

배추 칼루스 培養時 NaCl 및 Na₂SO₄가 Proline 蓄積과 水分關係에 미치는 影響

白基燁·李旺榮*·韓鳳熙
(忠北大學校 園藝學科, *興農種苗 育種研究所)

Effects of NaCl and Na₂SO₄ on Proline Accumulation and Water Relations through Callus Cultures of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis*

Paek, Kee Yoeup, Wang Young Rhee* and Bong Hee Han
(Department of Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju and
*Hungnong Seed Co. Breeding & Research Station, Jochiwon)

ABSTRACT

Hypocotyl-derived callus cultures of *Brassica pekinensis* cv. Chunseng were grown on Murashige-Skoog medium containing NaCl, Na₂SO₄ and mannitol to clarify the effect of salts on callus growth, proline accumulation and water relations. Na₂SO₄ was more inhibitory than NaCl when survival rate, growth and fresh:dry weight ratios of established callus were measured. Fresh weight in 0.25% NaCl treatment was more than twice as increasable in comparison to the same concentration of Na₂SO₄ or control. Proline concentration was increased on either salt, attained at highest levels at the 5th subculture, and fluctuated as affected by both salts or mannitol. Concentrations of reducing sugars were sharply increased after 2 or 3 times of subculture and decreased by increasing subculture. The water and osmotic potential in callus reached a maximum negative value after two weeks in culture, regardless of salt type and mannitol and turgor remained relatively constant on both salt and mannitol treatments.

緒 論

전 세계 토지의 40% 이상이 건조 혹은 반건조지역(Fisher and Turner, 1978)으로서 鹽類集積 障礙를 받고 있는 실정이며, 이들 지역에 있어서 農業生産性を 향상시키기 위해서는 관개작업이 필수적이나 土壤의 鹽類集積을 증가시키는 원인이기도 하다(Bernstein, 1975). 그 이유는 강우량이 많지 않거나 혹은 계절적으로 한정되어 있기 때문에 직접적 鹽類가 부분적으로 용탈되기도 하나 수분 증발로 인하여 土壤內 蓄積이 되기 때문이다. 또한 충분하지 못한 관개수도 鹽을 포함하고 있는 경우가 있으며 직접된 鹽類를

용탈시키기 보다는 오히려 土壤의 鹽類化를 촉진하는 경향이 있다(Bernstein, 1975).

土壤內 鹽類集積 障礙로 인한 농업생산성 감소를 극복하기 위해 대체적 수단으로서, 組織培養을 이용한 細胞 수준에서 耐鹽性이 증가된 突然變異體 細胞系를 선발하여 植物體를 재생시키는 방법이 응용될 수 있으며(Paek *et al.*, 1989; Stavarek and Rains, 1984), 또한 耐鹽性 선발에 관한 組織培養의 장점에 관해서 報告된 바도 있다(Chandler and Thorpe, 1986). 이러한 研究들은 거의 대부분 NaCl을 중심으로 이루어져 왔으나 북미 평원지대 등에 있어서 鹽類集積 土壤은 주로 黃酸鹽이 원인이 되고 있으며(Sanderson, 1982), 배추(Paek *et al.*, 1988a, 1988b, 1990), 유채(Chandler *et al.*, 1988; Chandler and Thorpe, 1987) 및 사탕수수(Paek *et al.*, 1987; Pua and Thorpe 1986) 등에서

本 研究는 教育部 支援 韓國學術振興財團의 1990年度 地方大學 學術研究造成費에 의하여 이루어진 것임.

