

## 乾燥, 염분 및 糖의 처리가 쇠비름 (*Portulaca oleracea* L.) 배양細胞의 再分化에 미치는 영향

權純泰\* · 吳世明

安東大學校 自然科學大學 園藝育種學科

### Effects of Dessiccation, Sucrose and Salt Stress on the Regeneration of *Portulaca oleracea* Cultured Cells

Soon Tae KWON\* and Sei Myoung OH

Dept. of Horticulture and Breeding, Andong

National University Kyungpook, 760-749. \*Corresponding author.

The optimal level of growth regulators for callus initiation from stem explants was BAP 0.1 mg/L combined with 2,4-D 1.0 mg/L in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 30 g/L sucrose and 10 g/L agar, and that for cell growth was BAP 0.1 + 2,4-D 0.5 mg/L in MS liquid medium. The regeneration frequency of *P. oleracea* cells was significantly increased by subjecting the cells to dessiccation for 1 and 2 h up to 83% and 80%, respectively, as compared with untreated control showing 61%. Cell viability and survival rate was inhibited by pretreatment of 0.6% NaCl for 2 days, while regeneration ability was not affected by the treatment. Pretreatment of 100 g/L sucrose for 2 days markedly stimulated the regeneration of cells up to 81%. These results suggest that in addition to physiological changes, water stress resulted from dessiccation and high concentration of sucrose and NaCl is closely related to the regeneration of *P. oleracea* cultured cells.

**Key words:** cell viability, growth regulator, water stress

세포액보다 삼투압이 높은 용액, 즉 고장용액에 속에 세포가 노출되면 세포안과 밖 사이에 물의 확산구배가 생겨 물이 세포안에서 밖으로 삼투된다. 고농도의 염분과 당은 고장용액으로 작용하며 지속적인 처리로 세포는 생리적인 수분결핍과 함께 원형질분리현상이 일어날 수도 있다(Ting, 1982). 이러한 생리적 현상뿐만 아니라 세포내의 효소활성이나 막기능의 변화를 초래하기도 하며 세포내에 잠재해 있던 새로운 유전자의 활성화로 mRNA나 단백질의 발현에도 큰영향을 미치는 것으로 보고되어 있다(Ting, 1982; Claes et al., 1990; Ramagopal, 1987; Piatkowski et al., 1990). 한편, 고농도의 염분은 세포의 수분생리에 영향을 미칠뿐만 아니라  $Na^+$ 나  $Cl^-$ 이온이 세포의 생존에 치명적인 독성을 유발

할 수도 있다(Kramer, 1984).

쇠비름(*Portulaca oleracea* L.)은 주로 경작지나 노지에 서식하는 일년초로 강한 번식력과 환경적응성을 가진 식물로, 일부에서는 식용으로 사용되며 벌레와 뱀의 해독제나 이질 또는 이뇨제 등의 한약제로도 사용된다. 한편, C4 광합성 식물로 더운지방에서는 생활사가 1달정도로 짧고 종자번식뿐만 아니라 다육질인 잎, 줄기등이 잘리면 쉽게 뿌리를 내리 새로운 개체를 형성하는 강한 생존력을 가지고 있다. 이러한 특성을 지닌 쇠비름의 배양세포를 모델로하여 식물의 수분생리와 연관된 건조, 염분 및 당의 처리가 세포의 생장과 재분화에 미치는 영향을 조사하여 얻어진 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

본 실험에 사용된 쇠비름(*Portulaca oleracea* L.) 종자는 경북지방의 전작지에서 채종한 것으로, 종자를 30 g/L sucrose, 10 g/L agar가 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962)배지위에 무균과중하여 60일동안 25°C 광조건에서 자란 식물체의 잎, 줄기를 각각 5 mm길이로 잘라 배양재료로 사용하였다.

