

Agrobacterium rhizogenes strains이 황금 모상근 유도 및 생육에 미치는 영향

박우태¹ · 김영선¹ · 박남일¹ · 김행훈² · 이숙영³ · 박상언^{1*}

¹충남대학교 응용식물학과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터, ³조선대학교 치과병원 의료기기 임상시험센터

Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on hairy root induction and growth in *Scutellaria baicalensis*

Woo Tae Park¹, Young Seon Kim¹, Nam Il Park¹, Haeng Hoon Kim², Sook Young Lee³, Sang Un Park^{1*}

¹Department of Crop Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-857, Korea

³Chosun University Dental Hospital, 375 Susuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea

Received on 17 March 2011, revised on 7 April 2011, accepted on 20 June 2011

Abstract : *Agrobacterium rhizogenes*, a gram-negative soil bacterium, is one of the most widely studied among them. *A. rhizogenes* can transfer T-DNA, excised from Ri (root inducing)-plasmids from the bacterial to the plant cell. It is the causal agent of 'hairy root' diseases in plants, and has been used for the production of hairy root cultures from a multitude of species. Five different strains of *Agrobacterium rhizogenes* differed in their ability to induce *Scutellaria baicalensis* hairy roots and also showed varying effects on the growth in hairy root cultures. *A. rhizogenes* R1000 is the most effective strain for the induction (57.3%) and growth (11.9 g L⁻¹) in hairy root of *Scutellaria baicalensis*. Our results demonstrate that use of suitable strains of *A. rhizogenes* may allow study of the regulation of flavone biosynthesis in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*.

Key words : *Agrobacterium rhizogenes*, Hairy root, *Scutellaria baicalensis*, Strains

I. 서론

황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 뿌리는 주로 심혈관 장애에 약초치료제로서 주로 이용되어 왔다(Huang 등, 2005). 중국의 전통한방에서는 염증, 호흡기 감염, 설사, 이질, 간 장애, 고혈압, 출혈, 그리고 불면증 등을 치료하는데 사용되어져 왔다(Li 등, 2000, Nishikawa 등, 1999). 플라본과 같은 플라보노이드는 생약재의 주요 성분이다. 황금에서의 baicalin, baicalein, wogonin과 같은 플라본(Fig. 1)은 항염증(Chi 등, 2001, Lee 등, 2003), 항산화(Shieh 등, 2000), 항암(Chung 등, 2008, Lee 등, 2008, Liu 등, 2007, Lu 등, 2008, Parajuli 등, 2009, Wang 등, 2006) 등과 같은 주요 약리성분을 지니고 있다.

위와 같은 결과로 미루어 볼 때, 플라본은 항암치료제나 화학요법의 보조약으로 사용될 수 있을 것이다(Li-Weber 2009).

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 발생하는 것에 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 효과적으

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5730

E-mail address: supark@cnu.ac.kr

로 유용물질을 연중 생산 할 수 있다(Hamill 등, 1987; Signs and Flores 1990).

*Agrobacterium rhizogenes*을 매개로 한 형질전환은 황금 같은 식물을 빠르고 다용도로 유전공학적으로 변형시킬 수 있는 방법이다(Kovács 등, 2004, Kuzovkina 등, 2001, Kuzovkina 등, 2005). 형질전환식물체를 얻는데 4-6개월 가량이 소요되는 *A. tumefaciens*을 이용한 형질전환과는 달리, *A. rhizogenes*을 이용해서 형질전환된 모상근을 불과 몇 주안에 얻을 수 있다(Georgiev 등, 2007; Srivastava and Srivastava, 2007). 하지만 서로 다른 계통의 *Agrobacterium rhizogenes*이 황금의 모상근 유도에 미치는 영향에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없으며 본 연구는 5 계통의 *Agrobacterium rhizogenes*를 이용하여 황금의 모상근 유도 효율성에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi) 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 & Skoog, 1962) 고체배지가 든 petri dishes (100 × 15 mm)에서 배양을 하였다. 배양실 조건은 25°C에 백열등 하에서 16시간 광상태로 유지되었다.

