1986) 있다. 그리고 Ri plasmid에 의해 誘導되는 毛狀根 培養은 clone의 選拔이 容易하며, 2次代謝産物의 生産性도 높다는 報告가 있다(Saito et al., 1989; Christen et al., 1989).

한편, *Solanum nigrum*의 毛狀根 培養에 關한 研究는 Wei (1986)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와 NN培地에서 sucrose濃도와 호르몬 添加에 따른 毛狀根 生長을 檢討함으로써 解熱, 利尿(Rejko et al., 1982) 및 消炎劑(Genjiro et al., 1987)로 사용되는 *S. nigrum*의 steroidal alkaloid의 大量 生産에 基礎資料로 하고자 하였다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1) 種子發芽

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

### 2) 毛狀根의 誘導

發芽시킨 幼植物의 줄기에 有病침으로 傷處를 내어, 傷處 部位에 YEB培地(Table 1), 25° C, 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.

### 3) 形質轉換의 確認

Opine分析은 Petit(1983)의 方法을 변형하여 사용하였다. 培養한 毛狀根 100mg을 0.1N HCl 100 $\mu$ l를 effendorf관에 취하고 粉碎한 후, 20,000xg에서 원심분리하고 상장액을 電氣泳動 試料로 使用하였다. 電氣泳動은 상장액과 standard opine을 3MM Whatman 濾過紙에 2-10 $\mu$ l spot한 後, formic acid : acetic acid : H<sub>2</sub>O (30 : 60 : 910)을 pH 2.8로 調整하여 緩衝液으로 하고 methylene



blue를 maker로 하여 400volt에서 實施하였고 다음과 같은 方法에 의해 染色하였다.

- (1) 0.5g AgNO<sub>3</sub>를 0.5ml 물에 녹여 250ml acetone에 混合한다.
- (2) 20% NaOH 50ml과 에탄올 450ml를 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 ).

Table 1. Composition of YEB medium

Composition	Concentration ( g/l )
Bacto beef extracts	5
Bacto yeast extracts	1
Peptone	5
Sucrose	5
MgSO <sub>4</sub>	0.24
Agar	15
pH 7.2	

#### 4) 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 $\mu$ 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).

5) 毛狀根의 培養과 生長量 測定

誘導된 毛狀根이 2-5cm 伸長한 후, *A. rhizogenes*를 除去하기 위하여 毛狀根을 잘라내어 抗生劑 Claforan 300mg/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°C, 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 hormone첨가( Yoshikawa, 1987)에 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.

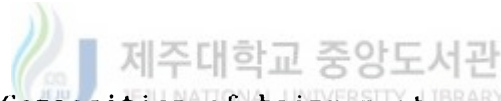


Table 2. Composition of hairy roots culture medium

Medium Compound	MS30	MS30 H	NN30	NN30 H	NN15	NN0
Basal medium	MS	MS	NN	NN	NN	NN
Sucrose(g/l)	30	30	30	30	15	0
Hormone (mg/l)	-	IBA 2 Kinetin 0.1	-	IBA 2 Kinetin 0.1	-	-

6) Steroidal alkaloid의 成分 確認

毛狀根을 形成한 뿌리와 一般뿌리의 건량 각각 5g을 1N HCl 50ml로 3시간 가열 抽出한 후, 클로로포름으로 2회 진탕 추출하였다(Chandler and Dodds, 1983). 클로로포름층을 減壓濃縮하여

1ml 클로로포름으로 溶解시켜, silica gel TLC(Merck Kieslgel 60 F254)에 점적하여 전개용매(Ethylacetate : Benzen=1:1)로 전개하였다.