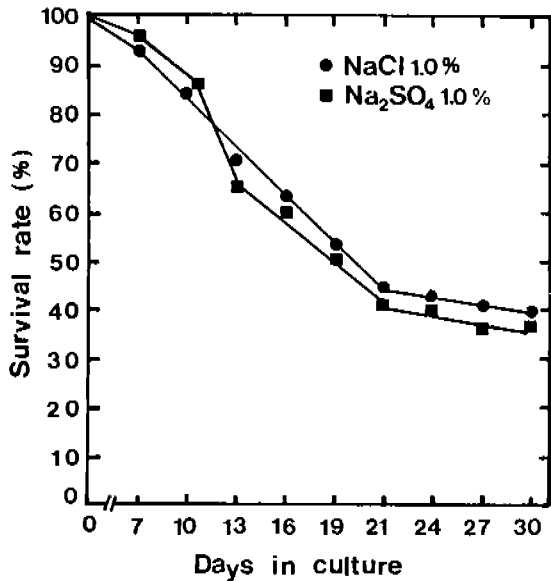


Fig. 1. Influence of NaCl and Na₂SO₄ on survival rate of undadapted callus of Chinese cabbage as affected by days in culture. Percentages are obtained from cultured 445 callus pieces and average initial callus weight is 12.5 mg.

報告된 바 있다.

따라서 本 實驗은 鹽類集積 障蔽에 대해 거의 알려져 있지 않는 배추의 칼루스를 재료로 하여 NaCl과 Na₂SO₄를 처리하였을 때 나타나는 生長適應 反應과 몇 가지 代謝物質 및 水分關係를 究明하기 위하여 실시되었다.

材料 및 方法

배추(*Brassica pekinensis* Rupr) 品種 '전승'의 종자를 無菌發芽시켜 5일 경과된 胚軸을 5mm 크기로 절편하여 Peak 등(1998)의 방법으로 칼루스를 유기시켰다. 형성된 칼루스는 당 30 g/L, 한천 8 g/L, 2,4-D 0.1 mg/L, NAA 1.0 mg/L 및 BA 1.0 mg/L를 添加한 Murashige-Skoog(MS, 1962) 培地에 4주 간격으로 培養하면서 實驗에 이용하였다. 鹽의 供給源으로써는 NaCl과 Na₂SO₄를 사용하였으며, 培地의 水分포텐셜을 조절하기 위하여 mannitol 4.0%를 첨가하여 NaCl 및 Na₂SO₄ 0.75% 添加區와 proline 蓄積 및 水分關係에 미치는 영향을 비교 조사하였다. 實驗에 사용한 칼루스의 초기 무게는 평균 13 mg 정도로 절편하여 培養液 20 mL를 분주한 일회용 페트리디쉬에 접종하고, 25±1℃의 培養室에서 螢光燈(약 100 μmol·m⁻²·s⁻¹)으로 6시간 조명하면서 培養하였다.

生長測定. NaCl과 Na₂SO₄가 1% 添加된 培地에 건

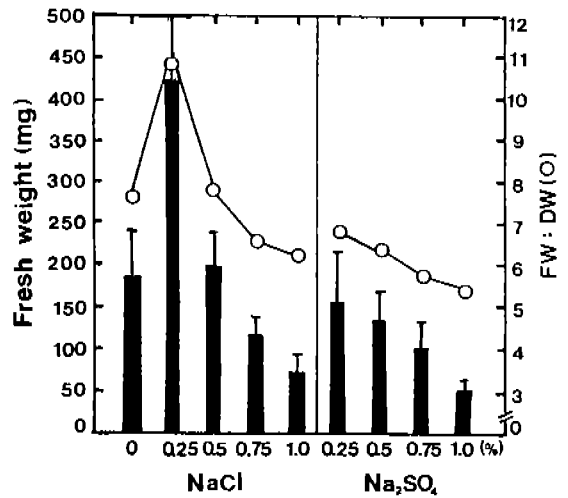


Fig. 2. Fresh weight (bar) and fresh weight: dry weight (○) in established callus of Chinese cabbage maintained with NaCl and Na₂SO₄ after 7 passages of culture. Values are the mean±SE of 10-14 replicates.

