

담배(*Nicotiana glauca* Graham) Callus 배양시 Nicotine 生成에 미치는 2,4-D 및 NAA의 影響

呂 邑 東 · 金 敬 鎬
(全北大學校 自然科學大學 生物學科)

Effects of 2,4-D and NAA on Nicotine Production during Callus Culture of *Nicotiana glauca* Graham

Yeo, Up Dong and Kyong Ho Kim
(Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju)

ABSTRACT

Effects of two auxins, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and α -naphthaleneacetic acid (NAA) on nicotine production during callus culture of a wild tobacco (*Nicotiana glauca*) were investigated using a high performance liquid chromatography (HPLC). The high concentration (11.5 μ M) of 2,4-D and NAA had peaks of nicotine contents at 4th and 2nd week, respectively. Thereafter, the contents decreased and the nicotine was metabolized to other alkaloids. The low concentration (1.5 μ M) of 2,4-D on the medium supplemented with 0.1 mM of L-aspartic acid or L-arginine inhibited nicotine production. However, the low NAA promoted it only when the medium was supplemented with L-aspartic acid. From these results, it could be concluded that both auxins exhibit different action mechanisms on nicotine production pathway and the low NAA promotes the activities for the pathway with L-aspartic acid as a precursor.

緒 論

담배(*Nicotiana tabacum*) 세포배양으로부터 nicotine이 검출된 이래(Speake *et al.*, 1964), 담배 조직배양은 담배 alkaloid의 생성과 여러 가지 방법에 의한 조절을 조사하기 위한 유용한 재료가 되어왔다. Nicotine 이외의 alkaloid가 담배배양세포에서 검출되었지만(Furuya *et al.*, 1966; Lockwood and Essa, 1984) 담배 alkaloid의 조절에 관한 연구에는 주로 nicotine이 그 대상이 되어 왔다. 그러나 어떤 경우에 있어서, 즉 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin-38) callus 배양에 있어서는 nornicotine이 비정상적으로 축적된다는 보고(Tiburcio *et al.*, 1985a)도 있다. 최근에는 분석기술의 발달로 담배屬으로부터 nicotine, nornicotine 및 anabasine 등 10餘種 以上の alkaloid가 檢出된(Furuya *et al.*, 1966; Lockwood and Essa, 1984; Saitoh *et al.*, 1985) 이래, 더욱 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 培地의 auxin 濃度를 낮추거나 다른 auxin으로 代替하거나 이 밖에

有機酸, 窒素化合物 등의 添加와 같은 化學的 條件 또는 빛과 溫度 등의 物理的 條件을 달리함으로써 母植物과 거의 같거나 훨씬 많은 2차 대사산물인 alkaloid를 생산해 낼 수 있었다(Misawa, 1985; Ohta *et al.*, 1978; Tiburcio *et al.*, 1985b). 그러나 이들 환경요인의 alkaloid 生成에 대한 구체적인 作用機作을 밝힌 보고의 예는 찾아보기 힘든 실정이다. 본 연구자들은 野生種 담배(*N. glauca*) 일컷片 으로부터 callus 誘導過程에 있어서 nicotine 生成에 미치는 식물호르몬 및 光照射의 效果를 조사한 바 있다(Yeo and Kim, 1990). 그러나 이들 환경요인의 구체적인 작용기작에 대해 野生種을 재료로 한 보고는 특히 찾아보기 힘든 실정이다. 野生種은 여러 가지 환경변화에 대한 抵抗性을 갖고 있기 때문에 分子生物學的 또는 遺傳學的 연구의 좋은 재료가 된다.

本 研究에서는 야생담배(*Nicotiana glauca* Graham)의 callus 培養시 nicotine 生成에 미치는 두 가지 auxin(2,4-D와 NAA)의 影響을 규명하고자 시도되었다.

材料 및 방법

Callus 誘導 및 培養. 種子를 받아서 全北大學校 生物學科 溫室에서 栽培하고 있는 野生담배(*Nicotiana glauca* Graham)의 頂端으로부터 6-10번째 잎을 採取하여 使用하였다. 채취한 잎을 70% ethanol에 약 30초간 1% 차아염소산나트륨 飽和水溶液에 約 10분 동안 浸漬하여 表面殺菌한 후, 滅菌水로 3회 세정하였다. 이로부터 10×5 mm(生重量; 約 10 mg) 크기로 切片을 만들었다. 배지는 4가지 有機酸(0.02 g/l sodium pyruvic acid, 0.04 g/l L-citric acid, 0.04 g/l L-malic acid, 0.04 g/l L-fumaric acid; Kao and Michayluk, 1980), 3% sucrose 및 0.9% agar를 포함한 MS(Murashige and Skoog, 1962) 修正培地에 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 11.5 μM과 kinetin 1.0 μM 또는 NAA(α -naphthaleneacetic acid) 11.5 μM과 kinetin 1.0 μM을 각각 添加하였다. 100 ml 삼각플라스크에 20 ml씩 分注하여 120°C에서 15분 동안 加壓滅菌한 培地위에 이 切片을 3개씩 移植한 후 25±1°C에서 2,000 lux의 螢光(광 주기: 18/6시간)으로 照射하여 callus를 유도하였다.