### III. 結果 및 考察

*S. nigrum*의 毛狀根 誘導는 表面殺菌된 種子를 25° C, 6,000lux, 16h light/ 8h dark 條件에서 2週間 培養하여 幼植物體를 얻었고, 發芽된 幼植物을 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 처리한 傷處部位에서 tumor組織이 형성되고 菌처리 3週 後에 毛狀根이 誘導되었다. 이러한 식물세포에서의 毛狀根 分化는 T-DNA의 호르몬 合成에 관련된 遺傳子에 의해서 生成된 auxin과 cytokinin의 作用(Cardarelli et al., 1987)이라고 推定되어진다.

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하지않는 아미노산이 Ri Plasmid에 의해 形質轉換된 毛狀根에서 生産되는것으로서 (Petit et al., 1983) 外來遺傳子, 즉 Ri Plasmid의 T-DNA 가 插入되어 그 形質을 發現하는것을 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얼이 旺盛하며 기관분화가 완전히 이루어지지 않았다. 이러한 조직의 형태는 黃등(1986)의

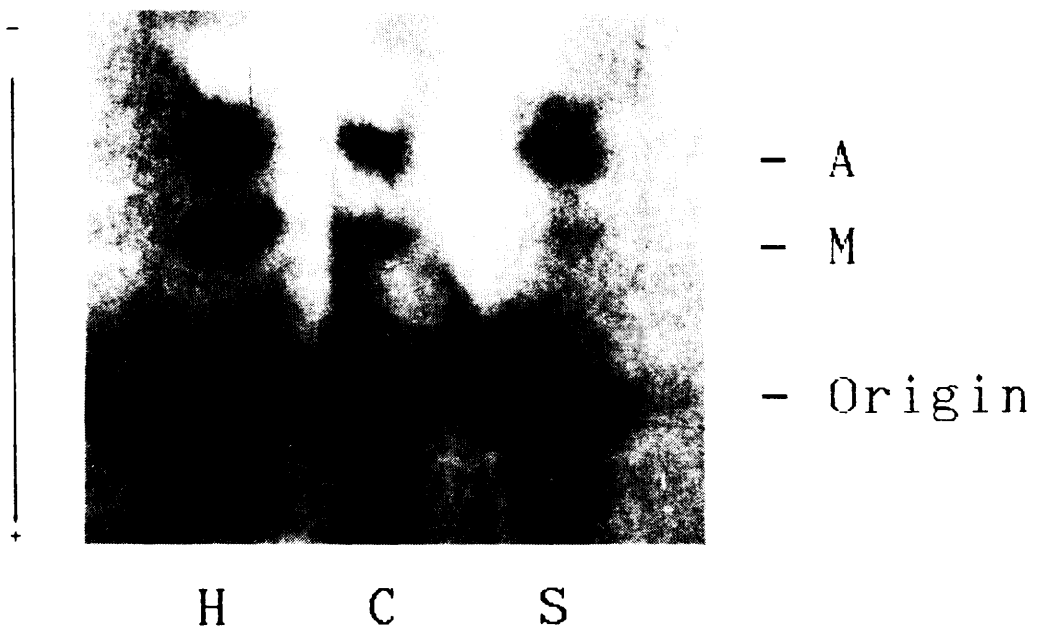


Fig. 1. Detection of agropine and mannopine in the extracts of callus(C) and hairy roots(H).  
A;agropine, M;mannopine, S;standard marker

