韓藥作誌(Korean J. Medicinal Crop Sci.) 14(1) : 31 – 35 (2006)

형질전환된 지황의 모상근으로부터 식물체의 재분화

황 성 진
동신대학교 한약재산업학과

Plant Regeneration from Hairy Root of *Rehmannia glutinosa* Liboschitz Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*

Sung Jin Hwang
Department of Oriental Medicine Materials, Dongshin University, Naju 520-714 Korea.

ABSTRACT : A protocol for plant regeneration from hairy root of *Rehmannia glutinosa* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 has been developed. Transgenic shoots were regenerated from hairy roots within 6 weeks after culture on the SH medium supplemented with 0.5 ㎎/ℓ BA. Shoots were rooted on plant growth regulator free SH medium successfully. The transformed plants, which were regenerated from hairy roots, had thiner roots with extensive lateral branches, wrinkled leaves, shorter node, and grew faster compared with non-transformed plants. The biomass of the transformed plant was 1.28 g (F.W) per plant, significantly higher than the non-transformed plant (0.54 g F.W). The catalpol content in the transformed plant (0.56%) was also higher than that of the non-transformed plants (0.43%).

Key words : hairy root, plant regeneration, catalpol, *Rehmannia glutinosa*

서 언

토양 미생물인 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해 식물세포의 게놈내로 pRi의 T-DNA가 전이될 경우 식물조직 표면에서 부정근의 분화가 이루어진다. 이와같은 형질전환된 부정근 (또는 모상근)은 기내 (*in vitro*) 배양시 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 기본배지 내에서 정상근에 비해 수십에서 수백배 빠르게 성장하며, 경사굴성 (plagiotropic) 현상과 분지화를 나타내며 계대배양 과정에서 유전적으로나 생화학적으로 안정성을 유지하는 것으로 알려지고 있다 (Grant *et al.*, 1991). 이와같은 모상근으로부터 재분화 과정을 거쳐 형성된 식물체는 하나의 세포로부터 만들어지기 때문에 단일 계통을 유지하게되는 잇점이 있다 (Bercetche *et al.*, 1987). 그러나, 모상근으로부터 재분화된 식물체는 모식물체와 다른 생장 양상을 보여주는데 간혹 생식력이 저하되거나 조기개화가 이루어지기도 하며, 외부 형태에 있어서 마디 사이가 짧아지고, 잎이 주름지며, 경사굴성현상을 보이는 다량의 뿌리를 만들어 낸다 (Tepfer, 1984). 모상근으로부터 재분화된 식물체가 갖는 많은 뿌리는 토양에 식재하였을 때 폭넓은 근계를 구축하게되어 지상부의 생육을 향상 시켜줄 수 있을뿐만아니라 시비량을 줄일 수 있어 근경을 약재로 사용하는 숙근초에 있어서 수확량을 높일 수 있을것으로 보인다.

지황 (*Rehmannia glutinosa* Loboschitz)은 현삼과 (Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 초본으로 한방에서는 근경을 보혈, 자양, 강장, 청혈 등의 처방에 사용하고 있다. 전초에서 생합성되어지는 주요 생리활성물질로는 sterol, campesterol, catalpol, 그리고 rehmannia A, B, C, D 등이 있으며 (Tomoda *et al.*, 1971; Hasegawa *et al.*, 1982; Oshio and Inouye, 1981), 지황 근경 추출물은 하제 (purgative), 간기능 보호, 항균, 진정, 항종양, 항염증작용을 갖는 것으로 알려지고 있다 (Ismailoglu *et al.*, 2002). 그러나, 지황의 약리성분은 재배지의 토양성분과 기후조건에 의해 크게 영향을 받으며 재배과정에서 종근이 부패하거나 발아가 지연되어 수확기 근중량의 급격한 저하를 가져오는 경우가 많다 (Park, 2000).

본 연구에서는 형질전환된 지황의 모상근으로부터 식물체를 재분화 시키기 위한 최적 조건을 조사함과 아울러 이러한 재분화 식물체가 갖는 형태적인 특징, 근중량, 그리고 지표물질인 catalpol의 생산성을 검토 하고자 하였다.

