

당근 배양세포의 생육에 미치는 수종 Hormone의 영향

康榮薰·黃 祐
(延世大學校 理科大學)

The Effects of Various Hormones on Growth of Carrot Tissue Culture

Kang, Young Hee and Baik Hwang
(Department of Biology, Yon Sei University, Seoul)

ABSTRACT

Experiments were conducted to investigate the effects of several hormones on the growth of suspension culture of carrot (*Daucus carota* L.) cells, where changes in pH and the amount of $\text{NH}_4\text{-N}$ in the medium were observed with regard to growth. A treatment with 2,4-D at 10^{-5}M resulted in a highest rate of growth; the hormone at this concentration caused an increase in dry weight by about 40 to 50% over the control, measured at a stationary phase. It was thus indicated that 2,4-D at 10^{-5}M provided the optimal condition for the suspension culture. Changes in pH of the medium were found to be affected by hormonal treatments during the first 2-3 days following the inoculation, after which the pattern of pH changes in hormone enriched media paralleled that of the control. Subsequent changes of $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$ from the medium by the cells, and also by growth of the cells. The uptake of $\text{NH}_4\text{-N}$ by the cells did not appear to be influenced by hormonal treatments. At a stationary phase, a considerable amount of $\text{NO}_3\text{-N}$ played a more important role than $\text{NH}_4\text{-N}$ in the growth of the carrot cell suspension culture.

서 론

식물의 성장에 영향을 미치는 식물 호르몬인 auxin, gibberellin, 및 kinetin 등의 영향은 이미 여러 각도에서 널리 밝혀진바 있다. 그러나 이러한 것은 대부분 기관이나 개체 level(Little and Loach, 1975)에서 각종의 호르몬 농도별 효과에 대한 실험이었다.

본 실험에서는 상술한 기관 또는 개체 level에서와는 달리 최근에 많이 이용되고있는 조직 및 세포 배양법을 이용하여 cell-level에서 이들의 작용을 규명하려 시도하였다.

Cell-level에서의 실험은 Torry 및 Shigemura (1959) 등이 auxin과 cytokinin의 농도에 따라 Pea의 뿌

리조직이 액체배지에서 성장하는 동안 받는 영향에 대하여 보고한 이래 많은 사람들이 (Engpild, 1974; Forket and Torry, 1969; Fujimura and Komanine, 1975; Helgeson and Upper, 1970; Helgeson et al., 1969; Leguay and Guren, 1975) 이에 대한 연구를 하여 각 조직이나 기관의 종류에 따르는 호르몬의 최적 농도를 밝힌바 있다.

당근에서는 이러한 성장조절물질이 발생과정에 미치는 영향(Ohira et al., 1973) 및 배양액의 영양물질 농도에 따른 생리적 변화(Berhrend and Mateles, 1975)를 보고한 바 있었고, 배양액의 배양에 따른 pH 변화와 질소의 대사 및 sucrose의 흡수에 대한 문제를 규명하였고, Durzen 과 Chalupa, 1976; Bayer 와

Sonka, 1976; Kang, 1972, 1976; Martin과 Rare, 1976; Nesius와 Fletcher, 1973; Ilan, 1973; Klambt, 1976; Little, 1975, 및 Fosket, 1973등이 auxin과 cytokinin이 단백질 합성과 explant의 단백질의 변화에 대한 영향을 보고한 바 있다.

또한 Fadia(1974)는 auxin의 농도와 callus tissue의 differentiation을, Mingo-Castel 등(1976)은 kinetin과 enzyme activity를 보아 potato의 전분생합성과 유관함을, Arnison(1976)은 효소활성과 cell wall expansion과의 관계에 미치는 2,4-D의 영향을 보아 이들 성장조절물질이 생리작용에 미치는 영향을 여러 면에서 관찰하였다.

본 실험은 위의 부분적인 hormone 문제를 좀더 탐위를 넓혀 무균하 cell-level에서 auxin, gibberellin 및 kinetin의 농도를 달리하여 처리했을 때 세포의 생육에 미치는 영향을 보려고 하였다. 이에 따라서 세포의 건조중량으로 본 성장과 배양에 따른 배양액의 pH 변화, 배양액내의 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 잔존량을 경시적으로 관찰하였다.

