연구논문

韓資植誌 23(1) : 14~18(2010)
Korean J. Plant Res.

Agrobacterium rhizogenes strains이 배초향 모상근 유도와 Rosmarinic acid 생산에 미치는 영향

김종세[1], 오은정[1], 이숙영[2]*
조선대학교 생물학과[1], 조선대학교 노인구강질환제어연구센터[2]

Influence of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Hairy Root Induction and Rosmarinic Acid Production in *Agastache rugosa* Kuntze

Jong Se Kim[1], Eun Jeong Oh[1] and Sook Young Lee[2]*
[1]Department of Biology
[2]Research Center for Oral Disease Regulation of the Aged, Chosun University, Gwangju, 501-759, Korea

Abstract - Rosmarinic acid, an ester of caffeic acid with 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid, is one of the main active constituents of *Agastache rugosa* Kuntze and has an astringent property, antioxidant capacity, anti-inflammatory activity, antimutagenic ability, antimicrobial capacity, and an antiviral property. Five different strains of *Agrobacterium rhizogenes* differed in their ability to induce Korean mint (*Agastache rugosa* Kuntze) hairy roots and also showed varying effects on the growth and rosmarinic acid production in hairy root cultures. *A. rhizogenes* R1601 is the most effective strain for the induction (72.90%), growth (13.50 g/l) and rosmarinic acid production (22.60 mg/g) in hairy root of Korean mint. Our results demonstrate that use of suitable strains of *A. rhizogenes* may allow study of the regulation of rosmarinic acid biosynthesis in hairy root cultures of *Agastache rugosa*.

Key words - *Agastache rugosa* Kuntze, *Agrobacterium rhizogenes*, Hairy root, Rosmarinic Acid,

서 언

배초향 (*Agastache rugosa* Kuntze)은 꿀풀과 (Labiatae)에 속한 여러해살이풀로 지역마다 부르는 이름이 다르다. 우리나라를 원산지로 추정하고 있으며 중국, 대만, 일본에서도 서식을 한다. 배초향은 우리나라 경상도, 전라도의 일부 지역에서는 깻잎처럼 배초향의 잎을 찌개나 전골을 끓일 때 향신료로 넣기도 하고, 부치거나 튀겨 먹기도 한다. 또한 예로부터 곽향(藿香)이라 부르며 약재로 사용되어 왔으며, 민간요법으로 콜레라나 구토에 처방을 하였으며, 항균, 항암등의 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다 (Hong *et al.*, 2001; Shin and Kang, 2003; Oh *et al.*, 2005).

Rosmarinic acid는 천연 polyphenol 물질의 하나로 주로 꿀풀과 식물에서 많이 존재하며 특히 배초향의 주요 성분 중 하나이다. Rosmarinic acid는 강한 항산화, 항염, 해열, 항균, 항바이러스 등의 효과가 뛰어나고 외국에서는 건강보조식품, 화장품, 식품첨가제 등으로 활용되고 있다 (Parnham and Kesselring, 1985; Ly *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

토양미생물 중 *Agrobacterium rhizogenes*가 식물체에 침입하여 그 토양미생물이 가지고 있는 Ri (Root induction)-플라스미드 (plasmid) 내에 식물호르몬 옥신 (auxin) 생산 관련 유전자가 들어있는 T-DNA가 식물체 염색체에 들어가 발현하면 자발적 병증상의 하나로 잔뿌리가 발생하는데 착안을 하여 기내에서 모상근을 이용하여 식물 유용물질을 생산하고자 하는 연구는 1980년대부터 활발히 진행되어 왔다. 모상근 배양은 본 식물체 보다 더 많은 양의 약리물질을 생산할 수 있으며 빠른 시간 내 물질 생산할 수 있다는

*교신저자(E-mail) : koreanseedbank@gmail.com

장점이 있다. 그리고 물질 생산 및 뿌리 생육의 극대화를 위해 배지 조성 및 물질생산을 촉진 할 수 있는 물질 첨가 등 배양 환경의 최적 조건을 확립하면 기내에서도 효과적으로 유용물질을 연중 생산 할 수 있다 (Hamill *et al.*, 1987; Signs and Flores, 1990; Giri and Narasu, 2000; Guillon *et al.*, 2006).

