

Agrobacterium rhizogenes에 의한 현사시나무의 形質轉換¹

鄭慶鎬² · 朴龍求³ · 盧義來⁴ · 全瑛宇²

Transformation of Populus alba x P. glandulosa by Agrobacterium rhizogenes¹

Kyung Ho Chung², Young Goo Park³, Eui Rae Noh⁴, and Young Woo Chun²

要 約

主要 造林樹種의 하나인 현사시나무를 *Agrobacterium rhizogenes*의 agropine 系統인 A4를 利用하여 遺傳的으로 形質轉換시켰다. 形質轉換 여부는 組織내의 opine(agropine) 존재를 分析하여 確認하였다. 形質轉換으로 얻어진 hairy root는 1/4MS+sucrose 30g/L에서 가장 좋은 生長을 보였으며, 植物體 再分化는 BAP 0.5mg/l를 첨가한 MS培地에 培養하였을때 가장 좋은 結果를 얻었다. 再分化된 植物體는 뿌리가 많고 形態의으로 變形되어 正상의 植物과 區別할 수 있었다. 部分的으로 뿌리部分만 形質轉換 시킴으로써 보다 많은 뿌리를 가진 個體로 만들 수 있었고 이는 林木의 地下部 形質改良에 有利한 것으로 나타났다.

ABSTRACT

The widely cultivated hybrid poplar *Populus alba* x *P. glandulosa* in Korea was transformed with *Agrobacterium rhizogenes* agropine type strain A4. Genetic transformation was confirmed by the presence of agropine. Alteration in growth rate of hairy roots was seen following changes in the dilution rate of medium and concentration of sucrose, suggesting that improved growth might be achieved by more precise manipulation of the nutrient medium. Plant regeneration occurred from transformed hairy roots on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP. Transformed plantlets grown *in vitro* exhibited a more developed root system characterized by fast growth behavior in comparison to normal plantlets. This work demonstrates that the root transformation would be useful in improving plantlet establishment and growth through the effective root system.

Key words : *Populus alba* x *P. glandulosa*, *Agrobacterium rhizogenes*, transformed plantlets, root system

緒 論

雙子葉 植物에 廣範圍한 感染性을 나타내는 土壤細菌인 *Agrobacterium tumefaciens*와 *A. rhizogenes*^{1,6)}는 主로 植物의 傷處部位를 通하여

침입한 후, 菌이 가진 大形의 tumor inducing (Ti) plasmid 혹은 root inducing (Ri) plasmid의 一部(T-DNA)를 植物의 genome 내부로 轉移 시킴으로써 形質轉換된 組織인 tumor나 hairy root를 生産한다.^{2,4,5,6,11,25,31,32,33)}

이러한 外來의 遺傳子를 植物體로 轉換시키는

¹ 接受 1989年 9月 4日 Recieved on September 4, 1989.

² 國民大學校 林業大學 Department of Forestry, College of Forestry, Kookmin Univ., Korea.

³ 慶北大學校 農科大學 College of Agri., Kyungpook Nat'l. Univ., Daegu, Korea.

⁴ 林木育種 研究所 Institute of Forest Genetics, Suwon, Korea.

方法에서 *A. rhizogenes*가 *A. tumefaciens*보다 유리한 점은 形質轉換된 hairy root 組織이 完全한 T-DNA를 가지면서도 植物體로 再分化가 可能하고^{1,3,7,19,24,26,30)} 部分的(地下部)으로 形質轉換함으로써 植物의 뿌리구조의 改良에 利用할수 있다는 것이다.²⁷⁾ 더구나 最近에는 Riplasmid T-DNA에 의하여 얻어진 hairy root 組織을 有用二次產物 生産方法으로 應用이 可能한것으로 밝혀져 많은 관심을 가지게 되었다.^{8,10,13,23)}

本 研究에서는 우리나라에 상당한 造林面積을 가지고 있으며¹⁹⁾ 生物工學的으로 主要한 資料가 되어왔던^{14,15,16,21)} 현사시나무에 agropine type strain인 *A. rhizogenes* A4 strain을 접종하여 形質轉換 可能性을 調査하고, 形質轉換된 hairy root의 生長條件과 植物體로 再分化 시킬수 있는지를 實驗함과 同時에 部分的으로 地下部만 形質轉換시켜 뿌리改良에 利用할수 있는지에 對한 可能性을 調査하는데 目的을 두었다.