이 결과는 당근세포 배양액 조성에 앞선 hormone의 조성을 확정짓고 또한 다른 식물의 세포 배양액에 있어 성장촉진효소의 최적 농도를 결정하는 방법을 시사하게 될 것이다.

재료 및 실험 방법

당근(*Daucus Carota* L.)의 뿌리에서 유도된 callus를 250ml 삼각후라스크에 100ml의 배양액이 든 실험구에 일정한 transfer하여 suspension culture를 하였다. 이때 120rpm의 gyratory shaker에서 27°C를 유지하면서 배양을 하였다.

각 시험구별로 2일마다 시료를 채취하여 건조중량, 배양액의 pH변화와 배양액내에 잔존하는 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 변화를 보았다. 이때 건조중량은 여과지도 세포를 여과하여 60°C, dry oven에 10시간 건조하여 건조중량을 측정하였고 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 양은 Nessler 시약에 의한 비색법을 사용했다.

본 실험에서 사용한 hormone의 농도는 $10^{-4}\text{M}\sim 10^{-7}\text{M}$ 을 취하였다. 또한 배양액은 Ohira 등(1973)이 개량한 합성 배양액인 R-2 media를 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 생육 조사

본 실험에 사용한 2,4-D, gibberellin 및 kinetin의 농도별 생육조사를 경시적으로 조사한 결과를 각각 Fig. 1, 2 및 3에 표시하였다. 각 처리구마다 hormone 부

침가구를 대조구로 삼았다.

① 2,4-D구

전반적으로 비교적 lag, logarithmic 및 stationary phase의 구별이 뚜렷하였고 비교적 같은 경향을 보였다.

접종 6일째까지는 10^{-5}M 처리구를 제외하고는 모두가 대조구와 비슷하였지만 10^{-6}M 처리의 경우는 접종 후 2일째 부터 logarithmic phase에 돌입하여 더구나 상당기간(6일)을 점령하였다. 또 접종후 2일째에 10^{-6}M 즉 저농도의 경우가 타농도에 비해 세포 생육에 미치는 영향이 특별히 컸다. Logarithmic phase 이후를 비교하면 10^{-4}M , 10^{-6}M , 10^{-7}M 의 순으로 세포의 생육이 대조구 보다 좋았다. 10^{-4}M 의 처리에는 오히려 대조구 보다 낮은 경향을 나타내어 고농도의 저해를 시사하였다.

따라서 본 2,4-D 실험구에서는 세포 생육은 10^{-5}M , 10^{-6}M 로 처리할 때가 가장 좋았다는 결론이 나왔다. 한편 Torrey(1956)는 yeast extract를 배양액에 1g/l로 넣고 2,4-D를 처리했을 때 생중량이 10^{-6}M , 10^{-5}M , control, 10^{-4}M 순으로 높았고 건조중량은 10^{-6}M , control, 10^{-5}M , 10^{-4}M 의 순서로 높았음을 보고하여 10^{-6}M 에서의 최적임을 밝혔는데, Leguay and Guern(1975)은 logarithmic phase 때 세포분열은 2,4-D 농도가 $4\times 10^{-8}\sim 4\times 10^{-6}\text{M}$ 에서는 auxin 농도와 무관하며 세포의 최대수는 최초의 auxin 농도의 영향을 받는다고하여 $4\times 10^{-6}\text{M}$ 에서 가장 높았고, $8\times 10^{-7}\text{M}$, $2\times 10^{-7}\text{M}$ 순으로 세포수가 증가되었다고 하였다. 또한 낮은 농도에서는 callus 형성이 일어나지 않았고 고농도에서 tuber tissue에 특성효과를 나타내는 것을 밝혔고 세포 분열도 일어나지 않음을 보였다. 이들은 2,4-D에 의한 callus induction은 10^{-5}M 에서 가장 좋았다고 결론지었다.

또한 Kang(1972, 1976)은 2,4-D 공급시 이에 따르는 단백질합성의 저하와 지연을 밝히 2,4-D는 세포의 생육뿐만 아니라 아미노산대사에도 크게 영향을 미친다는 것을 보고하였다.

② Gibberellin 구

Fig. 2는 gibberellin을 각 농도별로 처리하였을 때의 성장을 표시한 것이다.

