

Agrobacterium spp.에 의하여 형질전환된 감자조직의 생장특성

양덕춘, 박태은¹⁾, 윤의수²⁾, 민병훈¹⁾, 정해준¹⁾

한국인삼연구초연구원 유전생리부, ¹⁾배재대학교 원예학과, ²⁾공주대학교 생물학과

Growth Characteristics of Transgenic Potato Using Wild-type *Agrobacterium* spp.

Deok Chun Yang, Tae Eun Park¹⁾, Eui Soo Yoon²⁾, Byung Hoon Min¹⁾ and Hae Jun Chung¹⁾

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

¹⁾Department of Horticulture, Paichai University, Taejon 302-735, Korea

²⁾Department of Biology, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to obtain the information for growth characteristics of crown gall tumor and hairy root transformed by *Agrobacterium* spp. on the media with phytohormones, casein hydrolysate and activated charcoal. Crown gall tumors and hairy roots were formed respectively on potato tuber discs infected by *A. tumefaciens* Ach5 and *A. rhizogenes* ATCC 15834. These tumors and roots could be grown on the phytohormone free media. PCR analysis of Rol C and Vir C gene fragments confirmed that crown gall tumor and hairy root were transgenic tissues, free any wildtype *Agrobacterium*. Callus formation from hairy root was prompted on the medium containing 2,4-D 2mg/l with casein hydrolysate 1g/l. The survival ratio of crown gall tumor callus derived from potato increased on the medium containing the activated charcoal 0.5~2.0mg/l because of the prevention, on the other hand, hairy roots were necrosis on the same medium. Callus derived from hairy root were excellently grown for a short time by suspension culture on liquid medium containing 2,4-D 2mg/l and casein hydrolysate 1g/l.

Key words: activated charcoal, casein hydrolysate, crown gall tumor, hairy root, Rol C, Vir C

서 언

토양 미생물인 *Agrobacterium tumefaciens*와 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해서 식물조직의 상처부분이 감염되면 crown gall tumor나 hairy root가 유도되는데 이것은 토양미생물이 가지고 있는 Ti(tumor inducing) plasmid와 Ri(root inducing) plasmid의 일부분인 T-DNA가 식물체내의 핵 DNA에 삽입되어 발현되었기 때문에 일어나는 현상이다(Chilton 등, 1982; Inze 등, 1984). 이와 같이 원핵세포의 DNA가 진핵세포의 DNA로 안정되게 삽입되고 발현되는 현상은 자연계에서 일어나는 식물세포 형질전환의 대표적인 예로서 최근 발

전하고 있는 식물유전공학의 근간이 되고 있다(An, 1985; Shahin과 Simpson, 1986). 식물체의 핵내에 삽입된 *Agrobacterium*의 T-DNA가 발현되면 정상식물 세포들과 다른 특성을 나타내는데, 이러한 형질전환된 세포는 아미노산유도체인 opine 화합물을 합성하게 되며 이러한 화합물은 *Agrobacteria*에 의하여 질소 및 탄소원으로 이용될 수 있다(Ellis와 Murphy, 1981). 또한 T-DNA 내에는 식물생장 호르몬인 auxin과 cytokinin의 합성에 관여하는 유전자가 존재하여 형질전환된 세포에서 과량의 호르몬을 합성할 수 있으며, 이 종양세포는 *in vitro* 상태에서 식물호르몬 무첨가 배지에서도 계속 자랄 수 있게 된다(Chilton 등, 1982; Inze 등, 1984). 그러나 형성된 조직은 균주에 따라서 그

양상이 매우 달라지며 생장특성에 차이가 있으므로, 본 연구는 이러한 생장특성을 감자에 서로 다른 균주를 접종하여 유도되는 조직을 이용해서 각종 식물호르몬, casein hydrolysate 와 activated charcoal 등을 처리하여 조사하고자 수행하였던 바, 그 결과를 이에 보고한다.

재료 및 방법

식물재료 및 균주: 식물재료로서는 감자(*Solanum tuberosum* cv. Daeji)를 공시하였으며, crown gall tumor와 hairy root의 형성을 위한 균주는 octopine type인 *Agrobacterium tumefaciens* Ach5(De Vos 등, 1981)와 agropine type인 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834(Petit 등, 1983)를 사용하였다

감자 괴경 disc를 이용한 crown gall tumor 및 hairy root의 유기: 감자 괴경을 이용하여 disc를 만들기 위해서 70% ethanol에 5분간 침적하고 2% sodium hypochlorite 용액에 20분간 표면 살균한 후 멸균 증류수로 3회 세척하여 멸균하였다. 감자 disc의 크기는 $1.5 \times 1.5 \times 0.5$ cm'로 하여 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않고, carbenicillin이 250 g/ml 첨가된 1.5% water agar plate에 치상한 후, YEB(yeast extract 1g, beef extract 5g, peptone 5g, sucrose 5g, MgSO₄:0.406g, H₂O 1 l) 배지에서 2일간 현탁배양한 *Agrobacterium tumefaciens* Ach5와 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834를 600nm에서 optical density가 0.8(cell density 10⁹/ml)일 때 채취하여 disc위에 0.1ml씩 접종하여 crown gall 및 hairy root의 형성을 및 형태를 조사하였다.

