

人蔘 Tumor Callus의 生長 特性

崔光泰·梁德春

韓國人蔘煙草研究所

(1987년 6월 11일 접수)

Characteristics of the Growth of Ginseng Tumor Callus

Kwang-Tae Choi and Deok-Chun Yang

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Science Town, Taejeon 300-31, Korea

(Received June 11, 1987)

Abstract

Crown-gall tumor was induced from the infection of *Panax ginseng* C.A. Meyer by *Agrobacterium tumefaciens* C58 and the tumor calli were formed on the phytohormone free MS medium. The calli were friable and rough in appearance. Calli obtained from crown gall tumor were similar to and indistinguishable from each other. The tumor callus was quite different from normal callus. Tumor callus grew rapidly, whereas normal callus appeared late. The growth of tumor callus was better in the dark than in the light. In suspension culture, the fresh weight of tumor callus was twice as much in comparison with normal callus.

서 론

최근 外部遺傳子의 運搬體로 이용하기 위하여 植物體에 crown gall tumor를 형성하는 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti-plasmid에 관한 연구가 많이 수행되고 있다. Crown gall tumor는 토양세균인 *A. tumefaciens*의 감염에 의해서 주로 쌍자엽식물에서 형성되는데 이들 조직내에는 세포의 생장을 촉진시키는 물질이 다량 함유되어 있으며⁵⁾, tumor조직에서 생성되는 phytohormone에 대한 연구가 많이 수행되고 있다¹⁰⁻¹²⁾. Crown gall tumor조직은 *in vitro* 培養時 추가로 외부에서 phytohormone을 첨가하지 않아도 정상 조직과는 달리 생장이 가능한데¹²⁾, 이는 *A. tumefaciens*에 들어있는 Ti-plasmid의 일부인 T-DNA가 식물세포의 핵속에 안정되게 삽입되어 形質전환이 일어나 phytohormone을 생산해내기 때문이다^{1,2,4)}.

T-DNA의 transcript는 8개로 보고되어 있고^{13,14)}, 이중에 5개의 loci가 tumor의 형성과 생장에 관여한다고 알려 졌으며⁸⁾, 최근에는 transposon 등을 사용하여 이들의 기능을 밝혀내 결국 phytohormone autonomy gene이 이 3개의 유전자로 이루어졌음을 보고하였고^{13,14)}, 이

들 遺傳子가 생성한 auxin과 cytokinin의 비율에 의해서 tumor의 형태가 달라짐을 보고하였다⁸⁾.

Crown gall tumor의 형태는 *Agrobacterium*의 strain과 접종위치, 그리고 접종식물에 따라 차이가 있으며, 특히 식물의 종류에 따라서 脫分化의 정도와 phytohormone에 대한 반응이 매우 달라지게 된다^{3,7,9,12)}.

본 실험은 人蔘遺傳工學用 運搬體 개발연구의 일환으로서, *A. tumefaciens* C58을 人蔘의 뿌리에 감염시켜 형성된 crown gall tumor의 exogenous phytohormone에 대한 반응과 tumor callus의 성장에 대한 光의 효과, 그리고 정상 callus와 tumor callus 間의 성장 pattern을 조사하였던 바, 얻어진 결과를 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 人蔘 crown gall tumor 誘起

2년생 人蔘의 뿌리에 상처를 내고 *Agrobacterium tumefaciens* C58을 감염시켜 유기시킨 crown gall tumor 조직을 phytohormone free Murashige and Skoog(MS) 개량배지⁶⁾에 접종하여 형성된 callus를 계속 동일한 배지에서 계대배양하여 증식시켰으며, 이들 callus를 본 실험의 재료로 사용하였다.

2. 人蔘 crown gall tumor callus 生長에 對한 phytohormone의 效果

形質轉換된 人蔘 crown gall tumor의 성장에 대한 phytohormone의 효과를 구명하기 위하여 MS개량배지에 IAA, 2,4-D 및 NAA를 각각 0, 1, 3, 5 mg/l씩, kinetin과 BA를 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/l씩을 각각 단독으로 첨가하여 25°C의 光狀態에서 30일간 배양하여 生體重을 측정하였으며, 추가로 cytokinin으로써 kinetin, 2iP, BA 및 zeatin을 0.5 mg/l의 농도로 고정하여 첨가한 후 배양하였다. 또한 2,4-D와 BA의 혼합처리 효과를 구명하기 위해 2,4-D를 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/l씩, 그리고 BA를 0, 0.5 mg/l를 組合처리하여 배양하였다.