2,4-D구에서 보다는 안정기에 건물중이 50~60% 떨어지고 있으나 10^{-5}M 처리시에 대조구 보다 12% 증가를 보여주고 있었다. 대체적으로 접종 8일 까지 비슷한 상태로 성장을 보여주고 있다가 8~12일 사이에 약간의 차이가 생기거나 뚜렷한 hormone의 영향에 의한 것으로는 볼 수 없었다.

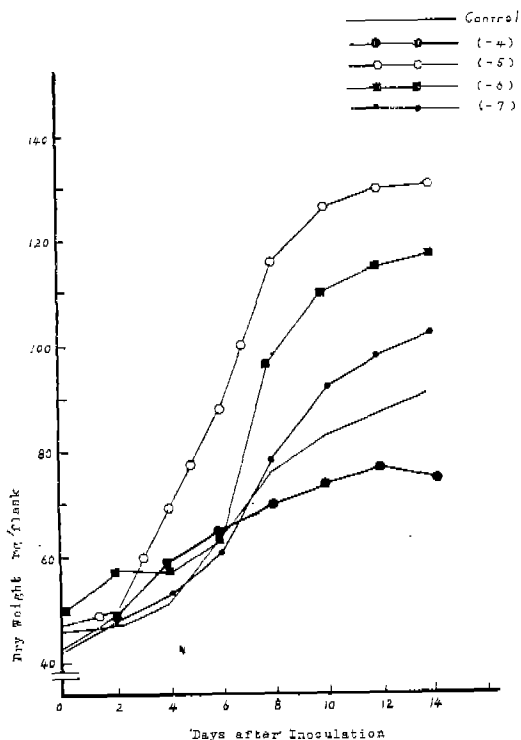


Fig. 1. Effects of 2,4-D on growth of callus tissues.

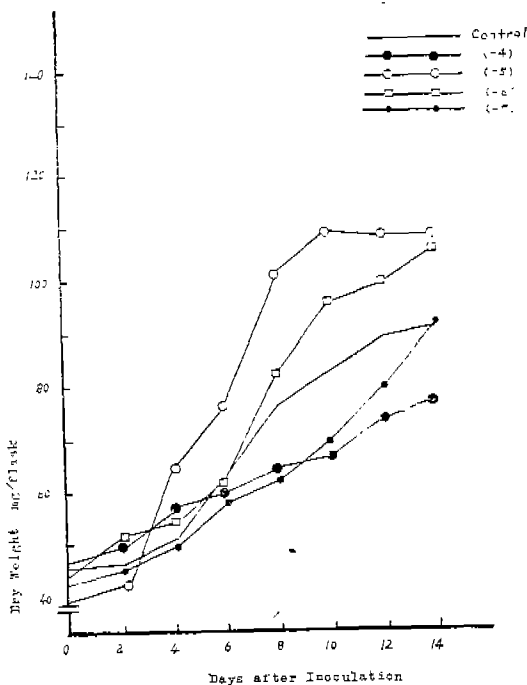


Fig. 3. Effects of kinetin on growth of callus tissues.

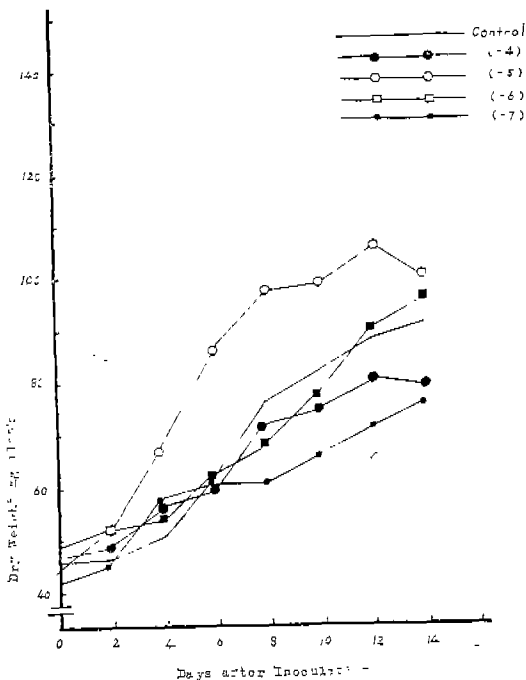


Fig. 2. Effects of gibberellin on growth of callus tissues.

본 실험의 결과는 Helgeson(1969)이 tobacco callus 에서 행한 실험 결과와 일치하였다. 즉 GA를 tobacco callus에 각 농도별로 처리했을 때 대조구와 큰 차이는 성장을 보여주는 그의 실험과 당근의 suspension culture 시 gibberellin의 효과를 본 실험의 결과와 일치하였다.