형질전환된 조직으로부터 crown gall tumor callus 유기 및 hairy root의 증식: 형성된 crown gall tumor 및 hairy root를 각각 절취하여 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않고 carbenicillin이 500g/ml 첨가된 Murashige and skoog(MS) 배지에 치상하였다. 치상된 tumor조직에서 *Agrobacterium*이 완전히 제거될 수 있도록 1주일 간격으로 2회 같은 조건의 신선한 배지에 옮긴 후 tumor callus로 탈분화시켰으며, 또한 hairy root를 증식시켰다. 배지의 산도는 agar(8g/l)를 첨가하기 전에 pH 5.8로 적정하였으며, 121°C에서 20분간 고압증기

로 살균하였다. 살균된 배지는 55°C로 식힌 다음 무균상자(Vision CO., LTD, Korea)에서 항생제를 첨가한 후 멸균된 9cm Petri dish에 분주하여 사용하였다. 배양시 광도는 형광등을 조사하여 2,000 lux로 하고 일장은 16시간으로 하여 25±1°C의 배양실에서 배양하면서 tumor callus와 hairy root의 형태적인 특징을 관찰하였다.

PCR에 의한 Rol C 및 Vir C gene의 확인: 형성된 tumor callus 및 hairy root로부터 Rol C 및 Vir C gene의 존재여부를 확인하기 위하여 PCR(Thermal cycler, Perkin Elmer Cetus)를 사용하였다. 우선 tumor 및 hairy root로부터 DNA를 추출하였으며(Edwards 등, 1991), Taq polymerase, dNPT, MgCl₂, buffer, dye등이 혼합되어 있는 Premix(Bioneer, Korea)에 추출한 DNA 50ng, primer 20pmol을 첨가하여 총량을 20μl로 하였다. PCR 반응조건은 우선 96°C에서 2분간 predenaturation 후, 96°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 2분간 증폭을 36회 반복시킨 후 72°C에서 15분간 post-extension 시키는 조건으로 하였다. PCR 반응시 사용한 primer는 Rol C 유전자의 증폭을 위하여(Oono 등, 1993), 5' -ATGGCTGAA GACGACCT- GTGTT-3', 5' -TTAGCCGATTGCAAAC TTGCAC-3' 등 각각 22mer를 사용하였고, Vir C 유전자의 증폭을 위하여(Sawada 등, 1995), 5' -ATCAITTTG TAGCGACT-3', 5' -AGCTCAAACCTG CTTC-3' 등 각각 16mer를 사용하였다. 합성된 DNA밴드는 1.2% agarose gel에서 1Kb ladder와 함께 전기영동하여 합성된 DNA의 크기를 확인하였다.

Hairy root의 식물호르몬에 대한 반응: Hairy root의 형태와 증식에 미치는 식물호르몬의 영향을 조사하기 위하여 2,4-D, NAA와 IAA를 사용하였으며, 그 농도는 0, 0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0mg/l로 하였고, BA, kinetin과 zeatin을 0, 0.1, 1.0, 2.0, 5.0mg/l 로 하여 각각 단독 처리 또는 상호 복합처리하였다. 각각의 처리는 10반복으로 하였고, 처리당 1개의 삼각 flask에 tumor callus는 3 × 3 × 3mm' 크기로 3개씩 치상하였으며, hairy root는 약 1cm 길이로 절단하여 5개씩 치상한 후 형태적인 특징과 생체중을 조사하여 표준오차를 각각 조사하였다

Hairy root callus의 분화에 미치는 **casein hydrolysate**와 **activated charcoal**의 영향: 2,4-D가 첨가된 배지에서 유도된 hairy root callus를 다시 식물호르몬 부첨가 MS배지에 casein hydrolysate(CH)와 activated charcoal(AC)을 각각 0, 0.5, 1.0, 5.0g/l 농도로 첨가하여 생체중과 생존율을 조사하였다. 또한 hairy root callus를 식물체로 재분화시키기 위해서 호르몬 농도에 activated charcoal을 위와 같은 농도로 처리하여 배양 30일 후에 callus 및 hairy root의 상태를 관찰하였다.