3. 人蔘 tumor callus의 성장에 미치는 光의 영향

Tumor callus의 성장에 미치는 光의 영향을 구명하기 위하여 phytohormone free 배지에 tumor callus를 접종하여 日長을 16시간으로 하여 25°C의 배양실에서 배양하였고, 이들을 暗培養과 대비하였으며, 生體重을 측정하였다. 乾物重은 60°C의 dry oven에서 48시간 건조시킨 후 무게를 측정하였다.

4. 人蔘 tumor callus와 정상 callus의 성장속도 비교

Tumor callus와 정상 callus의 성장 pattern을 비교 조사하기 위하여 2,4-D 0, 3 mg/l와 BA 0.05 mg/l를 혼합첨가하여 光상태에서 30일간 배양하여 그 生體重을 측정하였다. 그리고 暗상태에서는 tumor callus는 phytohormone free 배지에서, 정상callus는 2,4-D 3 mg/l와 BA 0.5 mg/l 첨가배지에서 25°C의 배양실에서 40일간 고체배양하여 生體重과 乾物重을 측정하였으며, 현탁배양으로서는 동일배지에 agar만 삭제하여 callus inoculum 量을 1g씩 접종하여 100 rpm의 gyratory shaker에서 30일간 배양한 후 生體重과 乾物重을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 人蔘 crown gall tumor callus의 誘起 및 樣相

A. tumefaciens C58에 의하여 형성된 人蔘 crown gall tumor 조직은 phytohormone free 배지에서 脫分化率이 다른 식물에 비해 매우 저조하였는데⁷⁾, 잎과 줄기에서 형성된 crown gall tumor조직은 형태적으로 脫分化가 잘 될 것으로 생각되었으나 오히려 callus가 전혀 형성되지 않았고, 뿌리에서 형성된 tumor조직만이 매우 낮은 빈도로 callus를 형성하였다 (Fig. 1). 人蔘 tumor callus는 T-DNA의 phytohormone autonomy gene의 발현으로 形質轉換이 일어나 phytohormone free 배지에서 왕성히 성장하였는 바, 이는 다른 식물의 경우와 같은 경향을 보였다. 성장한 tumor callus의 형태를 보면 정상조직 callus와는 매우 다른 양상을 보였는데 부슬부슬하게 잘 깨어지는 friable한 형태이면서 그 덩어리는 매우 단단하였다 (Fig. 2). 반면에 정상 callus 조직은 phytohormone free 배지에서는 전혀 생장이 되지 않았

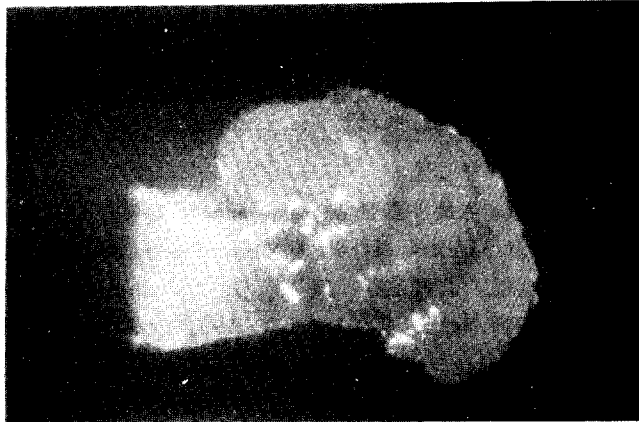


Fig. 1. Tumor callus induced from crown gall tumor formed in the root of *Panax ginseng* C.A. Meyer.