③ Kinetin 구

Fig. 3에서 나타낸 것은 kinetin을 농도별로 처리했을 때 세포들의 건물량의 변화이다.

$10^{-4}M$ 에서 접종 6일까지는 대조구와 비슷한 성장을 보여주고 있으나 8일 부터는 약 33%의 저하된 상태로 안정기까지 유지되어 고농도에서의 억제될 알 수 있었다. $10^{-5}M$ 에서는 2~8일 사이 최초의 접종시 보다 230% 증가하는 logarithmic phase를 보여주어 이 농도가 가장 적당한 것으로 추측할 수 있다. 이것은 Ogura(1975)가 tobacco callus 배양에서 실험한 결과와 일치하였으며, 억제시키는 Nudel et al.(1970)이 보고한 고농도의 kinetin이 tobacco의 suspension culture 시 uracil과 leucine의 incorporation을 억제하여 RNA 합성과 단백질 합성을 억제하는 결과로 성장을 감소하게 한다는 그의 보고와 상응하였다. 그러나 Fosket은 배 두에서 $10^{-5}M$ 의 kinetin 보다는 $10^{-6}M$ 에서 생중량이 더 컸다고 보고하였다. 이것은 재료의 품종차라고 생

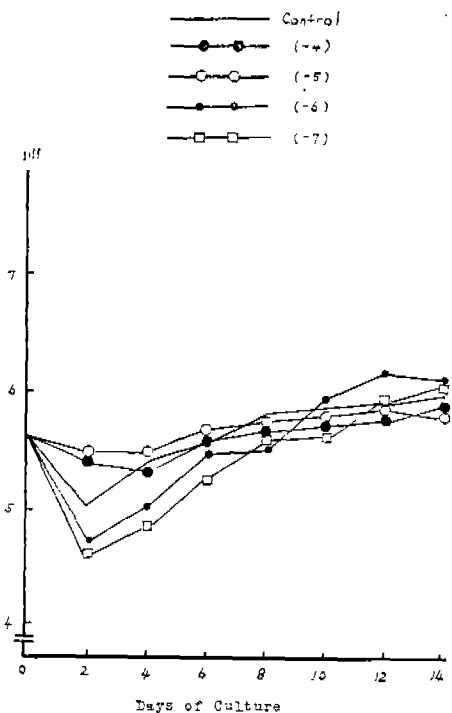


Fig. 4. Changes of pH in cultured media at various concentrations of 2,4-D.

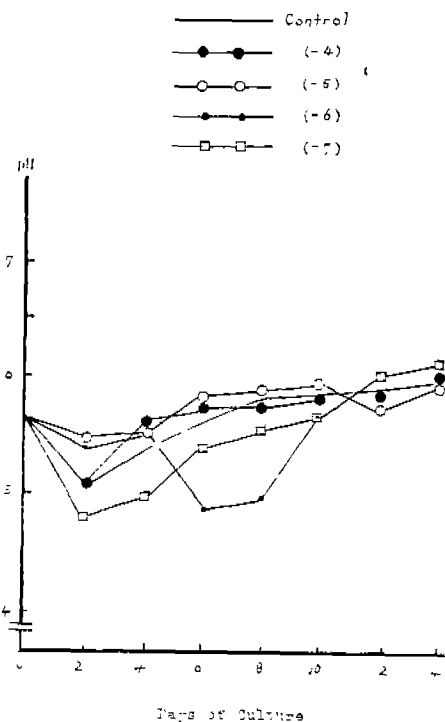


Fig. 5. Changes of pH in cultured media at various concentrations of gibberellin.

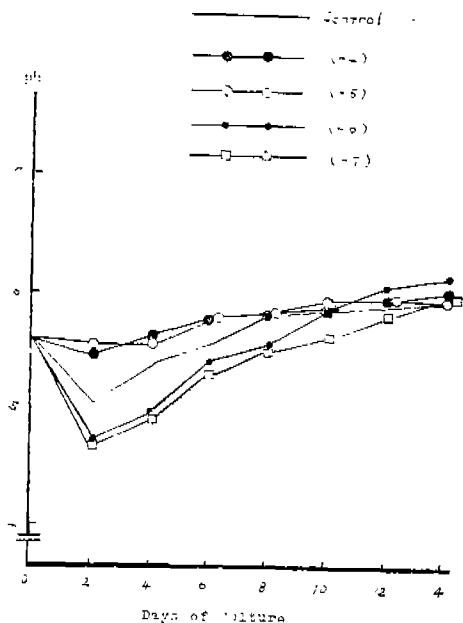
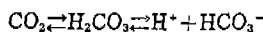


Fig. 6. Changes of pH in cultured media at various concentrations of kinetin.