材料 및 方法

1. 현사시 材料의 器內插木苗 培養

현사시 材料는 一年生 插木苗의 줄기를 一月에 採取하여 30cm 길이로 잘라 물통에 꽂은후 25°C 室內에서 腋芽를 發育시켰다. 5~10cm 길이로 자란 腋芽를 잘라 잎을 除去하고 tween 20을 2~3 방울 加하여 흐르는 물에 洗滌했다. 70% Ethyl alcohol로 1分, 0.2% HgCl₂에서 一分間 消毒하고 三回以上 滅菌水로 씻었다.

마디部分이 1個씩 包含되게 1cm 길이로 잘라 MS(Murashige and Skoog)¹⁷⁾+ BAP(benzylamino purine) 0.2mg/l培地에 넣었다. 4週마다 繼代培養하고 試料로 使用할것은 4週間 1/2 MS+IBA(indole-3-butyric acid) 0.2mg/l培地에서 發根시킨다음 使用했다.

2. *Agrobacterium rhizogenes* 培養 및 接種

*A. rhizogenes*는 agropine type strain인 A4²⁴⁾를 利用했고, Yeast extract mannitol 培地³¹⁾에서 48時間 培養하여 形成된 colony 위에, 현사시 試料의 잎과 葉柄 그리고 줄기를 따로하여 無菌狀

態에서 傷處를 주고 置上했다. 暗條件에서 2時間 培養한後 菌이 묻은 狀態로 MS基本培地로 옮겨 24時間 培養한후 2回以上 滅菌水로 洗滌하고 1/2 MS+cefotaxime 500mg/l 培地에서 뿌리가 形成될때까지 培養하였다. 그후 뿌리가 形成된 것은 같은 培地로 옮겨 菌이 完全히 無어지면 MS基本培地로 옮겨서 培養하였다.

3. Hairy root의 液體 培養

MS基本培地 上에서 生長을 繼續하여 形態的으로 形質轉換이 確認된 hairy root 150±5mg을 分離하여 100ml 三角flask에 30ml液體培地를 넣고 培養했다. 培地는 MS, 1/2MS, 1/4MS를 使用하고 sucrose 濃度를 0, 5, 10, 20, 30, 50g/l로 하여 5反復으로 했다. 26°C의 暗狀態에서 100rpm으로 回轉하는 shaking incubator를 利用했으며 二週마다 培地를 交換하고 8週後에 生重量을 調査했다.

4. Hairy root에서 植物體의 再分化

液體培地에서 4週間 자란 hairy root를 濃度別로 BAP가 添加된 MS 培地에서 줄기分化를 試圖했다. 再分化된 줄기는 生長調節物質이 添加되지 않은 MS 基本培地에서 發根시켜 계속 生長시켰다.

5. 뿌리部分 形質轉換體의 生産 및 活着

腋芽가 包含된 줄기의 基部에 傷處를 加하고 *A. rhizogenes*를 接種시켜 腋芽와 hairy root를 同時에 發育하게 함으로 地下部만 形質轉換된 苗木을 生産했다. 正常的으로 試驗管에서 生産된 苗木과 함께 各各 20本씩 pot에 심고 5週까지 生長과 活着을 比較했다.

6. Opine 分析

Hairy root와 再分化된 植物體가 遺傳的으로 形質轉換 되었는지를 確認하기 위하여 Petit²⁴⁾의 方法으로 opine(agropine) 分析을 實施하였다.

結果 및 考察

1. Hairy root의 生産



Fig. 1. a,b,c. Hairy roots induced by *A. rhizogenes* A4 on stems and leaves of aseptically grown plantlet of *P. alba* X *P. glandulosa*.

a : 6 days after infection on stem

b : 2 weeks after infection on leaf

c : 2 weeks after infection on stem

*A. rhizogenes*를 接種시킨 試料는 抗生劑 (cefotaxime 500mg/l)만 添加된 MS培地에서 5~7日이 經過하면서 뿌리가 發生되기 始作했다 (그림 1 a,b). *A. rhizogenes*가 현사시에서 反應하는 時間은 *A. tumefaciens*¹⁶⁾와 비슷하며, 당근이나 담배, oilseed와 같은 草本類에서 보다 다소 빠른 反應을 보였다.^{-0,33)}