### 캘러스유도

쇠비름의 식물체부위별 캘러스 유도조건을 조사하기 위해 식물체를 종자, 잎 및 줄기로 나누어 실험을 수행하였다. 캘러스 유도배지는 MS 기본배지에 30 g/L sucrose, 10 g/L agar를 첨가한 것을 사용하였으며, 식물생장조절제는 2, 4-D 0.5, 1, 2, 4 mg/L와 BAP 0.1, 1 mg/L를 각 농도별로 조합하여 사용하였다. 배지 20 ml이든 멸균사레에 종자는 20립씩, 잎 및 줄기는 각각 10개씩의 절편체를 5반복으로 치상하여 온도 25°C 연속적인 형광등 광조건에서 4주후에 절편체별로 생성된 캘러스의 생체중을 조사하였다.

### 액체배양

상기 실험에서 캘러스형성이 가장 양호한 줄기캘러스를 획득하여 다시 2,4-D 1.0 + BAP 0.1 mg/L를 첨가한 MS 고체배지에서 한달간 증식시킨 후 액체배양 재료로 사용하였다. 액체배양은 캘러스증식매와 동일성분의 배지 20 ml이든 100ml 삼각플라스크에 약 1 g의 캘러스덩이를 넣어 분당 70 회의 진탕배양기에서 2주간 순화한 후 100 mesh의 체를 통과시킨 세포를 신선배지에서 다시 1주간 배양하였으며, 증식된 세포를 실험재료로 사용하였다. 공시된 배지는 R2, MS 및 R6배지(Chu et al., 1975)로 식물생장조절제 BAP 0 및 0.1 mg/L와 2,4-D 0.1, 0.5, 1.0 mg/L 조합으로 3주후 증식된 세포의 생체중을 조사하였다. 모든 실험에서 매주마다 신선배지를 교환하여 주었다.

### 건조, 염분 및 당의 전처리 및 재분화

건조처리는 배지를 제거한 액체배양 세포를 여과지위에 고르게 퍼서 laminar air flow에 노출시키는 방법으로 수행하였다. 매 시간별로 건조된 세포를 취하여, 세포활력은 TTC염색법으로 생존세포로부터 생성된 formazan을 95% ethanol로 추출한 후 485nm에서 흡광도를 측정하여 무처리 세포와 비교하였으며(Towill and Masur, 1975), 수분유실은 건조된 세포의 무게를 측정하여 최초 무게에 대한 비율로 환산하였다. 한편, 이들 세포를 NAA 0.1 + BAP 2 mg/L, 20 g/L sucrose, 15 g/L sorbitol, 0.3% casein hydrolysate가 든

MS 고체배지에 45개씩(9 cm 사레) 치상하여, 30일후 계속 성장하는 세포덩이 수를 조사하여 총 치상 한 수에 대한 비율을 세포생존률로하고, 생존한 세포에서 재분화율을 조사하였다. 염분(NaCl, 농도 0 에서 2.0 %) 및 당(sucrose, 농도 30에서 100 g/L)의 전처리는 배지에 각 성분을 농도별로 첨가하여 2일간 액체배양하였으며, 이들 세포를 MS 기본배지로 3회 세척하여 염분 및 당을 완전히 제거하고 건조처리와 동일한 방법으로 고체배지에 치상하여 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 캘러스유도조건

생장조절제 2,4-D 및 BAP를 처리하여 4주후에 절편체부위별로 유도된 캘러스의 생체중을 조사하였다(Fig. 1). BAP의 농도효과는 전반적으로 1.0 mg/L에 비해 0.1 mg/L처리가 캘러스유도에 효과적인 것으로 나타났으며, 절편체부위별로는 줄기에서 가장 많은 캘러스가 유도되었고, 잎 및 종자순으로 나타났다. 캘러스유도를 위한 최적농도조건을 보면, 종자는 2,4-D 0.5 + BAP 0.1 mg/L, 잎은 2,4-D 1.0 + BAP 0.1 mg/L이었고, 줄기는 잎과 종자의 최적농도에서 모두 양호한 캘러스유도를 보였는데, 특히 2,4-D 1.0 + BAP 0.1 mg/L처리에서 4주후에 절편체당 182.5 mg의 생체중을 보여 본 실험조건중 가장 양호한 생장조절제 조합으로 판명되었다. 식물조직배양에 있어서 생장조절물질인 auxin과 cytokinin의 상호작용에 대해선 이미 오래전부터 알려져 왔는데, 이들 두 생장조절제의 균형조절은 식물조직으로부터 캘러스형성 및 재분화 혹은 체세포배발생 및 신초나 뿌리의 생성과 같은 기관분화에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 왔다. 한편, 2,4-D는 세포의 기관분화에는 억제적

