

光獨立營養細胞를 利用한 새로운 除草劑 選拔法 確立

I. 담배의 光獨立營養細胞 育成을 위한 培養條件의 究明

金吉雄 · 徐秀旻 · 權純泰*

Establishment of a New Herbicides Screening Method Using Photoautotrophic Cultured Cell

I. Studies on Culture Conditions for Developing Photoautotrophic Cells in Tobacco

Kim, K.U., S.K. Suh and S.T. Kwon*

ABSTRACT

This study was conducted to determine the appropriate culture conditions for developing photoautotrophic cells from tobacco using plant growth regulators, sucrose and light condition in LS medium. The greatest callus induction was observed in the LS medium supplemented with 10^{-5} M NAA and 10^{-4} M BA, showing 3.08 g of callus fresh weight determined at 30 days after incubation. The highest chlorophyll content of callus was obtained in the LS medium supplemented with 10^{-5} M NAA and 10^{-6} M BA, showing $28.42\mu\text{g/g}$. In both light and dark conditions, callus induction increased as the concentration of sucrose increased from 0.5% to 3.0%. In particular, in the light condition, the greatest callus induction was made in the LS medium supplemented with 2% sucrose. On the other hand, the heighest chlorophyll content was observed at 0.5% sucrose and chlorophyll wasn't induced in dark condition. The chlorophyll content of callus cultured in LS medium containing 0.75% sucrose was similar to 1% sucrose, as far as the chlorophyll content of callus was concerned.

Key words : photoautotrophic cells, culture conditions, tobacco.

緒 言

植物의 培養細胞는 環境 調節이 容易하고 취급이 쉬운 잇점이 있으며 많은 變異株를 生成하기 때문에 組織培養을 통해 育成된 培養細胞는 生理生化學의 研究에 利用 될 뿐만 아니라 除草劑의 效果 究明이나 除草劑 耐性細胞 또는 植物體 選拔에 이용되고 있다.^{6,5)}

최근에 光合成의 構造 및 機能的 解析 등에 培養細胞를 利用한 方法등이 檢討되고 있으며 Yamada 등^{7,8,12,13)}은 光合成機能의 解析 및 利用을 目的으로 細胞培養 培地에 炭素原인 sucrose

의 供給없이 mesophyll cell과 類似한 葉綠體를 발달시켜 光을 獨立的으로 이용하는 光獨立營養細胞(photoautotrophic cell)을 얻었다고 報告하였다.

그러나 高等植物의 培養細胞로 부터 光獨立營養細胞를 分離하는 것은 쉬운 일이 아니며 그동안 많은 研究가 시도되었으나 成功한 事例는 콩(*Glycine max* L.)을 비롯하여 아스파라거스(*Asparagus officinalis*), 명아주(*Chenopodium rubrum*), 사리풀(*Hyoscyamus niger*), 담배(*Nicotiana tabacum* var. samsun), 시금치(*spinachia oleracea*), 감자(*Solanum tuberosum*, L. CV. super) 등의 植物에서 報告된 바 있다.³⁾

* 慶北大學校 農科大學 College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
이 論文은 1990年度 韓國科學財團의 基礎 一般 研究費에 의하여 研究되었음.

光合成 作用에 의한 生長이 강한 光獨立營養細胞가 育成될 수 있다면 이들 細胞를 이용한 光合成 抑制 除草劑등의 新規 和合물의 器內에서 效果 檢定 및 耐性 植物 選拔에도 유익하게 이용될 수 있을 것으로 思料된다.

光獨立營養細胞에서 發育된 葉綠體의 化學的 조성이나 光合成 能力은 葉肉細胞와 類似하나 同一하지는 않다고 報告되었으며,⁴⁾ 光獨立營養細胞의 光合成은 주로 Calvin cycle을 통해 炭酸가스를 固定하며 附加的으로 PEP carboxylase의 活性이 높다고 한다.⁵⁾

따라서 本 研究은 器內에서 光獨立營養細胞를 용이하게 育成하는 조건을 確立하기 위하여 여러 種의 植物生長調節劑 및 sucrose농도를 달리한 배지에서 담배 callus의 유도 및 生長과 葉綠素 生成에 미치는 影響을 조사하였다.