결과 및 고찰

감자 괴경 disc를 이용한 crown gall 및 hairy root

유기: *Agrobacterium tumefaciens* Ach5와 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834를 감자 괴경 disc에 접종하여 시기별로 crown gall tumor와 hairy root의 형성율 및 형태를 관찰한 결과, 접종 7-8일 후부터 절단면에서 나타난 돌기를 육안으로 식별할 수 있었으며, crown gall tumor 및 hairy root의 뚜렷한 형태적 구별은 10일 후부터 가능하였고, 20-30일 정도에서 형성율은 최대를 보였다(표 1). 이러한 tumor 조직의 형태는 *A. tumefaciens* Ach5를 감염시킨 경우에는 구형의 크고 작은 것들이 많이 형성되었고(그림 1-A) 진한 녹색을 띄었으며, *A. rhizogenes* ATCC 15834를 감염시켰을 경우에는 돌기가 형성된 후 직접 hairy root가 형성되었으며 굴지성을 상실하여 뿌리가 위치에 관계없이 뻗어 나갔으며 무성하게 형성되는 경향을 보였다(그림 1-B). 또한 *Agrobacterium* spp.를 접종하지 않은 대조

Table 1. Formation of crown gall tumor and hairy root on the tuber disc of *Solanum tuberosum* cv. Daeji by *Agrobacterium* spp.

Strains of	Rate of tumor formation (%)					Phenotype tumor
	5 days	10 days	15 days	20 days	30 days	
<i>A. tumefaciens</i> Ach5	0	88.12	90.10	90.10	100.00	crown gall
<i>A. rhizogenes</i> ATCC15834	0	95.24	97.62	97.62	97.62	hairy root
Control	0	17.86	20.12	21.43	21.43	wound callus

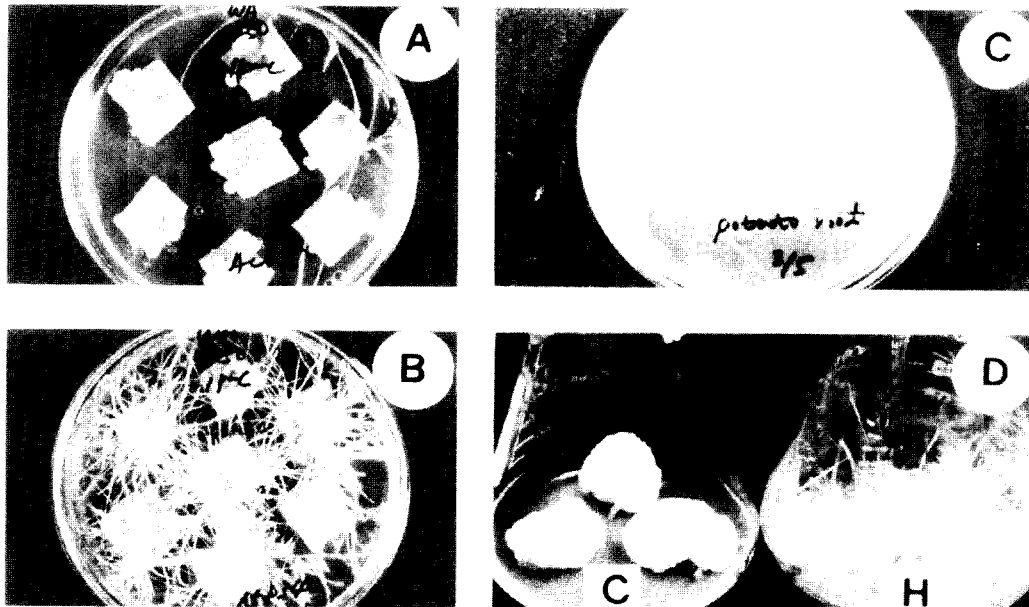


Fig. 1. Crown gall tumor(A) and hairy root(B) induced on potato(*Solanum tuberosum* cv. Daeji) tuber discs after inoculation with *A. tumefaciens* Ach5 and *A. rhizogenes* ATCC15834. Normal root(C), crown gall tumors callus(D-C) and hairy roots(D-H) were grown on the phytohormone free MS medium with carbenicillin.

구의 절단면에서도 초기의 crown gall tumor 모양과 비슷한 작은 크기의 callus가 일부 형성되었으나 이런 callus는 계속해서 성장하지 못하고 결국은 고사하는 경향을 보여 crown gall tumor 조직과는 전혀 다른 양상을 나타내었다(그림 1-3).

감자의 경우 *Agrobacterium*에 대해 감응이 매우 높아 많은 품종에서 이미 crown gall tumor 및 hairy root가 형성되었는 바, 감자 tuber disc에 *A. tumefaciens*를 접종하여 약 10일 후에 crown gall을 유기시켰고 접종 후 25일 까지 tumor의 수가 증가했다고 보고하였으며(Anand와 Heberlein, 1977), *A. rhizogenes*를 접종하여 유기된 hairy root도 접종 5-7일 후에 돌출부위가 발생했고 작은 tumor-like가 발달하여 2-3일 내에 hairy root로 발달하여 활발하게 자랐다고 보고하여(Mugnier 등, 1988), 본 실험에서 사용한 Daeji 품종과도 유사한 결과를 나타냈다.

