

# 담배細胞 (*Nicotiana tabacum*) 의 液体培養에 関한 研究

尹慶恩 · 金溶喆 · 閔泰基 · 孫世鎬 · 姜瑞奎

韓國煙草研究所 生理研究室

(1979. 3. 15 접수)

## Effects of Nutritional Conditions on Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Cell Suspension Culture

Kyung Eun Yoon, Joon Chul Kim, Tae Ki Min,  
Se Ho Son and Su Kyoo Kang

Lab. of Physiology Korea Tobacco Research Institute

(Received March 15, 1979)

### 초 록

담배 (Va 115) 細胞의 液体培養에서 담배細胞의 多量生産을 할 수 있는 Tank 培養에 関한 基礎調査로 培地造成의 效果를 調査하였으며 細胞增殖率에 큰 影響을 미쳤던 2,4-D와 無機磷酸의 效果에 關하여 調査하였다.

1. 培地造成에서 細胞增殖率에 많은 影響을 미쳤던 要素는 蔗糖, 無機磷酸의 濃度, 窒素源의 形態 및 植物ホルモン, 特히 2,4-D의 有無였다.

2. 蔗糖의 最適濃度는 3%였으며 3%以上의 濃度에서는 多小 細胞增殖率이 좋은 듯 하였으나 그 差異는 크지 않아 3% 程度로 足하였다. 無機磷酸濃度는 LS 培地内の 無機磷酸의 約 2.5 倍인 0.30 mg/ml 일 때 細胞增殖率이 가장 좋았다.

3. 液体培地의 窒素源은 암모니아態窒素와 硝酸態窒素가 1:2 일 때가 가장 좋았고 窒素源이 암모니아태 만으로 使用하였을 때 細胞增殖率이 가장 낮았으며 硝酸態만 使用되었을 때는 암모니아태만 쓰였을 때 보다는 좋았으나 암모니아태와 硝酸態의 比가 1:2 일 때 보다는 떨어졌다.

4. 液体培地에 2,4-D 添加와 無機磷酸濃度を 높이면 細胞增殖率이 增加되는 機作을 調査하기 爲하여 呼吸率과  $^{14}\text{C}$ -glucose 吸收利用을 調査하였다. 細胞의 呼吸率은 2,4-D 를 添加하면 增加되며  $^{14}\text{C}$ -glucose의 吸收는 培地内に 2,4-D가 包含되거나 (0.2 ppm) 磷酸濃도가 높아지면 (对照區의 2.5 倍) 더욱 많았고, 吸收된  $^{14}\text{C}$ -glucose는 糖 상태보다 다른 形態, 特히 amino 酸이나 有機酸으로 많이 變하였다.

<略字>

2,4-D ; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

Va 115 ; Virginia 115

LS 배지 ; Linsmaier - Skoog 培地

P 2.5 × ; LS 培地의  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  濃度の 2.5 培 無機인산농도

P.C.V ; Packed cell volume

### Abstract

For the preliminary experiments of mass production of tobacco cells in tank culture, the effects of nutritional conditions on the growth of suspended cells were investigated ;

1. The tobacco cell growth was affected by concentrations of sucrose or inorganic phosphate, type of nitrogen source, and plant hormone, especially 2, 4-D.

2. The optimum level of sucrose concentration was 3% and the level of inorganic phosphate was 0.3mg/ml, which was about twice as high as the level of Linsmaier - Skoog medium.

3. The best growth was observed when the ratio of nitrate nitrogen to ammonium nitrogen was 2 : 1, where the total nitrogen content was equal to that of nitrogen source.

4. To find out the mechanism of promotive effects of 2, 4-D and inorganic phosphate on the tobacco cell growth, the respiration and metabolism of  $^{14}\text{C}$ -glucose were investigated. Addition of 2, 4-D in culture medium increased if 2, 4-D (0.2ppm) was added to medium or the level of inorganic phosphate was raised 2.5 times as high as standard. In cultures with high inorganic phosphate and 2, 4-D, the absorbed  $^{14}\text{C}$ -glucose was converted to amino acids and organic acids rather than remained as sugars

### 緒 論

煙草植物은 植物組織의 分化力이 優秀하여 單一細胞培養<sup>8, 15, 25)</sup>, callus 培養<sup>13, 16)</sup>, 液体培養<sup>9, 16, 27)</sup> 과 藥培養<sup>2, 12, 17)</sup> 에 많이 利用되어 煙草植物의 組織培養에 關한 많은 研究가 遂行되고 있다.

