

---

碩士學位論文

*Agrobacterium rhizogenes* 에 의해 誘導된  
*Atropa belladonna* 毛狀根의 培養과  
Tropane alkaloid의 成分에 관한 研究

濟州大學校 大學院

生物學科



1991年 12月 日

*Agrobacterium rhizogenes* 에 의해 誘導된  
*Atropa belladonna* 毛狀根의 培養과  
Tropane alkaloid의 成分에 관한 研究

指導教授 許 仁 玉

韓 太 完

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

1991年 12月

韓太完의 理學 碩士學位 論文을 認准함



審査委員長 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_


濟州大學校 大學院

1991年 12月

---

The study on the growth and tropane alkaloids of  
*Atropa belladonna* hairy root induced by  
*Agrobacterium rhizogenes*

Tae-Wan Han  
(Supervised by Professor In-Ok Heo)

 제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY  
A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF NATURAL SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
CHE JU NATIONAL UNIVERSITY

1991. 12.

# 目 次

Summary .....	1
I. 緒 論 .....	2
II. 材料 및 方法 .....	5
III. 結 果 .....	9
IV. 考 察 .....	31
V. 摘 要 .....	35
參考文獻 .....	36



## Summary

The study was aimed to confirm transformation of *Atropa belladonna* by *Agrobacterium rhizogenes* and investigate tropane alkaloid production and growth of hairy roots.

Hairy roots were induced from stem of sterile plants of *A. belladonna* by *A. rhizogenes* strain 15834, A4 and R1000. Agropine and Mannopine were detected in the hairy roots.

The growth rate of hairy roots was measured according to medium, sucrose concentration and hormone. Growth of hairy roots was highest in 3% sucrose concentration. Hairy roots was altered into callus on the medium containing hormone (IBA 2, Kinetin 0.1 mg/l). The production of hairy roots was higher in hairy roots induced by strain 15834 than other strains. Especially, the hairy roots induced by strain 15834 produced 113.5 g per l in NN 30 liquid medium cultured for 40 days. The tropane alkaloid was 0.086%–0.628% per dry weight according to strain and produced 0.628% in hairy roots induced by R1000.

## I. 緒 論

Rhizobiaceae 에 속하는 *Agrobacterium*은 gram 음성의 土壤細菌으로서 특정의 宿主에 腫瘤을 만드는 *A. rubi*, 병원성이 없는 *A. radiobacter*, crown gall과 teratoma를 유발하는 *A. tumefaciens*(Smith and Townsend, 1907) 및 毛狀根을 誘發하는 *A. rhizogenes*(Riker et al., 1930)가 보고되어 있다.

*Agrobacterium*에는 크기에 따라 3 종류의 plasmid가 있으며, 그 중 180-240 kb의 plasmid 내 vir 領域이 acetosyringon과 같은 저분자 물질에 의해 활성화되어 T-DNA 부위를 식물의 genome에 삽입시키는 것으로 알려져 있다(Eckes et al., 1987). Plasmid는 *Agrobacterium*의 종류에 따라 tumour-inducing(Ti) plasmid와 root-inducing(Ri) plasmid로 구분된다(Van Larebeke et al., 1974; Watson et al., 1975; Moore et al., 1979; White and Nester, 1980). 이들 plasmid에는 T-DNA 상에 각각의 *Agrobacterium*만이 이용하는 특수한 아미노산인 opine의 합성에 관여하는 부위(Petit et al., 1983)와 auxin과 cytokinin의 合成에 관여하는 부위를 가짐으로써(Cardarelli et al., 1987) *Agrobacterium*이 감염된 식물체에 병상을 나타나게 한다. 그 중, *A. rhizogenes*는 T-DNA 상의 opine 합성 유전자의 종류에 따라 mannopine형, agropine형 및 cucumopine형으로 분류하고 있으며(Petit et al., 1983), 또한 NIEAES 1724 strain에서는 mikimopine형이 분리 되었다(鍾田, 1989). 그리고 이러한 opine 합성 유전자에 의해 합성되는 opine은 *Agrobacterium*의 窒素原과 炭素原으로 이용되고 있다(Petit et al., 1983).

한편, 식물에 外來遺傳子를 삽입시키는 방법으로서 原形質體 融合과 DNA virus, RNA virus 및 califlower-mosaic virus등이 導入 vector로서 보고되고 있으나(Murphy and Thompson, 1988), 그 성공율이 낮고 제한적 실험 예가 있을 뿐이다. 그러나 최근 *Agrobacterium*을 이용한 外來遺傳子 導入方法이 보고되어 外來遺傳子 導入의 범위가 크며, 또한 사용법이 간단한 것으로 보고한 이래(White and Nester, 1980), Ti plasmid와 Ri plasmid를 이용한 crown gall과 毛狀根의 배양은 苗木의 發根, 耐寒性 및 生長促進에 관한 연구 등에 이용되고 있다(Rugini and Wang, 1986). 그리고 *A. rhizogenes*를 식물체에 접종하여 유도된 毛狀根을 이용하여 器內培養을 통하여 antraquinone, alkaloid, ginsenoside 등과 같은 2차 代謝産物을 효율적으로 얻고자 하는 시도가 이루어 지고 있다. 毛狀根의 2차 代謝産物의 생산에 대해서는 인삼(*Panax ginseng*)에서 ginsenoside의 生産性을(Yosikawa and Furuya, 1987; Ko, 1990), 근대(*Beta vulgaris*)와 *Nicotiana rustica* 毛狀根에서 색소와 alkaloid의 함량을 측정하였고(Hamil et al., 1986), tropane alkaloid 생산은 다양한 식물 종들의 callus culture 에서 연구가 되고 있으나, 대량생산은 모든 경우에서 성공적이지 못하다고 보고되고 있다(Hiraoka and Tabata, 1974 ; Hasimoto and Yamada, 1983; Gizella, 1988 ). 또한, Knop 등(1988)은 몇몇 가지 科 식물에서, Hirosh 등(1986)은 *Atropa belladonna*에서 毛狀根을 가지고 tropane alkaloid에 대해 보고하고 있으며, 이밖에 사리줄(*Hyoscyamus niger*), *Datura candida*, *Duboisia lecichhardtii* 등에서 2차 代謝産物이 原植物體보다 높거나 유사하게 나타난다고 보고되고 있다(Yamada et al., 1982; Yasuyuki and Tsuyoshi, 1984; Christen et al., 1989).

*Atropa belladonna* L.는 가지과 식물로서 유럽과 서아시아의 건조한

지대에 분포하고 있으며, 독성이 강하고 예로부터 약초로서 널리 사용되어 왔다. 含有物質로는 tropane alkaloid, 즉 atropine, scopolamine, hoysciamine, norhoysciamine 등이 존재하여, 鎮痛, 鎮痙, 催眠藥으로서 이용되고 있으며, 항아세틸콜린제, 부교감신경 억제제로 사용되고 있다 (堀田 滿 등, 1989; 韓 등, 1988).

본 연구는 Ri plasmid의 종류를 달리하여 *A. belladonna* 에서 毛狀根을 유도하고, 유도된 毛狀根 중에서 tropane alkaloid의 생산성이 높은 주를 찾고자, 배지별 毛狀根의 生長率을 측정하고 tropane alkaloid의 생산량을 thin layer chromatography(TLC), high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 定性, 定量分析 하였다.



## II. 實驗材料 및 方法

### 1) 種子發芽

東京都 藥用植物園에서 분양 받은 *A. belladonna* 종자를 중성세제에 15 분간 씻고 70% 에탄올에서 10 분간 침지시킨 다음, tween 20이 2-3 방울 첨가된 1% sodium hypochlorite 용액에서 15 분간 소독하여 멸균수로 3 회 반복하여 세척하였다. 완전히 포면 살균된 종자를 3% sucrose를 함유하는 MS(MS30) 배지에 이식하고 25℃에서 광 주기는 16 시간으로 6,000 lux의 조명 하에서 無菌發芽시켰다.

### 2) 毛狀根의 誘導

발아시킨 幼植物의 줄기에 유병침으로 상처를 내어 *A. rhizogenes*를 직접 감염시켜 毛狀根을 유도하였다. *A. rhizogenes* 15834, A4, R1000은 YEB 배지(Bacto beef extracts 0.5%, Bacto yeast extracts 0.1%, peptone 0.5%, sucrose 0.5%, magnesium sulfate 0.024%, agar 1.5%; pH 7.2) 에서 25℃의 暗條件 하에서 3 일간 靜置培養시킨 후 사용하였다.

### 3) Callus 培養

발아시킨 幼植物의 잎을 일정한 크기로 잘라 1 당 NAA 1mg과 BA 1mg 이 첨가된 MS30 배지에 치상하여 25℃에서 조도를 6,000 lux로 하고 16 시간 조명 하에서 30 일간 배양하여 callus 를 유도하였다.