각각의 代數增殖期(유도 4주째)에서 callus 生重量 100 mg을 채취하여 auxin으로 2,4-D 또는 NAA 11.5, 1.5 μM 그리고 nicotine의 前驅物質로 밝혀진 0.1 mM의 L-aspartic acid 또는 L-arginine을 각각 첨가한 3% sucrose와 0.9% agar의 MS 培地에 이식한 후 25±1°C에서 2,000 lux의 螢光(光 16시간, 暗 8시간)을 照射하여 5주간 배양하였다. 배양 1주일 마다 callus를 採取하여 nicotine 精량의 試料로 하였다.

Nicotine 抽出 및 定量. 배양시기별 callus 生重量 1 g을 冷蔵 貯藏한 mortar에 넣고 0.1%(v/v) 1 N HCl이 含有된 40%(v/v) methanol 2 ml를 부은 후, 約 5분간 磨碎하여 추출하였다(Saunders and Blume, 1981). 이 抽出物을 500×G에서 5분 동안 遠心分離하였다. 上澄液을 HPLC(high performance liquid chromatography) injector에 注入하기 전에 Büchner funnel의 Whatmann filter paper No. 2로 濾過하고, Baker-10 SPE System(C₁₈ extraction column)과 0.45 μm Millipore filter로 濾過한 다음 10 μl씩 注入하였다. 標準 nicotine은 純도가 98-99%인 Sigma社 製品으로 HPLC用 methanol에 녹여 4°C 暗狀態에서 貯藏하면서 使用하였다. 표준 nicotine도 試料와 마찬가지로 Baker-10 SPE System과 0.45 μm Millipore filter로 濾過시킨 다음 HPLC injector에 注入하였다.

Alkaloid는 3.9×300 mm, 5 μm particle size를 갖는 bonda-pack(C₁₈) column(Water Co., Model 206)으로 室溫에서 分離하였다. Isocratic mobile phase는 acetic acid로 pH 4.0으로 맞춘 60%의 30 mM sodium acetate buffer를 含有한 40% acetonitrile로 하였고, 流速 1 ml/min로 통과

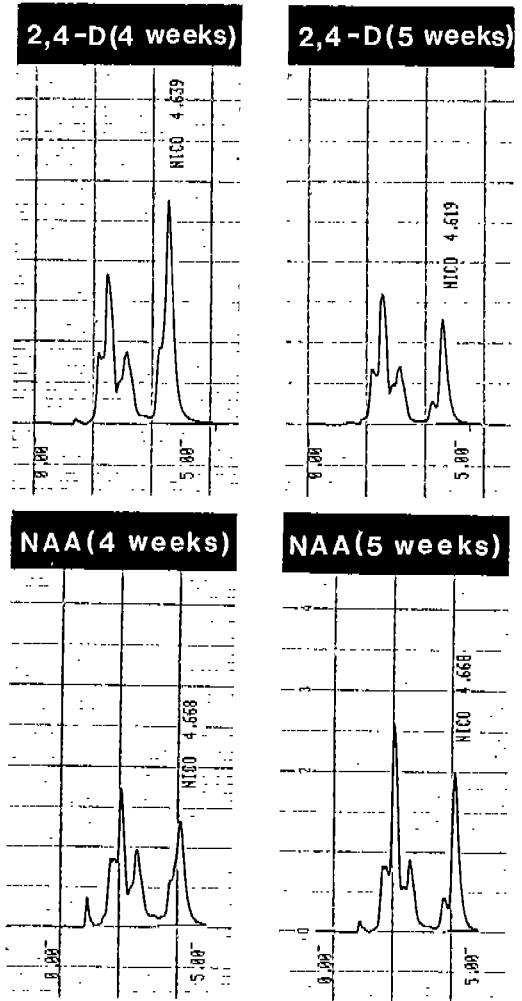


Fig. 1. HPLC profiles of alkaloids from calluses which were cultured for 4 and 5 weeks on MS medium supplemented with 11.5 μM of 2,4-D (upper) and NAA (low). Alkaloids were separated under isocratic conditions at a flow rate of 1 ml per min.