생명공학 기술을 이용한 rosmarinic acid 생산이 다양한 식물을 대상으로 세포배양이나 모상근 배양법을 통해 시도되었으며 (Petersen and Simmonds, 2003; Park *et al.*, 2008). 배초향에서도 세포배양과 모상근배양법으로 향성분과 rosmarinic acid 생산이 보고되었다 (Kim *et al.*, 2001a; Kim *et al.*, 2001b; Lee *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). 하지만 서로 다른 계통의 *A. rhizogenes*이 배초향의 모상근 유도와 rosmarinic acid 생산에 미치는 영향에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없으며 본 연구는 5 계통의 *A.rhizogenes*를 이용하여 배초향의 모상근 유도 효율성과 rosmarinic acid 생합성에 미치는 영향을 조사해 보고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

배초향 (*Agastache rugosa*) 종자를 70% 에탄올에 1분간 침지하고 다시 2% sodium hypochlorite 용액에 침지 후 10분간 천천히 흔들어주며 종자 소독을 마치고 멸균수로 3회 세척하였다. 7개의 종자를 25 mL의 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고체배지가 든 Petri dishes (100 × 15 mm)에서 배양을 하였다. 배양실 조건은 25°C에 백열등 (35 mol/s/m) 하에서 16시간 광상태로 유지되었다.

토양미생물 배양

모상근 유도를 위해 *Agrobacterium rhizogenes* 13333 ; 15834, R1000, R1200, R1601을 이용하였으며 배양은 Luria-Bertani 액체배지 (1% [w/v] tryptone, 0.5% [w/v] yeast extract, and 1% [w/v] NaCl, pH 7.0)에서 16시간 동안 암상태로 28°C의 진탕배양기에서 180 rpm으로 배양을 하였다. 배양된 박테리아는 원심분리기를 이용하여 1,500 rpm에서 10분간 회전 후 모아진 박테리아를 MS 액체배지로 밀도를 A_{600} = 1.0 이 되게 조절하였다.

모상근 유도와 배양

쪽 종자로 부터 발아하여 7일 정도 자란 유식물체의 잎을 잘라서 토양미생물인 *Agrobacterium rhizogenes* 13333, 15834, R1000, R1200, R1601을 희석한 MS 액체배지에서 약 15분간 공동 배양을 한 후 멸균된 거름종이에서 박테리아를 어느 정도 제거 후 호르몬이 처리되지 않은 MS 고체배지에서 옮긴 후 이틀간 암 상태에서 공동 배양을 하였다. 이틀간 공동 배양 후 멸균수를 이용하여 3회 세척을 하여 박테리아를 제거 후 호르몬이 처리되지 않고 항생제 timentin 200 mg/L이 처리된 MS 고체배지 (MS salts and vitamins, 3% (w/v) sucrose, 200 mg/L timentin and 8 g/L Phytagar)에서 배양을 하였다. 배양 일주일 후 잎에서 모상근이 유도되기 시작하였으며 유도된 모상근은 timentin (항생제)이 처리된 MS 고체배지에서 2주에 한번씩 계대배양을 약 2달간 지속하였으며, 빨리 자라는 모상근을 선발하여 MS 액체배지로 옮겨 배양을 하였다. 모상근 (100 mg) 은 30 mL 의 MS 액체배지가 든 삼각플라스크 (125 mL)에서 암상태로 25°C의 진탕배양기에서 100 rpm으로 2 주간 배양을 하였다. 배양 2주후 수확한 배초향 모상근의 건물중과 rosmarinic acid 함량을 조사하였다.

HPLC를 이용한 Romarinic acid 분석

수확한 모상근은 −80°C에 저장 후 냉동건조를 하여 곱게 마쇄 후 1 g을 70% 메탄올 20 ml 에 침지 후 24시간 동안 25°C에서 2회 반복 추출하였다. 추출물은 진공농충장치를 이용하여 건조후 다시 95% 메탄올에 녹여 분석시료로 사용하였다. 분석기기는 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하였으며 자세한 분석 조건은 Lee 등 (2008)의 방법과 동일하게 수행하였다.

결 과

Agrobacterium rhizogenes 계통이 모상근 유도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 서로 다른 5 계통의 strain (13333, 15834, R1000, R1200, R1601)을 이용하였다. 5 종의 *A. rhizogenes*와 배초향 잎 절편을 2일 간 공동배양 후 *A. rhizogenes*를 제거하기 위하여 항생제 timentine이 처리된 MS 고체배지에서 잎 조직을 배양한 결과 2 주후 모든 처리구에서 잎 조직의 감염 부위로부터 캘러스와 함께 모상근이 유도되기 시작하였다 (Fig. 1-A). 배양 3주후 *A.*

rhizogenes R1601 감염으로부터 발생한 모상근은 약 0.7 cm 정도의 길이 신장을 보였으며 (Fig. 1-B), 5 주후에는 약 2 cm의 길이 신장을 보였다. 하지만 계통에 따른 모상근 유도율과 발생 양상이 다르게 나타났다. 배양 5주후 5종의 *A. rhizogenes* strains이 모상근 유도율에 미치는 영향을 조사한 결과, Table 1에서 처럼 *A. rhizogenes* R1601이 가장높은 72.9%의 모상근 유도율을 보였으며 *A. rhizogenes* R1000도 67.3%로 양호한 유도율을 나타냈으나 *A. rhizogenes* 15834은 32.6%의 모상근 유도율을 보여 5종의 *A. rhizogenes* 중 가장 저조한 모상근 유도율을 보였다.