### 4) 形質轉換의 確認

*A. rhizogenes*에 의해 유도된 毛狀根이 形質轉換은 opine 존재 여부에

따라 확인 하였으며, opine分析은 Petit(1983)의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양한 毛狀根 100mg을 0.1 N HCl 100 $\mu$ l에서 분쇄한 후, 20,000 xg에서 10 분간 원심분리하고 상정액을 電氣泳動 試料로 사용하였다. 電氣泳動은 상정액과 포름 opine을 3MM Whatman 여과지에 2-10 $\mu$ l 점적한 후, methylene blue를 maker로 하여 600 volt에서 2시간 실시하였고 전극조 완충 용액은 3% formic acid - 6% acetic acid 용액을 pH 2.8로 조정하여 사용하였다. 電氣泳動한 Whatman 여과지의 染色은 0.2% silver nitrate 용액에서 1 분, 2% NaOH를 함유하는 90% 에탄올 용액에서 10분, 그리고 10% sodium thiosulfate 용액, 1.5 % sodium dimetasulfate 용액에서 20 분간 染色한 후, 흐르는 물로 세척하였다.

#### 5) 毛狀根의 培養과 生長量 測定

유도된 毛狀根이 2-5cm 신장한 후, *A. rhizogenes*를 제거하기 위해 毛狀根을 잘라내어 抗生劑 Claforan이 1 당 300-400mg을 포함하는 MS30 배지에 이식하여 1주 간격으로 2회 繼代培養하였다. *Agrobacterium*이 완전히 제거된 毛狀根을 호르몬이 없는 MS30 固體培地和 液體培地에 25°C, 暗條件에서 繼代培養하여 안정화 시켰다.

안정화 시킨 毛狀根을 배지의 종류, sucrose 농도 및 호르몬 농도를 달리하여 (Table 1) 靜置培養과 振盪培養을 하였으며, 10일 간격으로 3회 반복하여 성장량을 측정하였다(Yoshikawa, 1987).

#### 6) Tropane alkaloid의 成分 確認과 HPLC 分析

毛狀根과 배지 내에서 배양된 原植物體를 동결건조 시켜 乾體量 각 1g을 균질화 시킨 후 추출하였다(Hiroshi et al., 1986). 試料는 추출 용매(chloroform : MeOH : NH<sub>4</sub>OH = 15 : 5 : 1)를 가하여 12시간 진탕한

Table 1. Composition of medium for culture of hairy root

Compound	Medium						
	MS30	MS30 H	NN30	NN30 H	NN20	MS10	NNO
Basal medium	MS	MS	NN	NN	NN	MS	NN
Sucrose(g/l)	30	30	30	30	20	10	0
Hormone (mg/l)	-	IBA 2 Kinetin 0.1	-	IBA 2 Kinetin 0.1	-	-	-

MS; Murashige and Skoog medium, NN; Nitsch and Nitsch medium

후, 여과하여 45°C에서 減壓濃縮 하였다. 여기에 chloroform 과 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 2:1로 첨가하여 혼합한 후, 상층을 따서 28% NH<sub>4</sub>OH로 pH 10으로 조정하였다. 다시 chloroform를 가하여 3번 반복 추출하였다. 이것을 減壓濃縮 시킨 후, 1ml 메탄올로 용해시켜, silica gel TLC plate(Merck Kieselgel 60 F254)에 점적하여 전개용매(chloroform : acetone : MeOH : 28% NH<sub>4</sub>OH = 75 : 10 : 15 : 2)로 전개하였으며, 發色 試藥으로는 Dragendorff's 시약(Stahl, 1966)을 사용하였다.

HPLC에 의한 alkaloid의 分析은 10mM sodiumglycolate(pH 4.0) 와 MeOH 를 6:4로 혼합한 溶媒를  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> Column에 분당 1ml 씩 용출하여 254nm 에서 검출하였다(Table 2).

Table 2. The operational condition for HPLC analysis of alkaloids

Instrument	Waters Associates Model 441 Injector: Model U6K Pump : Model 590 Detector: Model 441
Column	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub> (30 cm X 3.9 mm)
Solvent	10 mM Sodium glycolate : MeOH (6:4)
Flow rate	1.0 ml/min
Injected volume	10 $\mu$ l
Wave length	254 nm



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

### III. 結 果

#### 1. 毛狀根 誘導 및 形質轉換 確認

*A. belladonna*의 毛狀根 유도는 포면 살균된 종자를 25°C, 조도는 6,000 lux, 광 주기는 16 시간 조명 하에서 3주 간 배양하여 幼植物體를 얻었고, 발아된 幼植物을 5주 배양한 후, YEB 배지에서 3일 간 배양한 *A. rhizogenes* 15834, A4, R1000를 각각 幼植物의 상처부위에 感染시켜 光條件 하에서 배양하였다. 그 결과, 균을 접종한 傷處部位에서 tumor組織이 형성되고 균처리 3-4주 후에 毛狀根이 유도되었다(Fig. 1).

유도된 毛狀根에서 形質轉換 여부를 확인하기 위하여 *A. belladonna*의 毛狀根 抽出液을 電氣泳動을 실시 하였다(Fig. 2). 그 결과, 原植物體에서는 agropine 과 mannopine이 확인되지 않았으나, *A. rhizogenes* strain 15834, A4, R1000을 처리하여 유도된 毛狀根에서는 mannopine과 agropine의 spot를 확인할 수 있었다.

#### 2. 毛狀根 培養과 生長率 측정

유도된 毛狀根은 抗生劑를 함유하는 培地에서 1주 간격으로 2회 繼代培養하여, *A. rhizogenes*를 제거하고(Fig. 3) 靜置培地와 液體培地에서 3주 간격으로 6회 繼代培養하여 안정하게 生長하는 毛狀根을 얻었다(Fig. 4). 얻어진 毛狀根을 배지, 호르몬 농도 및 sucrose 농도를 달리하여 生長율을 측정하였다.

##### (1) Strain 15834 에 의해 誘導된 毛狀根

MS 배지와 NN 배지 및 sucrose 농도별로 毛狀根을 40일 동안 靜置培養하였다(Table 3., Fig. 5). MS 배지와 NN 배지에서 生長율을 비교해 보



Fig.1. Hairy root induced from *A. belladonna* after infection of *A. rhizogenes*.

A; strain 15834, B; strain A4, C; strain R1000

HR; hairy root

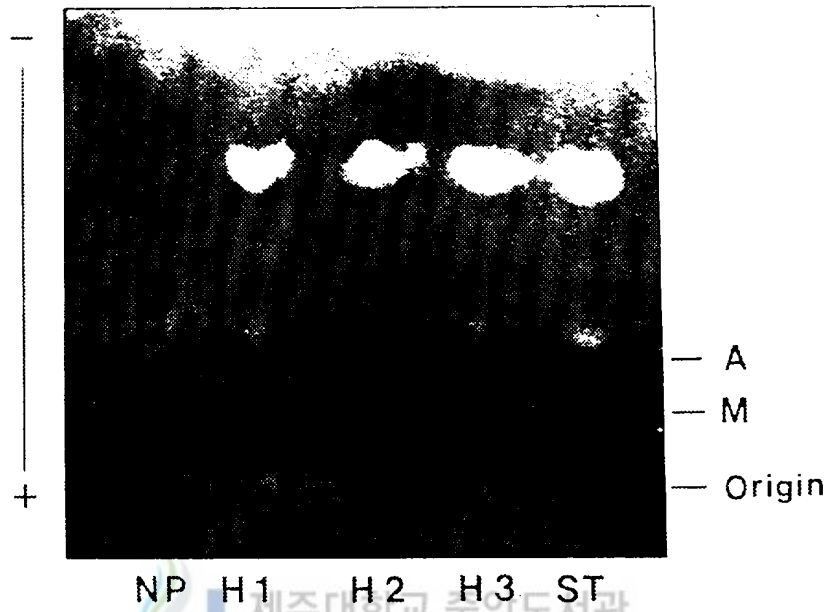


Fig.2. Detection of agropine and mannopine in the extracts of hairy root.