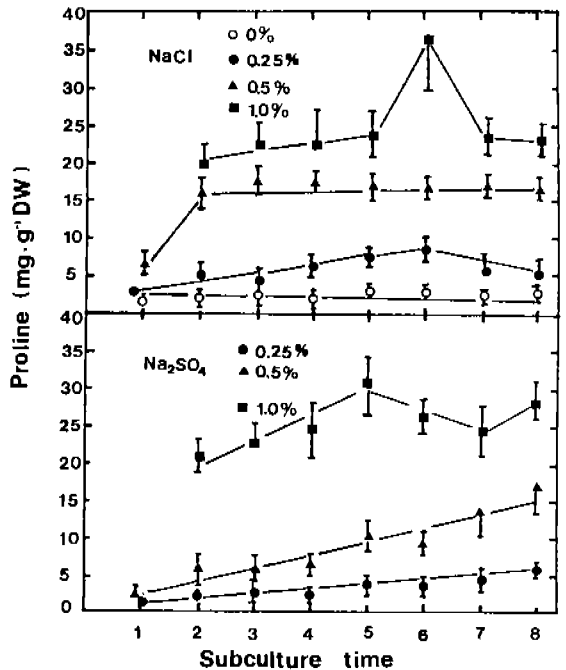


Fig. 3. Proline accumulation in callus of Chinese cabbage as affected by different salt concentrations and subculture time. Each point is the mean ± SE of 3 replicates.

전한 칼루스 조직 445개를 페트리디쉬에 접종하여 1주일이 경과한 후 3일 간격으로 生存率을 조사하였다. 또한 칼루스 증식용 培地에서 7회 繼代培養한 다음 NaCl과 Na₂SO₄가

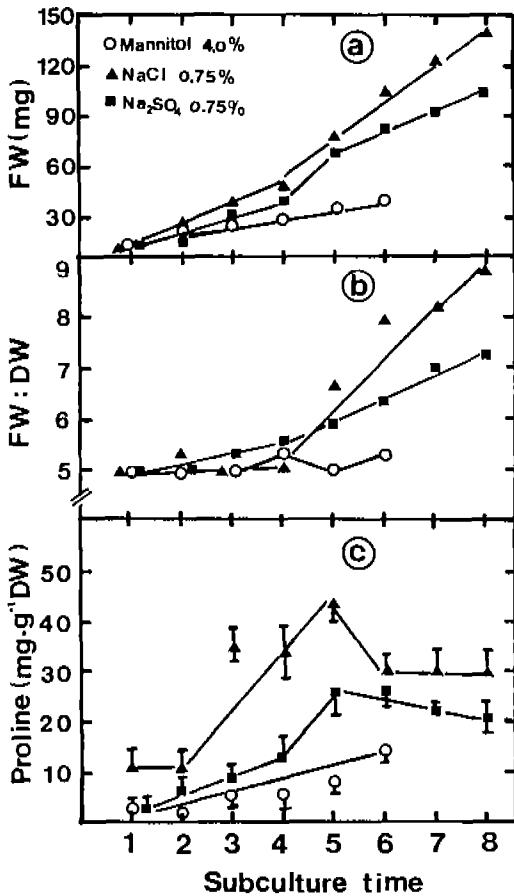


Fig. 4. Fresh weight (A), dry weight (B) and proline concentration (C) in established callus of Chinese cabbage maintained with NaCl, Na₂SO₄ and mannitol as affected by subculture time.

0.25-1.0% 添加된 培地에 칼루스 조직을 처리당 10-14개 접종하고, 培養 4주 후 生體重 및 乾物重을 조사하였는데, 乾物重 測定은 80°C의 건조기에서 24시간 건조한 후 조사하였다. 繼代培養 회수가 生體重 및 乾物重에 미치는 영향을 究明하기 위하여 mannitol 4.0%와 NaCl 및 Na₂SO₄ 0.75%가 添加된 培地에 배후 칼루스를 접종하고 4주 간격으로 8회 동안 培養하면서 生體重 및 乾物重의 변화를 조사하였다.