Crown gall tumor 조직으로부터 tumor callus 유기 및 hairy root의 증식: 감자에서 형성된 crown gall tumor 조직을 *Agrobacterium*가 제거된 tumor callus로 탈분화시키기 위하여 carbenicillin이 500 μ g/ml 첨가된 식물호르몬 무첨가 배지에 잘게 절단하여 치상한 결과 tumor callus가 형성되었으며, 이런 callus는 딱딱하고 녹색을 띤 반구형의 형태를 나타내었고, 불규칙하게 자라서 표면이 약간 거칠은 상태가 되어 정상 조직 callus와는 쉽게 구별할 수 있었다(그림 1-D-C). Hairy root의 경우에도 carbenicillin이 첨가된 식물호르몬 무첨가 배지에서 계속적으로 많은 hairy root가 왕성히 성장하였으나 배지 위에서도 역시 굴지성을 상실하여 배지 윗면 공간으로 뻗어 나오면서 자랐고 곁뿌리가 많은 것이 특징이었다(그림 1-D-H). 또한 간혹 root tip 부위나 절단면에서 약간의 callus가 형성되는 것들도 관찰할 수가 있었다. 반면에 정상적인 뿌리는 위와 동일한 배지에 치상하게 되면 hairy root보다 증식속도가 매우 느리며 뿌리가 배지 속으로 뻗고 계대배양을 하게 됨에 따라 생장이 느려지고 노화가 일어나 결국은 죽는 것을 관찰할 수 있어(그림 1-C), 형질전환된 hairy root와는 다른 성장특성을 나타내었다. 또한 *Agrobacterium* spp.로부터 유기된 감자의 crown gall tumor callus는 식물호르몬 무첨가 배지에서 왕성하게 자라는 반면에 대조구에서 형성

된 wound callus는 자라지 못하고 노화가 되어 역시 고사하였다(표 1). Crown gall tumor나 hairy root는 식물체 핵 DNA에 *Agrobacterium* spp.에 존재하는 유전물질인 T-DNA의 발현으로 식물호르몬 무첨가 배지에서도 잘 자란다고 하였고(Inze 등, 1984), hairy root는 굴지성을 상실하여 곁뿌리가 많으며 정상뿌리보다 증식이 현저히 빠르고 간혹 뿌리 끝에서 작은 callus가 형성되는 것도 있다고 보고하였으며, 식물호르몬 무첨가 배지에서도 신초가 분화한다고 하였다(David와 Tempe, 1988). 본 실험에서도 유사한 결과를 나타냈으나 신초는 전혀 분화되지 않았는데 이는 식물체나 근주에 따라 그 양상이 다르게 나타나기 때문인 것으로 생각된다.

PCR에 의한 Rol C 및 Vir C gene의 확인: 형성된 tumor callus 및 hairy root가 비록 식물호르몬 무첨가 및 항생제 배지에서 생존하였지만, 확실한 형질전환체인지, 혹은 *Agrobacterium*에 감염되어 있지 않은지를 Rol C 및 Vir C gene의 존재여부를 조사함으로써 확인하고자 하였다. 형질전환시 식물세포내로 도입되는 Rol C의 경우에는 tumor callus와 hairy root에서 약 540bp 위치에 밴드가 형성되었으나 대조구로 사용한 정상조직에서는 전혀 밴드를 관찰할 수 없었다(그림 2). 반면 Rol C 유전자등을 식물세포로 전이시키는 역할만 할뿐 직접 식물세포에는 도입되지 않은 Vir C의 경우에는 전혀 밴드가 형성되지 않았다(그림 2). 그러나 tumor 및 hairy root의 형성에 사용한 *Agrobacterium*에서는 모두 Rol C(540 bp) 및 Vir C gene(730 bp)이 확인되었다(그림 2). 따라서 본 실험결과 형성된 tumor callus 및 hairy root는 Rol C 유전자가 확인된

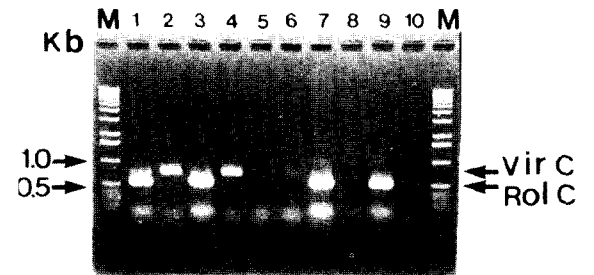


Fig. 2. PCR products of Rol C(540 bp) and Vir C(730 bp) from *Agrobacterium*, normal, crown gall and hairy root of *Solanum tuberosum* cv. Daeji.

것으로 보아 틀림없는 형질전환체로 사료되며, *Agrobacterium*에서는 Vir C 유전자밴드가 나타났지만 형질전환체인 tumor callus와 hairy root에서는 전혀 나타나지 않은 것으로 보아 이런 조직은 모두 *Agrobacterium*에 감염되어 있지 않음을 확인할 수 있었다.