시켜 254 nm에서 檢出, 定量하였다. 모든 HPLC用 溶媒는 J.T. Baker Chemical社(Phillipsburg, N.J. USA) 製品을 使用하였다.

結果 및 考察

야생담배(*Nicotiana glauca*) callus 배양에 있어서 nicotine 생성에 미치는 두 가지 auxin, 2,4-D와 NAA의 영향을 조사하기 위하여 callus 배양시기에 따라 추출한 nicotine을 HPLC를 이용하여 분석하였다(Fig. 1).

Table 1. Comparison between nicotine levels of the *Nicotiana glauca* callus grown on medium containing high (11.5 µM) or low (1.5 µM) 2,4-D levels and high (11.5 µM) or low (1.5 µM) NAA levels

Culture (week)	Callus on 2,4-D		Callus on NAA	
	high	low	high	low
1	589.9± 67.6	560.1± 33.6	875.4± 48.2	684.7± 44.4
2	1488.0± 88.5	2933.1± 54.2	3222.7± 90.4	2621.8± 88.9
3	2742.3± 98.9	3721.6± 91.8	3017.3± 72.8	2313.5± 91.6
4	4253.9± 93.2	4454.4± 73.3	2891.9± 83.3	1973.0± 70.9
5	1922.0± 70.7	3604.9± 90.5	1273.1± 65.4	1616.6± 77.7

Data± SD are the mean values of three measurements, µg/g fresh weight. 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid; NAA, α-naphthaleneacetic acid.

Callus 배양시기에 따라 nicotine 생성에 미치는 高濃度 (11.5 µM)의 2,4-D는 callus 배양 4주째에 nicotine 함량의 最大値를 나타내었고, 5주째에 현격한 減少를 나타내었다 (Table 1). 한편 高濃도의 NAA 경우는 배양 2주째에 최대치를 나타내고 이 후 감소되었다(Table 1). 이와 같은 결과는 담배(*N. tabacum*) callus 배양에 있어서 callus 細胞株에 따라 10⁻⁶ 또는 10⁻⁵ M보다 높은 농도에서 억제 효과를 나타낸다는 보고와 일치된다(Furuya *et al.*, 1971; Tabata *et al.*, 1971; Shiio and Ohta, 1973; Takahashi and Yamada, 1973; Lockwood and Essa, 1984). 또한 nicotine 생합성에 두 가지 auxin(2,4-D 및 NAA)의 영향은 차이가 있음을 나타내고 있다.

한편 저농도(1.5 µM)의 2,4-D는 고농도와 마찬가지로 배양 4주에 최대함량을 나타내었고, 저농도의 NAA는 고농도와 마찬가지로 배양 2주째에 최대함량을 나타내나 그 함량은 적었다(Table 1). 이와 같은 결과는 callus 誘導過程에 있어서의 증가 및 감소 현상과 일치하고 있다(Yeo and Kim, 1990).

각 처리군에 있어서 nicotine 함량이 減少되는 현상은 축적된 nicotine이 다른 alkaloid로 轉換되는 것으로 해석

된다(Fig. 1; Table 1). 담배屬의 주요 alkaloid는 retention time으로 보아 normicotine, anabasine, nicotine의 순으로 分子량을 갖고 있기 때문에(Tiburcio *et al.*, 1985a), 배양 2주 또는 4주째에 栽培種 담배(*N. tabacum* NTW-38) callus 배양에 있어서와 같이 nicotine이 anabasine 등의 alkaloid로 전환되거나 배지에 축적되었음을 시사한다(Ohta *et al.*, 1978; Tiburcio *et al.*, 1985a, 1985b).

저농도(1.5 µM)의 2,4-D 첨가배지에 nicotine의 pyrrolidine ring의 전구물질로서 L-aspartic acid와 L-arginine을 각각 0.1 mM씩 첨가하여 배양한 경우 L-aspartic acid와 L-arginine(0.1 mM) 첨가와 무첨가배양에서 모두 배양 4주째 最大値를 나타내었고, 5주째는 감소되었다(Table 2). 배양 4주째 nicotine 함량의 比較는 對照區가 가장 높았고(4,454.4 µg/g F.W.), 두 전구물질의 첨가배양은 각각 3,604.3과 3,729.8 µg/g F.W.로 비슷하게 생성이 억제되었다. 이와 같은 결과는 담배(*N. tabacum* NTW-38) 懸濁培養에서의 결과와 일치된다(Tiburcio *et al.*, 1985a). 그리고 두 전구물질의 첨가는 배양 5주째 대조구에 비해 nicotine 함량의 차이를 나타내었는데, 이는 두 가지 전구물질의 첨가에 따라 nicotine이 다른 alkaloid로 전환되는 율이 다르기 때문이라고 해석된다.

