

植物細胞 培養에 依한 二次代謝産物의 生成에 關한 研究

I. *Capsicum annuum* L. 果實의 Callus形成條件에 關하여

崔 奉 順

嶺南大學校 家庭大學

Formation of Secondary Products by Plant Cell Culture

I. Conditions of Callus Formation for *Capsicum annuum* L. Fruit

Bong-Soon Choi

Dept. of Food and Nutrition, College of Home Economics, Yeungnam Univ.

Abstract

In order to culture the placenta of *Capsicum annuum* L. in synthetic medium, the experiment was initiated to find out the proper medium for callus formation and growth rate.

Linsmaier and Skoog RM 1964 media was more effective than Murashige and Skoog or white media.

The addition of 2,4-D(10^{-6} M) and kinetin(10^{-6} M) into Linsmaier and Skoog RM 1964 media was very effective in callus formation.

The growth rate was the most rapid from 2 weeks to 3 weeks after inoculation, and then it showed slow rate.

緒 論

植物의 組織 혹은 細胞培養에 關한 研究는 1934年 White와 Ganthert等이 tomato와 樹木을 재료로 하여 植物組織의 無根生長에 成功한 이래 비약적인 發展을 하여 왔다. Steward等은 당근의 單細胞로부터 正常的인 植物體를 얻는 것에 成功하여 植物細胞의 全能性 (totipotency)을 立證 하였다¹⁾. 그리고 植物細胞의 分裂 促進因子로써 kinetin이 發見되어 培地의 單純化에 功한하였으며 1962年에 報告된 Murashige and Skoog의 培地와²⁾ 1964年의 Linsmaier and Skoog의 培地는

合成培地로써 널리 쓰여지게 되었다.

1960年代에 suspension culture 에 의한 大量培養法의 研究는 Tulecke, Nickell等에^{3,4)} 의해 研究되어 細胞體 自體生産 혹은 有用物質生産에 크게 기여되었다. 특히 二次代謝産物의 生成에 關한 研究는 1960年 후반부터 많은 論文이 報告되고 있는데 그 中에서 주목할만한 것은 Comfrey, *Symphytum officinale* 葉 培養細胞의 L-glutamine의 높은 축적 현상이 있음이 알려졌고⁵⁾, 大豆는 細胞培養에 의해 urease함량이 높은 細胞를 얻 어서 大豆의 營養적 개선을 試圖할려는 報告가 있다^{7,8)}. carrot의 경우에는 細胞培養에 의해 phenol化合物의 生成에 關하여 報告되어 있으며⁹⁾, 培養細胞에 의한

chlorophyll¹⁰⁾, carotenoids, anthocyan, ¹¹⁾ flavonoid 등의 天然色素 生成에 關係서도 報告되어 있다. 紫草根의 色素인 shikonin은 培養細胞中의 含量이 母植物에 比해 약 10배 높은 含量을 보였다¹²⁾. 담배의 培養細胞에서는 nicotin의 生成 및 nicotin含量的 人爲的인 조절이 가능하며¹³⁾, Scopolia parviflora나 Datura等에서는 的약품으로 이용되는 alkaloids의 生成^{14,15,16)}이 있다.

이로써 植物의 組織 혹은 細胞培養은 實驗材料의 單純化, 生育환경 제어가 용이하며, 계절성을 탈피할 수 있었고, 변이주 얻기가 용이한 장점 등으로 인하여 기초 및 응용과학 研究에까지 그 功익을 擔當하게 된 것이다.

이에 本 實驗은 우리나라 食生活에서 缺을 수 없으며 年間 약 7萬 5千톤을 生産하는 高추의 細胞 및 組織培養을 통하여 脫分化된 細胞의 大量生産 및 二次代謝産物의 生成과 그 生合成系의 人爲的인 조절등을 검토하기 위하여 高추과실의 callus 형성조건 및 성장상태를 검토하였기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

本 實驗에 使用한 材料는 1978年 8月에 경산 영대 부근에서 栽培되고 있는 풋고추를 채취하여 使用하였다.