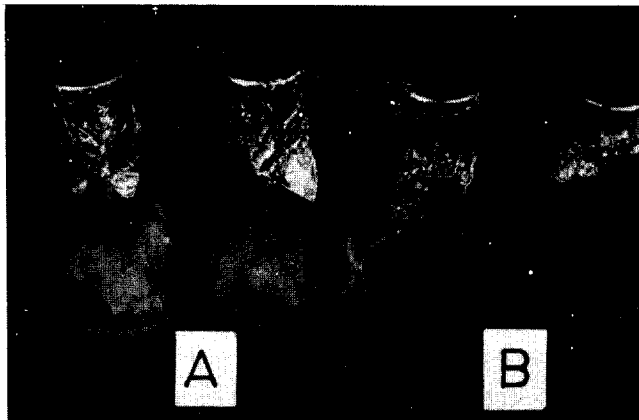


Fig. 2. Tumor(A) and normal(B) calli cultured on the phytohormone free media.

으며 시간이 경과할수록 senescence가 일어나 갈색을 띤 후 고사하였지만, 이들 callus를 2,4-D 3mg/l와 BA 0.5mg/l 첨가한 배지에서 배양하면 생장이 대단히 왕성하게 되며, 그 형태는 매우 부드러운 상태로 변하게 된다(Fig. 3).

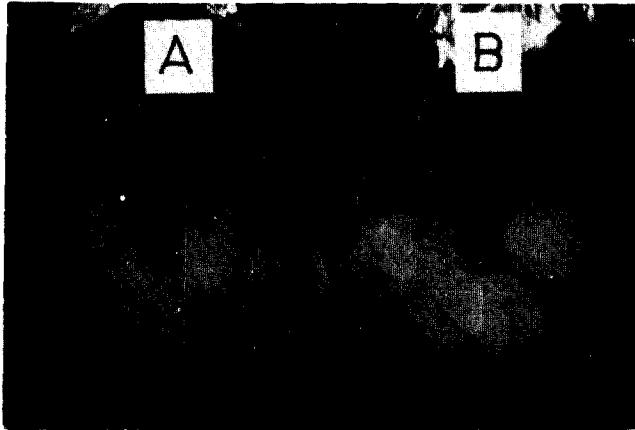


Fig. 3. Tumor callus(A) cultured on the medium without phytohormone and normal callus(B) cultured on the medium with 3mg/l 2,4-D and 5mg/l BA.

2. 人蔘 crown gall tumor callus 생장에 미치는 phytohormone의 영향

정상 인삼조직은 2,4-D에 매우 민감하여 callus 誘起나 생장이 잘 되지만, 줄기나 人蔘에 형성된 crown gall tumor조직은 phytohormone free 배지에서는 물론, 2,4-D 첨가배지에서도 거의 반응을 보이지 않고 脫分化가 되지 않았기 때문에⁷⁾ 뿌리에서 誘起된 tumor callus를 대상으로 각종 auxin에 대한 이들의 반응 정도를 구명하기 위해서 IAA, NAA, 2,4-D를 각각 농도별로 달리 처리하여 30일간 光상태에서 배양하여 그 生體重을 측정된 결과, auxin의 종류에 관계없이 모두 농도의 증가에 따라 성장량이 감소하는 경향을 보였으며, 오히려 phytohormone을 첨가하지 않은 배지에서 생육이 양호하였다(Fig. 4). 그리고 tumor callus의 생육에 미치는 cytokinin의 영향을 조사하기 위해서 BAP와 kinetin을 농도별로 처리하여 生體重을 측정된 결과, auxin과 마찬가지로 phytohormone free 배지에서 callus의 생육이 가장 왕성하였으며 cytokinin 첨가 배지에서는 생육이 억제되었다. 그러나 0.5mg/l 첨가구에서는 phytohormone free 배지보다는 生長량이 낮았으나, 다른 처리구에 비해서는 다소 생육이 높았으며, kinetin처리구가 BA보다 생육의 억제정도가 심한 경향을 보였다(Fig. 5). 그래서 농도를 0.5mg/l로 고정하고 cytokinin으로서 zeatin, 2iP, BA 및 kinetin을 각각 배지에 첨가하여 반응 정도를 관찰하였던 바, kinetin과 BA처리구는 처리하지 않은 區보다 callus 生長량이 훨씬 적은 반면에 zeatin처리구는 phytohormone free 배지보다 生長량이 높았다