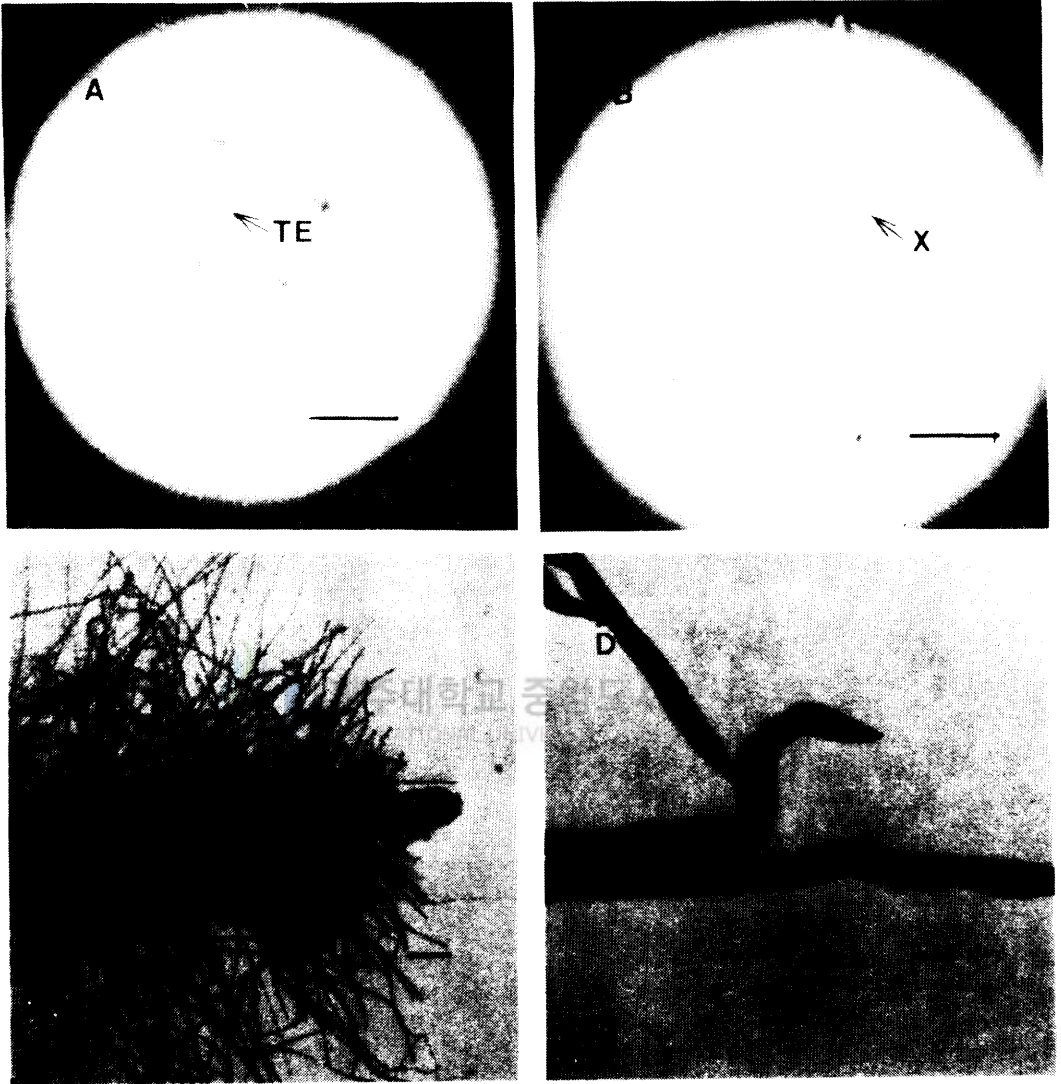


Fig. 2. Photographs of hairy root(A,C) and normal root(B,D).  
 ( A,B : Transverse section, C,D: Outer morphology,  
 TE: Tracheary element, X: Xylem, Scale: 100 $\mu$ m)

당은 毛狀根에서 分裂組織體와 基本組織 사이에는 부정형의 작은 동도요소들이 分化되어 분열조직과 연결시킨다는 것과 일치하였다.

形質轉換된 毛狀根은 培地の 種類와 Sucrose濃度 및 호르몬 添加에 따라 靜置培養과 振蕩培養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배지보다 호르몬이 없는 배지에서 높은 生長율을 나타내어 高(1989)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 cytokinin(Cardarelli et al., 1987)이 添加된 호르몬과 相互作用에 기인된다고 資料된다.