고추의 살균은 수도물에서 깨끗이 세척한 후 0.1%, 승홍수와 70% ethyl alcohol로 처리하였으며, 살균 증류수로 3回 세척하였다. 살균된 고추는 무균상자내에서 部位別로 나누었으며 胎座(placenta)만을 脫分化用 材料로 삼았다.

2. 實驗方法

1) 培地

本 實驗에 使用한 기본 培地는 Linsmaier and Skoog

Table 1. Basal medium (Linsmaier and Skoog RM 1964)

	(mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
H ₃ BO ₄	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	0.17
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
myo-inositol	100
Thiamine-HCl	0.1
Final PH	5.6

RM 1964培地를 使用하였으며, 여기에 kinetin 10⁻⁶M 및 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D,) α-naphthalene acetic acid(NAA), indole butyric acid(IBA), indole-3-acetic acid(IAA)을 各 各 10⁻⁵M, 그리고 sucrose 3%, agar 1.5%을 첨가하여 使用하였다.

2) 細胞의 重量測定

脫分化된 細胞를 무균상자 內에서 일정량씩(2g) 무균적으로 평량한 후 미리 준비한 한천 배양기에 이식한 후 26°C incubator에서 培養하면서 경시적으로 測定하였다.

結果 및 考察

고추과실의 placenta조직을 脫分化시켜 合成배양기 內에서 人工的으로 細胞를 培養코자 脫分化조건에 必要한 各種 培養기와 몇가지의 植物 hormone을 검토한 結果 Linsmaier and Skoog RM 1964培地가 가장 적당했으며 다른 植物의 組織이나 細胞培養에 유효한 white

Table 2. Effect of growth regulators on callus formation of Capsicum annuum L. cultured on Linsmaier and Skoog medium in dark at 26°C

Kinetin (M)	None	Auxin (M)												
		IAA			2,4-D			NAA			IBA			
		10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10 ⁻⁷	—	—	—	—	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—
10 ⁻⁶	—	±	—	—	+	+	+	±	—	—	±	—	—	—
10 ⁻⁵	—	—	—	—	+	±	—	+	±	—	—	—	—	—

Degree of callus formation; — no, ± poor, + fair, ++ good, +++ excellent

培地나 Murashige and Skoog 培地는 적당하지 않았다. 脫分化에 미치는 각종 hormone과 그 농도의 영향을 보면 Table 2에 나타난 바와 같이 kinetin은 필수적으로 必要하여 몇 종의 auxin과 그 농도의 영향을 보면 2,4-D가 細胞의 脫分化에 가장 좋은 효과를 나타내었으며 최적 농도는 kinetin $10^{-6}M$ 와 2,4-D $10^{-6}M$ 을 함유한 고체 培地에서 가장 좋은 脫分化 현상을 나타내었다.

그러나 NAA, IAA 및 IBA에서는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 脫分化 현상이 거의 나타나지 않았거나 2,4-D보다 나쁜 현상을 볼 수 있었다.

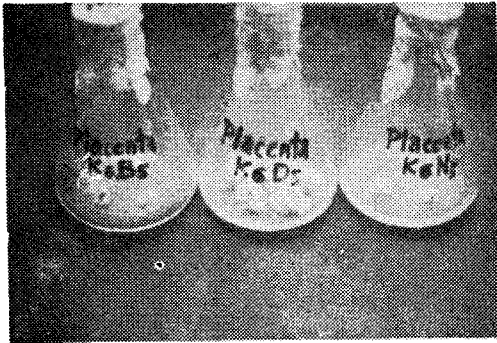


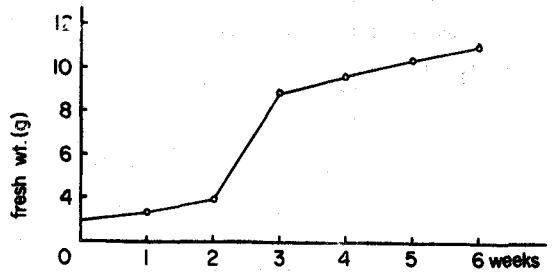
Fig.1 Effect of Auxin on callus formation of *Capsicum annuum* L. cultured on Linsmaier and Skoog medium.