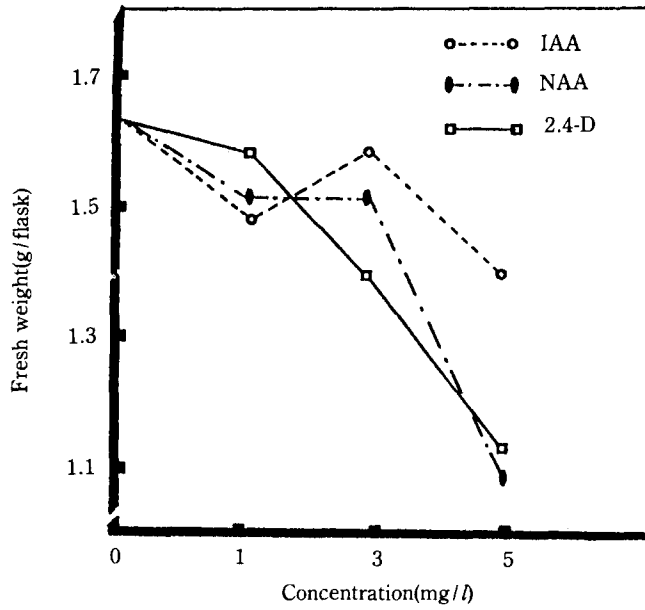


Fig. 4. The effect of auxins on the growth of ginseng tumor callus. Investigated 1 month after culture in the light.

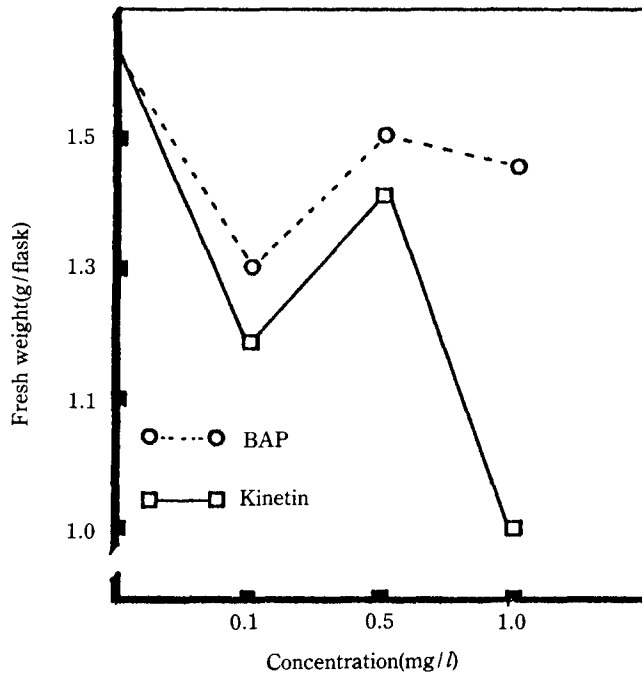


Fig. 5. The effect of cytokinins on the growth of ginseng tumor callus. Investigated 1 month after culture in the light.

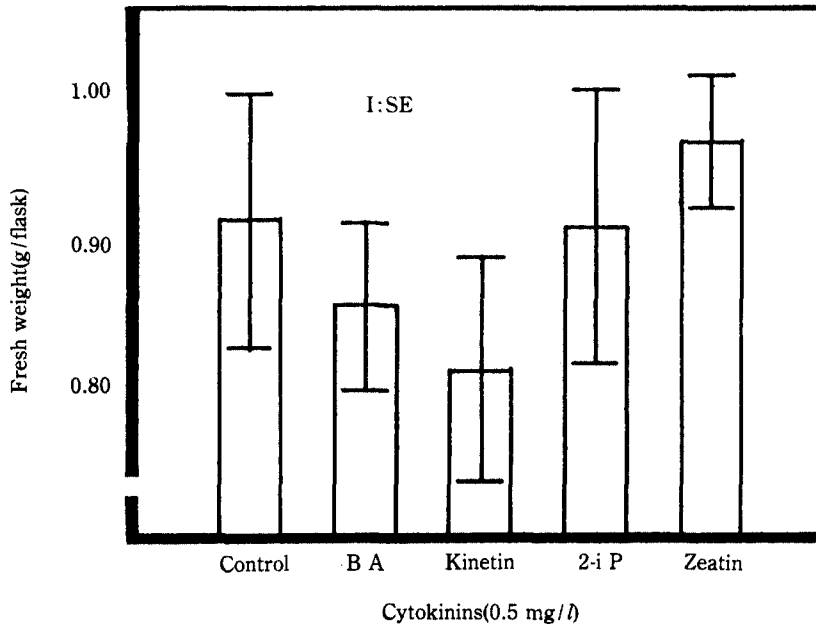


Fig. 6. The effect of cytokinins on the growth of ginseng tumor callus. Investigated 1 month after culture in the light.