2. 토양미생물 배양

모상근 유도를 위해 5종의 *Agrobacterium rhizogenes* (13333, 15834, R1000, R1200, R1601)을 이용하였으며 배양은 Luria-Bertani 액체배지(1% [w v⁻¹] tryptone, 0.5% [w v⁻¹] yeast extract, 1% [w v⁻¹] NaCl, pH 7.0)에서 16시간 동안 암상태로 28°C의 진탕배양기에서 180 rpm으로 배양을 하였다. 배양된 박테리아는 1,500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 모아진 박테리아를 MS 액체배지로 밀도를 A₆₀₀ = 1.0 이 되게 조절하였다.

3. 모상근 유도와 배양

황금 종자로 부터 발아하여 30일 정도 자란 유식물체의 줄기를 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 L⁻¹이 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 앞에서 모상근이 유도되기 시작하였으며 유도된 모상근은 Timentin(항생제)이 처리된 MS 고체배지에서 2주에 한 번씩 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 2 주간 배양을 하였다. 배양 2주후 수확한 황금 모상근의 건물중을 조사하였다.

III. 결과

Agrobacterium rhizogenes 계통이 모상근 유도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 서로 다른 5 계통의 strain (13333, 15834, R1000, R1200, R1601)을 이용하였다. 5종의 *A. rhizogenes*와 황금 줄기 절편을 2일 간 공동배양 후 *A. rhizogenes*를 제거하기 위하여 항생제 Timentin이 처리된 MS 고체배지에서 줄기 조직을 배양한 결과 4주후 모든 처리구에서 줄기 조직의 감염 부위로부터 모상근이 유도되기 시작하였다. 하지만 계통에 따른 모상근 유도율과 발생 양상이 다르게 나타났다. 배양 6주후 5종의 *A. rhizogenes* strains이 모상근 유도율에 미치는 영향을 조사한 결과, *A. rhizogenes* R1000이 가장높은 57.3%의 모상근 유도율을 보였으며 *A. rhizogenes* R1601도 52.9%로 양호한 유도율을 나타냈으나 *A. rhizogenes* 15834은 21.3%의 모상근 유도율을 보여 5종의 *A. rhizogenes* 중 가장 저조한 모상근 유도율을 보였다(Fig. 1).

5종의 *A. rhizogenes* strains이 모상근 유도시 모상근 발생 수와 길이 신장에 미치는 영향을 조사한 결과, *A. rhizogenes* R1000과 R1601으로 감염시킨 잎 조직에서 평균 4.1과 3.9 개의 황금 모상근이 발생하였으며, 15834로 감염된 잎 조직에서는 평균 1.3개의 가장 낮은 수의 모상근이 유도되는 것을 관찰하였다. 모상근의 길이 신장 역시

