

*Agrobacterium rhizogenes*에 의해 유도된 *Atropa belladonna* 毛狀根의 배양과 Tropane Alkaloid의 成分에 관한 研究

許仁玉*, 韓太完**

The Study of Growth and Tropane Alkaloids of *Atropa belladonna* Hairy Root Induced by *Agrobacterium rhizogenes*

In-Ok Heo*, Tae-Wan Han**

Summary

The study was aimed to confirm transformation, tropane alkaloid production and growth rate of hairy roots.

Hairy roots were induced by inoculation of stem of sterile plants of *Atropa belladonna* with *Agrobacterium rhizogenes* strain 15834, A4, R1000.

Agropine and Mannopine were detected in the hairy roots.

The growth rate of hairy roots according to medium and sucrose concentration was higher in hairy roots induced by strain 15834 than other strains, especially, the hairy roots induced by strain 15834 produced 113.5g ger 1 in NN 30 liquid medium cultured for 40 days.

Besides, the production of tropane alkaloid was 0.086%~0.628% per dry weight according to strain and produced 0.628% in hairy roots induced by R1000.

序 論

Rhizobiaceae에 속하는 *Agrobacterium*은 gram 음성
의 土壤細菌으로서 특정의 宿主에 腫瘍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 報告되어 있다.

*Agrobacterium*에는 크기에 따라 3종류의 plasmid가
있으며, 그 중 180~240kb의 plasmid내 vir 領域이
acetosyringon과 같은 低分子 물질에 의해 활성화되
어 T-DNA 부위를 식물의 genome에 插入시키는 것
으로 알려져 있다(Eckes *et al.* 1987). Plasmid는

* 자연과학대학 생물학과 (Dept. of Biology, Cheju Univ., Cheju-do, 690-756, Korea)

** 대학원 생물학과 (박사과정)

*Agrobacterium*의 종류에 따라 tumor-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 위에 각각의 *Agrobacterium*만이 이용하는 특수한 아미노산인 opine의 합성에 관여하는 部位 (Petit *et al.*, 1983)와 auxin과 cytokinin의 합성에 관여하는 部位를 가짐으로써 (Cardarelli *et al.*, 1987) *Agrobacterium*이 감염된 식물체에 병상을 나타내게 한다. 그 중, *A. rhizogenes*는 T-DNA 위의 opine 합성 유전자의 종류에 따라 mannopine型, agropine型 및 cucumopine型으로 분류하고 있으며 (Petit *et al.*, 1983), 또한 NIEAES 1724 strain에서 mikimopine型이 分離 보고되고 있다 (鎌田, 1989). 그리고 이러한 opine 합성 유전자에 의해 합성되는 opine은 *Agrobacterium*의 窒素原, 炭素原으로 이용되고 있다 (Petit *et al.*, 1983).

한편, 식물의 外來遺傳子를 挿入시키는 방법으로 原生질체 融合과 DNA virus, RNA virus 및 Califlower-mosaic virus 등이 도입 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 도입방법이 보고되어 外來遺傳子 도입의 범위가 크며, 또한 사용법이 간단한 것으로 보고한 이래 (White and Nester, 1980), Ti plasmid와 Ri plasmid를 이용한 crown gall과 毛狀根의 培養은 苗木의 發根, 耐寒性 및 生長促進에 관한 연구 등에 이용되고 있다 (Rugimi 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 대사산물을 효율적으로 얻고자 하는 시도가 이루어지고 있다.

毛狀根의 2차 대사산물의 생산에 대해서는 인삼 (*Panax ginseng*)에서 ginsenoside의 생산성을 (Yosikawa and Furuya, 1987; 고, 1990), 근대 (*Beta vulgaris*)와 *Nicotiana rustica* 毛狀根에서 색소와 alkaloid의 含量을 측정하였고 (Hamil *et al.*, 1986), tropane alkaloid 생산은 다양한 식물 종들의 callus culture에서 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, 사리풀 (*Hyoscyamus niger*), *Datura candida*, *Duboisia leichhardtii* 등에서 2차 대사산물의 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 아시아의 건조한 지대에 분포하고 있으며, 毒性이 아주 強하고 예로부터 藥草로서 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, 抗아세틸콜린제, 부교감신경 억제제로 사용되고 있다 (堀田 등, 1989; 韓 등, 1988).

본 研究는 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.