Proline 및 糖分析. 분석을 위한 시료의 抽出은 칼루스 조직 약 100 mg을 취하여 液體窒素에 5-10초간 냉동시킨 다음 12:5:1(v/v/v)의 MCW(methanol:chloroform:water) 용액 4 mL를 분주한 15 mL 유리호모제나이에 넣어 잘 분쇄하였다. 분쇄 후 이들 혼합물을 원심분리관에 옮겨 붓고 750 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상정액을 4°C에서 보관하면서 분석용 재료로 이용하였다.

Proline 분석은 抽出液 0.2 ml와 glycine 용액 2.5 mL를 添加하여 90°C의 항온수조에서 40분간 가열하였다. 이와 같이 제조한 시료는 Paek 등(1988)의 방법에 의해 분광광도계(UVIKON 930)로 518 nm에서 측정하였다. 還元糖 및 糖은 Somogyi(1952)와 Paek 등(1988a)의 방법에 따라 분석하였다.

水分 및 滲透 potential 測定. 水分 및 滲透 potential은 Wescor thermocouple hygrometer sample chamber (C-52)와 Wescor Dew Point Microvoltmeter(HR-33T)로 측정하였는데, 시료의 조제나 측정방법은 Chandler와 Thorpe(1987)의 방법을 따랐다.

結果

Fig. 1은 胚軸組織으로부터 유래된 칼루스를 3회 繼代培養하여 生理的 狀態가 균일하게 한 다음 NaCl과 Na₂SO₄가 1.0% 添加된 培地에 培養하였을 때 시기별 生存率을 나타낸 것이다. 培養 7일째까지는 90% 이상의 生存率을 나타내나 그 이후부터 21일까지 급격한 고사율을 나타냈으며 培養 30일 경에는 40% 정도의 저조한 生存率을 보였다. 그러나 두 鹽給源間 生存率 차이는 거의 비슷한 경향을 나타냈다.

칼루스 증식용 培地에서 칼루스를 7회 繼代培養한 다음 鹽의 濃度가 0.25-1.0% 添加된 培地에 培養하여 4주 경과한 후 生體重과 乾物重을 조사한 結果는 Fig. 2와 같다. NaCl 處理區를 보면 0.25와 0.5% 처리에서는 對照區보다 生體重, 生體重:乾物重이 오히려 증가하였으며, 그 이상 濃度에서는 현저히 감소하였다. Na₂SO₄ 處理區는 NaCl과는 달리 濃度가 증가할수록 生體重이 점진적으로 감소하였고, 生體重:乾物重도 7 이상을 나타내지 않았다.

鹽의 濃度別 및 繼代培養 기간이 칼루스 조직의 proline 蓄積에 미치는 영향을 조사한 結果는 Fig. 3과 같다. 鹽이 添加되지 않은 對照區에서는 繼代培養 회수에 관계없이 proline 含量이 2-3 mg으로 일정하였다. 반면에 NaCl이나 Na₂SO₄ 處理區는 對照區보다 含量이 높을 뿐 아니라 鹽의 濃度나 繼代培養 회수가 증가할수록 含量이 증가하는 경향이었다. 특히 0.25나 0.5% 處理區에 비해 1.0%에서 proline의 蓄積이 현저하였는데, NaCl에서는 繼代培養 6회째, Na₂SO₄에서는 5회째 최고에 달하였다. 한편 NaCl 0.5% 處理區는 繼代培養 2회째 proline 含量이 급격히 증가하여 그 이후부터는 15-17 mg 수준으로 8회 繼代培養까지 일정하게 유지되나, Na₂SO₄ 處理區는 1회 繼代培養에서 8회 繼代培養時까지 완만한 증가를 보여 對照的이었다.