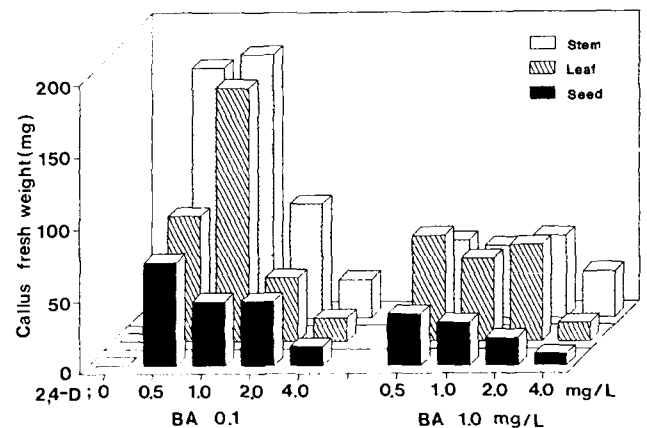


Figure 1. Effects of various concentrations of growth regulators on the fresh weight of callus derived from seed, leaf and stem explants of *P. oleracea* after 4 weeks of culture.

인 작용을 하는 것으로 알려져 있으나 일부 식물에서는 천연 auxin에 비해 캘러스형성에 효과적인 것으로 보고되고 있다(Mantel et al., 1985). 본 실험에서 식물의 절편체부위별로 캘러스유도를 위한 최적의 농도조건이 차이가 나는 것은 각 절편체의 식물생장조절제에 대한 반응차이도 있을 수 있겠으나 캘러스형성의 최적조건이 BAP 0.1 mg/L처리와 2,4-D 0.5에서 1.0 mg/L의 좁은 농도범위인 것으로 보아 각각의 절편체 스스로가 함유한 auxin계 내생호르몬의 함량차이와도 관련이 있을 것으로 사료된다.

### 액체배양조건

Table 1은 배지종류와 식물생장조절제 농도가 액체배양에 의한 세포의 증식량에 미치는 효과를 나타낸 것이다. 2,4-D 단일처리에서는 R6배지가 가장 효과적이었으며 BAP 0.1 mg/L와 2,4-D가 첨가된 배지에서는 MS배지가 가장 효과적인 것으로 나타났다. 액체배양 3주후에 세포생체중의 증가량을 보면 2,4-D 0.1 mg/L 단독처리에서 MS배지가 최초량의 235%, R6배지가 약 250%의 증가를 보였고 BAP 0.1 mg/L가 첨가된 배지에서는 MS 및 R6 배지 공히 2,4-D 0.5 mg/L에서 최적조건을 보여 각각 243.7% 및 220%의 증가를 보였다. 한편, R2배지는 모든 처리에서 MS나 R6배지에 비하여 세포증식에 저조한 효과를 나타냈다. 액체배지는 고체배지에 비하여 영양분이나 산소이용효율이 양호하여 세포의 대량증식에는 효율적이라고 하였는데(Kim, 1989), 캘러스생장을 위한 고체배지의 2,4-D 최적농도가 1.0 mg/L인데 비하여 액체배지에서는 0.5 mg/L 이하로 낮은 것은 이와도 연관이 있을 것으로 사료된다. 지속적인 실험수행을 위해 본 실험에서 세포증식을 위한 최적조건인 BAP 0.1 + 2,4-D 0.5 mg/L를 첨가한 MS배지에서 세포를 대량증식시켰다.