A: agropine, M: mannopine, ST: standard markers

NP: normal plant, H1: R1000, H2: A4, H3: 15834

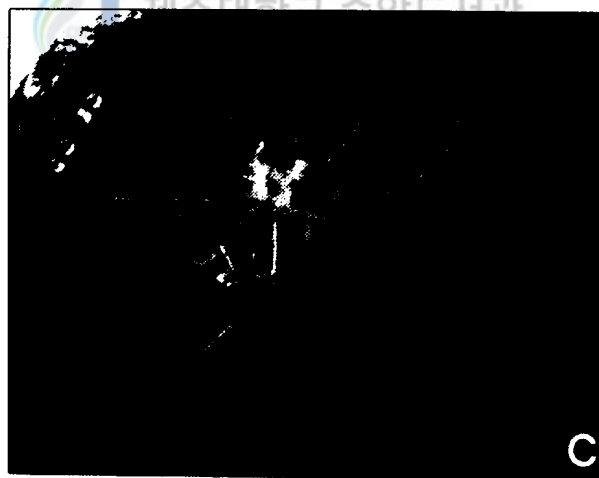
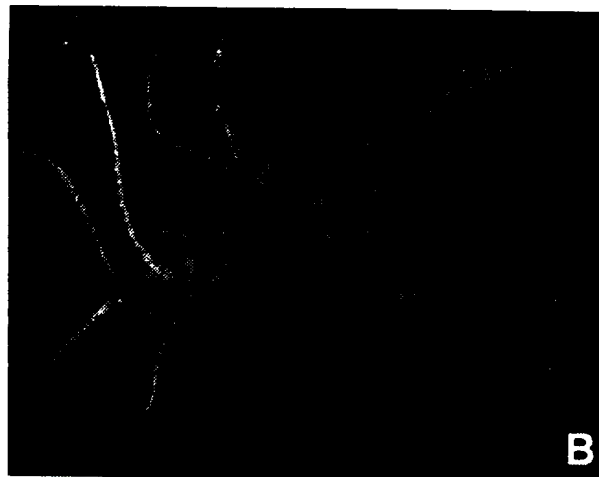


Fig.3. Hairy root culture on the MS medium containing 300-400mg/l Claforan.

A: strain 15834, B; strain A4, C; strain R1000





Fig.4. Culture of *A. belladonna* hairy root induced by *A. rhizogenes* in solid (A) and liquid (B) medium.

I ; strain 15834, II ; strain A4, III ; strain R1000

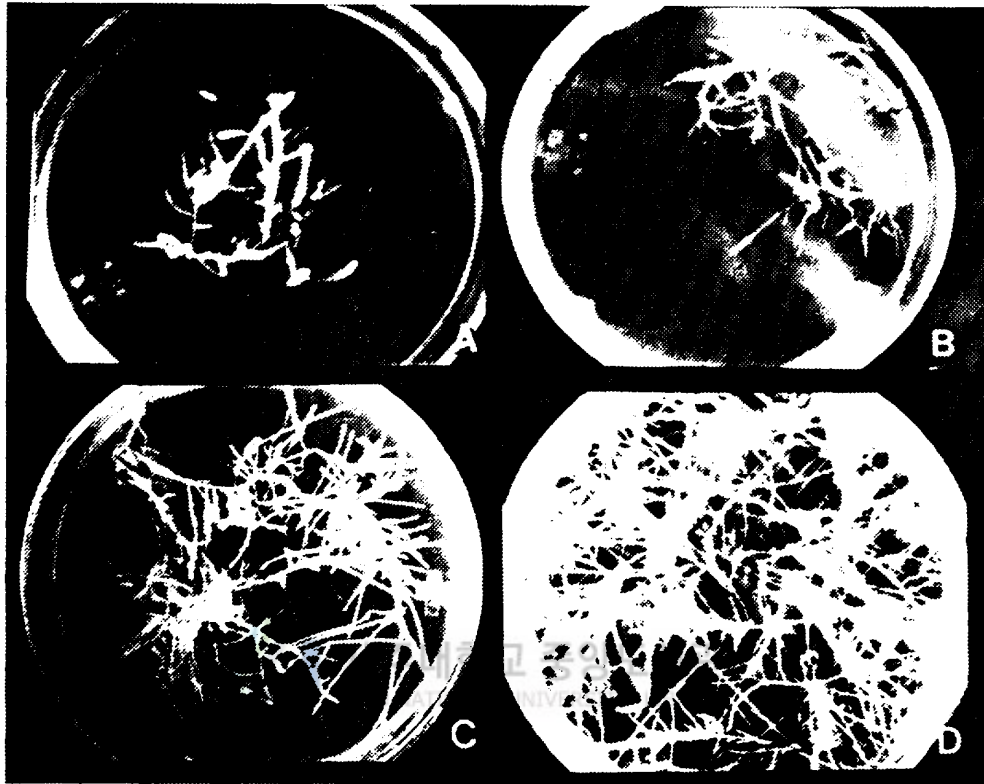


Fig.5. Culture of *A. belladonna* hairy root(15834) on solid medium for 40 days.

A; MS 20, B; NN 20, C; MS 30, D; NN 30

면, MS30 배지에 비해 NN30 배지에서 양호하게 성장하였고, 특히 40일 배양에서의 MS30 배지에서 20 배의 生長率에 비교하여 NN30 배지에서는 34 배로 높은 生長率을 보였다.

Table 3. Culture of *A. belladonna* hairy root(15834) on solid medium (g, fr. wt.)

medium	days	sucrose concentration(g/l)				
		0	10	20	30	30*
MS	10	-	-	0.24±0.021	0.27±0.020	-
	20	-	-	0.34±0.010	0.63±0.031	-
	30	-	-	0.42±0.017	1.24±0.010	-
	40	-	-	0.95±0.010	2.01±0.075	-
NN	10	-	-	0.22±0.010	0.32±0.015	-
	20	-	-	0.39±0.030	0.95±0.021	-
	30	-	-	0.61±0.043	1.96±0.020	-
	40	-	-	1.54±0.041	3.41±0.030	-

\*; medium supplemented with hormone(IBA 2mg/l, Kinetin 0.2mg/l)  
-; none growth

또한 배지의 sucrose 농도별에 따라 배양했을 때는 sucrose 농도 0%와 1%일 때는 생장이 되지 않았으며, 2%와 3%에서는 배양일 수에 관계없이 생장이 양호하였고, 특히 sucrose 농도가 3%일 때에는 생장이 대단히 양호 하였다. 배지내의 sucrose 농도에 따른 MS30 배지와 NN30 배지에서 生長率은 NN30 배지가 MS30 배지보다 1.4 배가량 높은 生長率을 보였다. 호르몬이 첨가된 MS(MS30 H) 배지와 NN(NN30 H) 배지는 생장이 이루어 지지 않았다.

한편 毛狀根을 MS 배지와 NN 배지에서 振盪培養 하였다(Table 4., Fig. 6), 배지 별로는 40日 동안 배양한 MS30 배지가 11 배의 生長率을

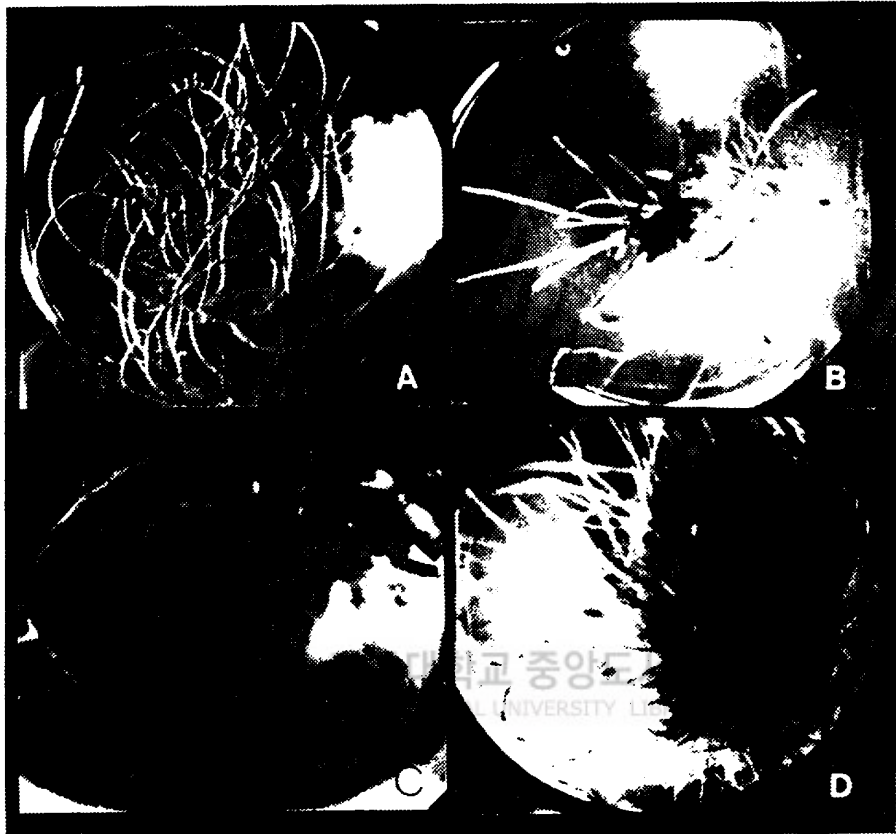


Fig.6. Culture of *A. belladonna* hairy root(15834) on liquid medium for 40 days.