Hairy root의 식물호르몬에 대한 반응: Hairy root는 *Agrobacterium*의 Ri-plasmid에 의하여 형질전환식물호르몬 자가합성 유전자가 도입되기 때문에 자체 내에서 충분한 식물호르몬을 함유하고 있다(Inze 등, 1984). 따라서 추가로 외부에서 식물호르몬 첨가시 오히려 생장이 억제될 수도 있으며 종류에 따라서는 생장에 더욱 많은 호르몬을 요구할 수 있다. 본 실험은 외부에서 추가로 2,4-D와 NAA 그리고 IAA 농도를 각각 달리 처리한 MS배지에 hairy root 절편을 치상한 후 30일간 배양하여 생체중과 형태를 조사한 결과(표 2), 2,4-D는 1mg/l, NAA는 5mg/l 그리고 IAA는 10mg/l까지 hairy root와 callus가 형성되었다. Callus 유기에 최적농도는 2,4-D 2mg/l와 5mg/l였고, NAA는 10mg/l였으며 callus의 양상은 상당히 유연하고 부스러지기 쉬운 상태였고 회백색을 띄었다. 그러나

IAA 처리의 경우 농도에 관계없이 hairy root만 발생하였으며 hairy root의 생체중은 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다(표 2).

한편 감자 hairy root에서도 식물호르몬 무첨가 배지에서 신초가 분화되기도 한다고 하였지만(David와 Tempe, 1988), 본 실험에서는 전혀 신초가 분화되지 않아 추가로 BA와 kinetin 그리고 zeatin을 처리하였다. 그러나 오히려 신초 분화에는 전혀 효과가 없었고 치상된 hairy root의 절편체는 딱딱하게 갈변되었고, 농도가 높아질수록 생체중이 감소하면서 hairy root의 발생량도 감소되는 경향을 보였다(표 3). 특히 BA 5mg/l와 Zeatin 5mg/l 처리의 경우 hairy root는 발생하지 않고 약간의 callus가 형성되었으며 절편체는 딱딱하게 표면이 갈변되었다. 2,4-D와 BA의 복합처리시는 2,4-D 1mg/l에 BA 0.5mg/l 농도까지는 hairy root와 callus가 동시에 성장하였고 2,4-D 1mg/l와 BA 1mg/l 농도 이상에서는 callus만 성장하였다. 최고의 callus의 생장은 2,4-D 5mg/l와 BA 1mg/l 농도였으며 BA 첨가시는 callus가 2,4-D 단독처리시보다 생체중은 약간 증가하였으나 노화가 빨리 일어나는 것을 볼 수 있었다(표 4).

Table 2. Effects of 2,4-D, NAA and IAA on the callus(C) induction from hairy root(HR) derived from *Solanum tuberosum* cv. Daeji

Conc. (mg/l)	2,4 - D		NAA		IAA	
	Phenotype of callus	Fresh weight(g)	Phenotype of callus	Fresh weight(g)	Phenotype of callus	Fresh weight(g)
0	HR	1.04±0.17	HR	1.04±0.17	HR	3.44±0.26
0.1	HR + C	0.96±0.08	HR	1.30±0.12	HR	3.01±0.14
1.0	HR + C	1.06±0.49	HR + C	1.36±0.08	HR	2.93±0.23
2.0	C	1.86±0.13	HR + C	1.79±0.04	HR	2.37±0.11
5.0	C	2.03±0.23	HR + C	2.86±0.13	HR	2.98±0.05
10.0	C	0.73±0.18	C	2.54±0.19	HR	2.35±0.12

Table 3. Effect of BA, kinetin and zeatin concentrations on differentiation of hairy root(HR) in *S. tuberosum* cv. Daeji

Conc (mg/l)	B A		kinetin		Zeatin	
	Phenotype of explant	Fresh weight(g)	Phenotype of explant	Fresh weight(g)	Phenotype of explant	Fresh weight(g)
0	HR	3.44±0.96	HR	3.44±0.96	HR	3.44±0.96
0.1	HR+C+N	0.82±0.17	HR+C+N	2.72±1.29	HR+C+N	0.97±0.22
1.0	HR+C+N	0.41±0.05	HR+C+N	1.56±0.81	HR+C+N	0.81±0.13
2.0	HR+C+N	0.41±0.10	HR+C+N	1.26±0.53	HR+C+N	0.71±0.19
5.0	C+N	0.36±0.07	HR+C+N	0.89±0.39	C+N	0.61±0.23

‘N’ : necrosis, ‘C’ : callus.

Table 4. Effect of 2,4-D and BA combinations on differentiation of hairy root(HR) derived from *S. tuberosum* cv. Daeji

Conc (mg/l)		Phenotype of callus	Fresh weight(g)
2,4-D	BA		
0.1	0.5	HR + C'	1.21 ± 0.17
	1.0	HR + C	0.96 ± 0.04
	5.0	HR + C	0.57 ± 0.08
1.0	0.5	HR + C	1.33 ± 0.03
	1.0	C	1.35 ± 0.31
	5.0	C	1.29 ± 0.42
5.0	0.5	C	3.12 ± 0.13
	1.0	C	3.39 ± 0.84
	5.0	C	2.54 ± 0.63

'C': callus.