發生한 뿌리는 生長이 빠르고 三日이 經過하면 곁뿌리 發生이 많아서 正常의 器內에서 發生한 뿌리와 形態의 差이를 나타냈다(그림 1c). 이미 다른 植物에서 報告된 바와같이 현사시에서 유도한 hairy root도 正常植物에서 必須의 添加物만 生育이 可能的한 生長調節物質의 添加와 無關하게 生長했으며^{12,19)}, hairy root의 發生部位

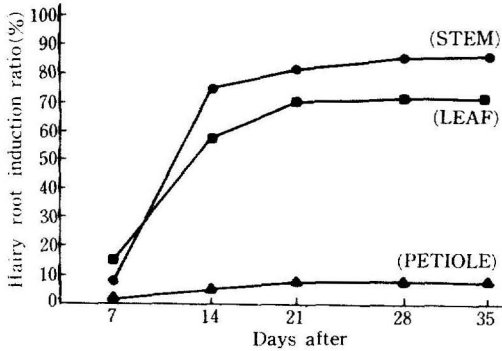


Fig. 2. Hairy root induction ratio on the leaf, petiole and stem

도 人爲的으로 傷處를 加한 處로 한정되어 다른 植物의 경우와 같았다.¹⁹⁾

잎, 葉柄 그리고 줄기에서 時間이 지나면서 뿌리가 發生되는 비율은 그림2에 나타난 곡선과 같다.

줄기에서는 5週後에 85% 以上の 높은 發生率을 나타낸 反面 葉柄에서는 10% 以下로 낮았다. 잎은 接種後 5日부터 發生하기 始作해 줄기나 葉柄에 比하여 1~2日 빠르며 5週後 65% 정도의 발생율을 보였다. 植物에서 *A. rhizogenes*를 利用하여 形質轉換된 hairy root를 얻기 爲해 줄기나 잎을 이용한 경우가 많았고^{12,19)} 本 實驗에서도 葉柄 組織보다 줄기나 잎이 유리한 것으로 나타났다.

2. Hairy root의 液體培地에서 生長

培地의 濃度와 sucrose量을 다르게 처리한 液體培地에서 hairy root를 培養했을때 8週後 生長量 變化는 그림3과 같다. MS培地를 1/4로 稀釋했을때 MS나 1/2MS 培地보다 比較的 生長이 좋았고, 이는 현사시에서 유래된 hairy root 組織이 生長하는데는 高濃度의 培地가 必須的이 아닌것으로 추측할수 있었다. Hamill 等이¹⁰⁾ *Catharanth-*

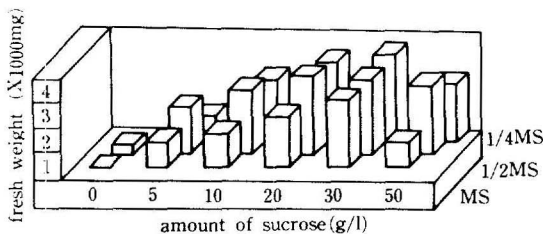


Fig. 3. Effect of medium dilution ratio and sucrose concentration on growth

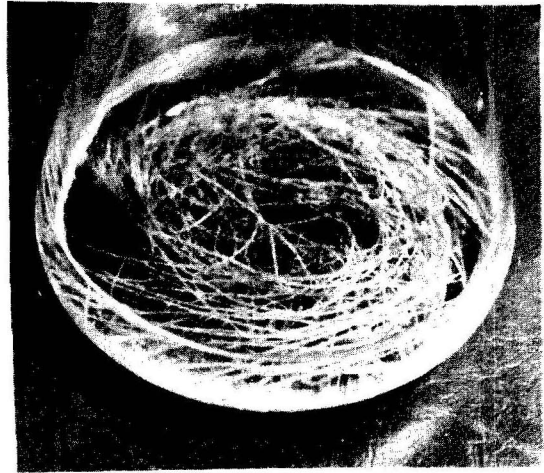


Fig. 4. Growth of hairy root in liquid hormone-free 1/4MS medium(2 weeks after).