MS 30배지와 NN 30배지 및 sucrose농도에 따른 毛狀根의 靜置 培養결과(Table 3) 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 2배 가량 높은 生長率을 보였고 30일과 40일 배양에서는 NN 30배지에서 각각 26배, 43배로 높은 生長率을 보였다. 이러한 결과로

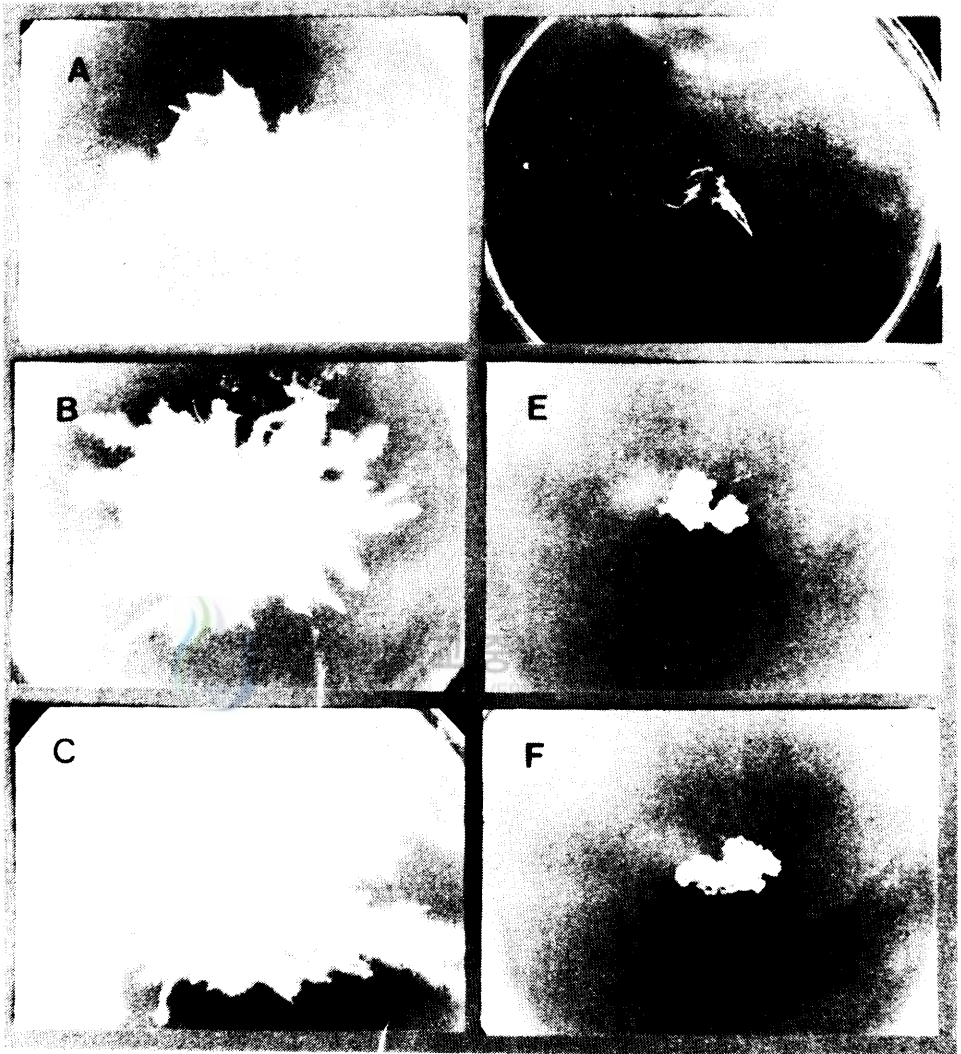


Fig. 3. Petridish culture of *S. nigrum* hairy roots for 20days. A: MS30, B: NN30, C: NN15, D: NNO  
E:MSH, F:NNH



Table 3. Petridish culture of *S. nigrum* hairy roots

Medium	MS30	NN30	NN15	NNO	MS30 H	NN30 H
Days					Fresh Weight(g)	
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			

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. 그리고 sucrose가 들어있지 않은 NN 0배지에서는 毛狀根이 生長하지 않았다. 이러한 結果는 光合成이 不可能한 뿌리 培養에서는 炭素原을 必要로 하기 때문에 炭素原의 不在에 의한 生長 抑制(Bhojwani et al., 1983)인 것으로 思料된다.