(Fig. 6). 이와 같이 정상callus의 생육이 왕성한 2,4-D 농도에서 tumor callus는 오히려 생육이 억제되어, phytohormone이 전혀 첨가되지 않은 배지가 tumor callus의 생육에 최적조건이 되거나, 혹은 더 낮은 농도가 최적조건일 것으로 생각되어 우선 2,4-D의 농도를 낮추어 BA 0.5 mg/l와 단독 및 혼합처리하여 배양한 후 生體重을 측정 한 결과, 2,4-D 단독 처리가 BA와 혼합 처리한 것보다 양호하였으며, 농도별로 보면 2,4-D 농도 0.1 mg/l에서 tumor callus의 생장이 가장 양호하였다 (Table 1).

Crown gall tumor의 형태가 달라지거나 *in vitro* 배양시 phytohormone을 첨가하지 않은 배지에서도 성장할 수 있는 것은 T-DNA 내의 phytohormone autonomy gene이 발현되었기 때문이다^{1,3,10}. Phytohormone autonomy gene에는 tumor의 크기에 관여하는 tml, 뿌리의 형성에 관여하는 tmr, 그리고 shoot의 형성에 관여하는 tms loci가 있으며 이들은 5개의 transcript로 되어있다^{1,8}. Akiyoshi 등¹¹은 tmr locus(transcript 4)에 Tn5를 삽입시켜 inactivation시킨 후 phytohormone량을 조사해 본 결과 cytokinin량이 매우 감소되었고, tms(transcript 1과 2) locus에 삽입시켰을 때는 오히려 다량의 cytokinin이 형성된 반면에 auxin은 매우 감소되었고, *in vitro* 배양시 auxin 첨가에 의해서 생장이 가능함을 보고하였다. Tumor callus의 형태도 이런 common DNA의 발현에 의해서 조절되는데 crown gall tumor callus는 주로 cytokinin이 과잉생산되어 단단하고 치밀한 형태의 tumor callus가 형성된다^{6,8,9}. 그러나 crown gall tumor 조직의 형태는 이런 gene의 발현에 의해서 생성된 phytohormone만으로 결정되는 것이 아니고 자체 조직내에서 생성한 endogenous phytohormone과 combination되어 결정되므로 식물의 종류와 접종 부위에 따라 많은 차이가 있다. Kim 등⁹은 *A. tumefaciens* C58을 煙草에 감염시켜 誘起시킨 crown gall tumor callus는

Table 1. Effects of 2,4-D and BA on the growth of ginseng tumor callus

Concentration(mg/l)		Fresh weight* of callus(g/flask)
2,4-D	BA	
0	0	0.910 ± 0.083
0.001	0	0.899 ± 0.069
0.005	0	0.967 ± 0.080
0.01	0	1.023 ± 0.104
0.05	0	0.965 ± 0.093
0.1	0	1.319 ± 0.106
0.5	0	1.279 ± 0.122
0	0.5	0.852 ± 0.055
0.001	0.5	0.822 ± 0.083
0.005	0.5	0.871 ± 0.069
0.01	0.5	0.818 ± 0.076
0.05	0.5	0.902 ± 0.083
0.1	0.5	0.995 ± 0.094
0.5	0.5	1.131 ± 0.086

Investigated 1 month after culture in the light.

exogenous phytohormone 첨가시 callus 증식이 오히려 잘 되었음을 보고하였고, Choi 등⁶⁾도 토양중에서 선발한 *A. tumefaciens*의 접종에 의해서 형성된 煙草 crown gall tumor callus도 소량의 phytohormone 첨가에 의해서 callus증식이 양호한 것으로 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 煙草와 반대로 auxin이건, cytokinin이건 exogenous phytohormone 첨가에 의해서 callus증식량이 현저히 감소되었는 바, 이러한 현상이 人蔘 tumor callus만이 가지는 특성인지, 혹은 다른 요인 때문인지 이에 관해서는 금후 계속해서 연구검토 되어야 할 것으로 사료된다.