†Corresponding author: (Phone) +82-61-330-3225 (E-mail) jimhwang@naver.com
Received November 22, 2005 / Accepted January 20, 2006

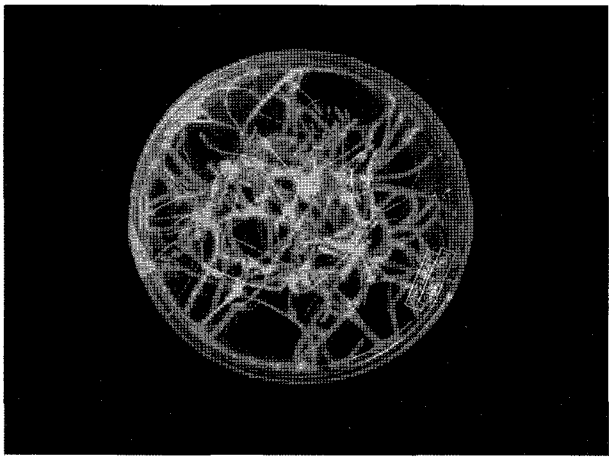

Fig. 1. Growing hairy roots on plant growth regulators-free SH medium.

재료 및 방법

1. 배지조제

SH (Schenk and Hildenbrandt, 1972) 배지의 기본 성분에 탄소원으로 3% sucrose와 고형제로 0.3% Phytagel (Sigma-Aldrich, USA)를 첨가한 후 감압멸균전에 1 N NaOH를 사용하여 pH를 5.8로 맞추었다. 식물성장조절물질은 membrane filter (pore size, 2 ㎛)를 통해 별도로 여과멸균한 후 감압멸균된 고형배지에 첨가하였다.

2. 모상근 배양

지황의 모상근은 본 연구실에서 잎절편에 pRi를 갖는 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834의 감염을 통하여 얻었으며, 유도된 모상근은 근단으로부터 약 1.5 ㎝ 크기로 절취하여 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 SH배지 (3% sucrose, 0.3% Phytagel, pH 5.8)에서 4주 동안 초기 배양한 후 증식된 모상근 배양체로부터 동일한 방법으로 근단을 절취하여 새로운 배지로 옮겨 주면서 유지 시켰다 (Fig. 1) (Hwang, 2005). 모든 배양은 암조건이 유지되며, 내부온도가 25 ± 1℃인 배양기내에서 이루어졌다.

3. 식물체 재분화

계대배양 후 2주가 지난 모상근 배양체로부터 근단을 포함한 2 ㎝ 길이의 시료를 절취하여 BA와 kinetin이 농도별 (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ㎎/ℓ)로 첨가된 SH배지 (3% sucrose, 0.3% Phytagel, pH 5.8)에 petri-dish 당 5개씩 치상하였다. 모든 배양은 16시간 광이 조사 (50 μmol $m^{-2}s^{-1}$)되는 항온실에서 수행하였다.

4. 생체량 조사

모상근으로부터 재분화된 식물체와 잎절편으로부터 재분화된 식물체를 8주 배양 후 수돗물로 세척한 다음 세겹의 여과지에 놓고 상온에서 24시간 유지 시킨 후 생중량을 측정하였으며, 이 후 건조기에 넣어 48시간 말린 다음 건중량을 조사하였다.

5. Catalpol 정량

Catalpol의 정량은 Park등 (1990)의 방법에따라 수행하였다. 냉동건조 시료 1 g을 마쇄한 후 90% (v/v) 메탄올 50 ㎖를 가하여 초음파 추출을 30분씩 3회 반복 추출하였다. 추출액은 membrane filter (0.45 ㎛)로 여과하여 HPLC분석에 시료로 사용하였다. HPLC분석시 column은 Capcell pak C_{18}, 유속은 1.2 ㎖/min, 이동상은 water : acetonitrile (100 : 1)에 시료 10 ul를 주입하여 UV detector로 검출 (280 ㎚)하였다. Catalpol의 정량에 사용한 표준품은 Wako Pure Chem. Co. (Japan)로부터 구입하였으며, 메탄올에 녹여 (1 ㎎/㎖) 사용하였다.

결과 및 논의

지황의 모상근을 BA와 kinetin이 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ㎎/ℓ 씩 단독으로 첨가된 SH배지에 치상하여 16시간 광이 조사되는 항온실에서 배양 하였을 때 BA 처리구에서 5주 후 신초를 유도할 수 있었다 (Fig. 2). 모든 실험구에서 배양 초기에 지속적인 분지화 현상을 보이지만 BA 처리구를 제외한 나머지 실험구에서는 4주 이내에 절취부에서 캘러스가 형성되거나 갈변화 현상을 나타내었다. Table 1은 모상근 절편으로부터 신초의 형성율을 나타낸 것으로 시료당 신초의 분화는 0.5 ㎎/ℓ BA 처리구에서 29.9%의 효율로 가장 높았으나 BA 농도가 증가할수록 신초의 분화는 억제되고 캘러스화 되는 경향을 보였다. 또한 형성된 신초의 수는 모상근 시료당 2.3개 였으며, 계대배양 과정에서 더 이상의 신초 형성은 이루어지지 않았다.