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

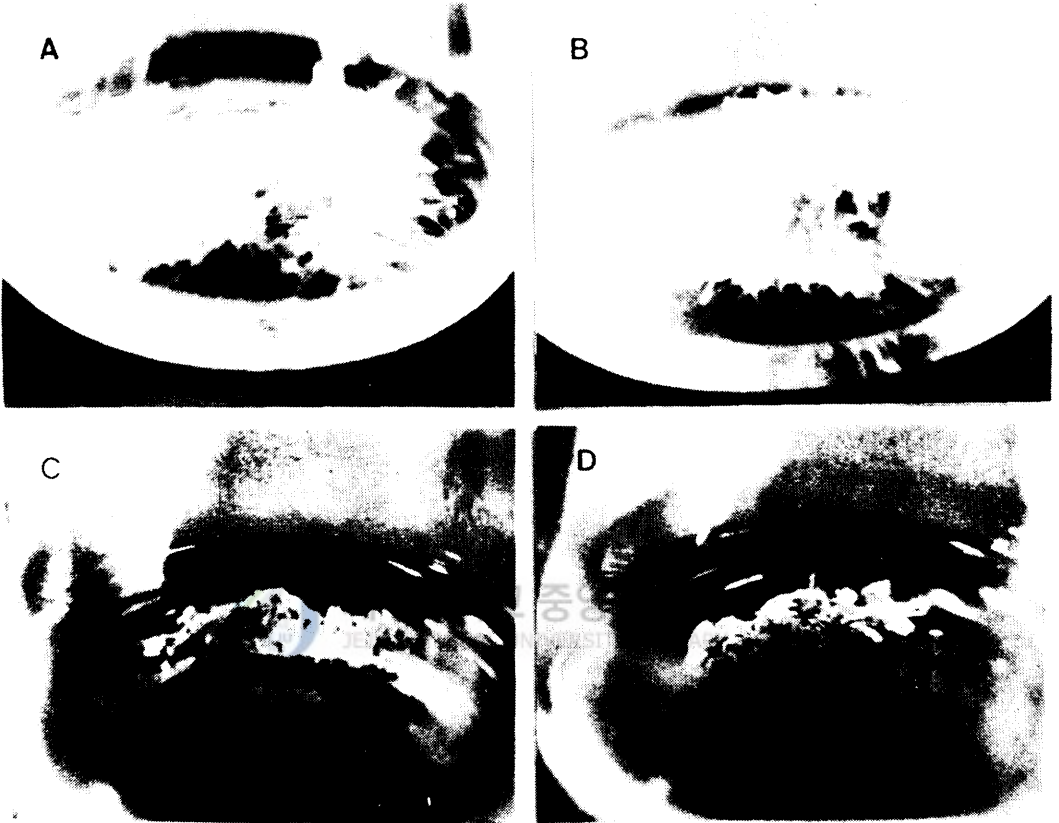


Fig. 4. Liquid culture of *S. nigrum* hairy roots for 20 days. A: MS30, B: NN30, C: MSH, D: NNH

