

## 당근(*Daucus carota* L.) 세포 배양시 세포의 크기, 밀도, Conditioned 배지 및 pH가 배발생에 미치는 영향

白 基 燁·李 澈 熙·黃 周 光  
(忠北大學校 農科大學 園藝學科)

## Effects of Cell Size, Density, Conditioned Media and pH on Carrot (*Daucus carota* L.) Cell Embryogenesis

Paek, Kee Yoeup, Cheol Hee Lee and Ju Kwang Hwang  
(Department of Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju)

### ABSTRACT

The effects of sizes and densities of cells cultured, conditioned medium, and media pH on the somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.) were examined. A large number of globular embryoids was formed after 4 days in cell culture, and later globular embryoids developed into heart and torpedo shape. High cell density resulted in higher number and better growth of embryos, especially on conditioned medium than Murashige-Skoog medium. The fresh weight and number of embryoids formed increased with the decrease in cell size. The significant reduction in fresh weight and number of embryoids was obtained when culturing cells with diameter of over 90  $\mu\text{m}$ . Dry weight and number of embryoids were markedly reduced with medium pH of 4 or 7, but promoted with pH 6.0.

### 緒 論

당근세포의 배형성능은 배양기간 (Drew, 1979), 배지내 첨가물질의 종류와 농도 (Paek *et al.*, 1985), 배양환경 (Kessel, 1977) 등에 따라 많은 차이가 있기 때문에 이에 대한 연구가 세포수준에서 많이 진행되고 있다. 배양중인 세포로부터의 배발생은 세포들간의 상호작용에 의한 것으로 (Stewart *et al.*, 1970; Wetherell, 1978) 세포분열시 배지내로 유출되는 세포대사물질이 배발생에 중요한 영향을 미친다는 것이 알려져있다 (Halperin, 1967; Hari 1980). 그러므로 배발생을 촉진하기 위해서는 callus가 유연하고 friable하며 세포분열 및 생장이 왕성한 초기단계의 세포를 배양하는 것이 무엇보다도 중요하다 (Jones, 1974; Wetherell, 1978; Vasil, 1982). 또한 배양중 세포의 밀도를 낮게하면 배지내로 유출되는 세포대사 물질의 양이 감소되기 때문에 배발생에 저해적으로 작용한다 (Halperin, 1967). 이러한

문제를 해결하기 위해서 cell plating시에는 conditioned 배지를 이용하여 colony 형성을 높이기도 한다 (Paek *et al.*, 1984). 그러나 당근 체세포 배양시 배발생을 촉진 시키기 위해서 conditioned 배지를 이용한 결과는 Hari (1980)의 보고를 제외하면 거의 찾아 볼 수 없는 실정이다. 그래서 본 실험은 지금까지 많이 알려지지 않은 배양세포의 밀도를 달리하거나 세포의 분열능이 다른 세포집단을 선택하여 배양하였을 때 배발생에 미치는 영향과 conditioned 배지 및 pH의 효과를 구명 하기위해서 실시하였다.

### 材料 및 方法

당근 (*Daucus carota* L.) cv. 오촌당근의 성숙한 뿌리조직을 코르크보리로 절편체를 분리하여 Murashige-Skoog 기본배지에 White의 vitamin과 2.0 mg/l 2,4-D, 1 g/l casein hydrolysate를 첨가한 배지에 접종하고 암상태에서 callus를 형성시켰다. 형성된 callus를 friabilize시켜 현탁배양하기 위해서 본래의 절편조직을 제거하고 callus 조직만 넓이 1 cm<sup>2</sup>, 두께 2 mm 정도되게 조절하여 계대배양재료로 이용하였다. 배지는 다량원소의 농도를 2배로 한 MS배지에 White의 vitamin과 2.0 mg/l 2,4-D, 1.0 mg/l casein hydrolysate를 첨가시켜 계대배양용 배지로 하였다. Friabilized된 callus는 암상태에서 배양하면서 4주 간격으로 계대배양하였다.