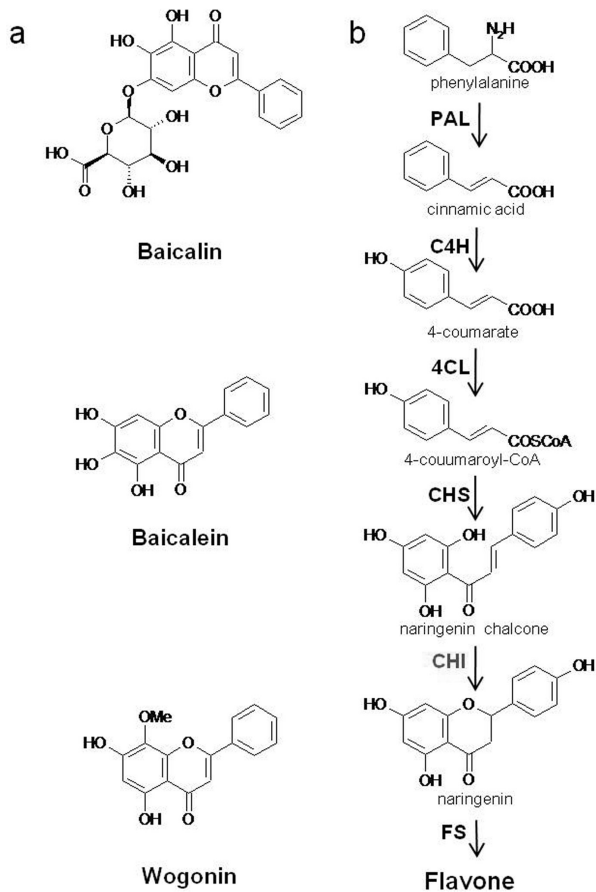


Fig. 1. The biosynthetic pathway of flavones. (a) Structure of baicalein, baicalin, and wogonin. (b) Flavones found in *S. baicalensis*; cDNAs have been isolated for those indicated in red. PAL, phenylalanine ammonia lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate:CoA-ligase; CHS, chalcone synthase; FS, flavone synthase.

A. rhizogenes R1000으로 감염시킨 잎 조직에서 평균 2.3 cm의 길이 신장으로 가장 좋은 결과를 나타냈으며, 15834로 감염된 잎 조직에서는 평균 1.3 cm의 길이신장을 보여 가장 저조한 결과를 나타내었다(Fig. 2).

다섯 계통의 *A. rhizogenes*으로 황금 줄기조직에 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 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 SH 액체배지에서 2주간 배양한 후 건물중을 측정하였다(Table 1).

다섯 계통의 *A. rhizogenes*감염으로부터 유도된 각각의 모상근의 생육은 서로 다른 양상을 보였으나 경향은 모상

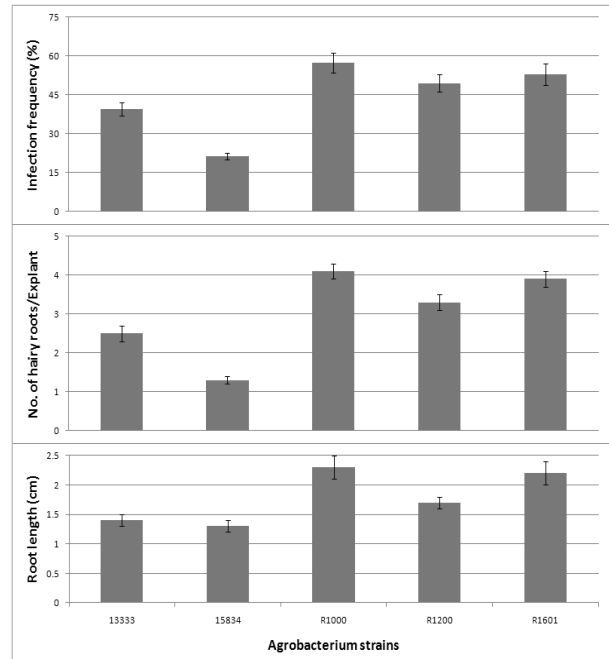


Fig. 2. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on the frequency of infection and the growth of hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. Values represent means±SE values of 50 independent measurements made 6 weeks after bacterial inoculation.

Table 1. Effect of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on growth in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*.

Agrobacterium strains	Dry weight (g L ⁻¹)
13333	9.8 ± 0.7
15834	8.4 ± 0.6
R1000	11.9 ± 0.9
R1200	10.3 ± 0.8
R1601	11.5 ± 1.0

근유도 결과와 유사하였다. *A. rhizogenes* R1000과 R1601 감염으로 유도된 모상근의 생육은 배양 3주후 건물중을 조사한 결과 11.9와 11.5 g L⁻¹로 다른 계통에서 유도된 모상근 보다 생육이 양호하였으며 15834 감염으로 유도된 모상근의 건물중은 8.4 g L⁻¹로 가장 저조한 생육을 나타냈다. 지금까지 결과를 종합해 보면 다섯 계통의 *A. rhizogenes* 이 황금 모상근 유도, 생장에 미치는 영향을 조사한 결과 *A. rhizogenes* R1000과 R1601이 배초향 모상근 유도과 생육에 좋은 결과를 나타낸 계통이었음을 알 수 있었다.