Table 1. Effects of growth regulators and media on the growth of suspension cultured cells.

Concentrations of growth regulators (mg/L) Medium	Percent cell growth <sup>a</sup>			
	R2	MS	R6	
BAP 0+2,4-D	0.1	194.5	235.0	243.5
	0.5	171.0	187.0	200.3
	1.0	181.0	190.0	180.4
BAP 0.1+2,4-D	0.1	187.0	226.4	216.0
	0.5	195.0	243.7	220.0
	1.0	136.0	216.4	123.5

<sup>a</sup>Suspension cultures were subcultured at an one-week interval. Cell growth was determined by measuring the fresh weight after 3 weeks of culture.

### 건조, 염분 및 당의 전처리효과

건조처리에 의한 세포의 수분유실 정도는 laminar air flow에 노출된 후 4시간 후면 90% 이상 유실되고, 그 이후에는 지속적인 건조에도 거의 변화가 없었다(Fig. 2). 건조 중인 세포의 TTC법(Towill and Masur, 1975)에 의한 활력을 보면 세포의 수분이 90% 이상 소실된 4시간 후에 88%이며, 24시간 건조 후에도 83%의 높은 활력을 유지하고 있었다. 수분유실속도에 비해 세포활력의 감소속도가 현저히 늦은 것으로 보아 세포는 수분이 90% 이상 소실된 후에도 죽지않고 장시간동안 활력을 유지할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 그러나, 건조한 세포의 고체배지에서 재생률은 급격한 수분유실속도와 비례하여 현저하게 감소하였다. 4시간 동안 건조하여 90% 이상까지 수분이 유실되어도 세포의 활력이 88%까지 유지되나 고체배지에서의 재생률은 29.9%로 현저히 낮은 것은 건조된 세포는 일정기간동안 세포의 활력이 유지될 수 있더라도, 본 실험에 사용된 조건으로는 세포가 다시 수분을 흡수하여 활력을 회복하거나 지속적인 생장을 하는 데는 심한 장애를 받는다는 것을 보여 주고 있다. Shin 등(1991)은 건조한 벼 캘러스의 재생에는 R2배지가 좋으며 배지에 고농도의 당과 ABA  $10^{-5}$ M을 첨가하면 재생률을 증가시키는데 효과적이라고 하였는데, 쇠비름도 건조처리 후 고체배지에서 재생률이 현저히 낮았으나 배지에 옮기기 직전의 활력은 상당히 높았던 것으로 보아 건조된 세포의 재생률을 증가시킬 수 있는 적정조건이 있을 것으로 예상되나 본 시험에서는 구명하지 못하였다. 한편, 건조처리에 의한 재분화율의 변화를 보면, 무처리의 세포는

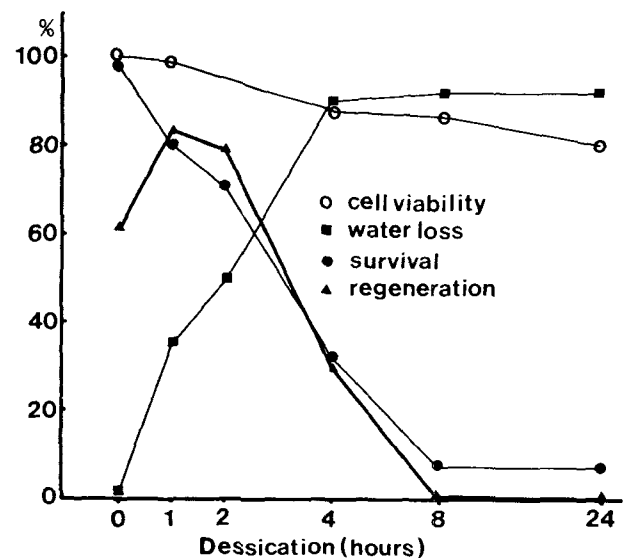


Figure 2. Percent cell viability (TTC), water loss, survival and regeneration of *P. oleracea* cultured cells as affected by desiccation for 1 to 24 h.