A: MS 20, B: NN 20, C: MS 30, D: NN 30

보였고, NN30 배지가 45 배의 生長率을 보여 MS30 배지보다 높은 生長率을 보였다. 그리고 sucrose 농도에서 0%와 1% 일때에는 생장이 이루어

Table 4. Culture of *A. belladonna* hairy root(15834) on liquid medium (g, fr. wt.)

medium	days	sucrose concentration(g/l)				
		0	10	20	30	30*
MS	10	-	-	0.27±0.025	0.55±0.020	-
	20	-	-	0.30±0.026	0.76±0.045	-
	30	-	-	0.39±0.097	0.94±0.043	-
	40	-	-	0.56±0.067	1.16±0.038	-
NN	10	-	-	0.39±0.032	1.21±0.026	-
	20	-	-	0.45±0.021	1.34±0.012	-
	30	-	-	0.63±0.075	1.92±0.033	-
	40	-	-	1.75±0.054	4.54±0.027	-

\*:medium supplemented with hormone(IBA 2mg/l, Kinetin 0.2mg/l)  
-:none growth

지지 않았으며, 2%와 3%일때는 생장이 양호하였다. 그리고 靜置培養과 振盪培養에서 毛狀根은 호르몬을 첨가한 배지에서 callus화 또는 생장의 억제되는 경향이 나타났으며(Fig. 7-1, Fig. 7-2), 毛狀根이 호르몬 첨가 배지보다 호르몬이 없는 배지에서 높은 生長率을 나타내었다. 60일 이상 배양했을때는 Fig. 8 과 같이 毛狀根이 callus화와 暗褐色으로 괴사하는 경향을 보였다.

## (2) Strain A4에 의해 誘導된 毛狀根

*A. rezoenes* strain A4를 접종하여 유도한 毛狀根을 MS 배지와 NN 배지 및 sucrose 농도에 따라 40일 동안 靜置배양 하였다(Table 5., Fig. 9). MS30 배지에서는 40일 배양에서 약 13 배의 生長率을 보인데 반해



Fig.7-1. Hairy root culture on the MS medium containing IBA 2mg/l and Kinetin 0.2mg/l.



Fig.7-2. Culture of *A. belladonna* hairy root induced by *A. rhizogenes* 15834.  
A; MS 30 H, B; NN 30 H

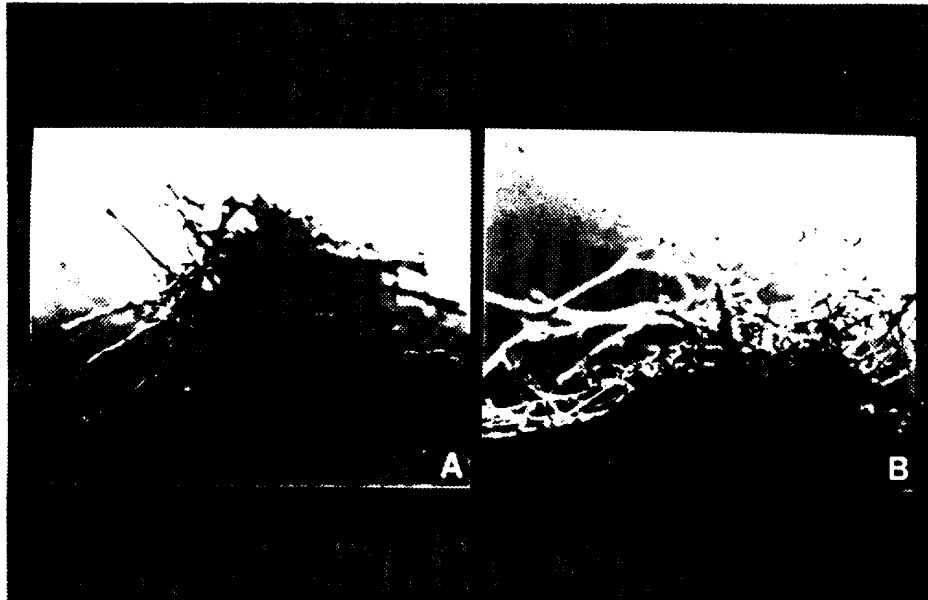


Fig.8. Culture of *A. belladonna* hairy root induced by *A. rhizogenes* 15834 on the liquid medium for 60 days.

A: MS 30, B: NN 30

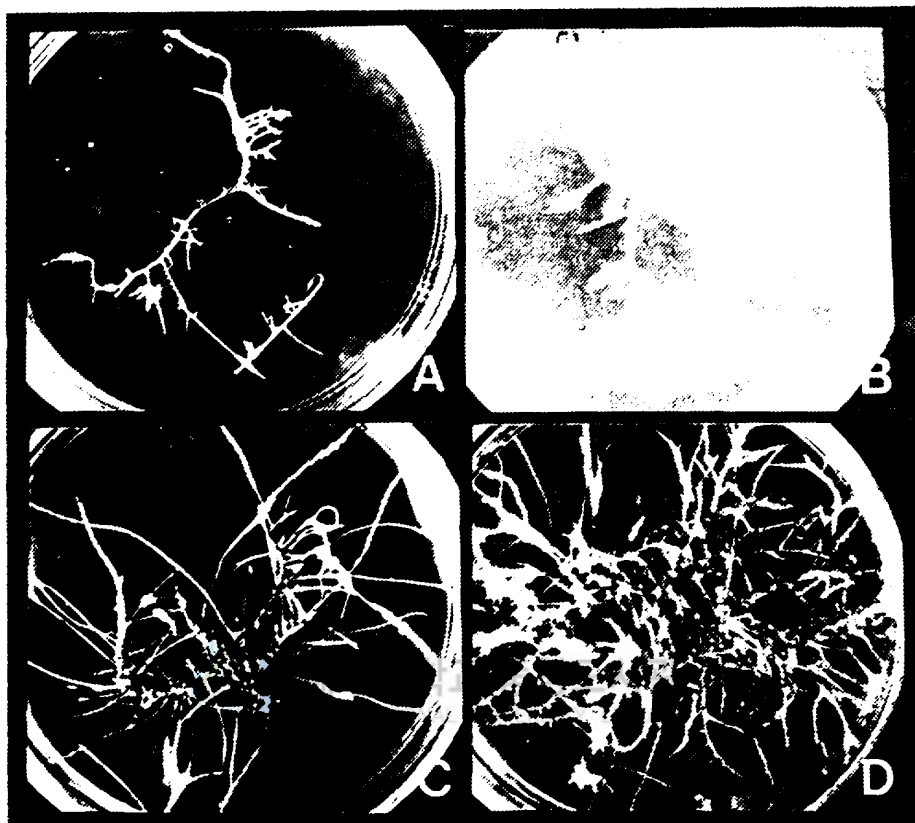


Fig.9. Culture of *A. belladonna* hairy root(A4) on solid medium for 40 days.

A: MS 20, B: NN 20, C: MS 30, D: NN 30



NN30 배지에서는 약 21 배의 生長率을 보였다. 그리고 sucrose 농도가 0, 1%일 때는 생장의 전혀 이루어 지지 않으며, 2%인 배지에서는 生長率이 약 0.7 배로서 3%인 배지에서 보다 生長率이 낮았다. 이것은 strain 15834의 毛狀根 生長보다는 다소 떨어지지만 strain A4인 경우도 MS 배지보다는 NN 배지에서 생장이 양호하였고, sucrose 농도별로는 3%일 때가 생장이 양호하였으며, 호르몬이 첨가된 배지에서는 생장이 이루어 지지 않았다.

Table 5. Culture of *A. belladonna* hairy root(A4) in solid medium (g, fr. wt.)

medium	days	sucrose concentration(g/l)				
		0	10	20	30	30*
MS	10	-	-	0.12±0.008	0.39±0.016	-
	20	-	-	0.16±0.018	0.57±0.014	-
	30	-	-	0.22±0.013	0.65±0.024	-
	40	-	-	0.32±0.020	1.35±0.016	-
NN	10	-	-	0.21±0.029	0.52±0.029	-
	20	-	-	0.28±0.025	0.87±0.045	-
	30	-	-	0.32±0.021	1.23±0.026	-
	40	-	-	0.57±0.027	2.12±0.046	-

\*: medium supplemented with hormone (IBA 2mg/l, Kinetin 0.2mg/l)  
 -: none growth

위의 strain에 유도된 毛狀根을 MS 배지와 NN 배지 및 sucrose 농도에 따라 40일 동안 振盪培養 하였다(Table 6., Fig. 10). 40일 동안 배양한 生長率은 MS30 배지에서는 약 16 배의 生長率을 나타냈고, NN30 배지에서는 약 26 배의 生長率을 나타냈다. 호르몬이 첨가된 배지에서는 시간이 경과해도 생장이 이루어 지지 않았고 sucrose 농도가 0%, 1%인 경우에도 생장이 이루어 지지 않았다.