*us roseus*에서 유래한 hairy root를 液體培地에서 培養했을때도 B5培地를 1/2로 稀釋하여 좋은 結果를 얻은바 있다. 그러나 보다 安定的이고 지속적인 hairy root의 生長에 關여하는 特定의 培地成分을 糾明하기 爲하여 보다 많은 研究가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

Sucrose量에 따른 生長의 變化에서는 20~30g/l가 좋은 生長을 보였고 50g/l에서는 各培地에서 共히 生長의 감소를 나타냈다.

3. Hairy root로부터 植物體의 再分化

Hairy root를 BAP가 濃度別로 添加된 MS培地에 培養했을때 生長을 계속하거나 callus를 형성하는 경우가 많았고, BAP가 0.5mg/l 添加된 배지에서 explant 10個中 2個의 줄기가 再分化 되었다(그림5).

再分化된 줄기를 MS 基本培地로 옮겼을때도 生長은 繼續했고 形態의 變換된것을 볼수 있었다(그림6). *A. rhizogenes*의 Ri plasmid에 의하여 形質轉換된 組織으로 부터 얻은 植物體의 形態의 變이는 他 植物에서 報告된바 있는데 特히 Tepfer²⁷⁾의 報告에 의하면 잎에 주름이 심하게 생기고 頂芽優勢現象이 줄어들어 줄기와 잎의 형태적 變이를 보였다. 또한 形質轉換된 植物體에서 유리한 형질체 의 선발 可能性을 제시한바 있어 *populus*를 包含한 林木에서도 形질개량 연구에의 응용이 必要할 것으로 사료된다.



Fig. 5. Shoot regeneration from transformed hairy root on MS with 0.5mg/l BAP medium



Fig. 6. Further growth of shoots from hairy roots on hormone-free MS agar medium

또한 *A. tumefaciens* Ti-plasmid의 경우 거의不可能한 것으로 알려진 植物體 再分化가 Ri plasmid의 경우 가능한 것으로 알려져 있으므로 *A. rhizogenes*를 이용한 林木의 遺傳子轉換 研究도 필요한 과제라 할수 있다.

4. 뿌리部分 形質轉換體의 生産 및 活着

腋芽와 hairy root를 同時에 發達시킨 경우 MS 基本培地에 生長調節物質을 添加하지 않고도 좋은 뿌리와 줄기가 生長狀態를 보였다(그림7). 10日間培地에서 자라서 뿌리와 줄기의 發育이 確實한 것

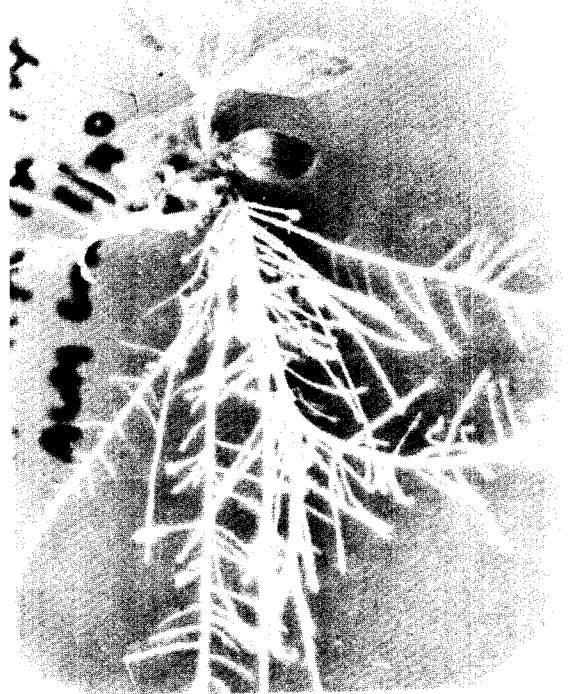


Fig. 7. Morphological characteristics of plantlet derived from partly transformation on hormone-free MS agar medium(2 weeks after).

들을 pot로 옮겨 馴化시켜 生産된 苗는 *A. rhizogenes*를 接種하지 않은 것보다 活着과 生長이 빠른것으로 나타났다(그림8, 9).

*A. rhizogenes*를 利用하여 根系의 形質轉換을 시도하므로서 有利한 뿌리구조를 얻게되어 生長과 biomass生産量 그리고 各種의 나쁜 환경에 耐性을 가지는 林木으로 개량이 可能하다는 것은 Torrey³⁰⁾가 제시한바 있고, 실제적으로 Tepfer²⁹⁾는 *Agrobacterium rhizogenes*의 plasmid를 利用하여 植物의 活着과 生長에 有利한 遺傳子를 植物體內로 導入 시킬수 있다고 주장했으며, 사과나무 같은 林木의 발근과 활착에 효과가 있음을 보고한 바 있다.

