

Polyamine이 쪽 모상근배양에서 인디고 생합성에 미치는 영향

김진만* · 장홍기** · 박상언***† · 류화원*‡

*전남대학교 응용화학공학부, **(주)세노코, ***충남대학교 식물자원학부

Effect of Polyamines on Indigo Biosynthesis in Hairy Root Cultures of *Polygonum tinctorium* Lour.

Jin-Nam Kim*, Hong-Gi Jang**, Sang-Un Park***†, and Hwa-Won Ryu*‡

*School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

**SENOCO Co. 322-1 Dongsoo-Dong, Naju, Chonnam 520-714, Korea

***Division of Plant Science and Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-754, Korea

ABSTRACT We herein studied the effect of polyamines (putrescine, spermidine and spermine) on growth and indigo biosynthesis in hairy root cultures of *Polygonum tinctorium* Lour. Our results revealed that polyamine treatment increased hairy root growth and indigo biosynthesis at all tested concentrations, with the highest growth rate (4.4 g/flask) and indigo yield (216 ug/g) induced by 70 mg/L putrescine. These results show for the first time that the growth rates and indigo biosynthesis of *Polygonum tinctorium* hairy roots may be improved by addition of polyamines to the liquid culture medium.

Keywords : *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root culture, indigo, polyamine, *Polygonum tinctorium* Lour.

쪽(*Polygonum tinctorium* Lour.)은 마디풀과(여귀과)에 속하는 1년생 초본으로 원산지는 아시아의 온대지방, 중국과 인도차이나로서 중요 염료작물 중 하나이다. 최근 천연 염색에 대한 관심의 증가와 제품의 수요증대로 국내에서는 전남과 경남 지역에서 그 재배가 늘어가고 있다.

식물 전체를 염료 추출에 이용하지만 특히 잎에서 indican(indoxyl-3-β-glucoside)이 산화반응으로 indigo와 indirubin을 생산하며 indigo는 오래전부터 천연 염료로 이용되어 왔으며 최근 indirubin은 항암효과가 있다고 보고되었다(Fox & Pierce, 1990; Kohda *et al.*, 1990; Xia & Zenk, 1992; Hoessel *et al.*, 1999).

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 자발적으로 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 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(Petit *et al.*, 1983; Hamill *et al.*, 1987; Parr & Hamill, 1987; Guillon *et al.*, 2006).

쪽의 모상근에 관한 연구는 모상근유도 후 배지조성이나 elicitor 처리를 통하여 기내에서 indigo 생산에 관한 연구를 보고된 바 있다(Chae *et al.*, 2000). 하지만 쪽 모상근을 이용하여 배양시 생리적인 측면에서 뿌리의 성장과 indigo 생합성에 관련된 연구는 보고된바가 없다.

본 연구는 뿌리생장을 촉진시키는 기능을 가지고 있는 polyamine을 이용하여 쪽 모상근 배양에 처리하여 뿌리의 성장과 indigo 생합을 조사하여 보고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

쪽(*Polygonum tinctorium* Lour.) 종자를 70% 에탄올에 1분간 침지하고 다시 2% sodium hypochlorite 용액에 침지

†Corresponding author: (Phone) +82-42-821-5730
(E-mail) supark@cnu.ac.kr

‡Corresponding author: (Phone) +82-62-530-1849
(E-mail) hwryu@chonnam.ac.kr

후 10분간 천천히 흔들어주며 종자 소독을 마치고 멸균수로 3회 세척하였다. 약 7개의 종자를 25 mL의 MS(Murashige & Skoog, 1962) 고체배지가 든 Petri dishes(100×15 mm)에서 배양을 하였다. 배양실 조건은 25°C에 백열등 하에서 16 시간 광상태로 유지되었다.

토양미생물 배양

모상근 유도를 위해 *Agrobacterium rhizogenes* R1000을 이용하였으며 배양은 Luria-Bertani 액체배지(1% [w v⁻¹] tryptone, 0.5% [w v⁻¹] yeast extract, and 1% [w v⁻¹] 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 A₆₀₀=1.0이 되게 조절하였다.

모상근 유도

쪽 종자로부터 발아하여 7일 정도 자란 유식물체의 자엽을 잘라서 토양미생물인 *Agrobacterium rhizogenes* R1000을 희석한 MS 액체배지에서 약 15분간 공동 배양을 한 후 멸균된 거름종이에서 박테리아를 어느 정도 제거 후 호르몬이 처리되지 않은 MS 고체배지에서 옮겨 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/l과 kanamycin 50 mg/l이 처리된 MS 고체배지(MS salts and vitamins, 3%(w v⁻¹) sucrose, 200 mg L⁻¹ timentin and 8 g L⁻¹ Phytagar)에서 배양을 하였다. 배양 일주일 후 자엽에서 모상근이 유도되기 시작하였으며 유도된 모상근은 timentin(항생제)이 처리된 MS 고체배지에서 2주에 한번씩 계대배양을 약 2달간 지속하였으며, 빨리 자라는 모상근을 선발하여 MS 액체 배지로 옮겨 배양을 하였다. 모상근(100 mg)은 30 mL의 MS 액체배지가 든 삼각플라스크(125 mL)에서 암상태로 25°C의 진탕배양기에서 100 rpm으로 2주간 배양을 하였다.

polyamine처리에 따른 쪽 모상근의 성장과 인디고 생합성량을 조사하기 위하여 putrescine, spermidine, spermine (0, 10, 40, 70, 100 mg/L)를 MS 액체배지에 처리를 하였다. polyamines이 처리된 배지에 100 mg의 모상근을 접종하여 진탕배양기에서(27°C, 100 rpm) 2주간 배양한 후 생체중과 인디고함량을 측정하였다.