材料 및 方法

本 實驗에 사용된 담배 品種은 NC 82로서 1989年 韓國人蔘煙草研究所에서 採種한 種子를 分讓받아 充實한 種子를 엄선하여 使用하였으며 sodiumhypochlorite 1% 溶液에 15분간 殺菌 후 催芽시켜 pot에 播種하여 溫室에서 栽培하였다.

담배의 callus 誘導는 葉을 採取하여 1×1cm 단편으로 잘라 70% ethanol에 30초, 1% sodiumhypochlorite에 15분간 殺菌하고 殺菌水로 4회 세척한 후 여러가지 培地에 置床하여 誘導시켰다.

1. 植物生長調節劑가 담배의 callus 誘導 및 葉綠素의 生成에 미치는 影響

植物生長調節劑가 담배의 callus 誘導 및 葉綠素 生成에 미치는 影響을 究明하기 위해 담배의 葉 斷面을 auxin類인 NAA(Naphthaleneacetic acid) 10^{-6} , 5×10^{-5} , 10^{-5} M과 cytokinin類인 kinetine 및 BA(Benzyl adenine) 5×10^{-7} , 10^{-6} , 2×10^{-6} M을 單獨 및 混合 添加하고 sucrose 3%를 添加한 LS 固體培地에 置床하여 25°C의 光狀態에서 培養시켰다. Callus 誘導量은 培養 후 30 日째에 生體重으로 測定하였으며 callus의 葉綠素의 含量은 Sunderland의 方法¹¹⁾에 準하여 막 자사발에 callus를 넣고 80% acetone 10ml을 가하여 攪拌한 후 遠心分離하여 上等液을 취해 紫

外線 分光光度計로 645nm, 663nm에서 吸光度를 測定하여 Arnon의 方法¹⁾에 따라 總 葉綠素 含量을 다음의 公式로 산출하였다.

$$C = (20.2 \times D_{645} + 8.02 \times D_{663}) \times 10 (\mu\text{g}/\text{生體重 } 1 \text{ g})$$

C = 總 葉綠素 含量

D₆₄₅ = 645nm의 吸光度

D₆₆₃ = 663nm의 吸光度

2. 培養培地の sucrose의 濃도가 callus 誘導, 生長 및 葉綠素의 含量에 미치는 影響

本 實驗은 sucrose 含量이 誘導되어 있는 callus의 增殖에 미치는 影響을 究明하기 위한 것으로서 callus 誘導는 實驗 1에서 가장 效果的인 NAA 10^{-5} M, BA 10^{-6} M 및 sucrose 3%가 含有된 固體培地를 使用하였으며, 3주 간격으로 3번 繼代 培養한 후 sucrose 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0%를 含有한 培地에 callus(약 0.2 g)를 置床하여 30日 후에 增殖된 callus의 生體重과 葉綠素의 含量을 測定하였다.

結果 및 考察

1. 植物生長調節物質이 callus 誘導와 葉綠素 含量에 미치는 影響

담배 잎으로 부터 callus 誘導는 LS 基本 培地에서 NAA의 濃도에 따라 크게 달라졌는데 NAA 濃도가 가장 높은 10^{-5} M에서 callus 生體重이 높게 나타났으며 BA 10^{-6} M과 混合處理하였을 때 가장 높은 callus 生體重을 보였다.

BA와 kinetine처리는 濃度間에 差異를 보이지 않았으며 담배 잎으로 부터의 callus 誘導는 NAA 濃도에 크게 좌우 되는 傾向을 보였고, NAA와 BA의 混合 處理가 kinetine의 混合 處理보다 callus 誘導에 보다 效果的이었다(表 1). 따라서 담배 callus 誘導에는 NAA 10^{-5} M, BA 10^{-6} M을 混合 處理한 것이 가장 適切함을 알 수 있다.