식물조직으로부터 기관형성에는 배지에 처리하는 옥신과 시토키닌의 종류와 농도가 많은 영향을 미치게된다 (Skoog and Miller, 1957). 그러나, T-DNA의 ORF (open reading frame) 상의 옥신 생합성에 관련한 조절유전자가 전이되어 형성되는 모상근의 경우 모식물체의 조직과는 내재하는 옥신과 시토키닌의 비율에 있어서 차이가 생기게 된다. 따라서, 모상근에 옥신을 처리해줄 경우 분지화를 촉진시키거나 캘러스화 되는 경우가 있으며, 이와 반대로 시토키닌을 처리할 경우 분지화가 억제되면서 신초가 유지되는 경우가 많다. Ohara 등 (2000)은 지황의 경우와 마찬가지로 BA 단독처리에 의해 *Crotalaria juncea*의 모상근으로부터 신초를 유기 시킨바 있다. 그러나, 식물종에 따라 kinetin을 단독처리하거나 NAA와 BA를 혼합하여 처리한 경우도 있다 (Momcilovic *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2004; Perez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo, 1998). 또한 신초의 재분화에 있어서 식물생장조절물질의 영향을 받지 않거나 유전자형에 따라서 신초의 형성이 많은 차이를 보이는

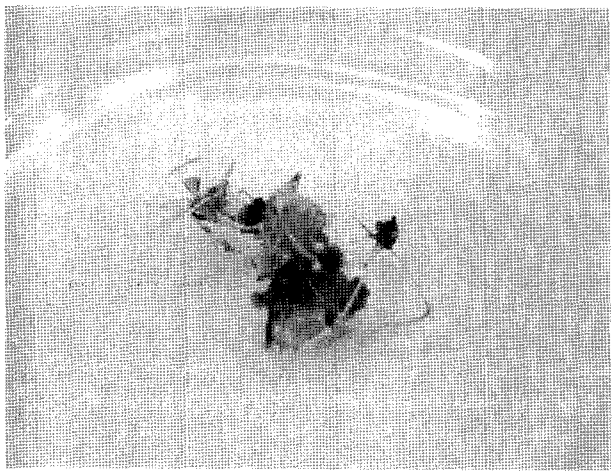

Fig. 2. Shoots formation from hairy root explant on SH medium supplemented with 0.5 ㎎/ℓ BA.

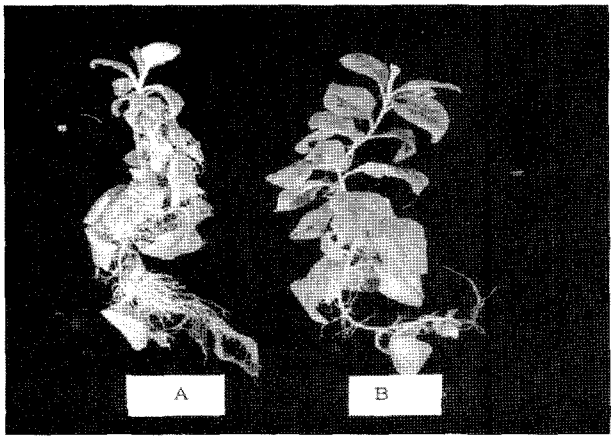

Fig. 3. Comparison of morphological characters of *in vitro* cultivated transformed (A) and non-transformed plant (B).

Table 1. Effects of cytokinins on adventitious shoot formation from hairy root explant of *R. glutinosa* after 6 weeks of culture.

Cytokinin (㎎/ℓ)		No. of explants	Shoots formation (%)	No. of shoots/ explant
BA	0.1	25	0.0	0.0 ± 0.0
	0.5	23	29.9	2.3 ± 0.5
	1.0	23	7.5	0.7 ± 0.4
	2.0	24	0.0	0.0 ± 0.0
kinetin	0.1	24	0.0	0.0 ± 0.0
	0.5	23	0.0	0.0 ± 0.0
	1.0	25	0.0	0.0 ± 0.0
	2.0	21	0.0	0.0 ± 0.0

* Data represent the mean value ± S.E of three independent experiments.

Table 2. Comparison of biomass and catalpol contents of *in vitro* cultivated plants derived from hairy root and leaf explant.