比較的 利用의 範圍가 넓은 *Populus*種의 適地를 넓힌다는 意圖에서, 보다많은 量의 뿌리구조를 가진 個體를 育成하기위해 많은 研究가 必要한 部分으로 사료된다.



Fig. 8. Potted up and grown in greenhouse for additional three weeks (partly root transformed plantlet (a) and untransformed normal plantlet (b)).

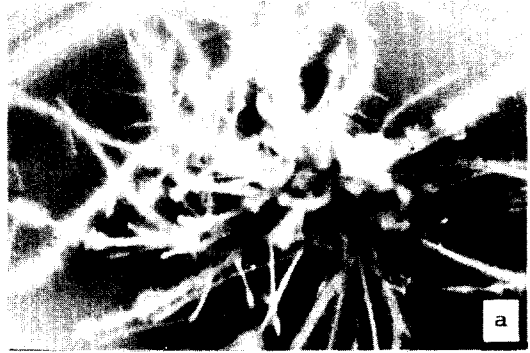


Fig. 10. Morphological comparison between transformed hairy root(a) and untransformed normal root(b) on hormone-free MS agar medium(2 weeks after).

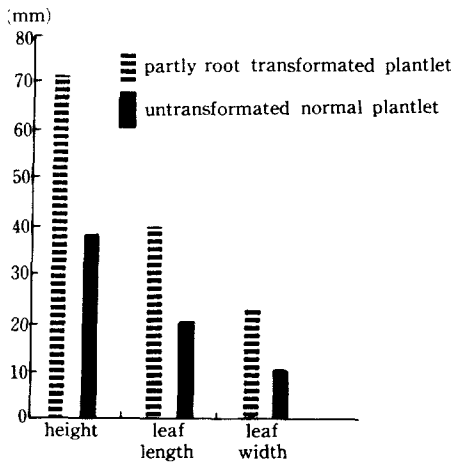


Fig. 9. Growth of 5-week-old shoots introduced from root transformation and normal in vitro propagation

5. opine 分析

A. rhizogenes를 현사시에 接種하여 얻은 hairy root는 MS 基本培地上에서 계속 좋은 生長을 보이는 反面, 正常的 뿌리에서는 根明芽가 發生되어

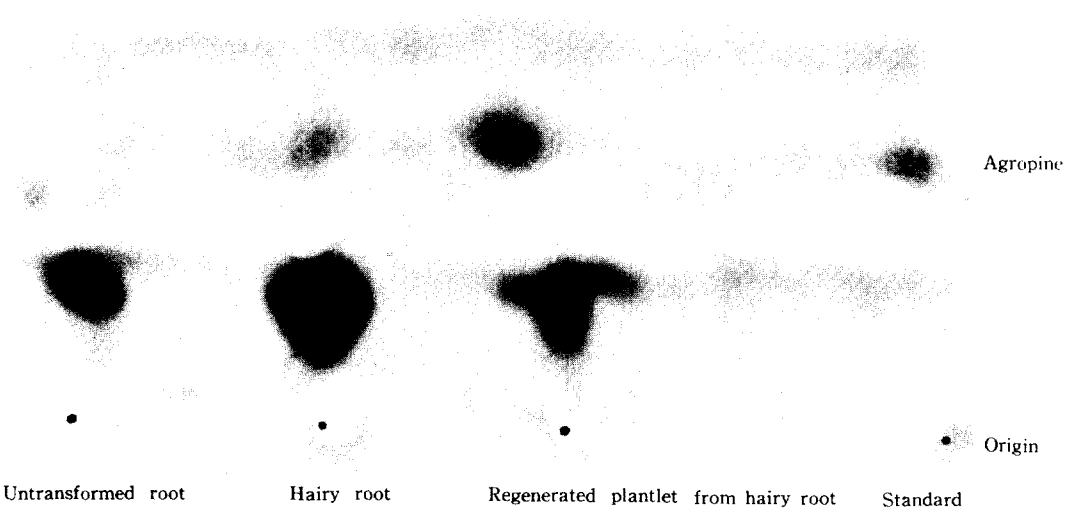


Fig. 11. Detection of opine(agropine) in hairy root and regenerated plantlet.