NAA와 BA 혼합처리시는 NAA 10mg/l에 BA 0.1mg/l 농도에서 callus생장이 가장 왕성하였으며 NAA 1mg/l에 BA 0.1, 1.0mg/l 그리고 NAA 5mg/l에 BA 0.1mg/l 혼합처리에서만 hairy root가 발생되었다. 또한 BA가 5mg/l 첨가된 처리구에서는 노화가 빨리 일어나고 callus의 성장을 억제시키는 것을 관찰할 수 있었다

Table 5. Effect of NAA and BA combinations on differentiation of hairy root(HR) derived from *S. tuberosum* cv. Daeji

Conc. (mg/l)		Phenotype of callus	Fresh weight (g)
NAA	BA		
1	0.1	HR + C'	1.04 ± 0.24
	1.0	HR + C	1.01 ± 0.14
	5.0	C + N ^b	0.79 ± 0.16
5	0.1	HR + C	1.98 ± 0.34
	1.0	C	1.60 ± 0.44
	5.0	C + N	1.36 ± 0.30
10	0.1	C	2.93 ± 0.84
	1.0	C	2.55 ± 0.39
	5.0	C + N	2.01 ± 0.55

'C' : callus, 'N' : necrosis.

Table 6. Effect of IAA and zeatin combinations on differentiation of hairy root(HR) derived from *S. tuberosum* cv. Daeji

Conc. (mg/l)		Phenotype of callus	Fresh weight(g)
IAA	Zeatin		
1.0	0.5	HR + C'N ^b	1.02 ± 0.22
	1.0	HR + CN	0.97 ± 0.20
	2.0	HR + CN	0.98 ± 0.17
2.0	0.5	HR + CN	1.22 ± 0.40
	1.0	HR + CN	1.11 ± 0.25
	2.0	HR + CN	1.10 ± 0.18
5.0	0.5	HR + CN	1.83 ± 0.47
	1.0	HR + CN	1.19 ± 0.25
	2.0	CN	1.10 ± 0.23

'C' : callus, 'N' : necrosis.

(표 5). IAA와 zeatin의 혼합처리시는 zeatin의 농도가 증가함에 따라 hairy root 형성이 감소하였으며 IAA는 hairy root증식이나 callus 형성에 거의 영향이 없는 것으로 나타났다(표 6).

대체로 hairy root에서는 crown gall tumor callus와는 달리 식물호르몬을 첨가하지 않은 배지에서도 쉽게 재분화가 되며 또한 식물호르몬을 첨가시켜 재분화를 촉진시켜서 정상식물체와 형태적인 차이를 보고한 예들이 있는데, 감자는 아니지만 ornamental kale에서 유기된 hairy root에 zeatin과 NAA를 공급하여 부정아를 형성시켰으며(Hosoki 등, 1989), *S. dulcamara*와 sainfoin에서 유도된 hairy root가 hormone 무첨가 배지에서 직접 신초가 분화되거나 또는 BAP나 zeatin을 첨가하였을 때 쉽게 신초가 발생하였다고 하였다(Lee와 Davey, 1988). 본 실험에서 hairy root와 callus의 발생양상은 이들의 실험과 유사하게 나타났으나 BA나 zeatin을 첨가해도 부정아는 형성되지 않아 서로 다른 양상을 보여주었다. 따라서 형질전환된 감자에서 신초를 발생시키기 위해서는 이에 관여하는 요인에 대해 추후의 상세한 연구가 요청된다고 하겠다.

Hairy root callus의 casein hydrolysate와 activated charcoal의 효과: 2,4-D가 첨가된 배지에서 유도된 hairy root callus를 다시 식물호르몬 무첨가배지에 casein hydrolysate(CH)를 농도별로 첨가하여 생존율과 생체중을 조사한 결과, CH가 첨가된 곳에서는 hairy root callus가 갈변되었으며 농도가 높을수록 생존율이 감소되는 경향을 보였다(표 7). 또한 성장량도 CH의 농도가 증가할수록 감소하였으며 5g/l에서는 절반이상으로 감소되는 경향을 나타내었다(표 7). 한편 hairy root callus를 activated charcoal(AC)이 첨가된 배지에 배양한 결과 대조구보다 생체중이 증가하는 경향을 보였고 생존율도 높일 수 있었으나 AC가 5g/l 첨가된 곳에서는 hairy root callus가 거의 증식되지 않고 백화되는 현상을 볼 수 있었다(표 7).