植物生長調節劑의 組成을 달리한 培地에서 誘導된 callus의 葉綠素 含量은 BA와 kinetine의 種類에 關係없이 전반적으로 NAA 5×10^{-6} M 處理에서 높게 나타났으나 가장 높은 葉綠素 含量은 NAA 10^{-5} M과 BA 10^{-6} M 組合에서 얻어졌다. 또 BA가 kinetine보다는 效果的이며 BA

Table 1. Combining effect of NAA with BA or kinetine on callus induction of *N. tabacum*.¹⁾

Hormones Concentration	Fresh weight of callus (g) ²⁾						
	BA (M)			Kinetine (M)			
	5×10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	2×10 ⁻⁶	5×10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	2×10 ⁻⁶	
NAA (M)	10 ⁻⁶	S ³⁾	S	S	S	S	S
	5×10 ⁻⁶	1.59	1.83	1.83	1.67	1.47	1.44
	10 ⁻⁵	2.54	3.08	3.03	2.59	2.89	2.60

¹⁾ Basal medium : LS medium with 3% sucrose.

²⁾ Fresh weight of callus induced from 1 square cm of leaf disc, determined at 30 days after incubation.

³⁾ S : direct shooting.

Table 2. Combining effect of NAA with BA or kinetine on total chlorophyll content in callus of *N. tabacum*.¹⁾

Hormones Concentration	Total chlorophyll content (μg/g.FW) ²⁾						
	BA (M)			Kinetine (M)			
	5×10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	2×10 ⁻⁶	5×10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	2×10 ⁻⁶	
NAA (M)	5×10 ⁻⁶	21.82	27.39	22.06	13.90	13.93	26.35
	10 ⁻⁵	16.62	27.42	21.92	11.04	13.04	13.0

¹⁾ Basal medium : LS agar medium with 3% sucrose.

²⁾ Total chlorophyll content indicates chlorophyll a (645 nm) plus chlorophyll b (663 nm), determined at 30 days after incubation.

10⁻⁶ M과 NAA 5×10⁻⁵ 또는 10⁻⁶ M 혼합 배지에서 높게 나타났다. NAA 농도 간에는 低濃度인 5×10⁻⁶ M이 10⁻⁶ M 보다 單位 生體重당 葉綠素 含量을 增加시켰으나, 表 1에서 제시된 callus 誘導量을 고려하면 全 callus의 總 葉綠素 含量은 NAA 10⁻⁵ M에서 더 높을 것이다. (表 2).

따라서 光獨立營養細胞 選拔을 위한 基礎培養에 가장 適切한 培地조성은 NAA 10⁻⁵ M과 BA 10⁻⁶ M로 思料되며 이것은 Yamada¹²⁾ 등의 *Cytisus scoparius*와 *Hyoscyamus niger*의 光獨立營養細胞 育成을 위해 使用된 培地 造成과 비슷하다.

2. 培養培地の sucrose의 濃度와 光條件이 callus 誘導, 生長 및 葉綠素의 含量에 미치는 影響

光獨立營養細胞 選拔 基礎 培養에 適切한 sucrose 濃度和 光條件을 調査하기 위하여 sucrose 濃度を 달리하여 添加한 培地를 이용하여 光狀態와 暗狀態에서 callus 誘導量을 調査한 結果, sucrose의 濃도에 관계없이 光狀態에서 callus의 誘導量이 높았으며, sucrose의 含量이 增加함에 따라 明, 暗狀態에 관계없이 callus 誘導量이 增加하는 傾向을 보였으며, 暗狀態에서는 sucrose 3%에서, 光狀態에서는 2%에서 가장 高