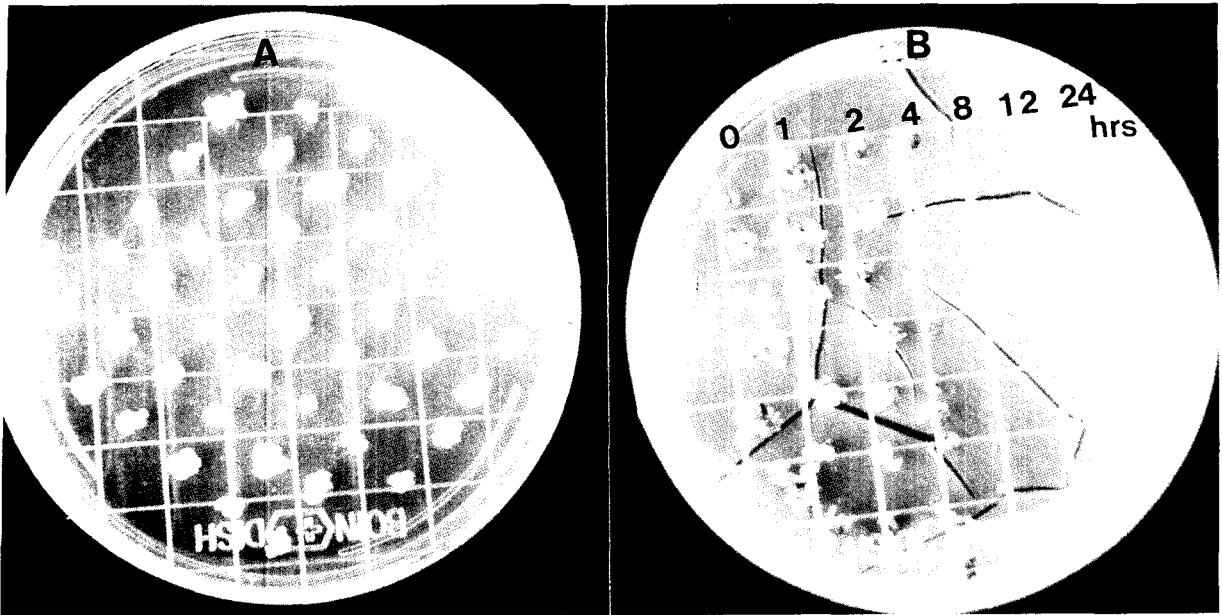


Figure 3. Callus propagation on MS medium supplemented with BAP 0.1 + 2,4-D 1.0 mg/L, 30 g/L sucrose and 10 g/L agar (A), and plant regeneration after various periods of desiccation (B).

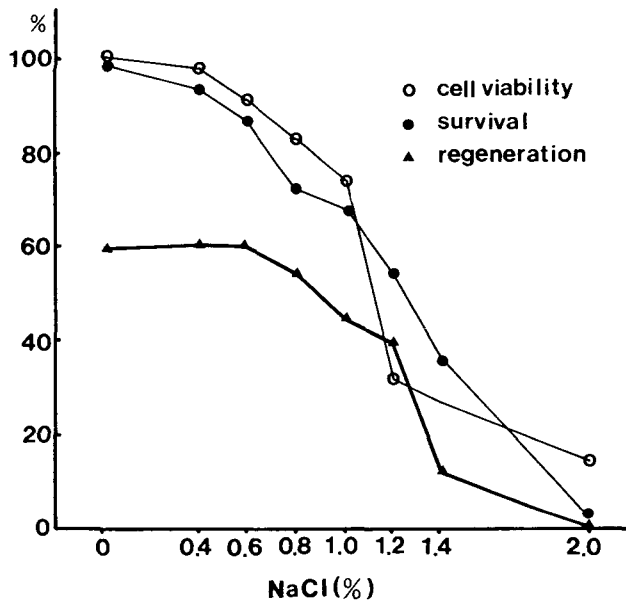


Figure 4. Percent cell viability (TTC), survival and regeneration of *P. oleracea* cultured cells as affected by various concentrations of NaCl pretreatment for 2 days.