가된다.

2. 배양액의 pH 변화

본 실험에서는 최초 pH를 5.6으로 설치하였으며 이의 조절은 0.1N HCl과 0.1N NaOH로 하였다. 일반적으로 auxin이 세포에서 [H⁺]의 분비를 촉진하여 성장을 촉진한다는 acid growth theory로



가 되어 [H⁺]의 증가로 성장이 증가되며 suspension culture에서는 접종 2~3일 사이에 pH가 일시적으로 산성쪽으로 떨어졌다가 서서히 증가하여 중성 쪽으로 기울어지며 안정기에서는 보통 6.0~6.5 부근에서 유지하게 된다. Caldas (1976), Martin (1976), Kang (1972, 1976) 등에 의하면 이러한 suspension culture에서의 pH 변화는 NH₄⁺와 NO₃⁻가 세포에 의해 흡수되면서 배양액의 pH에 영향을 미친다고 했다.

① 2,4-D 구

Fig. 4에 표시한 것은 2,4-D를 각 농도별로 첨가했을 때의 pH 변화를 나타낸 것이다.

대체적으로 배양 2일까지 pH가 저하되다가 차차 상승됨을 보였는데 10⁻⁶M과 10⁻⁷M이 대조구보다 산성쪽으로 기울어져 변화하였고 10⁻⁵M과 10⁻⁴M은 control과 같이 변화하였다.

안정기에서의 pH는 6.0부근까지 모두 올라갔다. 그러므로 2,4-D를 처리했을 때 pH의 저하는 일어났으나

배양하는 동안의 세포증식 등에 의해 다시 배양액의 액성이 중성쪽으로 기울어지고 있었다.

② Gibberellin 구

Fig. 5에서 나타낸 것과 같이 pH의 변화는 2,4-D 구와 거의 비슷했으나 10^{-6} , 10^{-7} M에서는 접종 2일째 control 보다 떨어져 4.6~4.7정도로 뚫다가 그후 차차 증가하는 양상을 보였는데 6일후 부터는 대조구와 비슷하게 변화하였다. 안정기에서는 5.7~6.0으로 모두 중성쪽으로 기울어지는 경향을 보여주었다. 특히 10^{-6} M에서는 접종 12일째 6.1~6.2까지 상승한 것을 보여준다.

③ Kinetin 구

Fig. 6은 kinetin 구에서 pH의 변화를 나타낸 것으로 접종 2일까지 떨어졌다가 2일째부터 다시 상승하여 안정기에서는 대조구와 같은 5.8~6.0 부근까지 액성이 중성쪽으로 기울어졌다. 10^{-4} M, 10^{-6} M은 대조구보다 변화가 적어 접종 2일째 5.4~5.5로 떨어졌다가 두 구가 비슷하게 상승하여 안정기에서는 모든 구가 거의 같은 pH까지 도달하여 유지되었다.

3. 배양액내의 NH_4-N 잔존량

질소의 급원으로 암모니아태 질소와 질산태 질소를 사용한 경우 배양액에 잔존하는 암모니아태 질소의 잔존량을 hormone별, 농도별로 처리하여 경시적으로 조

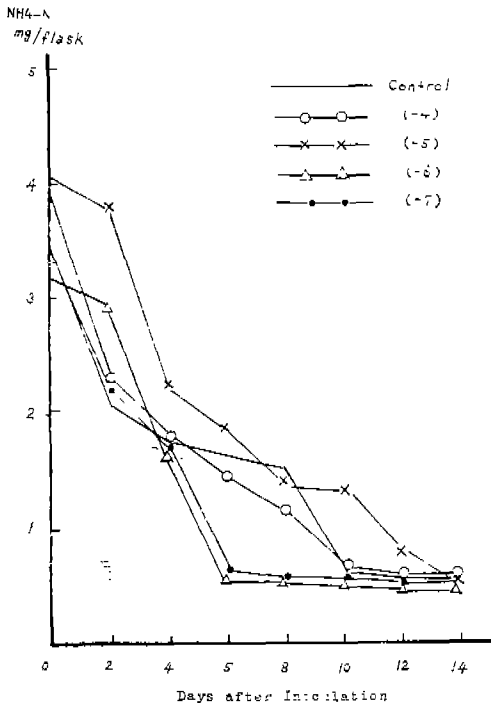


Fig. 7. Changes of NH_4-N in cultured media at various concentrations of 2,4-D.