**배양환경.** 배양실의 온도는 25±1C로 조절하였으며 현탁배양을 할 경우에는 형광등(500 lux)으로 16시간 조명하였다.

**배양기간 및 접종세포의 밀도와 크기가 배발생에 미치는 영향.** 세포의 배양기간별 배발생에 관한 실험은 MS 기본배지에 White vitamin과 500 mg/l casein hydrolysate, 3% sucrose를 첨가하여 배양액의 pH는 5.7로 조절하였다. 살균한 배양액을 petri dish당 5 ml씩 분주하고 세포의 크기가 75 μm 미만인 세포를 체로 걸러모으고 세포밀도가 2.5×10<sup>6</sup>/petri dish(5ml) 되도록 접종하여 배양하였다. 6일간 배양하면서 1일 간격으로 해부현미경 하에서 형성된 배의 수와 형태를 조사하였다. 세포밀도와 conditioned medium이 배발생에 미치는 영향을 보기위하여 기본배지는 배양일수 실험에서 사용한 배지의 조성파 동일하게 하였으며, conditioned medium은 당근세포 500 mg/20 ml를 접종하여 10일이 경과된 배양액을 membrane milipore filter (0.45 μm)로 여과하여 세포를 제거하고 배양액 10 ml를 취하여 신선한 배양액 10 ml와 혼합하여 전체용량을 20 ml로 하였다. 100 ml 삼각플라스크당 배양액 20 ml를 분주하고 여기에 세포밀도를 1.25×10<sup>6</sup>, 2.5×10<sup>6</sup>, 5.0×10<sup>6</sup> 및 1.0×10<sup>8</sup> 수준으로 접종하였다. 배양은 왕복진탕기의 속도를 90 stroke/분으로 조절하여 2주간 현탁배양하였다. 배의 형성수나 형태 조사는 배양 2주후 150 μm 체로 세포를 제거한 후 1500 rpm으로 원심분리하여 배양액을 씻어낸 다음 해부현미경으로 관찰하였다. 세포의 크기가 세포의 성장 및 배발생에 미치는 영향을 구명하기 위한 실험은 45 μm와 90 μm의 체를 이용하여 세포의 크기가 0~45 μm, 45~90 μm, 90 μm> 되도록 분리하고, 각 크기별로 300 mg을 취한 후 100 ml 삼각플라스크당 20 ml 배양액을 분주한 배지상에 접종하고 왕복진탕기에서 2주간 현탁배양 하였다. 배양 2주후 배양액을 1500 rpm에서 원심분리한 후 침전된 세포의 생체중을 측정하였으며 체를 이용하여 형성된 배만 채취한 후 다시 원심분리하고 해부현미경하에서 배의 형성수를 조사하였다.

또 세포의 크기별로 형성된 배를 Gelrite (Kelco Co.) 0.2%를 첨가하여 만든 고체배지에 접종하여 8주간 배양하면서 1주 간격으로 생체중의 증가를 조사하였다.

배지의 pH가 세포의 성장 및 배발생에 미치는 영향. MS 기본배지에 White의 vitamin과 500 mg/l casein hydrolysate, 3.0% sucrose를 첨가하였으며 배양액의 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0으로 각각 조절하였다. 100 ml 삼각플라스크에 배양액 20 ml를 분주하고 여기에 friabilized한 세포 500 mg를 접종한 후 왕복진탕기 (90 stroke/분)로 2주간 현탁배양하였다. 배양 2주 후 150  $\mu$ m체를 이용하여 세포와 배를 분리한 후 이들을 80C로 24시간 건조하여 건물중을 조사하였다.

## 結 果

배양기간 및 접종세포의 밀도와 크기가 배발생에 미치는 영향. 배양세포로부터 배발생과정을 보면 (Fig. 1), 세포의 분열이 왕성하게 일어나는 것이 있는 반면에 (Fig. 1. A), 액포화가 심하게 일어나 길게 신장하여 세포의 분열력이 상실한 것처럼 보이는 것도 관찰되었다 (Fig. 1. B). 배양후 3~4일이 경과하면 세포들은 서로 뭉쳐지면서 분열을 계속하였고 (Fig. 1. C) 이들 세포덩어리에서 배원기가 형성되어 배로 발달되었다 (Fig. 1. D). Callus의 계대배양 초기에 형성되는 배는 정상적인 배의 발달과정을 거치나 계대배양회수가 증가 할수록 배의 발달단계를 정확히 구별할 수 없었고 거의 모든배가 타원형을 나타내었다 (Fig. 1. E).