5종의 *A. rhizogenes* strains이 모상근 유도시 모상근 발생 수와 길이 신장에 미치는 영향을 조사한 결과, *A. rhizogenes* R1601과 R1000으로 감염시킨 잎 조직에서 평균 5.4과 5.1의 배초향 모상근이 발생하였으며, 15834로 감염된 잎 조직에서는 평균 1.8개의 가장 낮은 수의 모상근이 유도되는 것을 관찰하였다. 모상근의 길이 신장 역시 *A. rhizogenes* R1601으로 감염시킨 잎 조직에서 평균 2.0 cm의 길이 신장으로 가장 좋은 결과를 나타냈으며, 15834로 감염된 잎 조직에서는 평균 0.9 cm 의 길이신장을 보여 가장 저조한 결과를 나타내었다 (Table 1).

다섯 계통의 *Agrobacterium rhizogenes*으로 배초향 잎 조직에 감염시켜 유도된 각각의 모상근은 *A. rhizogenes*를 완전히 제거하기 위해 항생제 timentin이 처리된 MS 고체배지에서 2주에 한번씩 계대배양을 약 2달간 지속하였으며, 빨리 자라는 모상근을 선발하여 MS 액체 배지로 옮겨 배양하였다. 5 계통의 다른 *A. rhizogenes* 로부터 유도된 모상근의 생장과 rosmarinic acid 생합성량에 미치는 영향을을 조사하기 위하여 MS 액체배지에서 2주간 배양한 후 건물중과 rosmarinic acid 함량을 측정하였다 (Table 2).

다섯 계통의 *A. rhizogenes*감염으로부터 유도된 각각의 모상근의 생육은 서러 다른 양상을 보였으나 경향은 모상근 유도 결과와 유사하였다. *A. rhizogenes* R1601과 R1000 감염으로 유도된 모상근의 생육은 배양 2주후 건물중을 조사한 결과 13.5와 12.7 g/l로 다른 계통에서 유도된 모상근보다 생육이 양호하였으며 15834 감염으로 유도된 모상근의 건물중은 8.7 g/l로 가장 저조한 생육을 나타냈다. Rosmarinic acid 생산량은 생육량과 비례된 결과를 보였다. 배초향 모상근배양 2 주후 *A. rhizogenes* R1601과 R1000 감염으로 유도된 모상근의 rosmarinic acid 생산량은 22.6과 20.5 mg/g D.W.로 다른 계통에 비하여 높게 나타났으며 15834 감염으로 유도된 모상근의 rosmarinic acid 생산량은 14.3 mg/g D.W.로 가장 낮은 결과를 나타내었다.

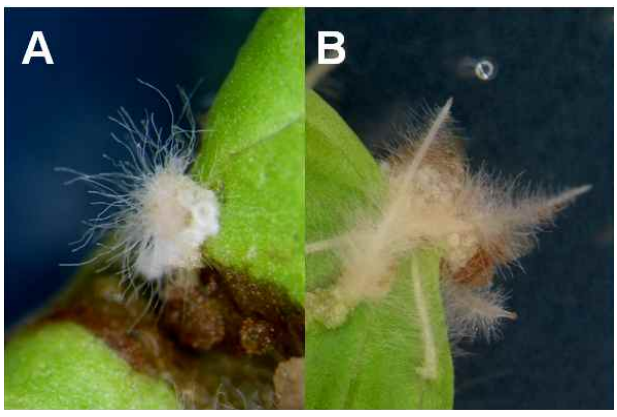

Fig. 1. Development of hairy roots from leaf of *Agastache rugosa*. after inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* strain R1601; Two weeks (A) and three weeks (B) after inoculation.

Table 1. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on the frequency of infection and the growth of hairy root cultures of *Agastache rugosa*

Agrobacterium strains	Infection frequency (%)	No. of hairy roots/Explant	Root length (cm)
13333	52.5 ± 4.5	3.6 ± 0.4	1.1 ± 0.1
15834	32.6 ± 2.8	1.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
R1000	67.3 ± 6.3	5.1 ± 0.5	1.7 ± 0.2
R1200	61.5 ± 4.8	4.3 ± 0.4	1.5 ± 0.2
R1601	72.9 ± 6.7	5.4 ± 0.5	2.0 ± 0.3

Values represent means ± SE values of 50 independent measurements made 5 weeks after bacterial inoculation.