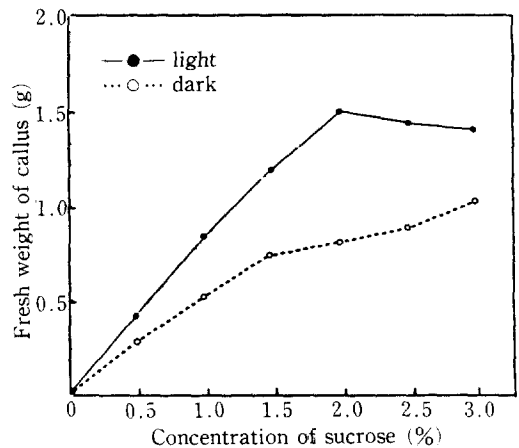


Fig. 1. Effect of sucrose concentrations on callus induction of *N. tabacum* under light and dark conditions¹⁾.

¹⁾ Basal medium : LS agar medium modified by NAA 10⁻⁵ M and BA 10⁻⁶ M, determined at 30 days after incubation.

은 誘導量을 나타냈다(그림 1).

暗狀態에서 誘導된 callus의 葉綠素 含量은 sucrose의 濃도에 관계없이 거의 生成되지 않아 흰색을 띠었으며, 光狀態에서는 葉綠素가 生成되어 綠色을 띠었는데 葉綠素 含量은 sucrose 0.5%에서 47.55μg/g으로 가장 많았고, sucrose 3%에서 21.2μg/g으로 가장 적어 sucrose의 濃

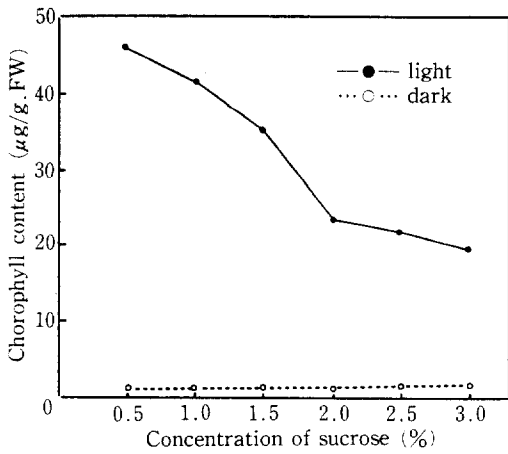


Fig. 2. Effect of sucrose concentrations on chlorophyll content of *N. tabacum* under light and dark conditions¹⁾.

¹⁾ Basal medium: LS agar medium modified by NAA 10^{-5} M and BA 10^{-6} M, determined at 30 days after incubation.

도가 낮아 질 수록 葉綠素의 生成이 增加됨을 나타내었다(그림 2).

그림 3은 sucrose 2%가 함유된 培地에서 誘導된 callus를 sucrose 含量을 낮추어 培養한 結果로서, callus의 增殖은 sucrose 2%에서 7.08g으로 가장 높았고, sucrose 1%에서 6.80g, 3%에서 3.07g으로 나타났다. 그러나 葉綠素 含量은

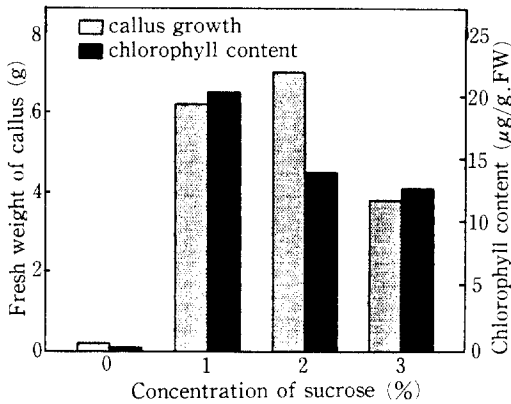


Fig. 3. Effect of sucrose concentrations on callus growth and chlorophyll content in *N. tabacum*¹⁾.