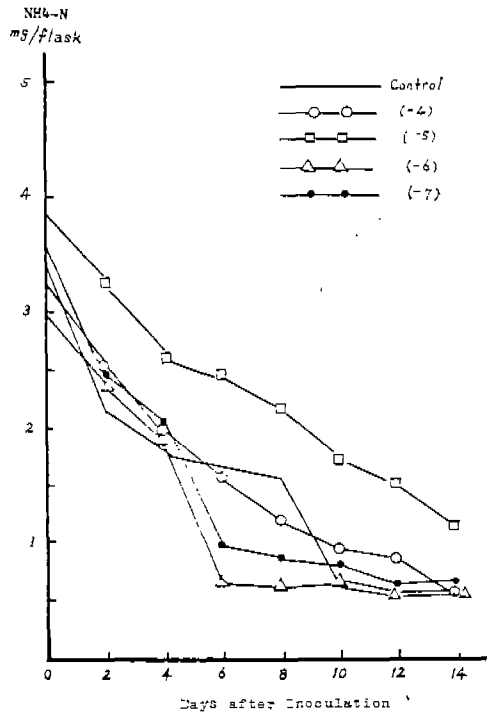


Fig. 8. Changes of NH_4-N in cultured media at various concentrations of gibberellin.

사한 것을 각각 Fig. 7, 8, 9에 표시하였다.

Caldas(1976), Martin(1976) 및 Kang(1972, 1976) 등에 의하면 NH_4-N 는 NO_3-N 보다 media에서 먼저 흡수 이용되어 접종 2~3일 동안에 완전 흡수되고 그후 NO_3-N 가 흡수된다고 하였다. 이들은 이 보고에서 양 질소원의 흡수의 차가 pH의 변화와 유관한 것으로 보았다.

① 2,4-D 구

모든 농도에서 접종 4일째 까지 대조구와 같은 양상으로 NH_4-N 의 흡수가 일어났다.

즉 접종 4일째까지는 각 농도별 흡수는 같게 일어났지만 4일부터 10^{-6} , 10^{-7} M에서 대조구보다 흡수가 빨랐으며 10^{-4} , 10^{-6} M은 대조구와 같이 흡수되었다.

그러므로 본 실험에서는 2,4-D가 암모니아태 질소의 흡수와 밀접한 관계가 없으며 암모니아태 질소의 흡수보다는 NO_3-N 의 흡수로 생장이 더 영향을 받는 것으로 생각할 수 있다.

② Gibberellin 구

Fig. 8에 gibberellin의 농도별 처리시 NH_4-N 의 흡수를 나타냈다. 10^{-5} M을 제외하고는 2,4-D구와 같은 양상으로 NH_4-N 의 흡수가 일어났다. 10^{-5} M에서는 대조구보다 흡수가 더디게 진행되었고 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} M에서는 대조구와 같이 흡수가 이루어졌다. 그러

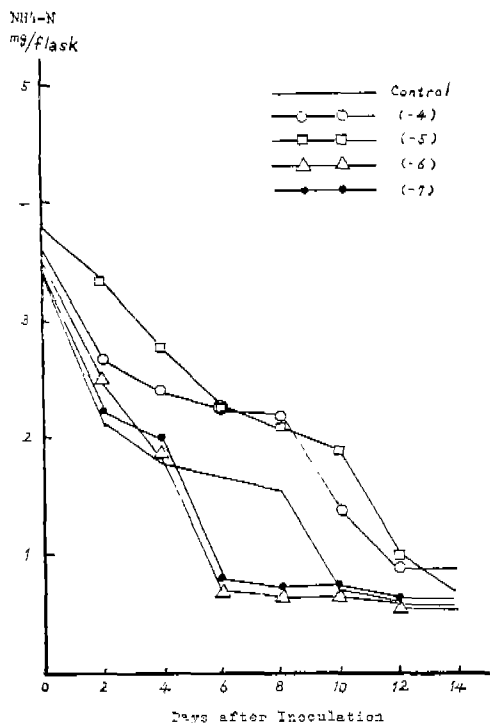


Fig. 9. Changes of NH₄-N in cultured media at various concentrations of kinetin.