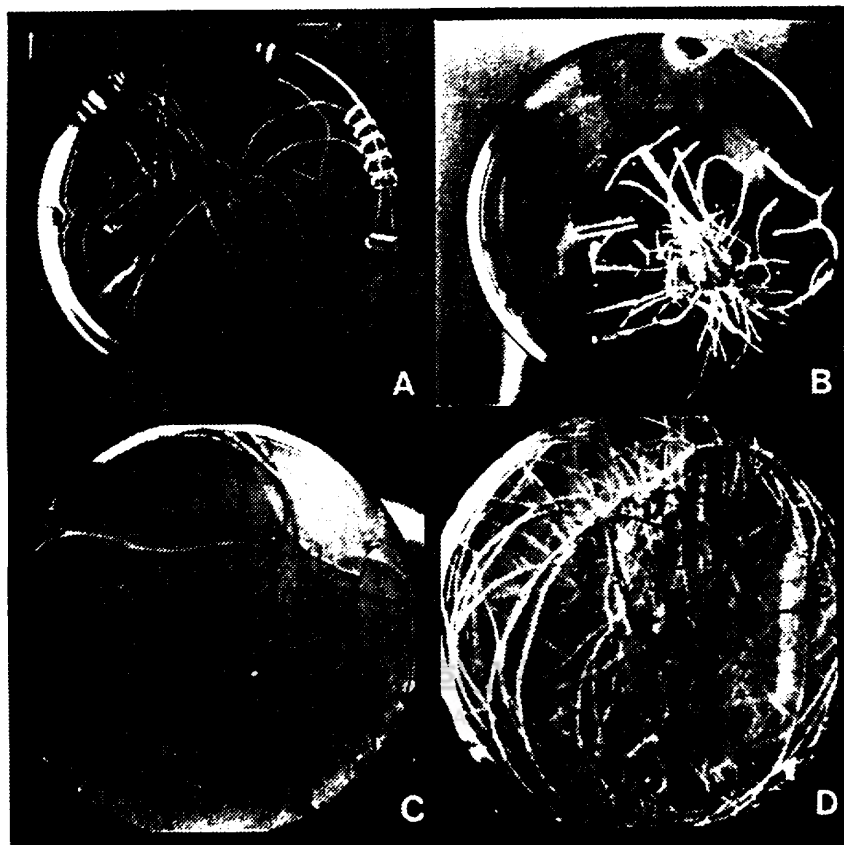


Fig.10. Culture of *A. belladonna* hairy root(A4) on liquid medium for 40 days.

A: MS 20, B: NN 20, C: MS 30, D: NN 30

Table 6. Culture of *A. belladonna* hairy root(A4) in liquid medium

(g, fr. wt.)

medium	days	sucrose concentration(g/l)				
		0	10	20	30	30*
MS	10	-	-	0.17±0.016	0.43±0.014	-
	20	-	-	0.23±0.014	0.67±0.014	-
	30	-	-	0.32±0.017	0.75±0.018	-
	40	-	-	0.55±0.040	1.69±0.028	-
NN	10	-	-	0.25±0.016	0.63±0.025	-
	20	-	-	0.32±0.018	1.00±0.020	-
	30	-	-	0.38±0.033	1.84±0.054	-
	40	-	-	1.68±0.020	2.61±0.029	-

\*: medium supplemented with hormone (IBA 2mg/l, Kinetin 0.2mg/l)  
 -: none growth

### (3) Strain R1000에 의해 誘導된 毛狀根

Strain R1000에 의해 유도된 毛狀根을 15834, A4와 마찬가지로 배지 별, sucrose 농도 별로 40 일 동안 靜置培養을 하였다 (Table 7., Fig. 11). MS30 배지에서는 배양 40일 후에 약 22 배 정도 성장하였으며, NN30 배지에서는 약 28 배 가량 생장이 증가하였다. sucrose 농도별에 따른 성장율은 sucrose 농도가 3% 일때 양호하였으며, 호르몬이 첨가된 MS 배지와 NN 배지에서는 위의 strain과 동일하게 생장이 이루어 지지 않거나 callus 화 하는 현상이 나타났다.

Strain R1000에 의해 유도된 毛狀根을 MS 배지와 NN 배지에서 sucrose 농도를 달리하여 40 일 동안 振盪培養하였다 (Table 8., Fig. 12).

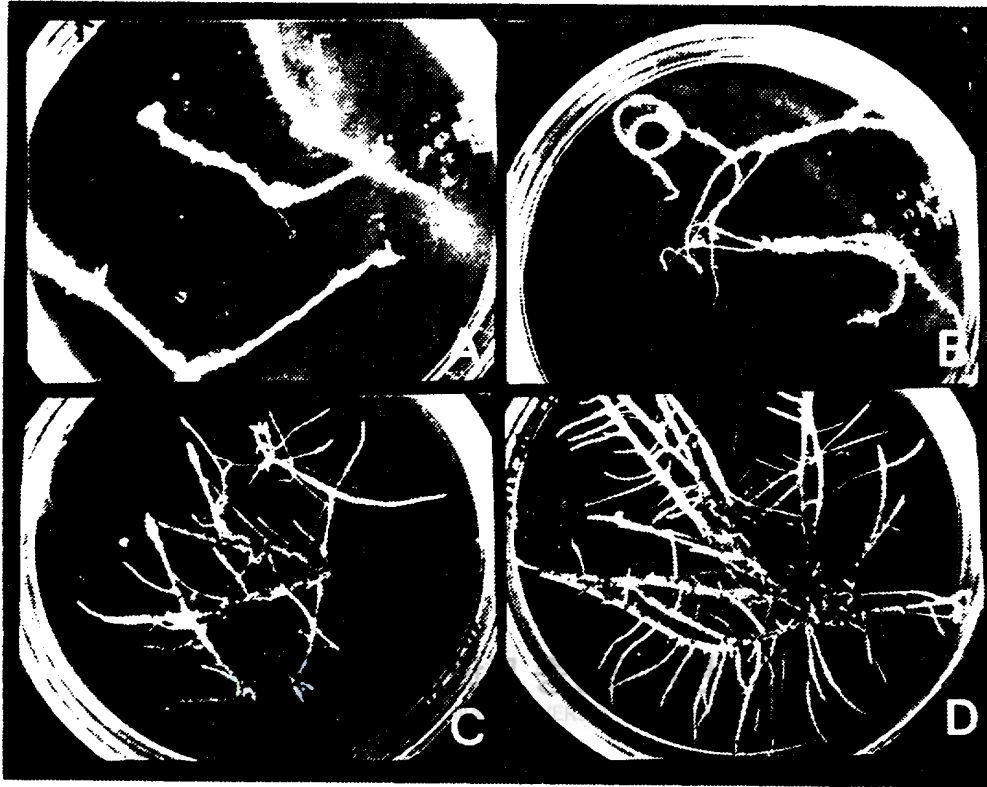


Fig.11. Culture of *A. belladonna* hairy root(R1000) on solid medium for 40 days.