3. 人蔘 tumor callus의 生長에 미치는 光의 영향

人蔘正常 callus의 生長은 暗배양이 光배양보다 양호한 경향이지만, tumor callus의 경우에

Table 2. Effects of light and dark on the growth of ginseng tumor callus

Condition	Weight(g)	Days after culture				Total
		15	30	45	60	
Light*	Fresh(F)	0.314	0.831	1.907	3.792	6.844
	Dry(D)	0.019	0.056	0.109	0.197	0.381
	D/F	0.061	0.067	0.057	0.052	0.056
Dark**	Fresh(F)	0.823	2.67	5.153	7.596	16.179
	Dry(D)	0.047	0.133	0.232	0.319	0.731
	D/F	0.057	0.051	0.045	0.042	0.045

*Light: Day-length(16 hrs.).

**Dark: Continuous dark.

는 어떤 차이가 있는가를 보기 위하여 tumor callus를 60일간 배양하여 15일 간격으로 生體重과 乾物重을 측정된 결과를 보면, 光배양에 비해 暗배양이 生體重은 2.4배 乾物重은 1.9배 더 증가하였고, 생체중에 대한 乾物重 比는 光상태가 0.056, 暗상태가 0.045로서 光상태가 暗상태보다 높은 경향이였다(Table 2). 또한 시기별로 보면 배양 30일 후에는 光상태에 비해 暗상태가 生體重이 높았으며 배양시간이 경과할수록 그 비율은 낮아지는 경향을 보였다. Tumor callus의 형태를 보면, 배양한 callus는 둥글둥글한 덩어리 형태로 다소 녹색을 띄고 있었으나, 暗배양한 callus는 큰 덩어리들이 뭉쳐있는 형태이었으며 미색을 띄고 있었다(Fig. 7).

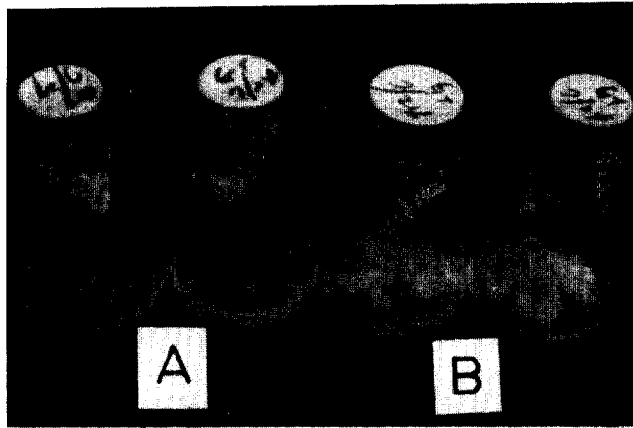


Fig. 7. Tumor calli cultured on the phytohormone free media in the light(A) and dark(B).

4. 人蔘 tumor callus와 normal callus의 생장 비교

Tumor callus는 phytohormone free 배지에서 생육이 왕성하므로 이들 callus와 최적조건에서 배양된 정상 callus의 생육 상태의 차이를 구명하기 위하여 tumor callus를 phytohormone이 전혀 첨가되지 않은 배지에서, 그리고 정상 callus를 2,4-D 3 mg/l와 BA 0.5 mg/l를 단독, 혹은 혼합 처리한 배지에서 暗상태에서 고체배양하여 40일 후에 生體重과 乾物重을 측정하였던 바, phytohormone이 전혀 첨가되지 않은 배지에서 자란 tumor callus와 최적조건의 배지에서 자란 정상 callus의 生體重은 비슷한 경향을 보였으나 乾物重은 tumor callus가 오히려 더 높은 경향을 보였다(Table 3). 그러나 tumor callus를

Table 3. Fresh and dry weights of ginseng tumor and normal calli cultured on solid medium for 40 days in the dark

Callus	Medium	Weight per flask(g)		
		Fresh(F)	Dry(D)	D/F
Tumor callus	Phytohormone free	6.063	0.255	0.042
	MS medium	±0.257		
Normal callus	MS medium with 3mg/l	5.903	0.201	0.034
	2,4-D and 0.5mg/l BA	±0.313		

secondary metabolite의 이용에 사용한다는 측면에서 inoculum으로 사용 가능성을 타진하기 위해 tumor callus와 정상 callus를 각각 1g씩 동일하게 현탁 배양하여 30일 후에 生長량을 조사한 결과, tumor callus가 phytohormone free 배지에서 자랐음에도 불구하고 최적조건에서 자란 정상 callus보다 生長량은 2배 이상 많았으며, 乾物重은 3.5배로써 대단히 희망적인 결과를 보였다(Table 4).