**Table 1.** Embryogenesis of carrot cells as influenced by culture time<sup>a</sup>

Days in culture	No. and shapes of embryo*			
	Globular	Heart	Torpedo	Total
1	—	—	—	
2	—	—	—	
3	34	—	—	34
4	196	24	—	220
5	173	64	19	256
6	142	92	36	270

a: Cell size < 75  $\mu$ m. Cell density =  $2.5 \times 10^6$ /petri dish (5ml). \*: Some abnormally elongated or aggregated embryos were also observed.

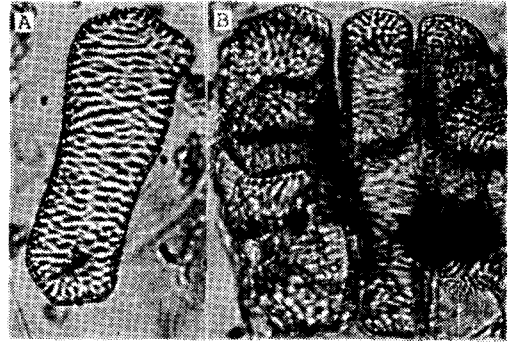
**Table 2.** Effect of cell density and conditioned medium on embryogenesis of carrot cells in 20-ml batch suspension culture after 2 weeks in culture

Cell density	No. of embryos		Remarks*	
	MS	Conditioned	MS	Conditioned
$1.25 \times 10^6$	34	56		Very young embryo
$2.5 \times 10^6$	72	136		Heart and torpedo embryos
$5.0 \times 10^6$	98	173	Torpedo	Torpedo and cotyledon
$1.0 \times 10^8$	192	263	Torpedo and cotyledon	Torpedo and plantlet

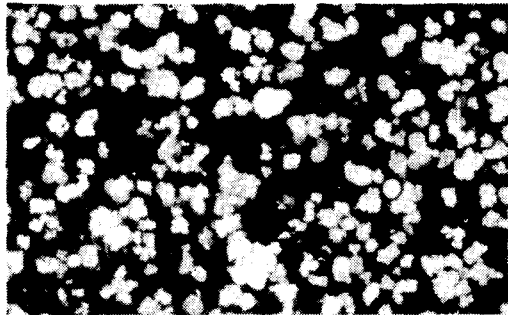
\*: Each stage of embryo development was considerably overlapped among cultures. Remarks mean the general tendency of embryo development.



**Fig. 1.** Embryogenesis from carrot root callus.  
 A : Actively dividing cells(150×).  
 B : Vacuolated and elongated cells(100×).  
 C : Embryogenic cluster lacking organization(60×).  
 D : Embryogenic mass prior to developing embryo(60×).  
 E : Mature embryo(60×).



**Fig. 2.** Cytodifferentiation of a single isolated cell (A) and a cluster of cells (B) into tracheary elements in MS basal medium.



**Fig. 3.** Embryoids from carrot suspension culture in conditioned medium at cell density of  $1.0 \times 10^8$  after 2 weeks in culture.

한편 생장조절제가 첨가된 배지에서 MS기 본배지로 세포를 옮겨 계대배양하면 세포의 액포화가 진전되고 길게 신장한 단세포 (Fig. 2. A)나 몇 개로 뭉쳐진 세포덩어리 (Fig. 2. B)에서 tracheary element가 발달하여 cytodifferentiation이 일어나는 것도 관찰되었는데 계대배양 기간이 길어질수록 발생 빈도가 증가 하는 경향이였다. 배발생에 소요되는 시간과 배의 형태를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 배양초기인 1~2일째에는 세포의 분열은 왕성히 일어났으나 배상체는 관찰할 수 없었고, 배양 3일째 34개의 어린 구상형의 배가 형성되기 시작하여 4일에 196개의 구상형배의 발생이 급격히 증가 되었으나 5일 이후 배의 발달이 일어남에 따

라 점차로 감소되는 경향이였다. 발생된 배는 배양기간이 경과됨에 따라 점차로 성숙되어 심장형을 거쳐 어뢰형태로 발달되었는데 심장형태는 배양 4일에, 어뢰형태는 배양 5일에 각각 24, 16개가 관찰되었다. 전체적으로 보면 배양 3일에서 4일사이에 배형성이 급격히 증가하였으나 5일째부터는 다소 둔화되었다. 또한 배양중 정상적인 배의 발달과정을 거치는 것 이외에도 길게 신장되거나 서로 뭉쳐진 비정상적인 배들도 다수 관찰되었다.