¹⁾ Initial calli were subcultured for 3 passages of 3 weeks in LS medium modified by 3% sucrose, NAA 10^{-5} M and BA 10^{-6} M, Determined at 30 days after incubation.

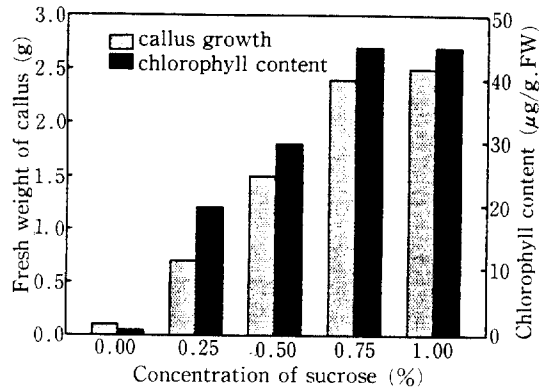


Fig. 4. Effect of various concentrations of sucrose on callus growth and chlorophyll content in *N. tabacum*¹⁾.

¹⁾ Initial calli were subcultured for 4 passages of 3 weeks in LS medium modified by 1% sucrose, NAA 10^{-5} M and BA 10^{-6} M. Determined at 3 weeks after incubation.

sucrose 1%에서 가장 많았으며, sucrose의 濃度가 增加함에 따라 減少하는 傾向을 보였다. Sucrose 1%에서 葉綠素가 많이 生成되어 callus 增殖에 影響을 끼친 것으로 判명되며, chlorophyllous cell의 光合成 能力을 예측할 수 있다. 그림 3에서 callus 增殖과 葉綠素 含量이 비교적 높게 유지되는 sucrose 1%가 含有된 培地에서 增殖된 callus를 sucrose의 含量을 더욱 낮추어 培養해보면 callus 生長과 葉綠素 含量은 sucrose 濃度가 0.25%로 낮아질수록 減少하는 傾向을 보이나(그림 4), sucrose 0.75% 濃度에서 葉綠素의 含量이 $40.58\mu\text{g/g}$ 으로 1%의 $44.45\mu\text{g/g}$ 과 비슷했고 生長量에는 별 差異를 보이지 않는 것으로 보아 sucrose의 濃度를 0.75% 까지 낮추어도 葉綠素 含量이 높은 細胞를 培養할 수 있을 것으로 思料된다.

이와 같은 사실은 光狀態에서 sucrose의 濃度가 3.0%에서 0.75%까지 낮아질 수록 葉綠素의 含量이 增加되어 sucrose의 要求量이 낮아지는 것을 미루어 보아 아마도 光條件 下에서 形成된 葉綠素를 含有한 培養 細胞가 光合成을 行해서 자체에서 有機物을 合成하기 때문이 아닌가 推定된다.

현재의 實驗 結果로서 明確하게 綠化된 培養細胞가 光合成 能力을 갖고 있는 光獨立營養細胞로

推定하기는 어려우나 이들 培養 細胞 中에는 從屬營養細胞와 光獨立營養細胞가 섞여 있을 것으로 思料된다. Yamada 등¹³⁾은 光合成 能力의 解析 및 利用을 目的으로 細胞 培養培地에 炭素原인 糖의 供給없이 mesophyll cell과 類似한 葉綠體를 發達시켜 光을 獨立的으로 이용한 光獨立營養細胞를 分離하는데 成功한 바 있고, 콩을 비롯한 몇 種의 植物細胞 培養에서 光獨立營養細胞를 選拔하는데 成功하였기 때문에, 高等植物의 種에 따라서 適切한 培地 造成과 培養 體系가 確立된다면 培養 細胞의 生理 生化學의 研究 뿐만 아니라 光合成 抑制 除草劑의 效果 究明이나 耐性 植物體 育成 研究에도 金요하게 利用될 수 있을 것으로 思料된다.