NaCl과 Na₂SO₄ 0.75%, mannitol 4.0% 處理가 生體重, 生體重:乾物重 및 proline 蓄積에 미치는 영향을 繼代培養 기간별로 조사한 結果는 Fig. 4와 같다. 繼代培養 기간별 生體重 증가를 보면, mannitol 處理區는 6회 繼代培養 이

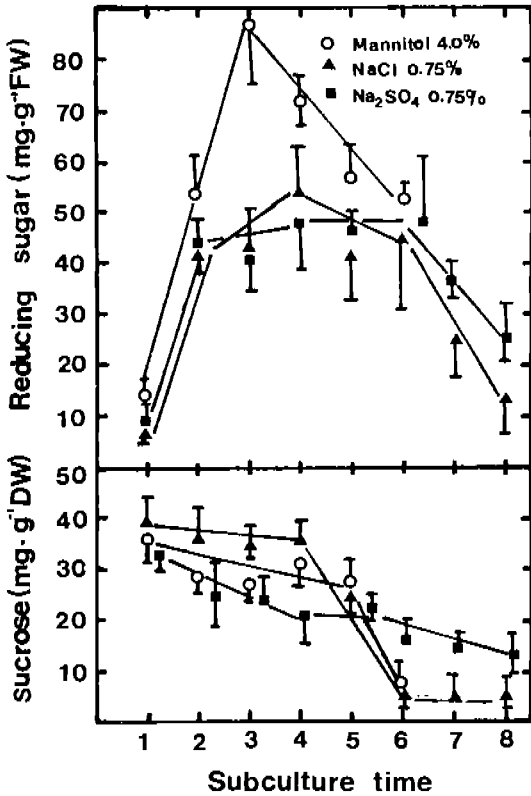


Fig. 5. Changes of sucrose and reducing sugar content in established callus of Chinese cabbage maintained with NaCl, Na₂SO₄ and mannitol as affected by subculture time. Each point is the mean ± SE of three replicates.

후에는 생존하지 못하고 고사할 뿐만 아니라 생장이 현저히 억제되는데 비해 NaCl이나 Na₂SO₄ 처리區는 繼代培養 회수가 증가할수록 生體重이 증가하였다. 生體重: 乾物重의 비율도 生體重 증가와 비슷한 경향을 나타냈는데, NaCl과 Na₂SO₄ 處理區를 비교해 보면 繼代培養 4회 이후부터 NaCl 處理區가 Na₂SO₄ 處理區에 비해 生體重: 乾物重의 비율이 증가하는 현상을 나타냈다. Proline 含量을 보면 mannitol 4% 處理區는 繼代培養 회수가 증가할수록 완만한 증가를 보이는 반면, NaCl이나 Na₂SO₄ 處理區에 비해 proline 含量이 높았다.

繼代培養 회수별 還元糖 및 糖 含量에 미치는 mannitol, NaCl 및 Na₂SO₄의 效果를 보면 Fig. 5와 같다. 還元糖의 경우 mannitol 處理區는 3회 繼代培養까지 급속한 증가를 보인 반면, 그 이후에는 급격히 감소하였으나 NaCl이나 Na₂SO₄ 處理區는 2회 繼代培養時 현저한 증가를 나타냈고, 그 이후부터 6회 繼代培養時까지 거의 일정하게 유지되다가 7회 繼代培養時부터 감소하기 시작하였다. 糖 含量을 보면 모든 處理區에서 繼代培養 회수가 증가할수록 감소

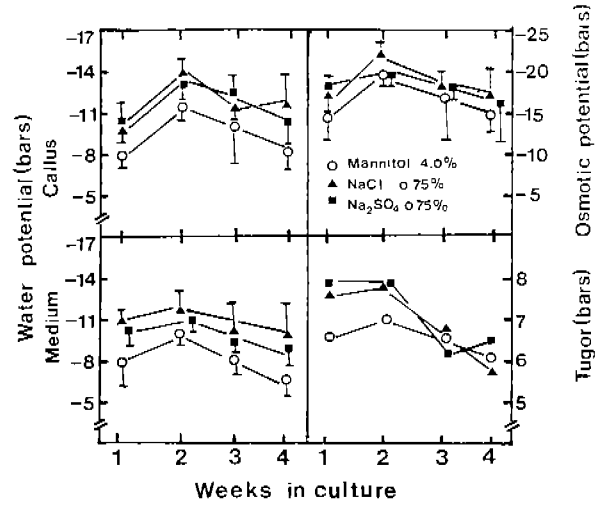


Fig. 6. Influence of NaCl, Na₂SO₄ and mannitol on water relations of medium and callus of Chinese cabbage as affected by weeks in culture. Each point is the mean ± SE of three replicates.