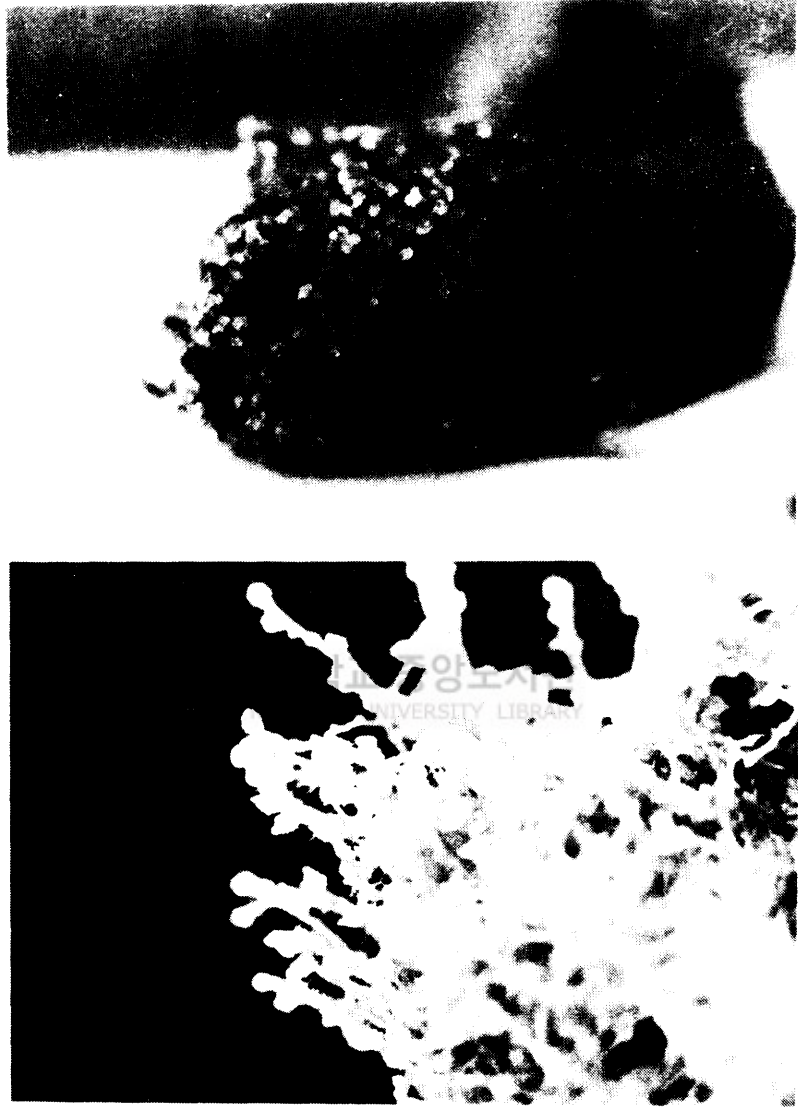


Fig. 5. Liquid culture of *S. nigrum* hairy roots  
for 50days. A: MS30, B: NN30

Table 4. Liquid culture of *S. nigrum* hairy roots

Medium	MS30	NN30	MS30 H	NN30 H
Days	Fresh Weight (g)			
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		

또한 毛狀根과 一般뿌리를 steroidal alkaloid 抽出法에 의해 추출하여 TLC로 確認한 결과(Fig.6) 일반뿌리에서 주성분으로 보이는 반점 Rf 0.16의 S1과 Rf 0.27의 S2중 毛狀根에서는 S2반점만이 주성분으로 확인되었으며 微量성분으로 보이는 반점에서도 다소 차를 보이나 대체적으로 유사하게 나타났다. 이러한 성분의 분석에 대하여는 추후 자세한 검토가 있어야 할 것으로 보인다.



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

## IV. 摘 要

*Solanum nigrum*의 種子를 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 0.1mg/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.