Indigo 분석

쪽 모상근을 냉동 건조하여 마쇄하고, chloroform으로 3

시간 동안 진탕하여 indigo를 추출하였다. 이를 감압농축하여 HPLC로 정량을 하였다. 자세한 분석 방법은 Chae 등 (2000)이 발표한 논문을 참조하였다.

결과 및 고찰

모상근 유도 및 배양

모상근 유도를 위하여 토양미생물인 *Agrobacterium rhizogenes* R1000을 이용하였다. 토양미생물과 공동배양 후 항생제(timentin)이 처리된 MS 고체배지에서 자엽을 배양한 결과 10일 후 모든 처리구의 자엽에서 모상근이 유도되기 시작하였다.

유도된 모상근은 항생제가 처리된 MS 고체배지에서 2주에 한번씩 계대배양을 약 2달간 지속하였으며, 빨리 자라는 모상근을 선발하여 MS 액체 배지로 옮겨 배양하였다.

Polyamines이 모상근 성장과 인디고 생합성에 미치는 영향

polyamines이 쪽 모상근의 성장과 인디고 생합성량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 putrescine, spermidine, spermine(0, 10, 40, 70, 100 mg/l)를 MS 액체배지에 처리를 하였다. 2주간 배양한 후 생체중과 인디고함량을 측정하였다. 배양 2주후 쪽 모상근의 생체중을 조사한 결과 Table 1에서 처럼 putrescine, spermidine, spermine 모든 처리에서 성장

Table 1. Effect of polyamines on growth and indigo biosynthesis in hairy root cultures of *Polygonum tinctorium* after 2 weeks in culture. Value present the mean±SE.

Polyamines (mg/L)	Fresh Weight (g/flask)	indigo (ug/g)
0	2.7±0.2	160.1±11.6
Putrescine	10	173.4±16.9
	40	196.7±21.2
	70	216.3±25.3
	100	209.9±19.7
Spermidine	10	168.5±15.6
	40	171.1±18.4
	70	189.5±19.8
	100	180.8±16.3
Spermine	10	175.1±18.6
	40	183.6±19.4
	70	207.2±22.1
	100	196.7±18.8

이 증가한 것을 알 수 있었다. 3가지 polyamine 중 putrescine이 spermidine이나 spermine 처리에 비하여 비교적 생장을 촉진시키는 효과가 큰 것으로 나타났다. 특히 모상근의 생육은 모든 처리에서 putrescine 70 mg/l 처리가 4.4 g/flask로 가장 좋았다. spermidine은 100 mg/l과 spermine은 70 mg/l에서 쪽 모상근의 생육이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 저농도 처리(10 mg/l)처리에는 3가지 polyamine 모두 약간의 생장 촉진 효과를 보였다.

Indigo 함량을 조사한 결과 모상근 생장과 같이 모든 polyamine 처리에서 증가한 것을 알 수 있었다. putrescine이 spermidine이나 spermine 처리에 비하여 각각의 농도별 처리에서 인디고 생합성량이 높았다. Putrescine 70 mg/l 처리에서 216.3 ug/g로 가장 높은 indigo 생합성량을 나타내었다. Spermidine과 spermine도 70 mg/l 처리에서 가장 높은 인디고 생합성량을 보였다. 그래서 쪽 모상근의 인디고 생합성은 polyamine 중 putrescine 가장 효과적이었으며, 70 mg/l 처리가 가장 적합한 농도임을 알 수 있었다.

Polyamine은 기능이 알려지지 않은 몇 개의 식물생장조절물질 중의 하나이며 이들은 2개 이상의 amine group을 가지고 있는 화합물을 총칭하는 것으로 식물, 동물 그리고 미생물 등 거의 모든 생명체에 존재하고 있다. Putrescine, Spermidine, Spermine이 대표적인 polyamine의 종류이며 Mg^{2+} 와 함께 세포내의 양전하의 대부분을 담당하고 있다. 식물에서는 polyamine은 세포분열을 촉진하고 식물 생육과 발달에 관여하는 것으로 보고되었다(Kakkar & Sawhney, 2002).