므로 gibberellin의 영향으로 NH₄-N의 흡수는 크게 영향을 받는 것으로는 생각할 수 없었다.

③ Kinetin 구

Fig. 9는 kinetin 구에서의 NH₄-N의 배양액 내 잔존량을 표시한 것이다. 10⁻⁶M과 10⁻⁷M에서의 변화는 대조구보다 접종 4~10일 사이에 급격했으나 10⁻⁵M과 10⁻⁸M에서는 대조구 보다 약간 낮은 흡수를 보여 주었다. 그러나 안정기로 갈수록 NH₄-N의 잔존량은 모든 구에서 대조구와 같은 양으로 변화함을 볼 수 있었다. 그러므로 kinetin도 NH₄-N의 흡수를 직접 촉진시키는 작용이 없는 것으로 생각된다.

즉 Caldas(1976)의 kinetin은 NO₃나 NH₄와의 상호 작용으로 생중량에 영향을 주지 않는다는 보고와 일치하였다.

요 약

당근을 재료로 한 suspension culture에서 몇가지 hormone이 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

이들 성장에 수반해서 일어나는 배양액의 pH 변화 및 그 속의 NH₄-N의 잔존량 등을 경시적으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 성장에서는 10⁻⁵M 2,4-D의 경우가 다른 모든 hormone을 처리할 때 보다 양호한 생육상을 나타냈으

며 특히 stationary phase에서의 전물중은 타 hormone 보다 40~50% 증가를 나타내어 당근의 경우는 2,4-D가 최적의 hormone이요 10⁻⁶M이 가장 적당한 농도임이 확인되었다.

2. 배양액의 pH 변화는 접종 2~3일 동안에는 hormone의 영향을 어느정도 받으나 3일 이후 부터는 대조구와 같은 양상으로 변화를 보여 hormone의 농도에 따른 pH의 변화는 관찰할 수 없었다. 따라서 pH의 변화는 hormone이 세포 증식의 작용끝에 일어나는 현상이라 추측되었다.

3. 암모니아태 질소의 흡수는 hormone 단독 처리시 hormone별, 농도별 차이는 거의 없었으며 안정기로 갈수록 모든구에서 대조구와 같은 양상으로 변화하였다. 그러므로 이들 hormone은 NH₄-N의 흡수에 직접 영향을 주지 않는 것으로 생각되어 성장에 직접 필요한 것은 NO₃-N로 생각할 수 있었다.

참 고 문 헌

Angel, M. Mingo-Castel, R.E. Young, and O.E. Smith. 1976. Kinetin-induced tuberization of potato in vitro: on the mode of action of kinetin. *Plant and Cell Physiol.* 17 : 557-570.

Arnison, P.G. and W.G. Boll. 1976. The effect of 2,4-D and kinetin on peroxidase activities and isoenzyme pattern in cotyledon cell suspension culture of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender) *Can. J. Bot.* 54 : 1847-1867.

Bayer, M. H. and J. Sonka. 1976. The effects of IAA on pH in mesophyll protoplast suspension of *Vicia faba*. *Pflanzenphysiol. Bd.* 78 : 271-276.

Berhrend, J. and R.I. Mateles. 1975. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. I. Effect of amino acids on growth. *Plant Physiol.* 56 : 534-539.

Caldas, R.A. and L.S. Caldas. 1976. Nitrate, Ammonium and kinetin effects on growth and enzyme activities of pauls scarlet rose callus. *Physiol. Plant.* 37 : 111-116.

Durzan, D.J. and V. Chalupa. 1976. Growth and metabolism of cells and tissues of Jack Pine (*Pinus banksiana*). 3. Growth of cells in liquid suspension cultures in light and darkness. *Can. J. Bot.* 54 : 456-467.

Durzan, D.J. and V. Chalupa. 1976. Growth and metabolism of cells and tissues of Jack Pine (*Pinus banksiana*). 6. Free nitrogenous compounds in cell suspension cultures of Jack Pine as affected by light and darkness. *Ibid.* 54 : 496-506.