Hairy root의 경우 식물호르몬 무첨가 배지에 casein hydrolysate(CH) 첨가시 생체중은 큰 차이가 보이지 않았지만 기부가 검게 변하고 생육상태가 좋지 않았다. 그러나 최적 callus 유기조건의 호르몬농도인 2,4-D 2mg/l와, 2,4-D 5mg/l 및 BA 1mg/l 복합처리구에서는 CH 처리에 민감한 반응을 나타내어 CH 농도가

Table 7. Effect of casein hydrolysate and activated charcoal on growth of hairy root callus derived from *S. tuberosum* cv. Daeji on the medium without any phytohormone

Casein hydrolysate			Activated charcoal		
Conc. (g/l)	Fresh weight (g)	Survival ratio (%)	Conc (g/l)	Fresh weight (g)	Survival ratio (%)
0	1.34±0.14	90.9	0	1.04±0.24	90.9
0.5	1.22±0.14	70.0	0.5	1.21±0.10	100.0
1.0	1.18±0.20	69.4	1.0	1.14±0.22	100.0
5.0	0.63±0.18	27.7	5.0	0.18±0.09	19.4

Table 8. Effect of casein hydrolysate(CH) on the growth and phenotype of hairy root(HR) in *S. tuberosum* cv. Daeji on the medium with/without phytohormone

Conc of CH(g/l)	Hormone Free		2,4-D 5mg/l + BA 1mg/l		2,4-D 2mg/l	
	Fresh weight(g)	Phenotype	Fresh weight(g)	Phenotype	Fresh weight(g)	Phenotype
0	1.47±0.17	HR	2.12±0.19	Callus	1.52±0.32	Callus
0.5	1.41±0.19	HR	4.37±0.17	Callus	2.30±0.16	Callus
1.0	1.47±0.19	HR	4.45±0.14	Callus	2.45±0.14	Callus
5.0	1.65±0.09	HR	6.80±0.42	Callus	4.10±0.51	Callus

높을수록 callus 생체중이 현저히 증가하였으며, CH 5g/l에 최고를 나타냈으나 callus가 빨리 갈변되는 것을 관찰할 수 있었다(표 8). 그러나 2,4-D 2mg/l와 casein hydrolysate 1g/l를 첨가한 배지에 hairy root callus를 현탁배양하면 양호한 callus 덩어리들을 단시간에 얻을 수 있었다. 따라서 hairy root callus의 성장에 CH의 적정농도는 1g/l가 적당한 것으로 판단되었다. 식물 세포의 배양에는 무기물 영양소의 추가 첨가는 적당하지 않지만 CH 0.05-0.2%의 첨가는 양호한 callus를 유지시킬 수 있으며(Gamborg, 1982), 배발생 calli의 유지 및 유지에 CH가 효과적이고(Vasil과 Vasil, 1984), 배배양에서 CH가 amino acid를 공급하고 osmolarity에 효과가 있다고(Collins와 Grosser, 1984) 하였던 바, 본 실험에서도 hairy root로부터 callus유기시 CH를 첨가하여 양호한 callus가 빨리 증식되었으므로 이들의 효과와 관련이 있다고 판단되었다. 그러나 신초의 형성은 전혀 없어 상기 실험결과와는 다소 다른 경향을 보였다. 한편 hairy root에 AC의 첨가시는 호르몬 첨가에 관계없이 AC 0.1g/l 첨가된 절편체만 약간의 hairy root만 나왔을 뿐 그 이상의 농도에서는 전부 고사하였다(표 9). 감자 약배양에서 AC의 첨가로 반수체 식물의 생산이 41%에서 91%까지 증가되었고, 식물체의 발생도 증가시켰는데 이는 억제물질과 외성적, 혹은 내성적인 성장조절물질의 흡수에 의한 것

Table 9. Effect of activated charcoal(AC) on the growth and phenotype of hairy root(HR) in *S. tuberosum* cv. Daeji on the medium with/without phytohormone

Conc. of AC(g/l)	Hormone Free		2,4-D 5 + BA 1(mg/l)	
	Fresh weight(g)	Phenotype	Fresh weight of hairy root	phenotype
0	1.47±0.17	HR	2.12±0.19	Callus
0.1	0.17±0.04	HR	0.27±0.10	Callus
0.5	-	-	-	-
1.0	-	-	-	-
5.0	-	-	-	-

이라고 하였다(Bajaj, 1983). 또한 AC가 당근에서 배발생을 촉진시켰는데 이때 배지에 첨가된 auxin의 농도가 감소되었다고 했으며, *Allium cepa*에서는 정상적인 뿌리가 발생하지 않았는데 이는 AC가 auxin 흡수와 관련이 있다고 했다(Fridborg와 Eriksson, 1975). 그러나 본 실험에서는 AC의 첨가로 crown gall tumor의 생존율은 높아진 반면에 hairy root에서는 전혀 신초가 형성되지 못했다. 이는 억제물질의 흡수나 내성적 혹은 외성적 auxin의 과잉흡수, 식물체 및 균주가 다른 것에 의해서 기인한 것이라고 여겨진다.