植物組織은 微生物에 比해 增殖이 매우 느리기 때문에 大規模의 液体培養에 對한 報告가 적으며 植物細胞의 多量培養은 微生物에서 얻을 수 없는 alkaloid, steroid, hormone 등을 얻기 위하여 하였고<sup>7, 10, 22, 23, 28)</sup> 植物細胞 自体를 얻기 위한 多量液体培養은 별로 없었다. 最近에 液体培養에 의한 細胞增殖率이 높은 植物體로 煙草와 populus 가 報告되어 現在의 callus의 大規模 液体培養을 可能하게 하였다.

本實驗은 담배細胞의 大量培養을 위한 培地造成을 調查하며 한편 組織培養中の 細胞生理를

究明코자 遂行하였다.

### 材料 및 實驗方法

材料는 黃色種 담배인 Virginia 115 (*Nicotiana tabacum* L.)의 葉組織 또는 葉脈을 사용하였다. 葉組織을 잘게 (0.5 × 0.5cm) 자른 切片을 95% ethyl alcohol 에 몇초동안 담근 후 sodium hypochlorite 용액에 5분간 表面殺菌하고 蒸溜水로 씻어낸 다음 Linsmaier-Skoog 固体培地에 接種하여 callus가 生成되도록 하였다.

液体培養은 250ml Erlenmeyer flask에 50ml의 培養液을 넣고 callus를 接種하여 26°C (室溫), 螢光 照明下에서 분당 80회 왕복하는 震盪機를 利用하여 培養하였다.

細胞 增殖率 測定은 細胞를 포함한 液體培養液을 30분동안 定置시킨 후 沈澱된 細胞의 부피

(V/V)로 測定하였다.

蔗糖의 測定은 1N HCl로 蔗糖을 還元시켜 Nelson-Somogyi法<sup>18)</sup>으로 測定하였고 糖類는 Beckman gas chromatography로 分析하였으며 分析時의 條件은 最初溫度 180°C, 最終溫度 280°C, 분당 6°C 上昇, 注入量 2 $\mu$ l, attenuation 32 $\times$ 10, column 5% SE 52였다.

<sup>14</sup>C-glucose 吸收測定은 <sup>14</sup>C-glucose가 10 $\mu$  Ci/ml들어있는 1.25 ml의 培養液에 약 300 mg 정도의 callus를 接種하여 3시간 동안 흡수시킨 후 放射能을 Beckman liquid scintillation counter로 測定하였다. 放射能을 測定하기 전에 5 ml의 80% ethyl alcohol로 갈아 低速으로 10분간 遠心分離하여 液體部分과 沈殿된 部分을 각각 알콜溶性 部分과 나머지 部分 (residue)으로 나누어 放射能을 測定하였다. alcohol 溶性 부분은 다시 이온交換樹脂 Dowex 50과 1을 사용하여 中性, 酸性, 塩基性 部分으로 구분하였다. 흡수된 <sup>14</sup>C-glucose의 이용을 調査하기 위하여 처음 3시간 흡수시킨 후에 <sup>14</sup>C-glucose가 들어 있지 않은 培地에 18시간동안 培養한 후 radioactivity를 같은 方法으로 測定하였다.

本 試驗의 遂行에 있어 實驗室에서 도와 주신 尹鍾赫과 方香變께 감사드립니다.

## 結果 및 考察

### 1. 培地組成에 따른 細胞增殖率 變化

細胞增殖에 對한 蔗糖濃度의 効果는 蔗糖濃도에 따라 큰 차이가 없었으며 8일 후 4.5%의 蔗糖濃度에서 他 濃度에서보다 細胞增殖에 미치는 영향이 뚜렷하였다 (Fig. 1). pH는 最初 接種時 6.0에서 10일 경과 후에는 4.9로서 떨어지는 현상을 나타냈으며 이는 植物細胞가 내는 副産物 때문인 것으로 推測된다.