Engrild, K.C. 1974. Growth and plating of cell suspension cultures of *Datura innoxia*. *Physiol. Plant.* 32 : 390-393.

Fadia, V.P. and A.R. Mehta. 1974. Tissue cultures studies on cucurbits: The effect of NAA, sucrose, and kinetin on tracheal differentiation in *Cucumis* tissues cultured in vitro. *Phytomorphology* 23 : 212-215.

Fosket, D.E. and J.G. Torry. 1969. Hormonal control of cell proliferation and xylem differentiation in cultured tissues of *Glycine max* var. Biloxi. 1. *Plant*

- Physiol.* 44 : 871—880.
- Fosket, D.E. and K.C. Short. 1973. The role of cytokinin in the regulation of growth, DNA synthesis and cell proliferation in cultured soybean tissues. *Physiol. Plant.* 28 : 14—23.
- Fujimura, T. and A. Komamine. 1975. Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Science Letters* 5 : 359—364.
- Helgeson, J.P. and C.D. Upper. 1970. Modification of logarithmic growth rates of tobacco callus tissue by gibberellic acid. *Plant Physiol.* 46 : 113—117.
- Helgeson, J.P. and M. Krueger. 1969. Control of logarithmic growth rates of tobacco callus tissue by cytokinins. *Ibid.* 44 : 193—198.
- Ilan, I. 1973. On auxin-induced pH drop and on the improbability of its involvement in the primary mechanism of auxin-induced growth promotion. *Physiol. Plant.* 28 : 146—148.
- Kang, Y.H. 1972, 1976. Studies on the nutritional physiology of the soybean cultured cells. Especially effect of 2,4-D on the absorption, nitrogen and free amino acid composition during their growth. *Yonseinonchong* 10 : 435—448. *Yonseinonchong* 13 : 107—118.
- Kaufman, P.B. and L.B. Petering. 1969. Regulation of growth and cellular differentiation in developing *Avena* internodes by gibberellic acid and IAA. *Am. J. Bot.* 56 : 918—927.
- Klamt, D. 1976. Cytokinin effects on protein synthesis of *in vitro* system of higher plants. *Plant and Cell Physiol.* 17 : 73—76.
- Leguay, J.J. and J. Guren. 1975. Quantitative effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid on growth of suspension cultured *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Physiol.* 56 : 356—359.
- Little, C.H.A. and K. Loach. 1975. Effect of gibberellic acid on growth and photosynthesis in *Abies balsamea*. *Can. J. Bot.* 53 : 1805—1810.
- Martin, S.M. and D. Rose. 1976. Growth of plant cell (*Ipomoea*) suspension culture at controlled pH levels. *Ibid.* 54 : 1264—1270.
- Nesius, K.K. and J.S. Fletcher. 1973. Carbon dioxide and pH requirements of non-photosynthetic tissue culture cells. *Physiol. Plant.* 28.
- Nudel, U. and E.S. Bamberger. 1970. Kinetin inhibition of ³H-Uracil and ¹⁴C-leucine incorporation by tobacco cells in suspension culture. *Plant Physiol.* 47 : 400—403.
- Okamura, S., K. Sueki, and A. Nishi. 1975. Physiological changes on carrot cells in suspension culture during growth and senescence. *Ibid.* 33 : 251—255.
- Ogura, H. 1975. Morphactin-kinetin interaction on growth and shoot formation in tobacco callus cultures. *Plant and Cell Physiol.* 16 : 563—569.
- Ohira, K. and K. Ojima. 1973. Studies on the nutrition of rice cell culture. I. A simple defined medium for growth in suspension culture. *Ibid.* 14 : 1113—1121.
- Pierik, R.L.M. and H.H.M. Steegmans. 1975. Effect of auxins, cytokinins, abscisic acid and Ethephon on regeneration and growth of bulblets on excised bulb scale segments of hyacinth. *Physiol. Plant.* 34 : 14—17.
- Reinert, J. and J.G. Torry. 1961. Suspension culture of higher plant cells in synthetic media 1,2. *Plant Physiol.* 36 : 483—491.
- Torry, J.G. and Y. Shigemura. 1956. Growth and controlled morphogenesis in pea root callus tissue grown in liquid media. *Am. J. Bot.* 44 : 334—344.

(1977년 3월 25일 접수)