하는 현상을 나타냈는데 특히 NaCl과 mannitol 處理區는 5회 繼代培養 이후 급격히 감소하였다.

Fig. 6은 鹽이 添加되지 않은 培地에서 4주 간격으로 3회 繼代培養한 칼루스를 NaCl과 Na₂SO₄ 0.75% 및 mannitol이 4% 添加된 培地에 培養한 후 1주 간격으로 培地 및 칼루스 조직의 水分關係를 조사한 結果이다. 培地의 水分포텐셜(ψ)을 보면 세 處理區 모두 培養 2주째 水分포텐셜이 가장 낮았으며, 3-4주째로 培養 기간이 길어질수록 높아지는 현상을 나타냈다. 또한 培地의 水分포텐셜은 mannitol, Na₂SO₄ 그리고 NaCl 순으로 낮았다. 칼루스 조직의 水分포텐셜을 보면 培地의 水分포텐셜과 비슷한 경향을 나타냈는데, 전반적으로 배지보다는 칼루스 조직에서 水分포텐셜이 낮았다. 滲透포텐셜(ψ_s)을 보면 mannitol 處理區는 水分포텐셜과는 달리 세 處理區 모두 培養 기간에 관계없이 -15 - -20 bar 범위였다. 한편 팽압(ψ_p)을 보면 NaCl과 Na₂SO₄ 處理區에서 7.5 - 0.8 bar로 차이가 컸으나, 培養 3-4주 동안에는 5.7 - 6.8 bar 범위로 滲透포텐셜과 水分포텐셜간에 차이가 감소함을 알 수 있었다.

考 察

칼루스 培養을 통한 배추의 耐鹽性 細胞 선발시 NaCl 보다는 Na₂SO₄ 處理가 細胞의 生存率, 生體重 및 乾物重 증가에 더 억제적으로 작용하였는데 이러한 結果는 타 식물에서는 報告(Stavarek and Rains, 1984; Chandler and Thorpe, 1986)된 바 있다. 따라서 本 實驗의 結果로 보면

生長抑制 정도는 培地內 添加되는 Na⁺ 이온 濃度에 의해서도 영향을 받지만 주된 원인은 Cl⁻ 이온보다 SO₄²⁻ 이온이 生長에 더 억제적으로 작용한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 NaCl의 濃도가 低濃度(0.25 혹은 0.5%)일 경우에는 對照區보다 칼루스의 生長이 오히려 증가되는 현상을 관찰하였는데 이는 배추의 頂端培養(Paek *et al.*, 1988b)이나 담배 칼루스 培養(Hasegawa *et al.*, 1980; Heyser and Nabors, 1981)에서도 報告된 바 있다. 이러한 현상은 培地의 水分포텐셜 감소로 인하여 培養細胞의 水分 含量이 증가했기 때문이라 생각되었다. 그러나 乾物重은 오히려 對照區보다 감소되었는데 이는 鹽 添加로 인하여 細胞의 分裂 促進보다는 細胞의 肥厚 내지는 多汁性에 기인하는 것 같으며 칼랑코의 實驗(Phillips and Jennings, 1976)에서도 본 實驗과 유사한 結果가 報告된 바 있다. 또한 高等植物에 있어서 NaCl 處理時 柵狀細胞의 양이 감소하고 海綿組織이 發達이 양호하며 水分 含量이 증가하여 生體重이 증가한다는 報告(Jennings, 1976)와도 관련성이 있는 것 같다.

Proline 含量은 對照區, mannitol 및 Na₂SO₄ 處理區보다 NaCl 處理區에서, 또한 鹽의 濃도가 증가할수록 현저히 증가하였는데, 이러한 結果는 鹽으로 인한 細胞의 水分스트레스를 보완하기 위한 자구책으로 proline이 합성되어 滲透調節劑로 중요한 역할(McNulty, 1985)을 할 뿐 아니라, 植物細胞內 주요 酵素 生産을 위한 保護劑(Greenway and Munns, 1980)로서도 작용한다는 것을 알 수 있다.