## 參 考 文 獻

- Bhojwani, S.S. and M.K.Razdan. 1983. Plant tissue culture theory and practice. Elsevier Science Publishers B.V. New York, pp 85-104.
- Cardarelli, M., D. Mariotti, M. Pomponi, L. Spano, L. Capone and P. Costantino. 1987. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. Mol. Gen. Genet., 209: 475-480.
- Chandler, S. and J. Dodds. 1983. Solasodin production in rapidly proliferating tissue cultures of *Solanum laciniatum* ait. Plant Cell Reports, 2:69-72.
- Christen, p., M.F.Roberts, J.D.Phillipson and W.C.Evans. 1989. High-yield production of tropane alkaloids by hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. Plant Cell Reports, 8:75-77.
- Eckes, P., G. Donn and F. Wengenmayer. 1987. Genetic engineering with plants. Angew.Chem.Int.Ed.Engl., 26: 382-402.
- Genjiro, K., A. Takahashi, K. Sugiyama and S. Nozoe. 1987. Antifungal Properties of Solanum Alkaloids. Chem. Pharm. Bull., 35(12):4862-4867.
- 黃柏, 趙德以, 洪性式. 1986. *Agrobacterium rhizogenes*에 의한

- hairy root 형성에 대한 생리학적 연구. Korean J. Bot., 29(4):275-283.
- 鎌田宏. 1989. 第11回 植物組織培養學會. Symposium, 227.
- Ko, K.S. 1989. Study on the secondary products formation and plant transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. Graduation thesis, pp 53-64.
- Moore, L., G.Warren and G. Strobel. 1979. Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plant caused by *Agrobacterium rhizogenes*. Plasmid, 2:617-626.
- Murphy, T. M. and W. E. Thompson. 1988. Molecular plant development. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey., 174-198.
- Petit, A., C.David, G.A.Dahl, J.G.Ellis, P.Guyon, F. Casse Delbart and J.Tempe. 1983. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. Mol. Gen. Genet., 190:204-214.
- Reiko, S., M.Kotaro, N. Toshihiro, T. Toshiaki, S. Akihiko and M. Kyoko. 1982. Studies on the Constituents of *Solanum* Plants. II. On the Constituents of the Immature Berries of *Solanum nigrum* L. Yakugaku Zasshi., 102(3):300-306.
- Riker, A.J., W.M. Banfield, W.H.Wright and H.E.Sagen. 1930.



- Studies on infectious hairy root of nursery apple tree. J. Agric. Res., 41:507-540.
- Rugini, E. and X. S. Wang. 1986. Abstract in VI IUPAC Congress. University of Minnesota. 374.
- Saito, K., I. Murakoshi, D. Inze and V. Montagu, 1989. Biotransformation of nicotine alkaloids by tobacco shooty teratomas induced by Ti plasmid mutant. Plant Cell Reports, 7:607-610.
- Smith, J.F. and C. O. Townsend. 1907. A plant tumor of bacterial origin. Science, 25:671-673.
- Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holsters, E. Van den Elsacker, I. Zaenen, R. A. Schilperoort and J. Schell. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. Nature, 252:169-170.
- Watson, B., T. C. Currier, M. P. Gordon, M. D. Chilton and E. W. Nester. 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol., 123:255-264.
- Wei, Z. M., H. Kamada and H. Harada. 1986. Transformation of *Solanum nigrum* L. protoplast by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Reports, 5:93-96.
- White, F. F. and E. W. Nester. 1980. Hairy root: plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. J. Bacteriol., 141:1134-1141.

Yoshikawa, T. and T. Furuya(1987). Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Report, 6:449-453.



## 감사의 글

본 論文을 完成하는데 있어 實驗設計에서부터 論文作成에 이르기까지 指導와 鞭撻을 아끼지지 않으신 許仁玉 교수님께 진심으로 感謝를 표히오며, 論文審查를 맡아주신 金文洪 교수님, 鄭忠德 교수님과 많은 가르침을 주신 吳文儒 교수님, 李龍蜀 교수님, 高碩贊 교수님, 吳德鐵 교수님, 金源澤 교수님, 李和子 교수님, 金世帝 교수님께 感謝를 표합니다.

그리고 研究過程에 있어 助言과 激勵을 아끼지지 않으신 高永秀 박사님께 깊은 感謝를 드리오며 植物生理學研究室 이다만에게 감사 마음을 전합니다.

상상 사랑으로 저를 보살펴 주신 父母님과 兄님들에게 감사의 마음을 바칩니다.