다른 작물의 모상근 배양에서 polyamine 처리를 통한 모상근의 생육과 이차대사산물의 생합성에 관한 연구 결과가 보고되었다. Putrescine이 chicory 모상근 배양에서 coumarin 계통의 2 물질인, esculetin과 esculin 생합성과 모상근의 생육을 촉진하는 것으로 나타났다(Bais *et al.*, 1999; Bais & Ravishankar, 2003). 동일한 연구진이 3가지의 polyamines (putrescine, spermidine, spermine)을 chicory 모상근 배양에서 처리하여 coumarin 생합성과 모상근의 생육을 조사한 결과 putrescine 처리가 가장 효과적인 것으로 나타났다(Bais *et al.*, 2004). Suresh *et al.*(2004)은 polyamine처리를 통하여 red beet 모상근 배양에서 betalaine 색소의 생합성량 증가와 모상근의 생육 촉진효과를 보고하였다. 이러한 연구 결과들은 본 연구 결과와 유사함을 알 수 있었다.

위의 연구 결과를 정리하여 보면 polyamine이 뿌리의 발육에 영향을 미치며 특히 뿌리의 생육을 촉진시키며 putre-

scine이 다른 polyamine에 비하여 더 효과적임을 알 수 있었고, 또한 이차대사산물 생합성에도 영향을 미치는 것을 나타냈다. 이러한 결과를 이용하여 다른 작물에서 polyamine의 생리적 기초연구에 활용 할 수 있을 것으로 예상된다.

적 요

본 연구는 polyamine이 쪽 모상근 배양에서 뿌리의 생장과 indigo 생합성에 미치는 영향을 조사하였다.

1. 토양미생물인 *Agrobacterium rhizogenes* R1000을 이용하여 쪽 자엽으로부터 모상근을 효과적으로 유도하여 배양하였다.
2. 모상근 생장과 인디고 생합성이 polyamines(putrescine, spermidine, spermine) 처리에 의하여 향상되었으며, 그 중 putrescine이 다른 polyamines에 비하여 효과적이었다.
3. Putrescine 70 mg/l 처리가 모상근의 생육(4.4 g/flask)과 인디고 생합성(216.3 ug/g)의 향상에 최적조건으로 조사되었다.

사 사

이 논문은 산업자원부 한국산업기술재단 지역전략산업 석.박사 연구인력 양성사업에 의해 수행된 결과의 일부 임.

인용문헌

- Bais, H. P., G. Sudha, and G. A. Ravishankar. 1999. Putrescine influences growth and production of coumarins in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local). *Journal of Plant Growth Regulation*. 18 : 159-165.
- Bais, H. P., and G. A. Ravishankar. 2003. Synergistic effect of auxins and polyamines in hairy roots of *Cichorium intybus* L. during growth, coumarin production and morphogenesis. *Acta physiologiae plantarum* 25 : 33-37.
- Bais, H. P., J. George, and G. A. Ravishankar. 2004. Influence of polyamines on growth of hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local) and formation of coumarins. *Journal of Plant Growth Regulation*. 18 : 33-37.
- Chae, Y. A., H. S. Yu, J. S. Song, H. K. Chun, and S. U. Park. 2000. Indigo production in hairy root cultures of *Polygonum tinctorium* Lour. *Biotechnology Letters* 22 : 1521-1525.
- Fox M. R., and J. H. Pierce. 1990. Indigo: past and present. *Textile Chemist and Colorist*. 22 : 13-15.
- Guillon, S., J. Trémouillaux-Guiller, P. K. Pati, M. Rideau,

- and P. Gantet. 2006. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr Opin Plant Biol.* 9 : 341-346.
- 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.
- Hoessel R., S. Leclerc, J. A. Endicott, M. E. Nobel, A. Lawrie, P. Tunnah , M. Leost, E. Damiens, D. Marie, D. Marko, E. Niederberger, W. Tang, G. Eisenbrand, and L. Meijer. 1999. Indirubin, the active constituent of a Chinese anti-leukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol.* 1 : 60-67.
- Kakkar, R. K. and V. K. Sawhney. 2002. Polyamine research in plant - a changing perspective. *Physiologia Plantarum.* 116 : 281-292.
- Kohda, H., A. Niwa, Y. Nakamoto, and O. Takeda. 1990. Flavonoid glucosides from *Polygonum tinctorium*. *Chem. and Pharma. Bull.* 38 : 523-524.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- Parr, A. J., and J. D. Hamill. 1987. Relationship between *Agrobacterium* rhizogenestransformed hairy roots and intact uninfected *Nicotiana* plants. *Phytochemistry* 26 : 3241-3245.
- Petit, A., C. David, G. A. Dahl, J. G. Ellis, P. Guyon, F. Casse-Delbart, and J. Tempe. 1983. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.* 190 : 204-214.
- Suresh, B., R. Thimmaraju, N. Bhagyalakshmi, and G. A. Ravishankar. 2004. Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments. *Process biochemistry* 39 : 2091-2096.
- Xia, Z. Q., and M. H. Zenk. 1992. Biosynthesis of indigo precursors in higher plants. *Phytochemistry* 31 : 2695-2697.