糖 含量은 McNulty(1985)의 結果와 마찬가지로 繼代培養 회수가 증가할수록 감소하였고 還元糖 含量은 繼代培養 초기 급속한 증가 현상을 나타내다가 繼代培養 회수가 증가할수록 감소하는 현상을 보여 타 報告(Handa *et al.*, 1983; Heyser and Nabors, 1981)와 비슷한 경향이었다. 이는 細胞內 澱粉이 分裂에 필요한 에너지로 전환되지 못하고 이미 蓄積된 糖이 細胞生長 과정 중 glucose로 還元되어 에너지로 이용된다는 것을 추측할 수 있다.

培養 全 기간을 통하여 培地 및 칼루스의 水分포텐셜의 증감은 滲透포텐셜과 밀접한 관련이 있었으며 팽압은 培養 日數나 添加한 鹽의 급원간 일정한 양상을 나타내지 않았다. 따라서 鹽 添加 培地에서 칼루스의 生長은 滲透調節에 의해서 가능하며 팽압은 生長의 제한 요인이 아니라고 한 Morgan(1977)의 견해를 본 結果는 충족시켰다.

이상의 結果를 종합해 볼 때 칼루스 生長에 대한 NaCl보다 Na₂SO₄의 抑制效果는 組織內 SO₄²⁻ 이온의 흡수가 Cl⁻ 이온보다 적게 일어나(Paek *et al.*, 1988) 수분의 손실과 生體重 감소를 초래하며, Na⁺ 이온과 SO₄²⁻ 이온의 불균등한 흡수는 細胞內 charge의 균형을 깨뜨려 細胞生長에 억제적으로 작용한다는 것을 암시한다. 한편 鹽의 濃도가 증가하면 proline의 蓄積은 증가되나, 繼代培養 회수가 증가할수록 proline 蓄積은 지속되지 않으며 칼루스

조직이 耐鹽性을 획득할 시기에 도달하면 proline 蓄積은 오히려 감소하는 현상을 보인 것은 耐鹽性 선발시 他植物에서도 관찰되는 일반적인 기작이라 생각되며, proline의 蓄積 정도와 칼루스 조직의 수분관계와는 밀접한 관련이 있는 것 같다.

摘 要

배추(*Brassica pekinensis* Rupr) 品種 '전승'의 胚軸 유래 칼루스를 NaCl, Na₂SO₄ 및 mannitol이 添加된 Mura-shige-Skoog 培地에 培養하여 칼루스의 生長 정도, proline 蓄積 및 수분관계에 미치는 영향을 조사하였다. Na₂SO₄ 處理가 NaCl보다 칼루스의 生存率, 生體重, 生體重: 乾物重에 더 억제적으로 작용하였으며, NaCl 0.25% 處理區에서는 生體重이 對照區보다 증가하였다. Proline 含量은 鹽의 종류에 관계없이 濃도가 증가할수록 증가하였으며 繼代培養 5회째 최고에 달하였고 그 이후에는 감소하였다. 또한 NaCl 處理區가 Na₂SO₄에 비해 proline 含量이 높았고, mannitol 處理區에서는 가장 낮았다. 還元糖 含量은 繼代培養 초기 급격한 증가현상을 나타냈으나 繼代培養 회수가 증가할수록 감소하였고, 糖 含量은 繼代培養 회수가 증가할수록 감소하였다. 鹽의 종류에 관계없이 칼루스의 滲透포텐셜은 培養 2주 후에 최대로 낮아졌으며, 그 이후로는 증가하였고 팽압은 비교적 일정상태를 유지하였다.