摘 要

담배 잎으로 부터 光獨立營養細胞 育成 方法을 確立하고자 植物生長調節劑 및 sucrose 濃度와 빛이 담배의 細胞 培養과 培養 細胞의 葉綠素 生成에 미치는 影響을 조사하여 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 담배 잎으로부터 callus 誘導에는 LS 基本 培地에 NAA 10^{-5} M과 BA 10^{-6} M을 混合 處理하였을때 置床 후 30일째 3.08g으로 가장 높았다.
2. Callus의 葉綠素 含量도 LS 基本 培地에 NAA 10^{-5} M과 BA 10^{-6} M을 混合 處理한 組合에서 28.42 μ g/g.(FW)의 가장 높은 含量을 얻었다.
3. 光 및 暗條件 下에서 sucrose 濃도가 0.5%에서 3.0%까지 增加할 수록 callus 誘導量이 增加되었으나 특히 光條件下에서는 sucrose 濃도 2.0%에서 가장 높았고 반면에 葉綠素 含量은 sucrose 濃도 0.5%에 가장 높았으며 暗條件 下에서는 葉綠素가 거의 形成되지 않았다.
4. 葉綠素 含量에 關한 한 sucrose 濃도를 0.75%까지 낮추어도 sucrose 濃도 1.0%와 類似한 傾向을 보였다.

引 用 文 獻

1. Arnon, D.I. 1959. Copper enzymes in isolated chloroplasts nonoxidase in *Beta vulgaris*. Plant

Physiology 24 : 1-15.

2. Barz, W., H. Hilegard, W. Hüsemann, G. Schceiders and H.K. Mangold. 1980. Alkaloids and lipids of heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic cell suspension cultures of *peganum harmala*. *Planta Med.* 40 : 137-148.
3. Chunche, X., L.C. Blair, S.M. Roger, D. Govindjee and J.M. Widholm. 1988. Characteristics of five new photoautotrophic suspension culture including two *Amarantus* species and a cotton strain growing on ambient O₂ levels. *Plant Physiol.* 88 : 1298-1320.
4. Horn, M.E. and J.M. Widholm. 1984. In, Collins, G.B. Pelobined. Application of genetic engineering to crop improvement. Dr. W. Junk Publishers. pp.113-161.
5. Karl Hermann and Ludwing Bender. 1987. Photosynthesis in cell and tissue culture systems. *Plant tissue and cell culture* pp.151-165.
6. K. Nishida, F. Sato and Y. Yamada. 1980. Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophically and photomoxotrophically cultured tobacco cells. *Plant & Cell Physiol.* 21(1) : 47-55.
7. Manabu Hagimori, Takashi Matsumoto and Yoichi Mikami. 1984. Photoautotrophic culture of undifferentiated cells and soot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L.. *Plant & Cell Physiol.* 25(6) : 1099-1102.
8. Mary B. Berlyn and Israel Zelitch. 1975. Photoautotrophic growth and photosynthesis in tobacco callus cells. *Plant Physiol.* 56 : 753-756.
9. Sato, F., S. Takeda and Y. Yamada. 1987. A comparison of effects of several herbicides on photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic cultured tobacco cells and seedlings. *Plant Cell Reports* 6 : 401-404.
10. Sato, F. and Y. Yamada. 1979. Photoautotrophic and photosynthetic potential of chlorophyllous cells in photomixotrophic cultures. *Plant Cell Physiol.* 20 : 193-200.
11. Sunderland, N. 1986. Pigmented plant tissue in culture. I. Auxins and pigmentation in chlorophyllous tissues. *Ann. Bot.* 30 : 256-268.
12. Yamada, Y. and F. Sato. 1983. The Photoautotrophic culture of chlorophyllous

cells. *Plant and Cell physiol.* 19(4) : 691-699.

13. Yamada, Y. and F. Sato. 1983. Selection of Photoautotrophic cells. In, *Handbook of Plant*

Cell Culture vol. I Ed. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada. Macmillan Pub. co. pp. 487-500.