培地에 葡萄糖과 果糖을 添加하지 않고 蔗糖만 添加하였으나 10일 후 葡萄糖과 果糖이 蔗糖과 함께 培地內에 나타났고 6일 경과 후 蔗糖의 대부분이 없어졌고 반면에 葡萄糖과 果糖은 增加하였다 (Fig. 2). Yasuda 등 (27)

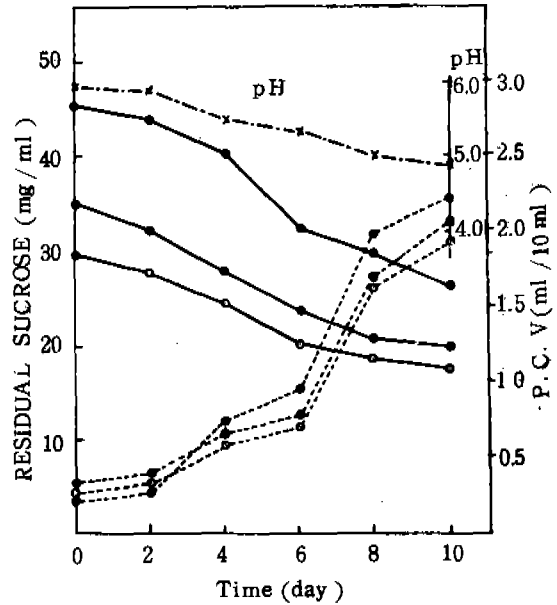


Fig. 1 Effects of sucrose concentration on the growth of Va 115 cells and pH change in suspension culture medium. Broken line; packed cell volume, solid line; residual, O; 3% sucrose, ⊙; 3.5% sucrose, ●; 4.5% sucrose

은 最初 接種時의 葡萄糖과 果糖의 發現은 滅菌時 蔗糖의 일부가 변하였다고 報告했고 또한 培養中에 생기는 葡萄糖과 果糖은 植物細胞의 invertase에 의해 生成된다고 解析할 수 있으며 Kilvilan 등<sup>11)</sup>과 같이 액체배지내에 invertase activity가 있다는 발표도 있다. 그러나 Straus<sup>24)</sup>, Yasuda<sup>27)</sup> 등은 細胞自体에는 invertase가 있어도 액체배지내의 invertase activity는 전혀 없었다는 研究도 있으므로 이점은 앞으로 더 研究되어야 할 것으로 생각된다.

液體培養에서 細胞增殖에 가장 큰 영향을 미치는 要素는 磷酸이라고 알려졌는데 Fig. 3에서 보는 바와 같이 培地內의 無機磷酸 濃度는 10일 경과 후 대부분 消耗되었고 그 濃度를 대조구보다 2.5배 높였을 때 細胞增殖이 증가하였다. 液體培地의 窒素源으로써 硝酸態 窒素와 암모니아態 窒素 比率이 2:1일때 細胞增殖이 가장 왕성하였으며 암모니아態만을 含有하는 培地는 細胞增殖이 저조하였다 (Fig. 4).