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 15분간 씻고 70% 에탄올에서 10분간 浸漬시킨 다음, tween 20이 2~3방울 첨가된 1% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 소독하여 滅菌水로 3회 반복하여 洗滌하였다. 완전히 표면 殺菌된 종자를 3% sucrose를 함유하는 MS (MS30) 배지에 이식하고 25°C에서 조도를 6,000 lux로 하고, 광주기는 16시간의 조명하에서 無菌發芽시켰다.

2. 毛狀根의 유도

발아시킨 幼植物의 줄기에 유병침으로 傷處를 내어 *A. rhizogenes*를 직접 감염시켜 毛狀根을 유도하였

다. *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°C의 暗條件 하에서 3일간 靜置培養 시킨 후 사용하였다.

3. Callus 培養

발아시킨 幼植物의 葉을 일정한 크기로 잘라 1당 NAA 1mg과 BA 1mg이 첨가된 MS30 배지에 치상하여 25°C에서 조도를 6,000 lux로 하고 16시간 照明下에서 30일간 培養하여 callus를 유도하였다.

4. 形質轉換의 확인

*A. rhizogenes*에 의해 유도된 毛狀根이 형질전환은 opine 존재 여부에 따라 확인하였으며, opine分析은 Petit (1983)의 方法을 변형하여 사용하였다. 培養한 毛狀根 100mg을 0.1N HCl 100 μ ml에서 粉碎한 후, 20,000xg에서 10분간 원심 분리하고 상정액을 電氣泳動 試料로 사용하였다. 電氣泳動은 상정액과 표품

opine을 3MM Whatman 여과지에 2-10 μ 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 1분, 2% NaOH를 함유하는 90% ethanol 용액에서 10분, 그리고 10% sodium thiosulfate 용액, 1.5% sodium dinitasulfate 용액에서 20분간 染色한 후, 흐르는 물로 洗滌하였다.

5. 毛狀根의 培養과 生長量 측정

유도된 毛狀根이 2~5cm 伸長한 후, *A. rhizogenes*를 除去하기 위해 毛狀根을 잘라내어 抗生劑 Claforan이 1당 300~400mg을 포함하는 MS30 배지에 이식하여 1주 간격으로 2回 繼代培養하였다. *Agrobacterium*이 완전히 除去된 毛狀根을 호르몬이 없는 MS30 固體培地와 固體培地와 液體培地에 25°C, 暗條件에서 繼代培養하여 안정화 시켰다.

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

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	μ -Bonda pak C ₁₈ (30cm x 3.9mm)
Solvent	10mM Sodium glycolate : MeOH (6 : 4)
Flow rate	1.0ml/min
Injected volume	10 μ l
Wave length	254nm

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

6. Tropane alkaloid의 成分 확인과 HPLC 分析

毛狀根과 배지 내에서 培養된 原植物體를 동결건조시켜 전체량 각 1g을 균질화 시킨 후 추출하였다 (Hiroshi *et. al.* 1986). 시료는 추출용매 (chloroform : MeOH : NH₄OH = 15 : 5 : 1)를 가하여 12시간 진탕한 후, 여과하여 45°C에서 減壓濃縮하였다. 여기에 chloroform과 1N H₂SO₄를 2 : 1로 첨가하여 혼합한 후, 상층을 따서 28% NH₄OH로 pH 10으로 조정하였다. 다시 chloroform를 가하여 3번 반복 추출하였다. 이것을 減壓濃縮 시킨 후, 1ml 메탄올로 溶解시켜, silica gel TLC plate (Merck Kieselgel 60 F254)에 점적하여 전개용매 (chloroform : acetone : MeOH : 28% NH₄OH = 75 : 10 : 15 : 2)로 전개하였으며, 發色 試藥으로는 Dragendorff's 시약 (Stahl, 1966)을 사용하였다.

HPLC에 의한 alkaloid의 분석은 10mM sodiumglycolate (pH 4.0)와 MeOH를 6 : 4로 혼합한 용매를 μ -Bondapak C₁₈ Column에 분당 1ml씩 용출하여 254nm에서 검출하였다 (Table 2).