지금까지 여러 종의 *Agrobacterium*이 고등식물에 플라스미드의 T-DNA를 도입하는 기능을 가진 것으로 보고가 되었다(Broothaerts 등, 2005). 그 중에서 *Agrobacterium*

*rhizogenes*는 그램 음성의 토양박테리아의 일종으로 *Agrobacterium tumefaciens*와 함께 가장 연구가 많이 되고, 또한 식물형질전환에 가장 많이 이용되는 토양박테리아 중 하나이다. 일반적으로 *A. tumefaciens*와 *A. rhizogenes*가 식물체에 침입하면 자발적 병증상의 하나로 크라운골이라는 흑과 모상근이 발생하고, 특히 *A. rhizogenes*의 감염으로 발생한 모상근은 기내배양을 통하여 이차대사산물 생산에 활용되어 왔다(Giri and Narasu 2000; Guillon 등, 2006).

다양한 *A. rhizogenes* 계통을 이용하여 동일한 식물체에서 모상근을 유도한 결과 서로 다른 계통의 *A. rhizogenes*이 모상근의 유도율이나 생장 및 이차대사산물 생산에 다른 영향을 미친다는 여러 보고가 있다. 이러한 연구 보고를 살펴보면 서로 다른 *A. rhizogenes*가 *Astragalus mongholicus* Bge.(Ionkova 등, 1997), *Hyoscyamus muticus*와 *H. albus*(Zehra 등, 1999), *Pisum sativum* L.(Nicoll 등, 1995), *Gentiana macrophylla*(Tiwari Brillanceau 등, 2007)와 같은 식물에서도 모상근의 유도율이나 생장 및 이차대사산물 생산에 다른 영향을 미친다는 보고가 있다.

위의 연구 결과를 통하여 여러 계통의 *A. rhizogenes*이 황금 모상근 유도과 생장에 서로 다른 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며 그 중 *A. rhizogenes* R1000과 R1601이 황금 모상근 유도과 생육에 적합한 계통으로 나타났다. 향후 형질전환 모상근을 이용하여 flavone 생합성 관련유전자를 도입하여 물질대사를 조절하는 대사공학(metabolic engineering) 연구에 *A. rhizogenes* R1000나 R1601을 활용하면 적합할 것으로 판단된다.

IV. 결론

Agrobacterium rhizogenes 계통이 모상근 유도과 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 5 계통의 *Agrobacterium rhizogenes*(13333, 15834, R1000, R1200, R1601)을 이용하여 조사한 결과 *A. rhizogenes* R1000이 가장 높은 57.3%의 모상근유도율을 보였다. 모상근 유도시 모상근 발생 수와 길이 신장에 미치는 영향을 조사한 결과도 *A. rhizogenes* R1000으로 감염시킨 잎 조직에서 평균 4.1개의 모상근이 발생하였으며, 평균 2.3 cm의 길이 신장으로 가장 좋은 결과를 나타냈다.

다섯 계통의 *A. rhizogenes*감염으로부터 유도된 각각의

모상근의 생육은 서로 다른 양상을 보였으나 경향은 모상근유도 결과와 유사하였다. *A. rhizogenes* R1000 감염으로 유도된 모상근의 생육은 배양 3주후 건물중을 조사한 결과 11.9 g L⁻¹로 다른 계통에서 유도된 모상근 보다 생육이 양호하였다. *A. rhizogenes* R1000이 황금 모상근 유도와 생육에 가장 좋은 적합한 계통이었음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 2009년도 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