參 考 文 獻

- Bernstein, L. 1975. Effect of salinity and sodicity on plant growth. *Ann. Rev. Plant pathol.* **13**: 295-312.
- Chandler, S.F. and T.A. Thorpe. 1986. Variation from plant tissue cultures: biotechnological application to improving salinity tolerance. *Biotechnol. Adv.* **4**: 117-135.
- Chandler, S.F. and T.A. Thorpe. 1987. Characterization of growth, water relations and proline accumulation in sodium sulfate tolerant callus of *Brassica napus* L. cv. Westar (canola). *Plant Physiol.* **84**: 106-111.
- Chandler, S.F., K.Y. Paek, E.C. Pua, E. Ragolsky, B.B. Mandal and T.A. Thorpe. 1988. The effectiveness of selection for salinity tolerance using *in vitro* shoot cultures. *Bot. Gaz.* **149**: 166-172.
- Fisher, R.A. and N.C. Turner. 1978. Plant productivity in the arid and semiarid zones. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 277-317.
- Greenway, H. and R. Munns. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.
- Handa, S., R.A. Bressan, A.K. Handa, N.C. Carpita and P.M. Hasegawa. 1983. Solutes contributing to osmotic adjustment in culture plant cells adapted to water stress.

Plant Physiol. **73**: 834-843.

- Hasegawa, P.M., R.A. Bressan and A.K. Handa. 1980. Growth characteristics of NaCl selected and nonselected cells of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Physiol* **21**: 1347-1355.
- Heyser, J.W. and M.W. Nabors. 1981. Growth, water content and solute accumulation of two tobacco cell lines cultured on sodium chloride, dextran and polyethylene glycol. *Plant Physiol.* **68**: 1454-1459.
- Jennings, D.H. 1976. The effects of sodium chloride by a succulent halophyte to saline shock. *Plant Physiol.* **78**: 100-103.
- McNulty, I.B. 1985. Rapid osmotic adjustment by a succulent halophyte to saline shock. *Plant Physiol.* **78**: 100-103.
- Morgan, J.M. 1977. Differences in osmoregulation between wheat genotypes. *Nature.* **270**: 234-235.
- Paek, K.Y., J.K. Cheong, W.Y. Rhee and C.W. Lee. 1987. Effect of growth regulators and several additives on callus formation and growth from cultured tissues of Chinese cabbage. *Kor. Soc. Plant. Tissue Cult.* **14**: 75-85.
- Paek, K.Y., S.F. Chandler and T.A. Thorpe. 1988. Physiological effects of Na₂SO₄ and NaCl on callus cultures of *Brassica campestris* (Chinese cabbage). *Physiol. Plant.* **72**: 160-166.
- Paek, K.Y., W.Y. Rhee, T.K. Hwang and Y.H. Cho. 1988a. Effect of sodium chloride and sodium sulfate on growth and metabolite content in shoot tip culture of Chinese cabbage. *Kor. Soc. Hort. Sci.* **29**: 159-170.
- Paek, K.Y., C.H. Lee and S.H. Shin. 1989. Biotechnological approaches to improving salt tolerance: Selection and physiological studies on salinity stress. *Kor. Soc. Plant. Tissue Cult.* **16**: 1-14.
- Paek, K.Y., S.W. Kim and Y.S. Lee. 1990. Effect of NaCl and Na₂SO₄ on content of metabolites in callus culture of Chinese cabbage. *Kor. Soc. Hort. Sci.* **31**: 317-326.
- Pua, E.C. and T.A. Thorpe. 1986. Differential response of non-selected callus cultures of *Beta vulgaris* L. to salt stress. *J. Plant Physiol.* **81**: 621-629.
- Phillips, R.D. and D.H. Jennings. 1976. Succulence, cations and organic acids in *Kalanchoe daigremontiana* grown in long and short days in soil and water culture. *New Phytologist.* **77**: 599-611.
- Sanderson, K. 1982. Soil fertility, land productivity and dry land salinity in Alberta. FECA 82/17/1322, Environmental Council of Alberta, Edmonton, Canada. 10p.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determinations. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
- Stavarek, S.J. and D.W. Rains. 1984. The development of tolerance to mineral stress. *HortScience.* **19**: 377-382.

(1991. 5. 30 接受)