結果 및 考察

1. 毛狀根 유도 및 形質轉換 확인

*A. belladonna*의 유도는 표면 殺菌된 종자를 25°C, 조도는 6,000lux, 광 주기는 16시간 照明 下에서 3주간 培養하여 幼植物體를 얻었고, 발아된 幼植物을 5주 培養한 후, YEB 배지에서 3일간 培養한 *A. rhizogenes* 15834, A4, R1000를 각각 幼植物의 傷處部位에 感染시켜 光條件 下에서 培養하였다. 그 결과 균을 접종한 傷處部位에서 tumor組織이 형성되고 균 처리 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 실시하였다 (Fig. 2). 그 결과, 原植物體에서는

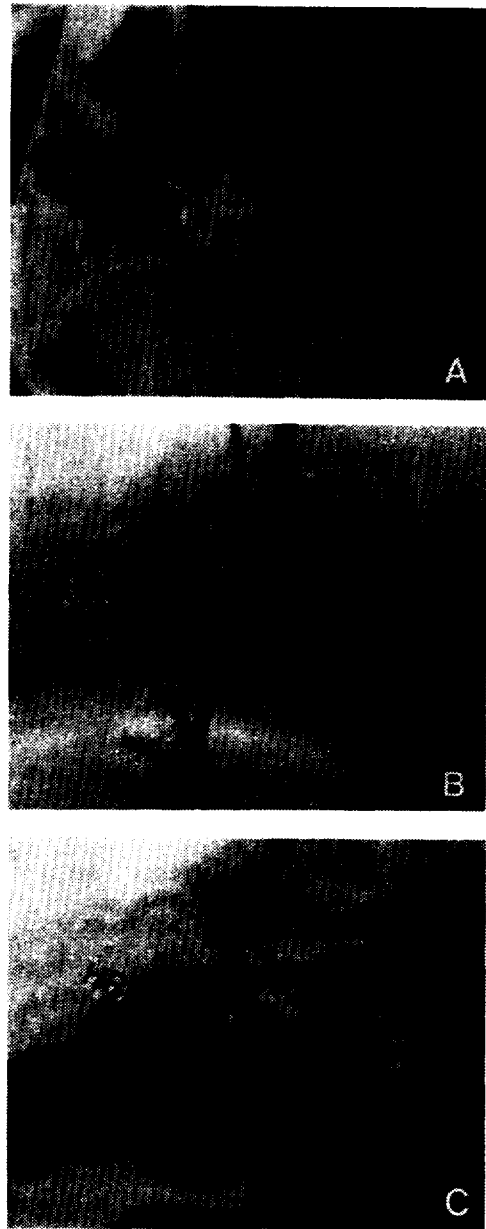


Fig. 1. Hairy root induced form *A. belladonna* after infection of *A. rhizogenes*.

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

HR : hairy root

agropine과 mannopine이 확인되지 않았으나, *A. rhizogenes* strain 15834, A4, R1000을 처리하여 유도

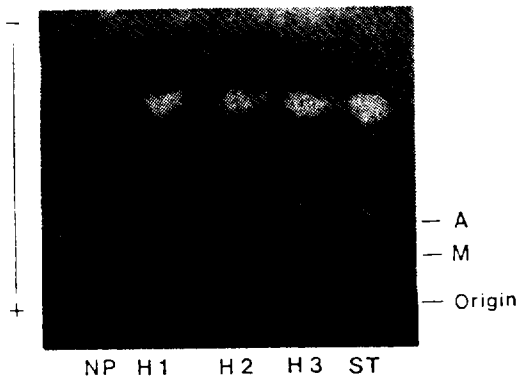


Fig. 2. Detection of agropine and mannopine in the extracts of hairy root.

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

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

된 毛相根에서는 mannopine과 agropine의 spot를 확인할 수 있었다.

2. 毛狀根 培養과 生長率 측정

유도된 毛狀根 抗生劑培地에서 1주 간격으로 2回 繼代培養하여, *A. rhizogenes*를 除去하고 靜置培地에서 3주 간격으로 6回 繼代培養하여 안정하게 生長하는 毛狀根을 얻었다(Fig. 3). 얻어진 毛狀根을 배지, 호

르몬 농도 및 sucrose 농도를 달리하여 生長율을 측정하였다.