참고 문헌

- Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LMA, Yang W, Mayer JM, Roa-Rodriguez C, Jefferson RA. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433: 629-633.
- Chi YS, Cheon BS, Kim HP. 2001. Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1195-1203.
- Chung H, Jung YM, Shin DH, Lee JY, Oh MY, Kim HJ, Jang KS, Jeon SJ, Son KH, Kong G. 2008. Anticancer effects of wogonin in both estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines *in vitro* and in nude mice xenografts. *Int. J. Cancer* 122: 816-822.
- Giri A, Narasu MJ. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18: 1-22.
- Guillon S, Tremouillaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P. 2006. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends Biotechnol.* 24: 403-409.
- Hamill JD, Parr AJ, Rhodes MJC, Robins RJ, Walton NJ. 1987. New routes to plant secondary products. *Biotechnology* 5: 800-804.
- Huang Y, Tsang SY, Yao X, Chen ZY. 2005. Biological properties of baicalein in cardiovascular system. *Curr. Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 5: 177-184.
- Ionkova I, Kartnig T, Alfermann W. 1997. Cycloartane saponin production in hairy root cultures of *Astragalus mongholicus*. *Phytochemistry* 45: 1597-1600.
- Kovács G, Kuzovkina IN, Szoke É, Kursinszki L. 2004. HPLC determination of flavonoids in hairy-root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Chromatographia* 60: S81-85.
- Kuzovkina IN, Guseva AV, Alterman IE, Karnachuk RA. 2001. Flavonoid production in transformed *Scutellaria baicalensis* roots and ways of its regulation. *Russ J Plant Physiol.* 48: 448-452.

- Kuzovkina IN, Guseva AV, Kovács D, Szöke É, Vdovitchenko MY. 2005. Flavones in genetically transformed *Scutellaria baicalensis* roots and induction of their synthesis by elicitation with methyl jasmonate. *Russ J. Plant Physiol.* 52: 77-82.
- Lee DH, Kim C, Zhang L, Lee YJ. 2008. Role of p53, PUMA, and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 75: 2020-2033.
- Lee H, Kim YO, Kim H, Kim SY, Noh HS, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Suk K. 2003. Flavonoid wogonin from medicinal herb is neuroprotective by inhibiting inflammatory activation of microglia. *FASEB J.* 17: 1943-1944.
- Li H, Murch S, Saxena P. 2000. Thidiazuron-induced *de novo* shoot organogenesis on seedlings, etiolated hypocotyls and stem segments of Huang-qin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 169-173.
- Liu S, Zhang J, Li D, Liu W, Luo X, Zhang R, Li L, Zhao J. 2007. Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. *Nat Prod Res: Formerly Nat. Prod. Lett.* 21: 915-922.
- Li-Weber M. 2009. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat Rev.* 35: 57-68.
- Lu N, Gao Y, Ling Y, Chen Y, Yang Y, Gu HY, Qi Q, Liu W, Wang XT, You QD, Guo QL. 2008. Wogonin suppresses tumor growth *in vivo* and VEGF-induced angiogenesis through inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR2. *Life Sci.* 82: 956-963.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Nicoll SM, Brigham LA, Wen FS, Hawes MC. 1995. Expression of transferred genes during hairy root development in pea. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 42: 57-66.
- Nishikawa K, Furukawa H, Fujioka T, Fujii H, Mihashi K, Shimomura K, Ishimaru K. 1999. Flavone production in transformed root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Phytochemistry* 52: 885-890.
- Parajuli P, Joshee N, Rimando AM, Mittal S, Yadav AK. 2009. In vitro antitumor mechanisms of various *Scutellaria* extracts and constituent flavonoids. *Planta Med.* 75: 41-48.
- Shieh DE, Liu LT, Lin CC. 2000. Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin. *Anticancer Res.* 20: 2861-2865.
- Signs M, Flores H. 1990. The biosynthetic potential of plant roots. *Bioessays.* 12: 7-13.
- Srivastava S, Srivastava AK. 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* 27: 29-43.
- Tiwari RK, Trivedi M, Guang ZC, Guo GQ, Zheng GC. 2007. Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicoside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Rep.* 26: 199-210.
- Wang W, Guo QL, You QD, Zhang K, Yang Y, Yu J, Liu W, Zhao L, Gu HY, Hu Y, Tan Z, Wang XT. 2006. The anticancer activities of wogonin in murine sarcoma S180 both *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1132-1137.
- Zehra M, Banerjee S, Sharma S, Kumar S. 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.