一次的으로 形質轉換의 形態區分이 可能했다(그림 10).

Paper electrophoresis 方法으로 opine을 검정했을때 *A. rhizogenes*에 의하여 生産된 hairy root 組織과 再分化된 植物體 組織에서만 agropine 物質이 검출되었고 正常組織에서는 나타나지 않았다(그림 11).

이로서 *A. rhizogenes* A4 strain을 현사시에 접종하여 形質轉換된 조직을 얻는 것이 可能하고, 또한 opine 物質은 再分化된 植物體에도 계속 유지됨을 알수 있었다.

結 論

우리나라의 主要造林樹種中 하나이며 生長이 優秀한 交雜 poplar인 현사시나무에 土壤細菌인 *Agrobacterium rhizogenes*의 Agropine type strain A4를 接種시켜 Ri-plasmid의 T-DNA를 식물체 내부로 轉移시키는데 成功했다. Hairy root 生産은 Cefotaxime 500mg/l을 添加한 MS 基本培地에서 5~6日 經過한때 부터 始作되어 2週에 가장많은 生産率을 보였다. Hairy root를 液體培地에 培養했을때 1/4로 희석한 MS培地에 30 g/l의 sucrose를 加한 培地가 가장좋은 生體生長率을 보였다. MS+BAP 0.5mg/l에서 hairy root는 1~2個의 植物體를 再分化했고, 再分化된 植物體는 形態의으로 變形되었으며 生長이 優秀했다. 根系形質轉換體는 正常的으로 組織培養方法으로 生産한 個體보다 活着과 生長이 좋았다. 本 研究에 연계한 研究가 계속되어 hairy root 利用方法이 모색점으로 理木의 生産性에 상당部分 效果가 있을 것으로 기대된다.

引 用 文 獻

1. Ackermann, C. 1977. Pflanzen aus *Agrobacterium rhizogenes* tumoren an *Nicotiana tabacum*. Plant Sci. Lett. 8 : 23-30.
2. Byrne, M.C., J.Koplow, J. Tempe and M. D. Chilton. 1983. Structure of T-DNA in roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. J. Mol. Appl. Genet. 2 : 201-209.
3. Chilton, M.D., D.A. Tepfer, A. Petit, F. Delvart and J. Tempe. 1982. *A. rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cell. Nature 295 : 432-434.
4. Chun, Y.W., N.B. Klopfenstein, H.S. McNabb Jr. and B. Hall. 1988. Transformation of *Populus* species by an *Agrobacterium* binary vector system. J. Kor. For. Soc. 77 : 199-207.
5. Chun, Y.W., N.B. Klopfenstein and R.B. Hall. 1988. Biotechnological application in *Populus* species. J. Kor. For. Soc. 77 : 467-483.
6. Costantino, P., L. Spano, E. Benvento and G. Ancora. 1984. The T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* is transmitted through meiosis to the progeny of hairy root plants. J. Mol. Appl. Genet. 2 : 465-470.
7. David, C. M.D. Chilton and J. Tempe. 1984. Conservation of T-DNA in plant regenerated from hairy root cultures. Bio/Technology 2 : 73-76.
8. Flores, H.E. and P. Filner. 1985. Metabolic relationship of Putrescine, GIBA and Alkaloid in cell and root cultures of Solanaceae. Pages 174-185 in K.H. Neumann, W. Barz, and E. Reinhard(eds.). Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Culture. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
9. Hall, R.B., G.B. Hilton and C.A. Maynard. 1982. Construction lumber from Hybrid aspen Plantation in the Centural States. J. of For. 80 : 291-294.
10. Hamill, J.D., A.J. Parr, M.J.C. Rodest, R.J. Robist and N.J. Walton. 1987. New routes to plant secondary product. Bio/Technology. 5 : 800-804.
11. Hernalsteens, J.P., F. van Vliet, M. De beuckeller, g. Engler, M. Holsters, M. van Montagu and J.Schell. 1980. The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. Nature. 287 : 654-659.
12. Hooykaas, P.J.J. and R.A. Schilperoort. 1983. The molecular genetics of crown-gall tumorigenesis. Adv. Genet. 22 : 209-283.