한편, 低濃度(1.5 µM)의 NAA 첨가배양에 있어서 배양 2주째에 nicotine 함량의 최대치를 나타내었다(Table 2). 高濃度(11.5 µM)의 NAA 처리에 있어서 배양 5주째에 최대치를 나타낸 것과 비교해 볼 때(Table 1), 저농도의 NAA 처리는 nicotine 생성을 억제시켰다고 할 수 있다. 이 농도는 담배(*N. tabacum* cv. Bright Yellow) callus에 있어서 nicotine 생성의 최적농도 범위에 있다(Ohta *et al.*, 1978). 본 연구 결과는 Ohta 등(1978)의 연구와는 상반된다. 그 이유는 callus 細胞株에 따라 nicotine 생성에 대한 효과가 촉진 또는 억제를 나타내는 것으로 해석된다(Furuya *et al.*, 1971; Shiio and Ohta, 1973). 그러나 L-arginine 첨가배양에 있어서는 대조구와 마찬가지로 nicotine 함량이 감소되었으나, L-aspartic acid 첨가배양에 있어서는 배양 5주까지 증가되었다(Table 2). 이와 같은 결과는 L-arginine은

Table 2. Comparison between alkaloid levels of the *Nicotiana glauca* callus grown on medium containing low (1.5 µM) 2,4-D and NAA levels and supplemented with L-aspartic acid and L-arginine

Culture (week)	Callus on 2,4-D			Callus on NAA		
	Control	L-Asp	L-Arg	Control	L-Asp	L-Arg
1	560.1± 33.6	958.2± 46.3	822.7± 56.1	684.7± 44.4	884.7± 66.1	599.3± 23.7
2	2933.1± 54.2	3290.3± 54.2	2063.1± 77.9	2621.8± 88.9	2278.2± 80.4	2404.2± 87.9
3	3721.6± 91.8	3419.9± 91.3	2876.0± 84.2	2313.5± 91.6	2514.7± 88.3	1877.4± 88.4
4	4454.4± 73.3	3604.3± 85.5	3729.9± 90.3	1973.0± 70.9	2714.2± 82.7	1318.0± 59.8
5	3604.9± 90.5	1729.2± 87.2	3236.5± 92.4	1616.6± 77.7	3532.4± 95.6	1002.3± 90.0

Data± SD are the mean values of three measurements, µg/g fresh weight. L-Asp, L-aspartic acid; L-Arg, L-arginine.

pyridine ring의 전구물질로서 L-aspartic acid는 nicotine의 pyrrolidine ring의 전구물질로서, 일반적으로 전구물질의 첨가배양은 이를 첨가하지 않는 배양에 비해 nicotine 생성을 억제한다는 보고와 상반된다. 그러나 이들의 배지첨가는 Burley 담배 callus 배양에 있어서는 nicotine 생성을 증가시킨다는 보고(Miller *et al.*, 1983)와는 일치된다.

이와 같은 결과에서 보는 바와 같이 저농도의 auxin과 전구물질 L-aspartic acid의 첨가배양으로 nicotine 생성을 유도할 수 있었다. 저농도의 2,4-D와 NAA의 nicotine 생성의 作用機作을 비교해 볼 때 2,4-D는 nicotine 생성과 nicotine이 다른 alkaloid로의 轉換을 촉진하였다. 이에 반해 NAA는 nicotine 생성과 nicotine이 다른 alkaloid로의 전환되는 것을 억제시켰다고 할 수 있다. 특히 전구물질로서 L-aspartic acid 첨가배양에 있어서는 저농도의 NAA는 저농도의 2,4-D보다 많은 양의 nicotine을 생성하였다. 그러므로 본 연구의 배양세포에 있어서 nicotine 생산에 대한 저농도의 NAA 효과는 L-aspartic acid를 포함한 대사계와 관련있는 것으로 추정된다. 담배 뿌리와 callus에 있어서 pyridine nucleotide cycle에 참여하거나 관련이 있는 효소의 활성은 nicotine 축적에 따라 결정되므로(Wagner *et al.*, 1986a, 1986b), nicotine 생성의 바로 전구물질인 nicotinic acid는 두 가지 경로 즉, nicotinic acid mononucleotide로부터 직접 또는 NAD의 합성과 분해를 통하여 보충된다고 보고된 바 있다(Wagner *et al.*, 1986a, 1986b). 따라서 저농도의 NAA 효과는 이러한 과정에서 작용하였다고 추정할 수 있으며, 이에 대한 구체적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

摘 要

담배(*N. glauca*) 잎 切片 유래 callus 培養에 있어서 cal-
lus 生長 단계에 따라 nicotine 生成에 미치는 두 가지 auxin
(2,4-D와 NAA)의 影響을 HPLC를 이용하여 조사하였다.