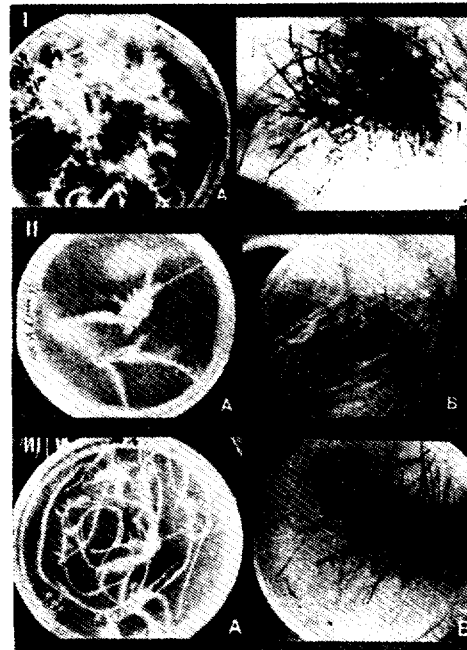


Fig. 3. Culture of *A. belladonna* hairy root induced by *A. rhizogenes* in solid (A) and liquid (B) medium.

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

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

(1) Strain 15834에 의해 유도된 毛狀根

MS 배지와 NN 배지 및 sucrose 농도별로 毛狀根을 40일 동안 靜置培養하였다(Table 3, Fig. 4). MS 배지와 NN 배지에서 生長율을 비교해 보면, MS30 배지에 비해 NN30 배지에서 培養기간에 관계없이 良好하게 生長하였고, 특히 40일 培養에서의 MS30 배지에서 20배의 生長率에 비교하여 NN30 배지에서는 약 34배로 높은 生長率을 보였다.

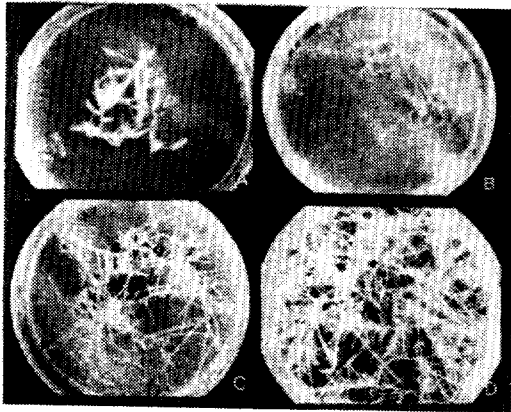


Fig. 4. Culture of *A. belladonna* hairy root(15834) on solid medium for 40 days.
A : MS 20, B : NN 20, C : MS 30, D : NN 30

또한 배지에서 sucrose 농도별에 따라 培養했을 때는 sucrose 농도 0과 1%일때는 生長이 되지 않았

으며, 2%와 3%에서는 배양일 수에 관계없이 生長이 양호하였고, 특히 sucrose 농도가 3%일때에는 生長이 대단히 양호하였다. 배지內的 sucrose 濃도에 따른 MS30 배지와 NN30 배지에서 生長率은 NN30 배지에서 MS30 배지보다 1.4배가량 높은 生長率을 보였다. 호르몬이 첨가된 NS 배지와 NN 배지 모두에서 生長이 이루어지지 않았다.

한편 毛狀根을 MS 배지와 NN 배지에서 振盪培養하였다(Table 4), 배지 별로는 40日 동안 培養한 MS30 배지가 11배의 生長率을 보였고, NN 30 배지가 45배의 生長率을 보여 MS30 배지보다 높은 生長率을 보였다.

그리고 sucrose 농도에서는 0과 1%에서는 生長이 이루어 지지 않았으며, 2%와 3%일때는 生長이 양호하였다. 그리고 靜置培養과 振盪培養에서 毛狀根은 호르몬을 첨가한 배지에서 callus化 또는 生長의 억제되는 경향이 나타났으며, 毛狀根이 호르몬 첨가배지보다 호르몬이 없는 배지에서 높은 生長率을 나타내었다. 60일 이상 培養했을때는 毛狀根이 callus화 와 暗褐色으로 괴사하는 경향을 보였다.

(2) Strain A4에 의해 유도된 毛狀根

A. rhizogenes strain A4를 유도한 毛狀根을 MS 배지와 NN 배지 및 sucrose 농도에 따라 40일 동안 靜置培養하였다. MS30 배지에서는 40일 배양에서 약 13

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

배의 生長率을 보인데 반해 NN30 배지에서는 약 21 배의 生長率을 보였다. 그리고 sucrose 농도가 0.1% 일때는 生長이 전혀 이루어지지 않았으며, 2%인 배지에서는 生長率이 약 0.7배로서 3%인 배지에서 보다 生長率이 낮아졌다(Table 5). 이것은 strain 15834의 毛狀根 生長보다는 다소 떨어지지만 strain A4인 경우도 MS 배지보다는 NN 배지에서 生長이 양호하였고, sucrose 농도별로는 3%일때가 生長이 良好하였으며, 호르몬이 첨가된 배지에서는 生長이

이루어 지지 않았다.