Table 2. Effect of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on growth and rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa*

Agrobacterium strains	Dry weight (g/l)	Rosmarinic acid /D.W. (mg/g)
13333	10.2 ± 1.0	16.9 ± 1.8
15834	8.7 ± 0.9	14.3 ± 1.3
R1000	12.7 ± 1.4	20.5 ± 2.2
R1200	11.8 ± 1.1	17.2 ± 1.5
R1601	13.5 ± 1.5	22.6 ± 2.1

Values represent the mean ± SE of six independent measurements made 2 weeks after liquid culture.

지금까지 결과를 종합해 보면 다섯 계통의 *A. rhizogenes* 이 배초향 모상근 유도, 생장 과 rosmarinic acid생산에 미치는 영향을 조사한 결과 *A. rhizogenes* R1601과 R1000 이 배초향 모상근 유도, 생육과 rosmarinic acid 생산에 가장 좋은 결과를 나타낸 계통이었음을 알 수 있었다.

고 찰

지금까지 여러 종의 박테리아가 고등식물에 유전자를 도입하는 기능을 가진 것으로 보고가 되었다 (Broothaerts *et al.*, 2005). 그 중에서 *A. rhizogenes*는 그램 음성의 토양박테리아의 일종으로 *A. tumefaciens*와 함께 가장 연구가 많이 되고, 또한 식물형질전환에 이용되는 박테리아이다 (Giri and Narasu, 2000; Guillon *et al.*, 2006). *A. rhizogenes* 가 식물체에 침입하면 자발적 병증상의 하나로 모상근이 발생하고 이 모상근을 배양하여 이차대사산물 생산에 활용되어 왔다.

다양한 *A. rhizogenes* 종을 이용하여 동일한 식물체에서 모상근을 유도한 결과 서로 다른 종의 *A. rhizogenes*이 모상근의 유도율이나 생장 및 이차대사산물 생산에 다른 영향을 미친다는 보고가 있다. 이러한 연구결과를 살펴보면 서로 다른 *A. rhizogenes* 가 *Astragalus mongholicus* Bge. 모상근 유도, 생장, 그리고 사포닌과 astragalosides 생산에 영향을 미쳤다는 보고가 있었으며(Ionkova *et al.*, 1997). 그리고 *Hyoscyamus muticus* 와 *H. albus* (*Zehra et al.*, 1999), *Pisum sativum* L. (Nicoll *et al.*, 1995), *Gentiana macrophylla* (Tiwari Brillanceau *et al.*, 2007) 와 같은 식물에서도 다른 종의 *A. rhizogenes*이 모상근의 유도율이나 생장 및 이차대사산물 생산에 다른 영향을 미친다는 보고가 있다.

위의 연구 결과를 통하여 여러 계통의 *A. rhizogenes*이 배초향 모상근 유도, 생장과 rosmarinic acid생산에 서로 다른 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며 그 중 *A. rhizogenes* R1601과 R1000이 배초향 모상근 유도와 생육에 적합한 계통으로 나타났다. 향후 형질전환 모상근을 이용하여 rosmarinic acid 생합성 관련유전자를 도입하여 물질대사를 조절하는 대사공학 (metabolic engineering) 연구에 *A. rhizogenes* R1601나 R1000을 활용하면 적합할 것으로 판단된다.

적 요

Agrobacterium rhizogenes 계통이 모상근 유도, 생장과 rosmarinic acid 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 5계통의 strain (13333, 15834, R1000, R1200, R1601)을 이용하여 조사한 결과 *A. rhizogenes* R1601이 가장 높은 72.9%의 모상근 유도율을 보였다. 모상근 유도시 모상근 발생 수와 길이 신장에 미치는 영향을 조사한 결과도 *A. rhizogenes* R1601으로 감염시킨 잎 조직에서 평균 5.4개의 모상근이 발생하였으며, 평균 2.0 cm의 길이 신장으로 가장 좋은 결과를 나타냈다.

다섯 계통의 *A. rhizogenes*감염으로부터 유도된 각각의 모상근의 생육은 서러 다른 양상을 보였으나 경향은 모상근유도 결과와 유사하였다. *A. rhizogenes* R1601 감염으로 유도된 모상근의 생육은 배양 2주후 건물중을 조사한 결과 13.5 g/l로 다른 계통에서 유도된 모상근 보다 생육이 양호하였으며, Rosmarinic acid 생산량도 22.6 mg/g D.W. 로 다른 계통에 비하여 가장 높게 나타났다. *A. rhizogenes* R1601이 배초향 모상근 유도, 생육과 rosmarinic acid 생산에 가장 좋은 적합한 계통이었음을 알 수 있었다.