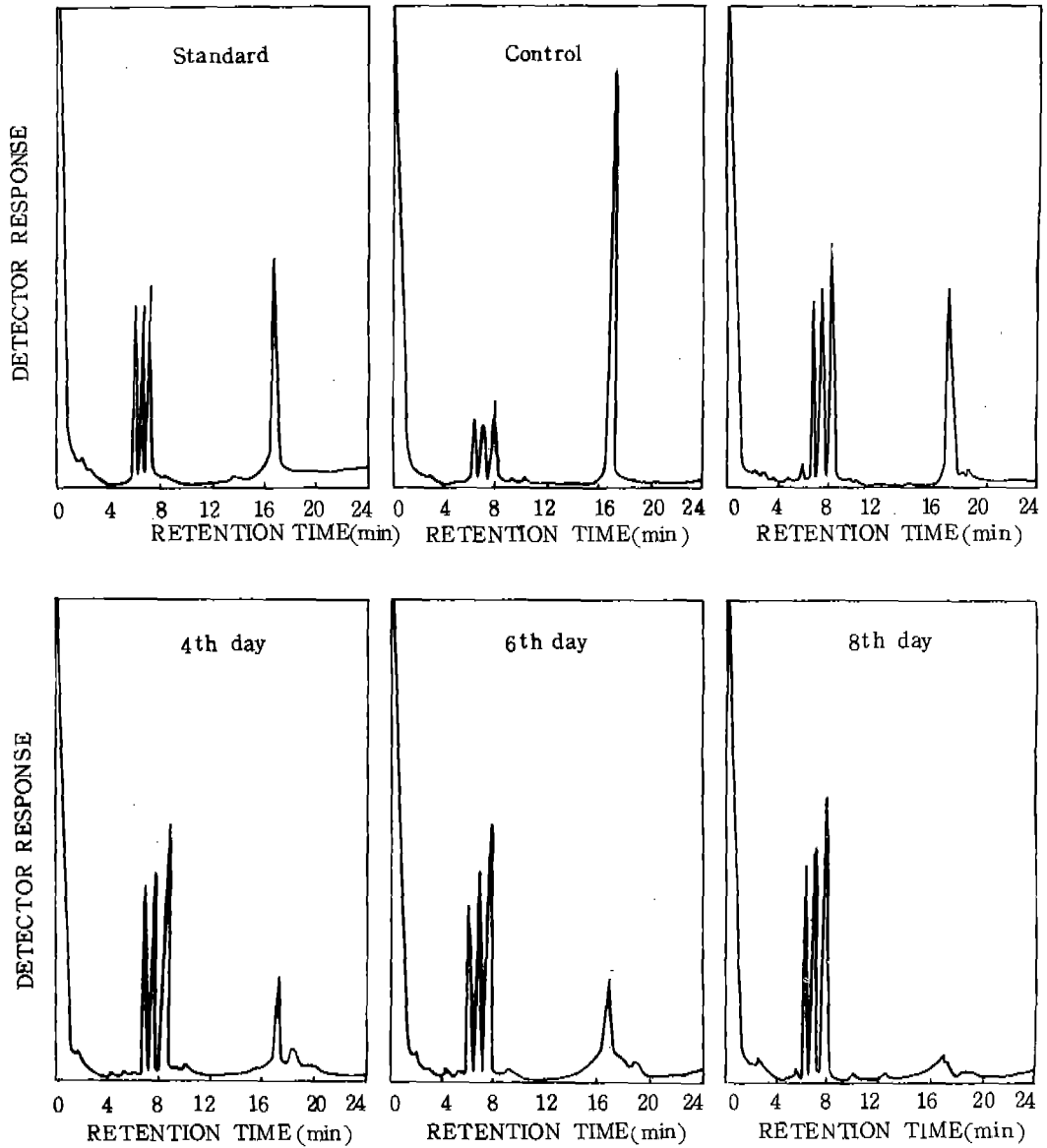


Fig. 2

Changes of sugar in a suspension culture medium of Va 115 cells. Sugars are monitored by gas chromatography. The conditions were: initial temp, 180°C, final temp 280°C, 6°C/min, volume of injection, 2 $\mu$ l, column no. 5% SE 52.

植物體組織培養의 標準培養液은 硝酸態와 암모니아態 두 形態의 窒素源을 사용하고 있다. Dougall<sup>4)</sup>은 標準培養液을 쓰게 되면 植物體가 주어진 암모니아態 窒素를 감당하지 못하여 細胞 增殖이 부진하다 하였다. 즉 *Haplopappus gracilis* 細胞는 2mM 以上の  $\text{NH}_4^+$  가 B-5

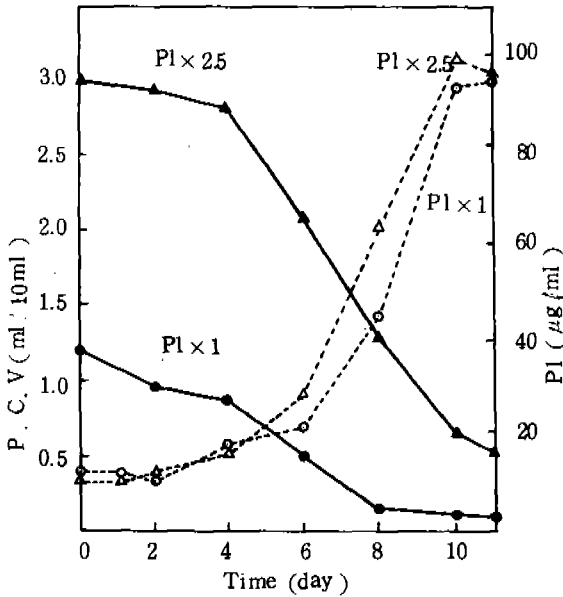


Fig. 3 Effect of phosphate concentration in the medium on the growth of Va 115 cells in suspension culture  
Broken line; packed cell volume  
solid line; residual phosphate.