지금까지 각종 植物組織의 脫分化 유도현상을 보면 植物에 따라 auxin이 미치는 영향이 조금씩 상이한 현상을 볼 수 있으나 2,4-D가 脫分化 유도에 가장 많은 효과를 나타냄을 볼 수 있다. 고추의 胎座에서도 같은 현상을 나타내었다.

고추의 callus 형성은 auxin類中 2,4-D가 가장 적합하였으므로 Linsmaier-Skoog培地에 callus生育最適 농도인 2,4-D $10^{-6}M$ 을 함유한 培地에 무균적으로 일정 량씩 이식하여 6주간 26°C에서 培養하면서 1주일 간격으로 細胞 증식속도를 조사한 結果 Fig. 2에서 보는 바와같이 이식한 후 2주일부터 3주일 사이에 급격한 세포증식을 볼 수 있으며 그 이후는 완만한 증가를 나타내고 있다. 이는 지금까지 알려진 植物細胞 증식에 비하면 비교적 빠른 증식속도를 나타내고 있다.

要 約

고추과실의 placenta 組織을 合成培養기에서 培養코자 callus發生에 適合한 培地를 선택하고 callus의 증식속도를 검토한 結果 다음의 結果를 얻었다.



Time-course of cell growth in the Linsmaier and Skoog medium containing 3% sucrose, $10^{-6}M$ kinetin and $10^{-6}M$ 2,4-D.

callus發生에는 Linsmaier and Skoog RM 1964 기본 배지에 2,4-D $10^{-6}M$ 과 kinetin $10^{-6}M$ 을 함유한 固形培地가 가장 効果的이었다. 이들 callus는 배양후 2주일부터 3주일 사이에 가장 증식이 빨랐고 그 이후는 완만한 속도를 보였다.

Reference

- 1) Steward F. G., M.O. Mapes and J. Smith: Am. J. Bot., 45,
- 2) Murashige, T. and F. Skoog: Physiol. Plant, 15, 473(1962)
- 3) Telecke W. and L.G. Nickell: Trans, New York Acad. Sci., 22, 197(1960)
- 4) Telecke W.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 139, 162(1966)
- 5) Tanaka H., Y. Machida, H. Tanaka, N. Mukai and M. Misawa: Agr. Biol. Chem., 38, 798(1974)
- 6) Widholm J. M.: Biochem. Biophys. Acta, 279, 48(1972)
- 8) Palaco J. C.: Plant Physiol., 58, 350(1976)
- 8) Stearns E.M. Jr.: Phytochem., 14, 619(1975)
- 9) Sugano N., R. Iwata and A. Nishi: Phytoc-hem., 14, 1205(1975)
- 10) Anstis B.J.P. and D.H. Northcote: Planta (Berl.) 116, 105(1974)
- 11) Stickland R.G. and N. Sunderland: Ann. Botany 36, 443(1972)
- 12) Tabata M., H. Mizukami, N. Hiraoka and M. Konoshima: Phytochem., 13, 927(1974)
- 13) Takahashi M. and Y. Yamada: Agr. Biol. Chem. 37, 1755(1973)

14) Tabata M., H. Yamamoto, N. Hiraoka, M.

Konoshima: Phytochem., 11, 949(1972)

15) Hiraoka N., M. Tabata, M. Konoshima:

Phytochem., 12, 795(1973)

16) Konoshima M., M. Tabata, H. Yamanoto,

N. Hiraoka: Yakugaku Zashi 90, 370(1970)