위의 MS 배지와 NN 배지 및 sucrose농도에 따른 毛狀根을 40일 동안 振盪培養하였다(Table 6, Fig. 5). 40일 동안 배양한 生長率은 MS30 배지에서는 약 16배의 生長率을 나타냈고, NN30 배지에서는 약 26배의 生長率을 나타냈다. 호르몬의 첨가된 배지에서는 시간이 경과해도 生長이 이루어 지지 않았고 sucrose 농도가 0%, 1%인 경우에도 生長이 이루어 지지 않았으며, 호르몬이 첨가된 배지에서는 生長이

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	1.52±0.029	-
	20	-	-	0.28±0.025	1.87±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

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	1.63±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



Fig. 5. 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

이루어지지 않았다.

(3) Strain R1000에 의해 유도된 毛狀根

Strain R1000에 의해 유도된 毛狀根들 15834, A4 와 마찬가지로 배지별, sucrose 농도별로 40일 동안 靜置培養을 하였다 (Table 7). MS30 배지에서는 배양 40일 후에 약 22배 정도 성장하였으며, NN30 배

지에서는 약 28배 가량 생장이 증가하였다. Sucrose 농도별에 따른 성장율은 sucrose 농도가 3%일 때 양호하였으며, 호르몬이 첨가된 MS 배지와 NN 배지에서는 위의 strain과 동일하게 생장이 이루어지지 않거나 callus화하는 현상이 나타났다.

Strain R1000에 의해 유도된 毛狀根을 MS 배지와 NN 배지에서 sucrose 농도를 달리하여 40일 동안 振盪培養하였다 (Table 8). 배양 40일 후인 MS30 배지와 NN30 배지에서의 生長率은 MS30 배지에서는 약 29배, NN30 배지에서는 35배로 높은 生長率을 나타냈다. sucrose 농도가 3%인 배지에서는 0, 1%, 2% 일때 보다 생장이 양호하였다. sucrose 농도가 0, 1%일때는 처음에 증가하는 듯 하다가 생장이 이루어지지 않았으며, 역시 호르몬이 첨가된 배지에서는 생장이 이루어지지 않았다.

3. Tropane alkaloid 成分

毛狀根과 原植物體 및 원식물체에서 유도된 callus를 tropane alkaloid 抽出法에 의해 추출하여 tropane alkaloid pattern을 TLC로 비교한 결과 (Fig. 6), atropine과 scopolamine의 Rf치는 각각 0.67과 0.88으로 原植物體와 15834, A4, R1000에서 主成分인 atropine과 scopolamine을 확인한 수가 있었으나, callus에서는 atropine 만이 극미량으로 존재하였다.

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±0.008	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

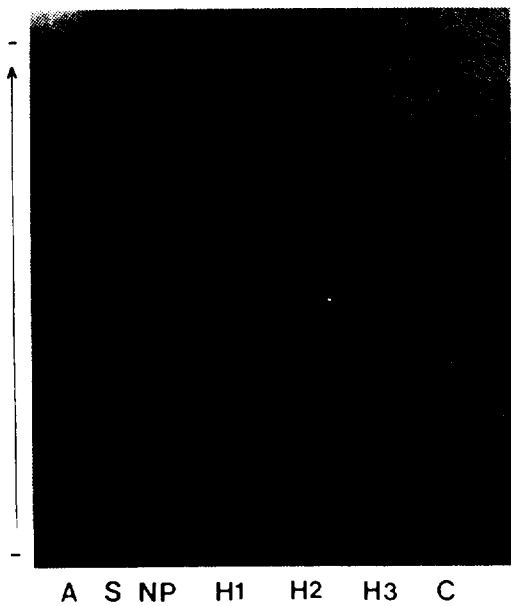


Fig. 6. TLC pattern of the tropane alkaloid fraction.

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

이들 成分의 含量을 분석하기 위해 표품 atropine, scopolamine과 각 시료를 HPLC로 분리하여 chromatogram을 비교한 결과, retention time이

7.2분, 5.8분대로 표품과 동일하게 확인되었다 (Fig. 7).