A: MS 20, B: NN 20, C: MS 30, D: NN 30

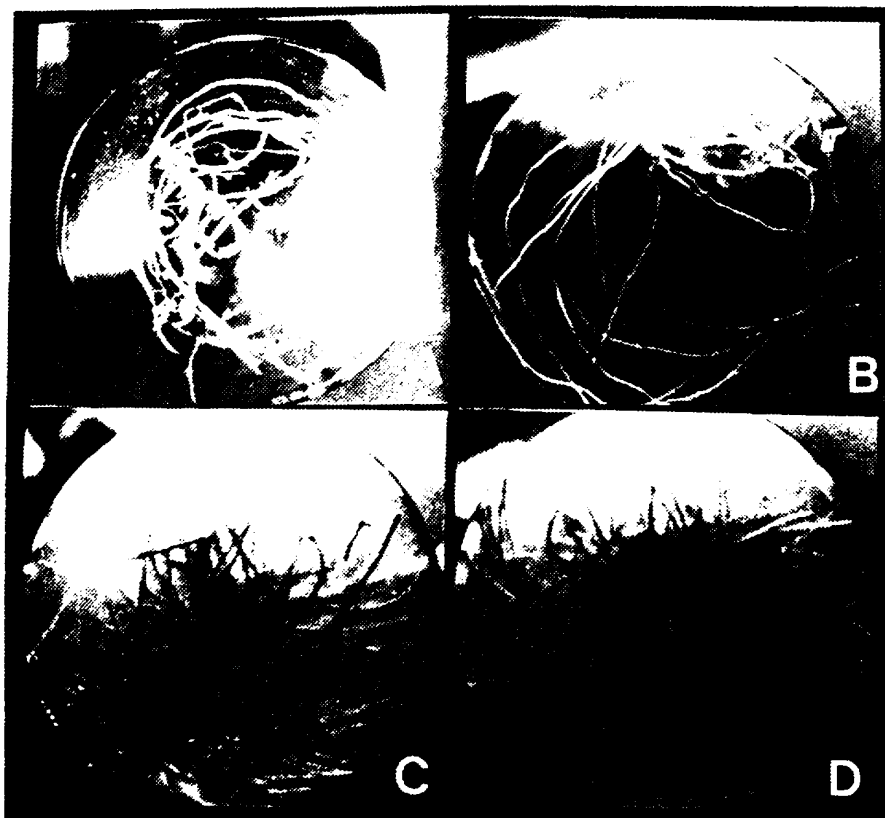


Fig.12. Culture of *A. belladonna* hairy root (R1000) on liquid medium for 40 days.

A; MS 20, B; NN 20, C; MS 30, D; NN 30

Table 7. Culture of *A. belladonna* hairy root(R1000) on solid medium

(g, fr. wt.)

medium	days	sucrose concentration(g/l)				
		0	10	20	30	30*
MS	10	-	-	0.21±0.016	0.28±0.033	-
	20	-	-	0.32±0.016	0.70±0.048	-
	30	-	-	0.38±0.024	1.12±0.021	-
	40	-	-	0.51±0.025	2.24±0.036	-
NN	10	-	-	0.27±0.024	0.31±0.016	-
	20	-	-	0.38±0.025	0.83±0.020	-
	30	-	-	0.51±0.034	1.54±0.039	-
	40	-	-	0.72±0.015	2.85±0.073	-

\*:medium supplemented with hormone(IBA 2mg/l, Kinetin 0.2mg/l)

-:none growth

Table 8. Culture of *A. belladonna* hairy root(R1000) in liquid medium

(g, fr. wt.)

medium	days	sucrose concentration(g/l)				
		0	10	20	30	30*
MS	10	-	-	0.23±0.021	0.42±0.020	-
	20	-	-	0.37±0.010	0.91±0.031	-
	30	-	-	0.57±0.017	1.98±0.010	-
	40	-	-	0.76±0.010	2.95±0.075	-
NN	10	-	-	0.23±0.010	0.84±0.015	-
	20	-	-	0.39±0.030	1.53±0.021	-
	30	-	-	0.68±0.043	2.84±0.020	-
	40	-	-	0.89±0.041	3.51±0.030	-

\*:medium supplemented with hormone(IBA 2mg/l, Kinetin 0.2mg/l)

-:none growth

배양 40 일 후인 MS30 배지와 NN30 배지에서 生長率은 MS30 배지에서는 약 29 배, NN30 배지에서는 35 배로 높은 生長率을 나타냈다. sucrose 농도가 3%인 배지에서가 0%, 1%, 2% 일때 보다 生長이 양호하였다. sucrose 농도가 0%, 1%일때는 처음에 증가하 듯 하다가 生長이 이루어 지지 않았으며, 호르몬이 첨가된 배지에서는 生長이 이루어 지지 않았다.

### 3. Tropane alkaloid 分析

毛狀根과 原植物體 및 원식물체에서 유도된 callus를 tropane alkaloid 抽出法에 의해 추출하여 tropane alkaloid pattern 을 TLC로 비교한 결과(Fig. 13), atropine 과 scopolamine 의 Rf치는 각각 0.67과 0.88으로 原植物體와 15834, A4, R1000에서 主成分인 atropine과 scopolamine을 확인할 수가 있었으나, callus에서는 atropine 만이 극미량으로 존재하였다.

이들 성분의 함량을 분석하기 위해 표준 atropine, scopolamine 과 각 시료를 HPLC로 분리하여 chromatogram을 비교한 결과, retention time이 7.2분, 5.8분대로 표준과 동일하게 확인되었다(Fig. 14 ).

NN30 액체배지에서 40일 동안 배양한 毛狀根의 alkaloid 함량을 측정하기 위해 시료 乾體重 1 g 당 alkaloid 함량을 分析한 결과( Table 9), *A. belladonna* 의 主成分인 atropine 의 함량은 strain R1000에서 乾體重 1 g당 atropine 함량이 0.568% 와 strain A4에서는 0.076% 이고, strain 15834에서는 0.104% 로 나타났다. 原植物體는 약 0.018%의 함량을 나타냈으며, R1000은 原植物體보다는 50 배가량 함량에서 차이가 낮으며, 함량이 다소 떨어지지만 A4는 7배, 15834에서는 10 배의 함량차를 보였다. 그리고 scopolamine은 R1000에서 0.06 %로 높게 나타났으며, A4

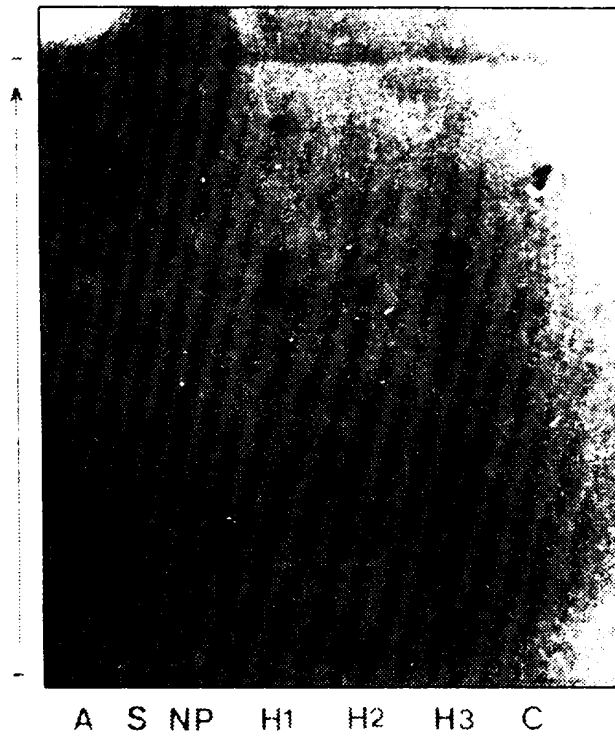


Fig.13. TLC pattern of the tropane alkaloid fraction.

A; atropine, S; scopolamine, NP; normal plant, H1; R1000  
H2: A4, H3: 15834, C: callus