61%의 재분화율을 보이거나 1시간 및 2시간 건조한 세포는 각각 83% 및 80%로 높은 재분화율을 나타냈으며, 2시간 이상 건조한 세포는 재분화율이 급격히 감소하여 4시간 건조세포는 32%, 8시간 건조세포는 0%를 나타내었다(Fig. 2, Fig. 3)

NaCl처리효과는 Figure 4와 같다. 염분의 농도가 증가함

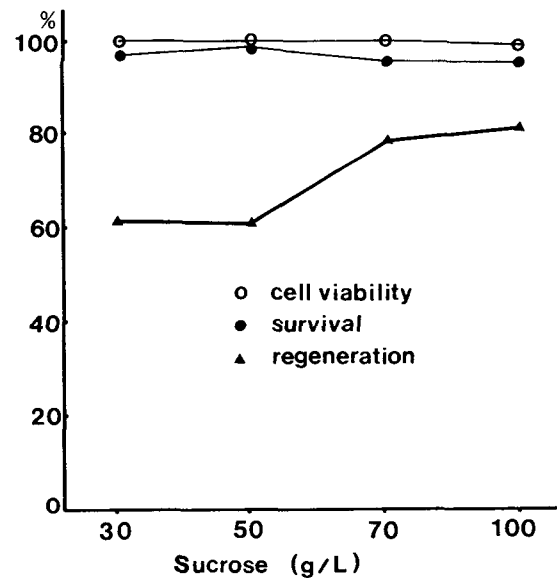


Figure 5. Percent cell viability (TTC), survival and regeneration of *P. oleracea* cultured cells as affected by various concentrations of sucrose pretreatment for 2 days.

에 따라 세포활력과 생존률이 급격히 감소하며, 재분화율도 떨어지나 NaCl의 농도 0.6%까지는 재분화율이 무처리와 비슷하며, 그 이상의 농도에서는 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 고농도의 NaCl이 식물세포에 미치는 직접적인 영향은 크게 두가지로 나눌 수 있는데, 일차적으로 배지를 고장액으로 만들어 높은 삼투압에 의한 수분결핍을 유발하

고,  $Na^+$ 와  $Cl^-$ 이온이 세포생장에 독성을 일으킬수 있다고 한다(Kramer, 1984). 상기 실험에서 2시간까지 건조된 후 생존한 세포는 재분화율이 증가하였는데, NaCl 0.6% 이하 농도를 비교해 보면 세포의 활력과 재생률은 현저히 떨어졌지만 생존한 세포의 재분화율에는 무처리와 차이가 없는 것으로 보아 염분의 수분결핍 유도효과와 이온의 해작용이 동시에 쇠비름세포의 재분화에 영향을 미친 것으로 추정된다. 식물세포의 수분결핍과 재분화에 대해서는 알려진 바 없으나, 본 실험의 결과로 보아 건조 및 고농도의 당과 염분처리에 의해 유발된 쇠비름세포의 생리적 수분스트레스는 탈분화상태에 있는 세포의 재분화를 촉진시키는 기작과 밀접한 연관이 있는 것이 아닌가 사료된다.

고농도의 sucrose에 노출되었던 세포는 활력 및 재생률은 거의 변화가 없었으나 재분화율은 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5). Sucrose 70 및 100 g/L에 2일간 노출되었던 세포는 재분화율이 각각 80 및 81%로 무처리 61%에 비해 현저히 높아 고농도의 sucrose처리도 쇠비름 배양세포의 재분화율을 증가시키는데 효과적인 것으로 나타났다.