적 요

감자에 *Agrobacterium*을 접종하여 유기된 조직을 각종 식물호르몬, casein hydrolysate, activated charcoal을 처리하여 생장특성을 조사하기 위해서 수행하였다. 감자 괴경에 *Agrobacterium tumefaciens* Ach5와 *A. rhizogenes* ATCC15834를 접종하여 각각 crown gall tumor 및 hairy root를 유기하였으며, 이러한 tumor조직은 식물호르몬 무첨가배지에서 생장이 왕성하였다. 유기된 crown gall tumor 및 hairy root는 PCR에 의해서 Rol C 및 Vir C gene을 조사함으로써 형질전환체임이 확인되었고, 또한 *Agrobacterium*에 전혀 감염되어 있지 않음을 확인할 수 있었다. 감자에서 유기된 hairy root로부터 callus 형성은 2.4-D 2mg/l첨가된 MS 배지에서 가장 양호하였으며 casein hydrolysate 1g/l가 첨가하면 유연한 callus의 증식이 더욱 왕성하였다. Activated charcoal이 0.5~2.0g/l 첨가된 배지에서는 crown gall tumor callus의 절단면이 갈변되는 것을 방지할 수 있어 생존율을 높일 수 있었으나, hairy root에서는 갈변되어 고사되는 경향을 보였다. 그러나 2.4-D 2mg/l와 casein hydrolysate 1g/l를 첨가한 배지에 hairy root callus를 현탁배양하면 양호한 callus 덩어리들을 단시간에 얻을 수 있었다.

인 용 문 헌

- An G. 1985. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 79: 568-670.
- Anand, V., Heberlein, K. 1977. Crown gall tumorigenesis in potato tuber tissue. *Amer. J. Bot.* 64(2): 153-158.
- Bajaj, Y.P.S. 1983. In vitro production of haploids. In : *Handbook of plant cell culture*. Evans D.A.W., Sharp, R., Ammirato, P.V., Yamada, Y.(eds). Vol 1. New York, p. 228-287.
- Chilton, M.D., Tepfer D.A., Petit, A., Tempe, J. (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. *Nature(Lond)* 295: 432-434.
- Collins, G., Grosser, J.W. 1984. Culture of embryos. In: Vasil I.K.(eds). *Cell culture and somatic cell genetic of plant*. vol.i. New York. p. 241-257.
- David, C., Tempe, J. 1988. Genetic transformation of cauliflower(*Brassica oleracea* L. var Botrytis) by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*. 7: 88-91.
- De Vos, G., Beuckeleer, D., Montagu, M.V., Schell, J. 1981. Restriction endonuclease mapping of the octopine tumour-inducing plasmid pTiAch5 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 6: 249-253.
- Edwards, K.C., Johnson C., Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19: 1349.
- Ellis, J.G., Murphy, P.J. 1981. Four new opines from crown gall tumors their detection and properties. *Mol Gen Genet* 181: 36-43.
- Fridborg, G., Eriksson, T. 1975. Effects of activated charcoal on trwoth and morphogenesis in cell cultures. *Physiol plant* 34: 306-308.
- Gamborg, O.L. 1982. Callus and cell culture. In: *Plant tissue culture methods*. Wetter, L.R., Constable, F.(eds). p. 1-9.
- Hosoki, T., Shiraishi, K., Kigo, T., Ando, M. 1989. Transformation and regeneration of ornamental kale(*Brassica oleracea* var. Acephala DC) mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *Scientia Horticulture* 40: 259-266.
- Inze, D., Lijsebettens, M.V., Simoens, C., Genebello, C., Montagu, M.V., Schell, J. 1984. Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*: further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol Gen Genet* 194: 265-274.
- Lee, J.Y., Davey, M.R. 1988. Transformation of several plant species with Ri plasmid. *Korean J. Tissue culture* Vol 15(3): 167-174.
- Mugnier, J. 1988. establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 7: 9-12.
- Oono, Y., Suzuki, T., Toki, S., Uchimiyu, H. 1993. Effects of the over-expression of the rolC gene on leaf development in transgenic periclinal chimeric plants. *Plant Cell Physiol.* 34(5): 745-752.

- Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, G.J., Guyon, P., Tempe, J. 1983. Mol Gen Genet 190: 204-214.
- Shahin, E.A., Simpson, R.B. 1986. A gene transfer system for potato(*Solanum tuberosum* L.) In : Y.P.S. Bajaj(ed) Biotechnology in agriculture and forestry 3. Springer-Verlag. p. 224-239.
- Sawada, H., Ieki, H., Matsuda, I. 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Appl Environ Microbiol 61(2): 828-831.
- Vasil, V., Vasil, I.K. 1984. Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of gramineae. In: Vasil, I.K.(eds). Cell culture and somatic cell genetics of plant. Vol 1, New York, p. 36-42.