사 사

이 논문은 2007년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음

인용문헌

Broothaerts, W., H.J. Mitchell, B. Weir, S. Kaines, L.M.A. Smith, W. Yang, J.M. Mayer, C. Roa-Rodriguez and R.A. Jefferson. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. Nature. 433:629-633.

Giri, A. and M.J. Narasu. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology Advances. 18:1-22.

Guillon, S., J. Tremouillaux-Guiller, P.K. Pati, M. Rideau and P. Gantet. 2006. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. Trends Biotechnol. 24:403-409.

Hamill, J.D., A.J. Parr, M.J.C. Rhodes, R.J. Robins and N.J. Walton. 1987. New routes to plant secondary products. Biotechnology. 5:800-804.

Hong, J.H., J.H. Choi, S.R. Oh, H.K. Lee, J.H. Park, K.Y. Lee,

J.J. Kim, T.S. Jeong and G.T. Oh. 2001. Inhibition of cytokine -induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa*. FEBS Lett. 495:142-147.

Ionkova, I., T. Kartnig and W. Alfermann. 1997. Cycloartane saponin production in hairy root cultures of *Astragalus mongholicus*. Phytochemistry. 45:1597-1600.

Kim, H.K., S.R. Oh, H.K. Lee and H Huh. 2001a. Benzothiadiazole enhances the elicitation of rosmarinic acid production in a suspension culture of *Agastache rugosa* O.Kuntze. Biotechnology Letters. 23:55-60.

Kim, T.H., J.H. Shin, H.H. Baek and H.J. Lee. 2001b. Volatile flavour compounds in suspension culture of *Agastache rugosa* Kuntze (Korean mint). Journal of the science of food and agriculture. 81:569-575.

Lee, J., Y.S. Kim and D. Park. 2007. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. Biochem Pharmacol. 74:960-968.

Lee, S.Y., H. Xu, Y.K. Kim and S.U. Park. 2008. Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24:969-972.

Ly T.N., M. Shimoyamada and R. Yamauchi. 2006. Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity. J Agric Food Chem. 54:3786-3793.

Moreno, S., T. Scheyer, C.S. Romano and A.A. Vojnov. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free Radic Res. 40: 223-231.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15:473-497.

Nicoll, S.M., L.A. Brigham, F.S. Wen and M.C. Hawes. 1995. Expression of transferred genes during hairy root development in pea. Plant Cell Tissue Organ Cult. 42:57-66.

Oh, H.M., Y.J. Kang, S.H. Kim, Y.S. Lee, M.K. Park, J.M. Heo, J. Sun, H.J. Kim, E.S. Kang, H.J. Kim, H.G. Seo, J.H. Lee, H.S. Yun-Choi and K.C. Chang. 2005. *Agastache rugosaleaf* extract inhibits the iNOS expression in ROS 17/2.8 cells activated with TNF-alpha and IL-1beta. Arch Pharm Res. 28:305-310.

Park, S.U., M.R. Uddin, H. Xu, Y.K. Kim and S.Y. Lee. 2008. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. African Journal of Biotechnology. 7:4959-4965.

Parnham, M.J. and K. Kesselring. 1985. Rosmarinic acid. Drugs of the Future. 10:756-757.

Petersen, M., M.S.J. Simmonds. 2003. Rosmarinic acid. Phytochemistry. 62:121-125.

Shin, S. and C.A. Kang. 2003. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. Lett. Appl. Microbiol. 36:111-115.

Signs, M. and H. Flores. 1990. The biosynthetic potential of plant roots. Bioessays. 12:7-13.

Tiwari, R.K., M. Trivedi, Z.C. Guang, G.Q. Guo and G.C. Zheng. 2007. Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*:growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. Plant Cell Rep. 26:199-210.

Xu, H., Y.K. Kim, X. Jin, S.Y. Lee and S.U. Park. 2008. Rosmarinic Acid Biosynthesis in Callus and Cell Cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. Journal of Medicinal Plants Research. 2:237-241.

Zehra, M., S. Banerjee, S. Sharma. and S. Kumar. 1999. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* strains on biomass and alkaloid productivity in hairy root lines of *Hyoscyamus muticus* and *H. albus*. Planta Med. 65:60-63.

(접수일 2009.10.7; 수락일 2010.1.21)