13. Kamada, H., N.O. Kamura, M. Satake, H. Harada and K. Shimomura. 1986. Alkaloid production by hairy root culture in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep.* 5 : 239-242.
14. Kim, J.H., S.K. Lee, Y.W. Chun. 1981. Mass propagation of tree species through in vitro culture. I. Bud culture of *Populus alba* × *P. glandulosa* F1. *Inst. For. Gen. Res. Rep.* 17 : 57-63.
15. Kim, J.H., H.K. Moon and J.I. Park. 1986. Plantlet regeneration on callus derive from internodal tissue of *Populus alba* × *P. glandulosa*. *Inst. For. Gen. Res. Rep.* 22 : 116-121.
16. Lee, B.S. 1989. A study on gene transformation of *Populus alba*, *P. glandulosa*, *P. alba* × *P. glandulosa* by *Agrobacterium tumefaciens*. M.S. thesis, Univ. of Seoul, Korea.
17. Murashige, T. and Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-479.
18. Noh, E.R., S.K. Hyun, J.M. Jo, R.M. Cho, S.K. Lee, J.K. Ann and J.J. Kim. 1984. Activities related to poplar breeding, cultivation, exploitation and utilization (1980-1984). *Inst. For. Gen. Res. Rep.* 20 : 10-45.
19. Ooms, G., A. Karp, M.M. Burrell, D. Twell and J. Roberts. 1985a. Genetic modification of potato development using Ri T-DNA. *Theor. App. Gen.* 70 : 440-446.
20. Ooms, G., A. Karp, M.M. Burrell, D. Twell and E. Wilcox. 1985b. Genetic manipulation in cultivars oilseed rape (*Brassia napus*) using *Agrobacterium*. *Theor. Appl. Gen.* 71 : 325-329.
21. Park, Y.G. and K.H. Han. 1986. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from in vitro cultured *Populus alba* × *P. glandulosa*. *J. Kor For Soc.* 73 : 33-42.
22. Parsons, T.J., V.P. Sinkar, R.F. Stettler, E.W. Nester and M.P. Gordon. 1986. Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. *Bio/Tecnology* 4 : 533-536.
23. Parr, A.J., A.C.J. Peerless, J.D. Hamill, N.J. Walton, R.J. Robins, M.J.C. Rhodes. 1988. Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* 7 : 309-312.
24. Perit, A.C., G. David, J. Dahl, P. Ellis, F. Guyon, Casse-delvart and J. Tempe. 1983. Further extension of the opine concept : plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.* 190 : 204-214.
25. Spano, L. and P. Costantino. 1982. Regeneration of plant from callus culture of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on tobacco. *Z. Pflanzen.* 106 : 87-92.
26. Taylor, B.H., R.M. Amasino, F.F. White, E.W. Nester and M.P. Gordon. 1985. T-DNA analysis of plant regenerated from hairy root tumors. *Mol. Gen. Genet.* 201 : 554-557.
27. Tepfer, D. 1983. The biology of genetic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. Pages 248-258 in A. Puhler (ed.) *Molecular Genetics of the Bacteria Plant Interaction*. Springer-Verlag, New York.
28. Tepfer, D. 1984. Genetic transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes* : phenotypic consequences and sexual transmission of the transformed genotype. *Cell.* 37 : 959-967.
29. Tepfer, D., A. Yacoub, C. Lambert, A. Goldmann, C. Rosenberg, J. Denaire, G. Jung and J. Slightom. 1986. Application of genetic transformation by Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in plant biotechnology. *Symbiosis.* 2 : 9 (Abstr.).
30. Torrey, J.G. 1986. Endogenous and exogenous influences on the regulation of lateral root formation. In *new root formation in plants and cuttings*, M.B. Jackson, ed. Martinus Nijhoff pub, Dordrecht, The Netherlands, pp.31-66.

31. White, F.F. and E.W. Nester. 1980. Hairy root : Plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. J. Bacteriol. 141 : 1134-1141.
32. White, F.F., G. Ghidosi, M.P. Gordon and E.W. Nester. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 79 : 3139-3197.
33. Willmitzer, L., J. Sanchez-Serrano, E. Buschfeld and J. Schell. 1982. DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred and expressed in axenic hairy root plant tissues. Mol. Gen. Genet. 186 : 16-22.