	Biomass		Catalpol content (% DW)
	g (FW)/plant	g (DW)/plant	
Transformed plant	1.28 ± 0.07	0.09 ± 0.004	0.56 ± 0.04
Non-transformed plant	0.53 ± 0.08	0.07 ± 0.003	0.43 ± 0.05

* Data represent the mean value ± S.E of three independent experiments.

경우도 있다 (Hoshino and Mii, 1998; Lee *et al*, 2004; Peres *et al*., 2001).

형성된 신초는 4주 후 기저부를 절취하여 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 기본배지로 옮겼을 때 캘러스 형성 없이 2주 후부터 뿌리가 형성되었다. 한편, 지황의 잎절편으로부터 직접 재분화 시킨 식물체와 비교 하였을 때 형질전환된 식물체의 경우 줄기의 마디 사이가 짧고, 잎이 오무라드는 현상을 볼 수 있었으며, 뿌리부분은 많은 수의 세근이 형성되었다 (Fig. 3). 이와같은 형태적 특징들은 형질전환된 모상근으로부터 재분화된 식물들에서 흔히 볼 수 있는 현상으로 Cho와 Widholm (2002)는 식물게놈내에 삽입된 T-DNA의 *rol* gene의 발현에 의한 영향으로 보았다. 따라서, 모상근으로부터 재분화과정을 통해 얻은 형질전환 식물체의 경우 다양한 선발과정이 반드시 필요할 것으로 사료된다.

지황의 형질전환된 모상근과 잎절편으로부터 직접 재분화된 식물체를 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 SH배지에서 8주 동안 배양한 후 생체량을 측정한 결과 잎절편 유래 식물체에 비해 약 2배의 차이를 보여주었다 (Table 2). 이와같은 결과는 Lee 등 (2004)이 *Taraxacum platycarpum*의 모상근으로부터 재분화된 식물체에서 1.7배의 건중량 증가를 보인것과 유사하며, 뿌리의 무게만을 측정하였을 때 1.8배 증가한 점을 고려할 때 지황에서 나타난 생체량의 차이는 줄기나 잎의 무게 보다는 뿌리의 무게에서 비롯된 것으로 보인다.

기내에서 증식된 식물체의 경우 대부분 모식물체와 화학합성능력의 차이를 보이지 않는다 (Tanaka *et al*., 1995b; Hiraoka and Tomita, 1990). 지황의 지표물질인 catalpol의 함량 비교에서 형질전환된 식물체의 경우 건중량을 기준으로 0.56%로 대조구에 비해 1.3배 높게 나타났다 (Table 2). 모상근으로부터 재분화된 식물체의 경우 모식물체에 비해 건중량은 증가하나 2차대사물질의 함량 증가는 이루어지지 않는 경우가 많으나 (Noda *et al*., 1987; Okasman-Caldentey *et al*., 1991; Yoshimatsu and Shimimura, 1992) Aoki 등(1997)과 Tanaka와 Matsumoto (1993)의 연구에서는 *Atropa belladonna*와 *Ajuca reptans*의 모상근으로부터 재분화된 식물체에서 모두 대조구에 비해 물질의 함량이 2배 이상 증가됨을 확인 한 바 있다. 지황을 포함한 몇몇 식물종에서 이처럼 물질함량이 차이를 보이는 이유는 특징적으로 뿌리에서 특이적 생합성능을

나타내는 물질이거나 T-DNA의 삽입변이에 따른 대사경로의 일부가 변화되어 나타난다고 할 수 있다.

적 요

Agrobacterium rhizogenes ATCC15834에 의해 형질전환된 지황 (*Rehmannia glutinosa*)의 모상근으로부터 유식물체를 재분화 시키기 위한 최적 조건을 탐색하였다. 모상근 절편으로부터 유식물체의 재분화는 0.5 mg/ℓ BA가 첨가된 SH배지 (3% sucrose, pH 5.8)에서 배양 5주 후 이루어졌다. 이와 같은 유식물체는 식물생장조절물질이 포함되지 않은 기본배지로 옮겼을 때 발근이 이루어졌다. 형질전환된 모상근 유래 식물체는 잎으로부터 직접 재분화된 식물체와 비교했을 때 잎이 오므라드는 경향을 보였고 줄기는 절간이 짧았으며, 뿌리는 가늘고 수량이 많은 특징을 보였다. 생체량 비교에서 형질전환 식물체는 식물 하나의 무게가 1.28 g (생중량)으로 대조구인 잎 유래 재분화식물체 (0.53 g)에 비해 높았으며, 지표물질인 catalpol의 함량에 있어서도 차이를 보여주었다.

LITERATURE CITED

Aoki T, Matsumoto H, Asako Y, Matsunaga Y, Shimomura K (1997) Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. Plant Cell Rep. 16:282-286.