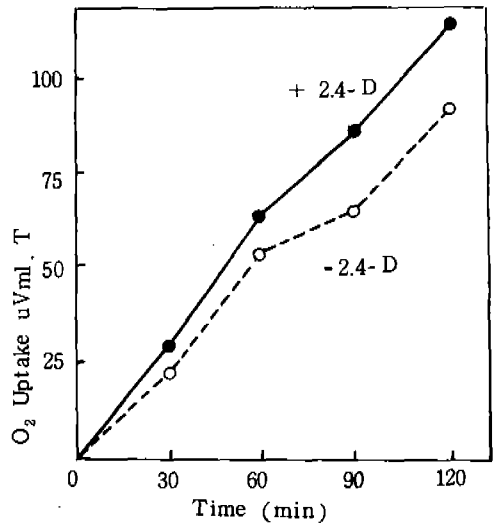


Fig. 5 Respiration of tobacco callus cells

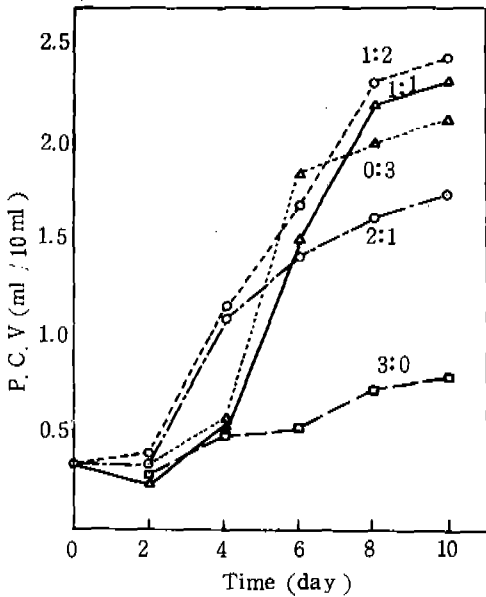
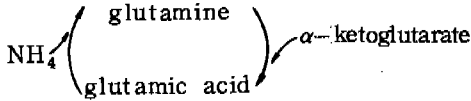


Fig. 4 Effects of the ratio of  $\text{NH}_4\text{-N}$  to  $\text{NO}_3\text{-N}$  in the initial media on the growth of Va 115 cells.

培地에 들어가면 細胞增殖이 줄어들었고 (21) 大豆에서도  $\text{NH}_4^+$  濃도가 2mM 이상이면 細胞增殖이 不良하였으나<sup>5)</sup> 野生당근세포는  $\text{NH}_4^+$  濃도가 10mM이 될 때까지 영향이 없었다고 報告된 바 있다<sup>20)</sup>. 本試驗에서는  $\text{NH}_4^+$  濃도가 2.5mM 일 때 最適이었다. Behrend와 Matels<sup>2)</sup>, Gamborg 와 Shyluk<sup>6)</sup>의 研究에 의하면 Kreb's cycle의 中間生成 有機酸을 培地에 添加하여 주면 암모니아態 窒素만으로도 細胞增殖이 좋다고 하였다. 암모니아態 窒素만이 窒素源이 되는 경우에 細胞增殖率이 떨어지는 一部 要因은 pH의 조절이 問題로 생각된다. 즉, 암모니아態 窒素는 培地의 pH를 낮추는 것으로 이미 알려졌다<sup>14, 20)</sup>.

그뿐 아니라 窒素分の 吸收, 利用에도 基因되는 것으로 생각된다. 植物体에서 窒素分の 흡수는 대부분 植物体的 뿌리조직에 의하여 대부분이 硝酸態로 흡수된다고 생각되어 진다<sup>4)</sup>. Pate<sup>20)</sup>는  $^{16}\text{NO}_3^-$  吸收에 대한 研究에서 암모니아態 窒素는 硝酸態 窒素의 흡수를 억제하였다고 보고하였다. 암모니아態 窒素를 이용하게 되는 酵素인 glutamate synthetase는  $\text{NH}_4^+$ 의 濃도가 낮은 때만 암모니아 合成代謝에 작용한다<sup>14)</sup>. 즉  $\text{NH}_4^+$ 가 限界濃度 이하로 있어야  $\text{NH}_4^+$ 가 모두 이용되어 glutamine

이 되고 다시  $\alpha$ -ketoglutarate 와 작용하여 2分子의 glutamic acid 를 生成하여 흡수된  $NH_4^+$  가 이용되나  $NH_4^+$  濃도가 한계이상으로 높아지면 機能이 달척 버린다.