NN30 액체배지에서 40일 동안 培養한 毛狀根의 alkaloid 含量을 알아보기 위해 시료 전체량 1g당 alkaloid 含量을 分析한 결과 (Table 9), *A. belladonna*의 主成分인 atropine의 含量은 strain R1000에서 전체량 1g당 atropine 含量이 0.568%와 strain A4에서는 0.076%이고, strain 15834에서는 0.104%로 나타났다. 原植物體는 약 0.018%의 含量을 나타냈으며, R1000은 原植物體보다는 50배가량 含量에서 차이가 났으며, 含量이 다소 떨어지지만, A4는 7배, 15834에서는 10배의 含量차를 보였다. 그리고 scopolamine은 R1000에서 0.06%로 높게 나타났으며, A4와 15834가 각각 0.010%, 0.017%로 검출되었다. 그러나, 원식물체에서 유도된 callus에서 atropine은 극미량으로 검출되었고, scopolamine은 검출이 되지 않았다.

Atropine과 scopolamine의 total alkaloid 含量은 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 0당 113.5g을 얻을 수가 있었다.

A. belladonna 幼植物體에 *A. rhizogenes* 15834, A4, R1000을 감염시켜 毛狀根을 유도하였으며, 유도된 毛狀根에 opine 존재함을 확인하였다. 이는 植物이

HPLC condition

Column : μ -Bondapak C₁₈ (30cm X 3.9mm)
 Detection: UV 254nm
 Flow rate: 1.0ml/min
 Solvent : 10mM sodium glycolate : MeOH
 6 : 4

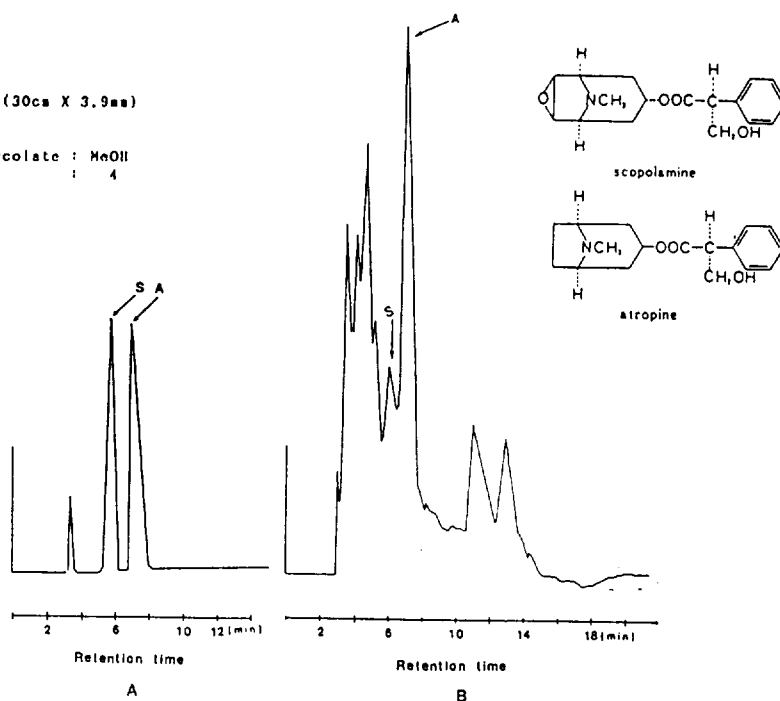


Fig. 7. Comparison of HPLC chromatogram of standard tropane alkaloid and crude extract from *Atropa belladonna* hairy roots.

A : standard tropane alkaloid, B : hairy roots (strain 15834)

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

	total alkaloid (A+S)	atropine (%/D. W)	scopolamine (%/D. W)	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.

生産하지 않는 아미노산, 즉 opine이 Ri plasmid에 의해 形質轉換된 毛狀根에서 生産되는 것으로서 外來遺傳子, 즉 Ri plasmid의 T-DNA가 插入되어 그 形質을 發現하는 것을 확인할 수 있었다 (Petit et al, 1983).