세포의 밀도와 배지의 종류가 배형성에 미치는 효과는 Table 2와 같다. 세포의 밀도별로 보면 MS 배지와 conditioned medium 모두 세포밀도가 낮은  $1.25 \times 10^6$ 개 처리구에서 각각 34, 56개로 발생된 배의 수가 매우 적었으나 세포밀도가 증가됨에 따라 배형성수가 현저히 증가하였다. 특히  $1.0 \times 10^8$ 개로 세포의 밀도를 높였을 때 MS 배지에서는 192개, conditioned medium에서는 263개로 배형성이 가장 양호하였다 (Fig. 3). 배지의 종류별 배 발생 정도를 보면 conditioned medium이 세포밀도에 관계없이 MS배지에 비해 현저히 증가하였다.

또한 배의 발달과정도 배 발생률과 비슷한 경향을 보여 배지의 종류에 관계없이  $1.25 \times 10^6$ 개의 세포 첨가구에서는 매우 어린 배상체가 관찰되었으나  $2.5 \times 10^6$ 개의 첨가구에서는 심장형과 어뢰형의 배가 나타났다. 그러나 세포밀도를  $5.0 \times 10^6$ 개로 다소 높여주면 배지간에 배 발생 과정에 차이가 나타나 conditioned medium에서는 성숙한 어뢰형태로 발달되어, MS 배지에  $1.0 \times 10^8$ 의 밀도로 접종한 구와 동일한 경향을 나타냈고, 특히  $1.0 \times 10^8$ 개의 세포를 처리한 conditioned medium에서는 식물체로 분화되는 것도 관찰되었다.

당근세포를 크기별로 구분하여 2주간 현탁배양한 결과 (Table 3), 전반적으로 세포의 크기가 작을 수록 생체중 및 배 발생에 효과적이었다. 생체중은 0~45  $\mu\text{m}$ 의 세포를 첨가한 구에서 980 mg으로 가장 좋았으나 접종한 세포가 클수록 감소되어 90  $\mu\text{m}$ 이상의 큰 세포를 첨가한 구에서는 생체중이 570 mg으로 불량하였다. 또한 배 발생에서는 그 차이가 더욱 심하게 나타나 45  $\mu\text{m}$ 이하의 세포 첨가구에서 416개의 배가 발생된 반면 90  $\mu\text{m}$ 이상의 구에서는 56개로 배 발생이 심하게 억제되었다. 한편 크기를 달리한 세포를 300 mg씩 접종하여 8주간 배양하면서 주별로 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 생체중의 증가는 배를 접종한 구에서 가장 양호하여 배양 6주까지 급격한 증가율을 보이다가 그 이후 둔화되었다. 세포를 접종한 구에서는 세포의 크기가 45  $\mu\text{m}$  이하일 때 생체중의 증가가 현저하였는데 배를 접종한 구와 유사하게 6주까지 높은 증가율을 나타냈으나 그 이후부터는 거의 증가되지 않았다. 세포의 크기가 45~90  $\mu\text{m}$ 에서 90  $\mu\text{m}$ 이상으로 커질수록 생체중의 증가는 타처리구에 비해 현저히 감소되었으며 또한 4주이후에는 생체중의 증가가 둔화되거나 오히려 감소하는 경향을 나타냈다. 배양 8주후 배상체를 접종한 구에서는 배가 발달하여 자엽이나 뿌리가 발생하였고 45  $\mu\text{m}$ 이하 및 45~90  $\mu\text{m}$ 의 세포를 접종한 구에서는 callus 및 다수의 배상체가

**Table 3.** Effect of cell sizes on the embryogenesis of carrot cells in 20-ml batch suspension culture after 2 weeks in culture. Initial inoculum weight of each cell size was 300mg