Bercetche J, Chriqui D, Adams S, David C (1987) Morphogenic and cellular reorientations induced by *Agrobacterium rhizogenes* on carrot, pea and tobacco. Plant Sci. 52:195-210.

Cho HJ, Widholm JM (2002) Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of the legume *Astragalus sinicus*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 69:259-296.

Choi PS, Kim YD, Choi KM, Chung HJ, Choi DW, Liu JR (2004) Plant regeneration from hairy root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus rosues*. Plant Cell Rep. 22:828-831.

Grant JE, Dommisse EM, Christey MC, Conner AJ (1991) Gene transfer to plant *Agrobacterium*.. In: Murray DR (eds.) Advanced Methods in Plant breeding and Biotechnology. CAB International, Wallingford p. 50-73.

Hiraoka N, Tomita Y (1990) Botanical and chemical evaluation of *Atractylodes laucea* plants propagated in vitro and by division of the rhizome. Plant Cell Rep. 9:332-334.

Hasegawa T, Koike K, Takehashi S, Ariyoshi U (1982) Constituents of leaves and roots of Kaikei Jio. Shoyakugaku Zasshi 36:1-5 (in Japan).

Hoshino Y, Mii M (1998) Bialaphos stimulates shoot regeneration from hairy roots of snapdragon transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 17:256-261.

Hwang SJ (2005) Growth characteristics and catalpol production in *Rehmannia glutinosa* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. J. Plant Biol. 48:380-386.

Ismailoglu UB, Saracoglu I, Harput US, Sahin-Erdemli I (2002) Effects of phenylpropanoid and irdoid glycosides on free radical induced impairment of endothelium dependent relaxation in rat aortic rings. J. Ethnopharmacol. 79:193-197.

Lee MH, Yoon ES, Jeong JH, Choi YE (2004) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters. Plant Cell Rep. 22:822-827.

Momcilovic I, Grubisic D, Kojic M, Neskovic M (1997) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and plant regeneration of four Gentiana species. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 50:1-6.

Moreno-Valenzuela OA, Galaz-Avalos RM, Minero-Garcia Y, Loyola-Vargas VM (1998) Effect of differnetiation on the regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy roots. Plant Cell Rep. 18:99-100.

Noda T, Tanaka N, Mano Y, Nabeshima S, Ohkawa H, Matsui C (1987) Regeneration of horseradish hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* infection. Plant Cell Rep. 6:283-286.

Ohara A, Akasaka Y, Daimon H, Mii M (2000) Plant regeneration from hairy roots induced by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Crotalaria juncea* L. Plant Cell Rep. 19:563-568.

Okasman-Caldentey KM, Kivela O, Hiltman R (1991) Spontaneous shoot organogenesis and plant regeneration from hairy root cultures of Hyoscyamus muticus. Plant Sci. 78:129-136.

Oshio H, Inouye H (1981) Quantitative analysis of iridoid glucosides of Rehmanniae Radix. Phytochemistry 21:133-138.

Park CH, Seong NS, Kim SK, Paek KY (1999) Characteristics in tissue cultured plants of *Rehmannia glutinosa.* Kor. J. Plant Tiss. Cult. 26:205-210.

Park JH (2000) Plant propagation in bioreactor and acclimatization of shoots in *Rehmannia glutinosa.* PhD Thesis, Seoul National Univ.

Peres LEP, Morgante PG, Vecchi C, Kraus JE, van Sluys MA (2001) Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 65:37-44.

Perez-Molphe-Balch E, Ochoa-Alejo N (1998) Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes* transformed tissues. Plant Cell Rep. 17:591-596.

Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50:199-204.

Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-231.

Tanaka N, Matsumoto T (1993) Regenerants from Ajuga hairy roots with high productivity of 20-hydroxyecdysone. Plant Cell Rep. 13:87-90.

Tanaka N, Yamashita K, Takao M, Matsumoto T (1995b) Clonal propagation of 20-hydroxyecdysone producing plant, *Pfaffia iresinoides*. Plant Tissue Cult. Lett. 12:187-191.

Tepfer D (1984) Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes* : phenotypic consequences and sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell 37:959-967.

Tomoda M, Tanaka M, Komdo N (1971) Water soluble

contituents of *Rehmannia glutinosa* Lib. Chem. Pharm. Bull. 19:2411-2419.

Yoshimatsu K, Shimomura K (1992) Transformation of opium poppy (*Papaver somniferum L.*) with *Agrobacterium rhizogenes* MAFF 03-01724. Plant Cell Rep. 11:132-136.