각각 유도된 毛狀根을 배지별, sucrose 濃度, 호르몬 濃度에 따른 生長率을 測定하였는데 배지별 生長率을 비교해 볼 때, *A. rhizogenes* 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 40일간 靜置培養과 振湯培養한 결과, MS30 배지에서는 strain 모두 10~30배의 生長率을 보였으며, NN30 배지에서는 20~40배의 生長率을 보였다. 특히 strain 15834에 의해 유도된 毛狀根을 NN30 배지에서 振湯培養한 결과, 45배의 높은 生長率을 보였다. 이러한 生長 정도는 인삼에서 3배(Yoshikawa and Furuya, 1987), 당근(*Daucus carota*)에서 10배(Hwang et al, 1989), 근대와 *Nicotian rustica*에서 20배(Hamill et al, 1986), 그리고 까마중(*Solanum nigrum*)에서 52배(Yang et al, 1991) 등과 生長率을 비교해 볼때 strain A4에서 유도된 毛狀根을 배양했을때 26배, strain R1000에서 35배, strain 15834에 의해 유도된 毛狀根을 배양했을때 生長率의 45배로서 유의할 만한 生長 정도를 보여 주었다. 그러나, 유도된 生長率을 振湯培養에서 60일 이상 培養 했을때는 毛狀根의 callus화 하거나 괴사하는 경향을 보여 振湯培養에서는 50일 이내 배양이 적합하다고 사료된다.

sucrose 농도별에 따른 毛狀根의 生長率을 측정한 결과(Table 3-8), sucrose가 들어있지 않은 배지와 sucrose농도 1%일때에는 毛狀根이 生長하지 않았다. 이러한 결과는 도라지와 까마중의 毛狀根 배양에서 sucrose가 첨가되지 않은 배지에서는 毛狀根이 生長하지 않는다는 결과와 일치하였다(Kim et al, 1990; Yang et al, 1991). 이것은 광합성이 불가능한 뿌리 培養에서는 탄소원을 필요로 하기 때문에 탄소원의 부재에 의한 生長 억제인 것으로 사료된다(Bhojwani et al, 1983).

A. rhizogenes 15834, A4, R1000에 의해 유도된 毛狀根을 호르몬이 첨가된 배지에서 生長率을 비교했을 때, 모두 callus화 하거나, 生長이 이루어지지 않았다. 이는 당근의 경우와 인삼의 毛狀根 배양에서 외부 호르몬인 IBA와 kinetin를 첨가했을때 生長이 촉진된다는 결과와 일치하지 않았으나(Yoshikawa and Furuya, 1987; Hwang et al, 1989), 高(1989)가 인삼의 毛狀根은 호르몬이 없는 배지에서 잘 분지하며 生長한다는 것과 金 등(1990)의 도라지(*Platycodon grandiflorum* DC.)에서 호르몬이 첨가하지 않은 배지에서 生長이 양호하였으며, 본 연구에서 kinetin과 NAA를 첨가했을때 生長이 이루어지지 않았다는 결과와 일치하였다. 그리고 일반적으로 *A. rhizogenes*의

T-DNA에 의해 形質轉換된 조직은 T-DNA상의 auxin과 cytokinin 합성에 관여하는 효소 유전자의 발현으로 배지에 외부 호르몬이 공급없이도 生長을 지속할 수 있다는 사실(Knopp et al, 1988; Parr et al, 1988)과 일치하였다.

이렇듯 毛狀根 배양에 있어서 최적조건(배지成分, sucrose 濃度)의 확립이 毛狀根의 대량 增殖 및 유용한 物質을 安定的으로 얻는데 基礎資料가 되리라 思料된다.

각 strain에 의해 유도된 毛狀根의 tropane alkaloid 함량은 乾體量當 0.086%~0.628%였고, R1000으로 유도된 毛狀根에서 0.628%의 生産量을 보였다. 이것은 Hiroshi 등(1986)의 *A. rhizogenes* strain 15834를 처리했을때 atropine 함량의 건체량당 0.371%인데 반해 본 연구에서는 atropine 함량이 0.568%로 약간 높은 함량을 얻을 수 있었다. 그리고 scopolamine의 함량은 건체량당 0.060%로서 原植物體, 15834, A4 등에서는 극미량과 0.017%, 0.010%로 검출된데 반해 R1000에서는 많은 양의 scopolamine을 얻을 수가 있었다. scopolamine 함량은 strain R1000에서 0.060%로 callus와 cell line 배양에서 얻은 scopolamine 보다 약 60배나 많은 含量을 生産할 수가 있었다(Yasuyuki and Takashi, 1982). 그러나 이런 cell line을 이용하면 대량 生産에는 유용하지만 繼代培養을 계속할수록 生産성이 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 含量을 보인데 반해 약 2배 가량 차이를 보이며, Jung 등(1987)에서 scopolamine 含量이 0.07~0.09%인것과 근소한 차이를 보였다.