Table 4. Fresh and dry weight of ginseng tumor and normal calli grown by suspension culture for 30 days

	Fresh weight (F) of callus(g/flask)	Dry weight(D) of callus(g/flask)	D/F
Tumor callus(T)*	4.887	0.337	0.069
Normal callus(N)**	2.185	0.096	0.044
T/N	2.237	3.510	1.568

*Tumor callus was cultured on phytohormone free MS medium.

**Normal callus was cultured on MS medium with 3mg/l.

이상의 결과들은 tumor callus를 人蔘의 secondary metabolite를 대량 생산하는데 이용할 수 있다는 가능성을 충분히 내포하고 있으며, 더욱 더 명백히 구명하기 위하여 이들에 관한 광범위한 연구가 필히 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

人蔘 crown gall tumor callus의 특성을 구명하기 위하여 *Agrobacterium tumefaciens* C58을 감염시켜서 얻어진 crown gall tumor를 phytohormone 無添加 배지에서 배양하여 생육이 왕성한 tumor callus를 유지하였다. 이들 tumor callus는 정상조직에서 유기한 callus에 비해 외관상으로는 friable한 형태의 덩어리로 자라면서도 매우 단단한 양상을 보였으며, callus층식에 적합한 phytohormone 농도에서는 tumor callus의 생육이 오히려 억제되는 현상을 보였다. Tumor callus의 생육은 고체배양시, 暗배양이 光배양보다 生體重의 경우에는 2.4배, 乾物重은 1.9배 가량이 더 많으며, 2,4-D가 함유된 최적조건에서 배양한 정상 callus의 生體重과는 비슷한 경향을 보였으나, 건물중은 tumor callus가 더 높았다. 그리고 현탁배양 시에는 tumor callus가 정상 callus보다 生長속도가 2배 이상 빠른 경향이였다.

인용문헌

1. Akiyoshi, D.E., Morris, R.O., Hinz, R., Mischke, B.S., Kosuge, T., Garfinkel, D.J., Gordon, M.P. and Nester, E.W.: *Proc. N.A.S.* 80, 407 (1983).
2. Akiyoshi, D.E., Klee, H., Amasino, R.M., Nester, E.W. and Gordon, M.P.: *Proc. N.A.S.* 81, 5994 (1984).
3. Amasino, R.M. and Miller, C.O.: *Plant Physiol.* 69, 389 (1982).
4. Binns, A.N.: *Planta* 158, 272 (1983).
5. Braun, A.C. and Naf, U.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86, 212 (1954).
6. Choi, K.T., Yang, D.C., Baik, H.S., Park, S.W. and Lee, C.H.: *Kor. J. Breed.* 17(4), 348 (1985).

7. Choi, K.T. and Yang, D.C.: *Kor. J. of Gin. Sci.* **10(1)**, 45 (1986).
8. Inze, D., Follin, A., Lijsebettens, M.V., Simoens, C., Genetello, C., Montagu, M.V. and Schell, J.: *Mol. Gen. Genet.* **194**, 265 (1984).
9. Kim, S.K. and Woo, J.C.: *Kor. J. Genet.* **6**, 45 (1984).
10. Liu, S.T., Perry, K.L., Schardl, C.L. and Kado, C.I.: *Proc. N.A.S.* **79**, 2812 (1982).
11. Schroder, G., Waffenschmidt, S., Weiler, E.W. and Schroder, J.: *Eur. J. Bio. Chem.* **138**, 387 (1984).
12. Weiler, E.W. and Spanier, K.: *Planta* **153**, 326 (1981).
13. Willmitzer, D.J., Simpson, R.B., Ream, L.W., White, F.F., Gordon, M.P. and Nester, E.W.: *Cell* **27**, 143 (1981).
14. Willmitzer, D.J., Simons, G. and Schell, J.: *EMBO J.* **1**, 139 (1982).