窒素가 암모니아태와 硝酸態 같이 공급되면  $NH_4^+$  形態로도 이용되고  $NO_3^-$  는 nitrate eductase 에 의해 환원되어 植物体 有機合成에 이용되나 이 때에 중요한 것은 암모니아態와 硝酸態가 알맞은 비율로 포함되어야 한다. 암모니아태 窒素가 많이 含有되었을 때 생기는 암모니아 毒性 (ammonia toxicity) 의 機作은 정확히 알려지지 않았다.

2,4-D를 添加하거나 無機磷酸濃度を 높이면 細胞增殖이 良好해지는데 그 機作을 알기 爲하여 吸收率과  $^{14}C$ -glucose 의 利用을 調査하였다.

(1) 2,4-D 添加에 따른 呼吸率의 變化

Warburg 呼吸測定法에 依해 呼吸率을 測定한 結果 2,4-D 0.2 ppm 을 培地에 添加하면 呼吸率이 添加하지 않은 處理보다 增加 하였다 (Fig. 5).

(2)  $^{14}C$ -glucose 의 利用

表2에서 보는 바와 같이 培地에 0.2 ppm 의 2,4-D가 함유되었거나 磷酸濃도가 높아지면  $^{14}C$ -glucose 吸收가 많아졌으며 吸收된 것은 2,4-D 包含한 區나 磷酸濃도가 높은 쪽에서는 吸收되어 알콜용성형태로 있는 것보다 不溶性 物質로 變化된 比率이 높았다 (표1).

Table 1. Effects of 2,4-D and inorganic phosphate on utilization of  $^{14}C$  -glucose by tobacco callus (3 hr exposure)

Treatment	Total radio activity	Alcohol - soluble		Residue	
	cpm	cpm	%	cpm	%
Control	31470.7	26044	82.8	5426.7	17.2
2,4-D	39015.4	30959	79.4	8056.4	20.6
2,4-D & P 2.5x	42193.8	26966	63.9	15227.8	36.1

Table 2. Effects of 2,4-D and inorganic phosphate on utilization of  $^{14}C$  -glucose by tobacco callus (3 hr exposure followed by 18 hr chasing)

Treatment	Total radio-activity	Alcohol - soluble		Residue	
	cpm	cpm	%	cpm	%
Control	9165.0	1581.8	17.3	7583.2	82.7
2,4-D	14811.8	5506.7	37.2	9305.1	62.8
2,4-D & P 2.5x	16733.9	7245.2	43.3	9488.7	56.7

Table 3. Loss of radioactivity by callus tissue after 18 hr chasing

Treatment	Before chasing	After chasing	Ratio
	cpm	cpm	%
Control	31470.7	9165.0	70.8
2,4-D	39015.4	14811.0	62.0
2,4-D & P 2.5x	42193.8	16733.9	60.3

Table 4. Metabolism of  $C^{14}$ -glucose by tobacco callus

Treatment	Distribution of radioactivity					
	Neutral		Amino acid		Acidic	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
Control	17539.6	87.40	2330.6	11.62	197.3	0.98
2,4-D	22713.0	67.90	10363.0	30.98	374.7	1.12
2,4-D & P-2.5x	16646.7	38.04	26189.0	59.85	922.7	2.11

알콜 水溶性 部分을 다시 分類하여 보면 中性의 糖類보다는 amino 酸이나 有機酸이 대부분 酸性部分에서 radioactivity가 對照區, 2,4-D 區, 2,4-D와 磷酸濃度를 높인 區의 순으로 높아 갔다 (표 2).

3시간동안 吸收된  $C^{14}$ -glucose가 어떻게 代謝利用되는가를 調査하기 위하여 18시간동안 追跡하여 본 結果 역시 2,4-D를 넣은 培地와 磷酸濃度를 높인 培地에서 자란 callus 細胞에서 radioactivity가 더 많이 나타났다. 흡수된 radioactivity는 18시간후에는 알콜 水溶性物 質보다 알콜 不溶性物 質로 더 많이 변하였다.