Cell size ( $\mu\text{m}$ )	Fresh wt. (mg)	No. of embryo/culture
<45	980	416
5~90	750	309
90>	570	56

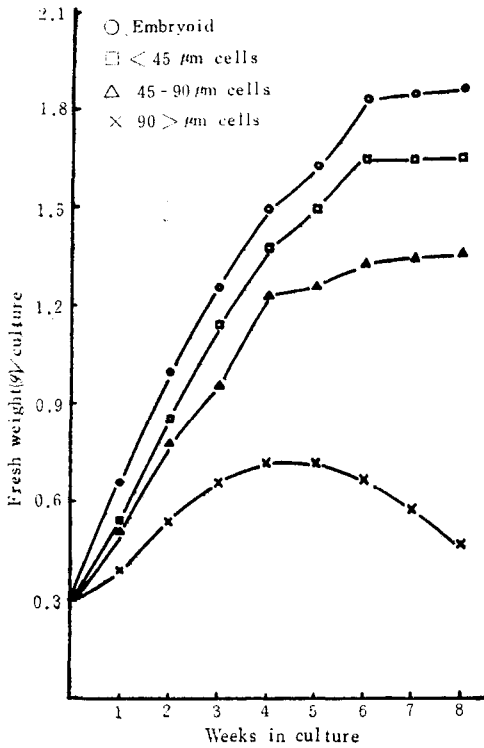


Fig. 4. Effect of culture period on fresh weight of embryoid and different cell sizes inoculated on the gelrite-gelled medium.

로 수소이온 농도가 감소할수록 현저히 증가하였다. 그러나 배지의 pH가 7.0일 때는 전체 건물중이 현저히 감소하여 배지의 pH가 4.0일 때와 비슷하였다. 한편 전체 건물중당 배상체의 건물중이 차지하는 비율을 보면 전체 건물중의 증가와 비슷한 경향을 나타내어 배상체의 형성이나 발달도 배지의 pH가 6.0부근일 때 가장 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

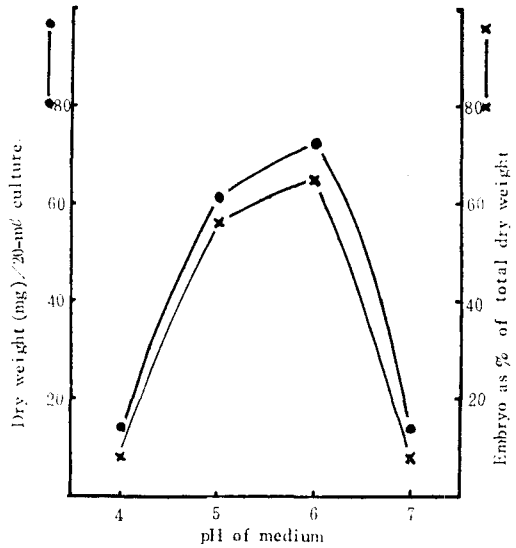


Fig. 5. Cell growth and embryogenesis of friabilized carrot callus in 20-ml batch suspension culture after 2 weeks in culture.

형성되었다.

배지의 pH가 세포의 성장 및 배발생에 미치는 영향. 배지의 pH를 달리하여 배상체와 세포의 건물중을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 전체 건물중은 배지의 pH가 4.0에서 6.0으로

考 察

배양기간 및 접종세포의 밀도와 크기가 배발생에 미치는 영향. Hari (1980)는 세포의 크기가 45 μm이하인 당근세포를 9.0×10<sup>5</sup>/petridish의 밀도로 배양한 결과 배양 4일째부터 구상형 배가 처음으로 발생한다고 하여 본 실험과는 배발생시기에 있어서 1일정도 차이가 있었다. 이러한 결과는 세포밀도의 차이에 의한 것이라 생각되었으며 본실험의 결과와 같이 세포밀도가 높을수록 배발생이 촉진됨을 알 수 있었다. 배발생은 배지의 종류에 관계없이 세포의 밀도가 높을 때 촉진되었는데 이는 Halperin (1967)과 Wetherell (1978)의 실험 결과와 비슷한 경향이였다. 세포의 밀도가 높을 경우에는 세포분열시 대사물질의 배지내로의 유출과 세포내 대사물질의 생산이 서로 균형을 이루어 세포의 분열과 배발생이 촉진되었다고 생각된다. 한편 세포의 크기를 달리하여 고체 배지에 배양하였을 때 세포의 크기가 작은세포에

서 생체중 및 배발생수가 많았고 또 90 $\mu$ m 이상의 큰세포에서는 배발생수가 현저히 감소하였는데 이는 Westherell(1978)과 Vasil(1982)의 보고와 일치하는 경향이였다.