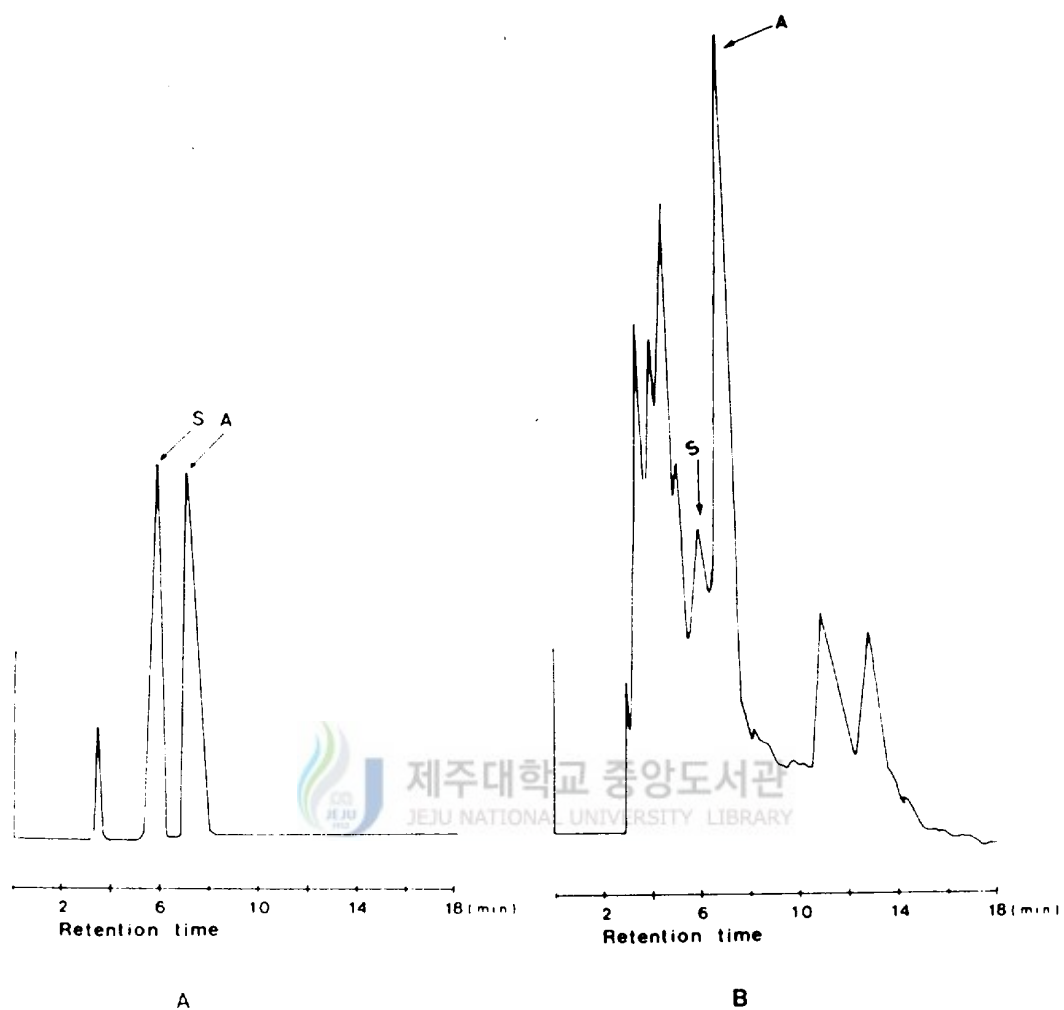


Fig.14. Comparison of HPLC chromatogram of standard tropine alkaloid(A) and crude extract(B) from *Atropa belladonna* hairy root induced by *Agrobacterium rhizogenes* 15834.

A: atropine                      S: scopolamine

와 15834가 각각 0.010%, 0.017% 로 검출 되었다. 그러나, 원식물체에서 유도된 callus에서 atropine은 극미량으로 검출되었고, scopolamine은 검출되지 않았다.

Table 9. Comparison of tropane alkaloid content and biomass among normal plant, callus and hairy root induced by *A. rezoogenes* R1000, A4 and 15834

	total alkaloid ( A + S )	atropine ( %/ D.W )	scopolamine	biomass (g, fr. wt./l)*
N.P.	0.018	0.018	trace	.
Callus	trace	trace	N.D	.
R1000	0.628	0.568	0.060	87.75
A4	0.086	0.076	0.010	65.25
15834	0.121	0.104	0.017	113.50

N.P.;normal plant, N.D:none detected

\*: hairy root cultured during 40 days in NN 30 liquid medium.

Atropine과 scopolamine의 total alkaloid 함량은 R1000에 의해 유도된 毛狀根에서 0.628%로 나타났으며, 毛狀根의 생산은 strain 15834에 의해 유도된 毛狀根을 NN30 액체배지에서 40일 동안 배양한 결과 1 당 113.5g 을 얻을 수가 있었다.

## N. 考 察

*A. belladonna* 幼植物體에 *A. rezo*genes 15834, A4, R1000을 감염시켜 毛狀根을 유도하였으며, 유도된 毛狀根에 opine이 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 식물이 생산하지 않는 아미노산인 opine이 Ri plasmid에 의해 形質轉換된 毛狀根에서 생산되는 것으로서 外來遺傳子, 즉 Ri plasmid의 T-DNA가 삽입되어 그 형질을 발현하는 것을 확인할 수 있었다(Petit *et al.*, 1983).

*A. rhizogenes*에 의해 각각 유도된 毛狀根을 배지, sucrose 농도, 호르몬 농도에 따른 生長率을 측정하였는데 배지별 生長率을 비교해 볼 때 (Table 3-8), *A. rezo*genes 15834, A4, R1000 모두가 MS 배지에서 보다 NN 배지에서, 靜置培養에서 보다 振盪培養에서 生長이 良好하였다. 毛狀根을 MS30 배지와 NN30 배지에서 40일 간 靜置培養과 振盪培養한 결과, MS30 배지에서는 10 - 30 배, NN30 배지에서는 20 - 40 배의 生長率을 보였으며, 특히 strain 15834에 의해 유도된 毛狀根을 NN30 배지에서 振盪培養하였을 경우에는 45 배의 높은 生長率을 보였다. 이러한 生長 정도는 인삼에서 3 배(Yoshikawa and Furuya, 1987), 당근(*Daucus carota*)에서 10 배(Hwang *et al.*, 1989), 근대 와 *Nicotiana rustica*에서 20 배(Hamill *et al.*, 1986), 그리고 까마중(*Solanum nigrum*)에서 52 배(Yang *et al.*, 1991) 의 生長率과 비교해 볼 때, strain A4에서 유도된 毛狀根을 배양했을 때 26 배, strain R1000에서 35 배, strain 15834에서 45 배로서 유의할 만한 生長 정도를 보여 주었다. 그러나, 유도된 毛狀根을 振盪培養에서 60일 이상 배양 했을 때는 모상근의 callus화 하거나 괴사하는 경향을 보여 振盪培養에서는 50일 이내의 배양이 적합하다고 사료된다

(Fig. 8).

Sucrose 농도별에 따른 毛狀根의 生長率을 측정한 결과(Table 3-8), sucrose가 들어있지 않은 배지와 sucrose농도 1%일 때에는 毛狀根이 성장하지 않았다. 이러한 결과는 광합성이 불가능한 루리 배양에서는 탄소원을 필요로 하기 때문에 탄소원의 부재에 의한 성장 억제인 것으로 사료되며(Bhojwani *et al.*, 1983), 도라지 와 까마중의 毛狀根 배양에서 sucrose가 첨가되지 않은 배지에서는 毛狀根이 성장하지 않는다는 결과와 일치하였다(Kim *et al.*, 1990 ; Yang *et al.*, 1991).

*A. rezoigenes* 15834, A4, R1000에 의해 유도된 毛狀根을 호르몬이 첨가된 배지에서 生長率을 비교했을 때(Table 3-8), 모두 callus 화하거나, 생장이 이루어 지지 않았다. 이와 같은 결과는 *A. rhizogenes* 의 T-DNA 에 의해 形質轉換된 조직이 T-DNA 상의 auxin 과 cytokinin 합성에 관여하는 호소 유전자 발현으로 배지에 외부 호르몬이 공급없이도 생장을 지속하는 것으로 보인다(Knopp *et al.*, 1988; Parr *et al.*, 1988). 그리고 당근의 경우와 인삼의 毛狀根 배양에서 외부 호르몬인 IBA 와 kinetin를 첨가했을 때 생장이 촉진된다는 결과와 일치하지 않았다(Yoshikawa and Furuya, 1987; Hwang *et al.*, 1989). 그러나 인삼의 毛狀根은 호르몬이 없는 배지에서 잘 분지하여 성장하며(Ko, 1989), 도라지 (*Platycodon grandiflorum* DC.) 에서 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서 생장이 양호하다는 사실(金 등., 1990)과 일치하였다.

위와 같이 *A. belladonna* 毛狀根 배양에 있어서 배지성분, sucrose 농도의 최적조건등의 확립이 毛狀根의 대량 증식 및 유용한 물질을 안정적으로 얻는데 기초자료가 되리라 사료된다.

각 strain에 의해 유도된 毛狀根의 tropane alkaloid 함량은 乾體量 당 0.086% - 0.628% 였고, R1000으로 유도된 毛狀根에서 0.628%의 生産量

을 보였다(Table 9). 또한 atropine 함량은 *A. rhizogenes* strain 15834를 처리했을 때 atropine 함량이 乾體量 當 0.371 %인데 반해(Hiroshi et al., 1986), 본 연구에서는 0.568%로 약간 높은 함량을 얻을 수 있었다. 그리고 scopolamine 의 함량은 乾體量 當 0.060%로서 原植物體에서는 극미량, 15834와 A4등에서는 각각 0.017%, 0.010% 로 검출된데 반해, R1000에서는 많은 양의 scopolamine 을 얻을 수가 있었다. Scopolamine 함량은 strain R1000 에서 0.060%로 callus와 cell line 배양에서 얻은 scopolamine 보다 약 60 배나 많은 함량을 생산할 수가 있었다(Yasuyuki and Takashi, 1982 ). 그러나 이런 cell line 을 이용하면 대량 생산에는 유용하지만 繼代培養을 계속 할수록 生産性이 떨어진다고 보고하고 있다(Szoke et al., 1982; Yasuyuki and Tsuyoshi, 1984). 그리고 Hiroshi 등(1986)의 同植物體에서 배양한 毛狀根 에서 0.024%의 함량을 보인데 반해, 약 2 배 가량 차이를 보이며, Jung 등(1987)에서 scopolamine 함량이 0.07-0.09%인 것과는 근소한 차이를 보였다.