결과를 종합해 볼때, 각 strain에서 유도된 毛狀根의 生長率은 MS30 배지보다 NN30 배지에서 生長이 良好하였으며, 靜置培養보다는 振湯培養에서 生長率 이 양호하였다. sucrose 濃度별에 따른 生長率은 sucrose 濃度가 증가할수록 生長率도 증가하였는데, 특히 sucrose 濃度가 3%일때는 生長이 아주 良好하였다. 호르몬이 첨가된 배지(IBA 2mg/l, kinetin 0.1 mg/l)에서는 生長이 되지 않거나 callus化 하는 현상이 나타났으며, *A. rhizogenes* 15834, A4, R1000에서 유도된 毛狀根을 NN30 배지에서 40일 동안 振湯培

養하였을 때 배지 1ℓ당 113.5g, 65.25g, 87.75g의 생체량을 생산할 수 있는데 특히, strain 15834를 처리하여 유도된 毛狀根을 NN 30배지에서 배양했을 때 생체량 113.5g을 생산할 수 있었다. 그러나, 2차成分인 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 60배와 16배로서 높은 生産性을 얻을 수가 있었고, strain 15834와 A4의 tropane alkaloid 함량은 각각 0.121%와 0.086%로서 함량이 낮았다. 따라서, R1000에 의해 유도된 毛狀根이 tropane alkaloid 生産性이 높은 것으로 보아 完全한 植物體로 再生될 때까지 앞으로 더 研究가 必要하다고 사료된다.

摘 要

*Atropa belladonna*의 種子를 無菌의으로 發芽시킨 幼植物에 *Agrobacterium rhizogenes* 15834와 A4 및 R1000으로 Direct infection 法에 의해 毛狀根을 유도하고, 배지별, sucrose 농도별에 따른 培養 條件과

tropane alkaloid의 生産에 대하여 檢討하였다.

A. rhizogenes 15834와 A4 및 R1000을 처리하였을 때 毛狀根을 유도할 수 있었으며, 毛狀根 抽出物에서 agropine과 mannopine이 檢出되어 形質轉換을 확인할 수 있었다.

毛狀根의 生長率을 檢討한 結果, MS 배지보다는 NN 배지에서, sucrose 濃도가 3%일 때 가장 良好하였다. 또한, 호르몬(IBA 2, Kinetin 0.1mg/ℓ)이 첨가된 배지에서는 *A. rhizogenes* 15834, A4, R1000에서 모두 callus화하는 傾向을 보였으나 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서는 生長이 良好하여 *A. rhizogenes* 15834에 의해 유도된 毛狀根이 NN30 배지에서 45배의 生長率을 보여 1ℓ당 113.5g을 生産할 수 있었다.

毛狀根과 原植物體를 tropane alkaloid 抽出法에 의해 抽出하여 TLC로 확인할 수 있었으며, HPLC로 分析한 tropane alkaloid 生産은 각 strain에 의해 유도된 毛狀根의 種類에 따라 乾體量當 0.086%~0.628%를 얻을 수 있었고, R1000으로 유도된 毛狀根에서 atropine과 scopolamine 生産은 각각 0.568%와 0.060%로 높은 生産량을 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, 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, 金鐘源, 金昌玟, 陸昌洙, 成忠基, 都象學, 裴基煥, 申順姬, 林鍾鈞, 韓普燮, 1988. 生藥學. 東明社, 208.
- Hasimoto, T., 1987. Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids by the use of plant tissue culture. graduation thesis, 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, 山崎耕子, 淺山英, 岩櫻邦勇, 大橋廣好, 柏谷博之, 北川尚史, 小山鐵夫, 小山博茲, 田村道夫, 千原光雄, 椿 啓介, 光田重幸, 村田 源, 山崎 敬, 湯淺浩史, 1989. 世界 有用 植物 事典, 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.
- 鎌田 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 root의 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, 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.
- 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., 432-435.
- 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. Schilperoot 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.
- White, F. F. and E. W. Nester, 1980. Hairy 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, 趙弼衡. 1991. *Agrobacterium rhizogenes*를 이용한 까마중의 形質轉換과 毛狀根 培養. *Kor. J. Pharmacoh.*, 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.