高濃度(11.5 μM)의 2,4-D는 배양 4주째에, NAA는 배양
2주째에 nicotine 生成을 促進시켜 最大含量을 나타내었고,
그 이후로는 減少하였다. 생성된 nicotine이 다른 alkaloid로
轉換되었다. 한편, 前驅物質로 알려진 L-arginine 또는 L-
aspartic acid 첨가배양에서 저농도(1.5 μM)의 2,4-D는 고
농도에 비해 nicotine 생성을 촉진시켰고, 저농도의 NAA는
고농도에 비해 억제시켰다. 그러나 L-aspartic acid 첨가배
양에서 저농도의 NAA는 배양 5주까지 nicotine 생성을
촉진시켰다. 이와 같은 결과로부터 두 가지 auxin은 nico-
tine 생성에 대해 효과가 다르며, L-aspartic acid가 nicotine
생합성의 전구물질으로서, 저농도의 NAA는 이 합성경로에
작용하여 nicotine 생성을 誘導하였음을 추론할 수 있었다.

參 考 文 獻

- Furuya, T., H. Kojima and K. Syóno. 1966. Nicotine and anatabine in tobacco callus tissue. *Chem. Pharm. Bull.* **14**: 1189-1190.
- Furuya, T., H. Kojima and K. Syóno. 1971. Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in tobacco callus tissues. *Phytochemistry* **10**: 1529-1532.
- Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplast of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.* **96**: 135-141.
- Lockwood, G.B. and A.K. Essa. 1984. The effect of varying hormonal and precursor supplementations on levels of nicotine and related alkaloids in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Rep.* **3**: 109-111.
- Miller, R.D., G.B. Collins and D.L. Davis. 1983. Effects of nicotine precursors on nicotine content in callus cultures of Burley tobacco alkaloid lines. *Crop Sci.* **23**: 561-565.
- Misawa, M. 1985. Production of useful plant metabolites. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Plant Cell Culture*, A. Fiechter (ed.). Springer-Verlag, Berlin. 59 pp.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* **5**: 473-479.
- Ohta, S., O. Matsui and M. Yatazawa. 1978. Culture conditions for nicotine production in tobacco tissue culture. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1245-1251.
- Saitoh, F., M. Noma and N. Kawashima. 1985. The alkaloid contents of sixty *Nicotiana* species. *Phytochemistry* **24**: 477-480.
- Saunders, J.A. and D.E. Blume. 1981. Quantitation of major tobacco alkaloids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **205**: 147-154.
- Shiio, I. and S. Ohta. 1973. Nicotine production by tobacco callus tissues and effect of plant growth regulators. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 1857-1864.
- Speake, T., P. McCloskey and W.K. Smith. 1964. Isolation of nicotine from cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Nature* **201**: 614-615.
- Tabata, M., H. Yamamoto, N. Hiraoka, Y. Marumoto and M. Konoshima. 1971. Regulation of nicotine production in tobacco tissue cultures by plant growth regulators. *Phytochemistry* **10**: 723-729.
- Takahashi, M. and Y. Yamada. 1973. Regulation of nicotine production by auxins in tobacco cultured cells *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 1755-1757.
- Tiburcio, A.F., R. Ingersoll and A.W. Galston. 1985a. Modified alkaloid pattern in developing tobacco callus. *Plant Sci.* **38**: 207-212.
- Tiburcio, A.F., R. Kaur-Sawhney, R. Ingersoll and A.W. Galston. 1985b. Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus. *Plant Physiol.* **78**: 323-326.

- Wagner, R., F. Feth and K.G. Wagner. 1986a. Regulation in tobacco callus of enzyme activities of the nicotine pathway. II. The pyridine-nucleotide cycle. *Planta* **168**: 408-413.
- Wanger, R., F. Feth and K.G. Wagner. 1986b. The regulation of enzyme activities of the nicotine pathway in tobacco.

Physiol. Plant. **68**: 667-672.

- Yeo, U.D. and K.H. Kim. 1990. Simultaneous effects of two auxins and irradiation on growth and nicotine production of callus derived from *Nicotiana glauca* Graham leaf explants. *Bull. Mol. Biol. Genet.* **3**: 1-5.
(1990. 12. 26 接受)