그의 비례로 보면 對照區보다 2,4-D區나 2,4-D와 P 2.5x 區에서 알콜不溶性部分으로 변한 율이 적으나 絕對量으로 따질 때는 2,4-D 區나 2,4-D와 P 2.5x 區의 알콜不溶性物 質의 radioactivity가 높았다. (표 3) 알콜水溶性部分과 不溶性部分의 비율이 대조구에서 높게 나타난 것은 알콜水溶性物 質이 不溶性으로 변하게 하는 機構에 한계가 있어 이와같이 나타난 것이 아닌가 생각된다.

한편 18시간 追跡하면 총 radioactivity가 追跡하기 전보다 상당히 낮았으며 그 잃어버린 率

은 對照區에서 가장 높았다 (표 4).

이상의 結果로 볼 때 2,4-D를 處理하거나 磷酸濃度가 높아지면 物 質吸收가 낮고 呼吸이 증가되면서 代謝作用이 圓滑하여 吸收된  $C^{14}$ -glucose가 다른 形態, 특히 amino 산이나 有機酸과같이 合成作用에 寄與가 큰 物 質로 많이 변하고 또한 吸收된 物 質을 쉽게 잃어버리지 않고 잘 作用하므로 細胞增殖率이 높아지는 것이 아닌가 생각된다.

#### 參 考 文 獻

1. Behrend, J. and I.R. Matels, Plant Physiol. 56: 584~589(1975).
2. Collins, G. B., P. D. Legg. and M.J. Kasperbauer, Crop Sci. 14: 77~80 (1974).
3. Devlin, R. M., "Plant Physiology" P. 373~375, D. Van Norstrand, New York, U. S. A (1975).
4. Dougall, D.K., "Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application", 1st ed, P. 76~84.

- W. Barz, E. Reinhard and M.H. Zenk Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York (1977).
5. Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima, *Exp. Cell Res.* 50:151~158 (1968).
  6. Gamborg, O.L., and J.P. Shyluk, *Plant Physiol.* 45: 598~600 (1970).
  7. Ikeda, T., T. Matsumoto, and M. Noguchi, *Phytochemistry* 15:568~569 (1976).
  - ai, S. Mizusaki, K. Nishida, M. Noguchi and E. Tamaki, *Proc. IV IFS : Ferment. Technol. Today.* 689~695 (1972).
  10. Kaul, B., S.J. Stohs and E. J. Staba, *Lloydia* 32: 347~359 (1969).
  11. Kilvilaan, A. T.C. Bearman and R.S. Bandurski, *Plant Physiol.* 36:605~610 (1961).
  12. Kuo, J.S., Y.Y. Wang, N.F. Chien, S.J. Ku, M.L. Kung and H.C. Hsu, *Acta Bot. Sinica* 15:37~50(1973).
  13. Linsmaier, E.M. and F. Skoog, *Physiol. Plant* 18:100~127 (1965).
  14. Mifflin, B.J. and P.J. Lea, *Phytochemistry* 15: 873~885(1976).
  15. Muir, W.H., A.C. Hildebrandt and A.J. Riker, *Am. J. Bot.* 45:589~597 (1958).
  16. Murashige, T. and F. Skoog, *Physiol. Plant* 15:473~497 (1962)
  17. Nakata, K., *Jap. J. Breed.* 21 : 29~34 (1971).
  18. Nelson, A. J., *Biol. Chem.* 153:375~380 (1944).
  19. Nickell, L. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 42: 848~850 (1956).
  20. Pate, J.S., *Soil Biol. Biochem.* 5 : 109~119 (1973).
  21. Sargent, P.A. and J. King, *Can. J. Botany.* 52:1747~1755 (1974).
  22. Scott, A.I. and S.L. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* 97:6906~6908 (1975).
  23. Shio, I and S. Ohta, *Japan Patent (Kokoku)* 73~91287 (1973).
  24. Straus, J., *Plant Physiol.* 37: 342~348 (1962).
  25. Vasil, V. and A.C. Hildebrandt, *Science* 147:1454~1455 (1964).
  26. Wetherell, D.F. and D. K. Dougall *Physiol. Plant* 37:97~103 (1976).
  27. Yasuda, S., K. Satoh, T. Ishii and T. Furuya, *Proc. IV IFS : Ferment Technol. Today* 697~703. (1972).
  28. Zenk, M.H., H. El-shagi and U. Schulte. *Planta Med. Suppl.* 79:101 (1975).