본 연구의 결과, 각 strain에서 유도된 毛狀根의 生長率은 MS30 배지보다 NN30 배지에서 生長이 양호하였으며, 靜置培養 보다는 振盪培養에서 生長率이 양호하였다. Sucrose 농도별에 따른 生長率은 sucrose 농도가 증가할수록 生長率도 증가하였는데, 특히 sucrose 농도가 3%일 때는 生長이 아주 양호하였다. 호르몬이 첨가된 배지(IBA 2mg/l, kinetin 0.1mg/l)에서는 生長이 되지 않거나 callus화 하는 현상이 나타났으며, *A. rhizogenes* 15834, A4, R1000에서 유도된 毛狀根을 NN30 배지에서 40일 동안 振盪培養 하였을 때 배지 1 l 당 113.5g, 65.25g, 87.75g의 생체량을 생산할 수 있는데, 특히 strain 15834를 처리하여 유도된 毛狀根을 NN30 배지에서 배양했을 때 생체량을 많이 얻을 수

있었다. 그러나, 2차 성분인 tropane alkaloid 생산은 strain R1000을 처리했을 때 atropine과 scopolamine 함량이 각각 乾體量當 0.568%, 0.060%로 原植物體보다는 60 배와 16 배로서 높은 生産性을 얻을 수가 있었고, strain 15834 와 A4의 tropane alkaloid 함량은 각각 0.121% 와 0.086% 로 낮았다. 따라서, R1000에 의해 유도된 毛狀根이 tropane alkaloid 生産性이 높은 것으로 보아 완전한 植物體로 培養될 때까지 앞으로 더 연구가 필요하다고 사료된다.

## V. 摘 要

*Atropa belladonna*의 종자를 무균적으로 발아시킨 幼植物에 *Agrobacterium rhizogenes* 15834와 A4 및 R1000으로 Direct infection 法에 의해 毛狀根을 유도하고, 毛狀根 抽出物에서 agropine 과 mannopine이 검출되어 形質轉換을 확인한 다음 배지별, sucrose 농도별에 따른 배양 조건과 tropane alkaloid의 生産量에 대하여 조사하였다.

毛狀根의 生長率은 MS 배지보다는 NN 배지에서, sucrose 농도가 3%일 때 가장 良好 하였다. 또한, 호르몬(IBA 2, Kinetin 0.1 mg/l)이 첨가된 배지에서는 *A. rhizogenes* 15834, A4, R1000에서 모두 callus화하는 傾向을 보였으나 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서는 生長이 양호하였다. *A. rhizogenes* 15834에 의해 유도된 毛狀根이 NN30 배지에서 40일 동안 振盪培養하여 45 배의 生長率을 보였으며, 1 l 당 113.5g 을 生産할 수 있었다.

毛狀根과 callus 그리고 原植物體에서 tropane alkaloid를 추출하여 TLC로 확인할 수 있었으며, HPLC로 分析한 tropane alkaloid는 각 strain에 의해 유도된 毛狀根의 종류에 따라 乾體量 당 0.086% - 0.628%를 얻을 수 있었고, R1000으로 유도된 毛狀根에서 atropine과 scopolamine 은 각각 0.568%와 0.060%로 높은 生産量을 보였다.

## 參考文獻

- Bhojwani, S. S. and M. K. Razadan. 1983. Plant tissue culture theory and practice. Elsevier Science Publisher B.V. New York, PP 85-104.
- Cardarelli, M., D. Mariotti, M. Pomponi, L. Spano, L. Capone and P. Constantino. 1987. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol. Gen. Genet.*, 209: 475-480.
- 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 Rep.*, 8:75-77.
- Eckes, P., G. Donn and F. Wengenmayer. 1987. Genetic engineering with plants. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 26:382-402.
- Gizella, V. P. 1988. Tropanes. cell culture and somatic cell genetics of plants, 5:263-275.
- 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 Rep.*, 5:111-114.
- 韓大錫, 金鍾源, 金昌玟, 陸昌洙, 成忠基, 都象學, 裴基煥, 申順姬, 林種弼, 韓普燮. 1988. 生藥學. 東明社, p.208.
- Hasimoto, T. 1987. Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids by the use of plant tissue culture. graduation thesis, pp.5-15.
- Hasimoto, T. and Y. Yamada. 1983. Scopolamine production in suspension cultures and redifferentiated roots of *Hyoscyamus niger*. *Planta Med.*, 47:195-199.



- 黃栢, 趙德以, 洪性式. 1986. *Agrobacterium rhizogenes*에 의한 Hairy Root 형성에 대한 생리학적 연구. *Korean J. Bot.*, 29(4):275-283.
- 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.
- Hiroshi, K., N. Okamura, M. Satake, H. Harada and K. Shimomura. 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep.*, 5:239-242.
- Hiraoka, N. and M. Tabata. 1974. Alkaloid production by plants regenerated from cultured cells of *Datura innoxia*. *Phytochemistry*, 13:1671-1675.
- 堀田 萬, 緒方 健, 新田あや, 星川清親, 柳 宗民, 山崎耕宇, 磯山英, 岩槻邦勇, 大橋廣好, 柏谷博之. 北川尙史, 小山鐵夫, 小山博滋, 田村道夫, 千原光雄, 椿 啓介, 光田重辛, 村田 源, 山崎 敬, 湯漢浩史. 1989. 世界有用植物 事典, p.131.
- Jung, G. and D. Tepfer. 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.
- 鍾田 宏. 1989. 植物組織培養學會. Symposium, 227.
- 金炳魯, 李載赫, 黃栢. 1990. *Agrobacterium rhizogenes*에 의하여 유도된 도라지(*Platycodon grandiflorum* DC.) Hairy Root 의 배양. *Korean J. Bot.*, 33(3):183-188.
- Knopp, E., A. Strauss and W. Wehrli. 1988. Root induction on several

- Solanaceae* species by *Agrobacterium rhizogenes* and the determination of root tropane alkaloid content. *Plant Cell Rep.*, 7:590-593.
- 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. Strobil. 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.
- 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.
- Smith, J. F. and C. O. Townsend. 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science*, 25:671-673.
- Egon stahl. 1966. Thin layer chromatography. Toppan Printing Co., pp432-435.
- Szoke, E., N. N. Dung, G. Verza-Petri, A. Potoczki. 1982. Change in the total alkaloid contents in the tissue cultures of *Datura innoxia* Mill.: the function of the cultural circumstance. *Acta. Bot. Sci.*

- Hung.*, 29(3-4):403-410.
- 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. 11
- White, F. F. and E. W. Nester. 1980. Hariy root:plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.*, 141:1134-1141.
- White, F. F. , B. H. Taylor, G. A. Huffman, M. P. Gordon and E. W. Nester. 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.*, 164:33-44.
- 梁寬八, 高京秀, 許仁玉, 李雲鎮, 金昌敏, 趙蜀衡. 1991. *Agrobacterium rhizogenes* 를 이용한 까마중의 形質轉換과 毛相根 培養. *Kor. J. Pharmacol.*, 22(1):26-32.
- Yasuyuki, Y. and T. Endo. 1984. Tropane alkaloid production in cultured cells of *Duboisia leichhardtii*. *Plant Cell Rep.*, 3:186-188.
- Yasuyuki, Y. and T. Hashimoto. 1982. Production of tropane alkaloids in cultured cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Rep.*, 1:101-103.
- Yoshikawa, T. and T. Furuya. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.*, 6:449-453.

## 감사의 글

본 論文을 完成하는데 있어 實驗設計에서 부터 論文作成에 이르기까지 指導와 鞭撻을 아끼시지 않으신 許仁玉 교수님께 먼저 깊은 感謝를 表하며, 論文審査를 맡아주신 金文洪 교수님, 高碩贊 교수님과 많은 가르침을 주신 吳文儒 교수님, 吳德謙 교수님, 李龍弼 교수님, 金源澤 교수님, 李和子 교수님, 金世帝 교수님께 感謝를 表합니다.

그리고 研究過程에 있어 助言과 激勵을 아끼시지 않으신 高京秀 박사님께 깊은 感謝를 드리오며 본 실험에 種子를 분양해 주신 東京都 藥用植物園의 袴木 辛子 선생님에게 감사를 드리고 또한, 植物生理學研究室 여러분에게 고마움을 전합니다.

항상 사랑으로 저를 보살펴 주신 父母님, 형과 누님들, 매형들에게 감사를 드리오며, 그리고 오늘에 있기까지 여러모로 도움을 주신 막내누나에게 고마움을 이 논문으로 대신합니다.