이상의 쇠비름 배양세포에 처리한 건조 및 고농도의 sucrose와 NaCl은 세포의 수분스트레스와 밀접한 연관이 있는 것으로, 세포막의 기능 및 효소활성의 변화나 이온의 선택적 흡수 등과 영향을 미칠 것으로 사료된다. 본 실험의 결과에서 쇠비름 배양세포는 단시간의 건조처리를 하거나 고농도의 당이 함유된 배지에 일시적으로 노출되면 세포의 재분화율이 현저히 증가하는 것을 볼 수 있었다. 극한 수분스트레스로부터 식물의 생존이나 재생 혹은 저항성에 관한 연구와 유전자의 발현등에 관해서 활발한 연구가 진행중에 있으며(Claes et al., 1990; Ramagopal, 1987; Piatkowski et al., 1990), 세포의 재분화율에 영향을 미치는 스트레스의 역할에 관해서도 일부 연구가 수행되어 왔다(Nakanish et al., 1991). 본 실험에서 쇠비름에 나타난 현상이 타 식물세포에도 같은 결과를 나타내는지에 대해서는 아직 알려지지 않았으나, 탈분화한 식물세포의 재분화율을 증가시키는 연구에 중요한 기초자료가 되리라 사료되며, 내부물질의 변화와 관련된 생리·생화학적인 조사나 분자생물학적인 재분화메카니즘을 구명함으로써 유용인자의 소재를 찾는 연구가 계속 진행되어야 할 것이다.

## 적 요

쇠비름(*Portulaca oleracea* L.)의 줄기절편체로부터 캘러스 유도를 위한 적정배지는 BAP 0.1 + 2,4-D 1.0 mg/L, 30 g/L sucrose 및 10 g/L agar를 첨가한 MS배지로 나타났으며, 액체배양에 의한 세포의 증식에는 BAP 0.1 + 2,4-D 0.5 mg/L 가 함유된 MS배지가 효과적이었다. 장시간 건조처리

는 세포는 활력과 재생 및 재분화율이 강하게 억제되나, 1 시간 및 2시간동안의 단시간 건조처리한 세포의 재분화율은 각각 83 및 80%로 나타나나 무처리 61%에 비해 높았다. 0.6% NaCl의 2일간 전처리는 세포의 재분화율에는 영향을 미치지 않으나, 세포활력 및 재생률에는 억제작용을 나타내었다. Sucrose 70 및 100 g/L를 전처리한 쇠비름세포의 재분화율은 각각 80 및 81%로 무처리에 비해 높았다.

## 인 용 문 헌

- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sinica* 18:659-668
- Claes B, Dekeyser R, Villarroell R, Bulcke MV, Bauw, G, Montagu, MV (1990) Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. *Plant Cell* 2:19-27
- Kim KW (1986) Rapid multiplication of plants through micropagation. *In Agricultural Application of Plant Tissue Culture and Its Industrialization*. Ed Kyungpook Natl Univ, Taegu Korea pp 85-98
- Kramer D (1984) Cytological aspects of salt tolerance in higher plant. *In RC Satples, GH Toenniessen, eds, Salinity Tolerance in Plants*. John Will and Sons. pp 3-15
- Mantel SH, Mathews JA, Mckee RA (1985) Principles of Biotechnology. Blackwell Scientific Publication. pp 89-129
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497
- Nakanish H, Moti S, Ueno N (1991) Effect of gravity stimulation on organ formation from wheat callus. *J Jpn Breeding (suppl)* 41:294-295
- Ramagopal S (1987) Differential mRNA transcription during salinity stress in barley. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:94-98
- Piatkowski D, Schneider K, Salamini F, Bartels D (1990) Characterization of five abscisic acid responsive cDNA clones isolated from desiccation tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water stress genes. *Plant Physiol* 94:1682-1688
- Shin DH, Virigool S, Shinozaki KY, Oono K (1991) Survival mechanism of dried calli and regeneration of plants in rice. *Jpn J Genet* 66:13-25
- Ting IP (1982) *Plant Physiology*. Addison-Wesley Publishing Company. pp 81-100
- Towill LE, Masur P (1975) Studies on reduction of 2,3,5-TTC as a viability assay for plant tissue. *Planta* 157:64-70