배지의 pH가 세포의 생장 및 배발생에 미치는 영향. 배지의 pH를 달리하여 배양한 결과 pH 5.0~6.0 사이에서 건물중이 무겁고 전체 건물중에 대한 배의 건물중의 비가 가장 높았는데 콩은 pH 5.5(Gamborg *et al.*, 1968)에서, *Haplopappus*(Eriksson, 1965)는 pH 6.0에서 세포증식이 활발히 일어난다는 보고가 있어 식물의 종류에 따라 적정 pH의 수준이 각기 다르다는 것을 알 수 있었다.

### 摘 要

당근(*Daucus carota* L.) 세포 배양시 무성배 발생에 미치는 세포의 크기, 세포의 밀도, conditioned medium 및 배지의 pH효과를 구명하기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다. 세포배양시 구상형 배의 발생은 배양 4일째 최대에 달했으며 그 이후부터는 심장형 및 어뢰형 배로 발달되었다. 세포의 밀도가 높을수록 배 발생수가 증가하였으며 MS배지보다는 conditioned medium에서 양호하였고 배의 발달도 촉진되었다. 세포의 크기가 작을수록 생체중 및 배의 형성수가 증가하였으며 90 $\mu$ m이상의 세포에서는 현저히 억제되었다. 배지의 pH가 4.0 혹은 7.0일때는 세포의 건물중이 현저히 감소하였고 배의 발생도 억제되었다. 그러나 pH 6에서 건물중이 최대에 달하였고 배의 발생도 양호하였다.

### 参 考 文 献

- Drew, R.L.K. 1979. Effect of activated charcoal on embryogenesis and regeneration of plantlets from suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Ann. Bot.* 44: 387-389.
- Eriksson, T. 1965. Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. Pl.* 18: 976-993.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Halperin, W. 1967. Population density effects on embryogenesis in carrot cell cultures. *Exp. Cell Res.* 48: 170-173.
- Hari, V. 1980. Effect of cell density changes and conditioned media on carrot cell embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol.* 96: 227-231.
- Jones, L.H. 1974. Factors influencing embryogenesis in carrot cultures (*Daucus carota* L.). *Ann. Bot.* 38: 1077-1088.
- Kessel, R.H.Z. 1977. The relationship between dissolved oxygen concentration, ATP, and embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L.) tissue culture. *Plant Sci. Lett.* 10: 265-274.
- Paek, K.Y., C.H. Lee and J.K. Hwang. 1985. Effect of growth regulators on cell growth, embryogenesis and regeneration of plantlets from carrot (*Daucus carota* L.) cell and callus culture. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* (in press).
- Paek, K.Y., J.K. Hwang, C.H. Lee, Y.H. Kang and K.T. Choi. 1984. Methods of cell plating and growth measurements of liquid suspension cultures from *Nicotiana glutinosa* callus tissue. *Korean J. Plant Tissue Cult.* 11: 5-14.
- Steward, F.C., P.V. Ammirato and M.O. Mapes. 1970. Growth and development of totipotent cells:

- some problems, procedures and perspectives. *Ann. Bot.* 34: 761-787.
- Vasil, I.K. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. *In*, Plant Tissue Culture 1982. A. Fujiwara (ed). Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo. pp.101-104.
- Wetherell, D.F. 1978. *In vitro* embryoid formation in cells derived from somatic plant tissues. *In*, Propagation of Higher Plants through Tissue Culture. K.W. Hughes. R. Hende and M. Constantin (eds.). V.S.D.O.E., Washington. pp.102-124.

(1985. 1. 24. 接受)