

# 지치 (*Lithospermum erythrorhizon* S.) Callus 성장에 미치는 저선량 $\gamma$ 선의 효과

황혜연 · 김재성<sup>1</sup> · 이영복\*

충남대학교 원예학과, <sup>1</sup>한국원자력연구소 동위원소 · 방사선 응용연구팀

## Effects of Low Dose $\gamma$ Radiation on Callus Growth of *Lithospermum erythrorhizon* S.

HWANG, Hye Yeon · KIM, Jae Sung<sup>1</sup> · LEE, Young Bok\*

Department of Horticulture, Chungnam National University, Taejon, 305-764, Korea

<sup>1</sup>RI · Radiation Application Research Team, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon, 305-353, Korea

**ABSTRACT** The effect of low dose  $\gamma$ -radiation on the callus growth of *Lithospermum erythrorhizon* S. cultured on different medium and lighting condition was investigated. The 8 Gy irradiation stimulated callus growth on LS medium supplemented with BA 2 mg/L and NAA 2 mg/L, however, the growth of callus was more effective on LS medium supplemented with BA 1 mg/L and NAA 1 mg/L under 16 hrs day light. And on the LS medium containing IAA 0.2 mg/L, 16 Gy irradiation increased the callus growth by supplement with kinetin 2 mg/l and the effect of kinetin was higher than BA at same concentration. The growth of callus was more vigorous on LS medium than MS medium in general. On M-9 medium, the growth of callus was poor regardless lighting conditions, however, by  $\gamma$ -ray irradiation of 16 Gy or 30 Gy, callus growth rates were increased by 30% or more than 30%, especially, under 16 hrs day light condition.

**Key word:** Callus growth, lighting condition, medium,  $\gamma$ -ray irradiation

### 서 론

한국, 일본 및 중국에서 자생하는 지치 (*Lithospermum erythrorhizon* S.)는 옛부터 고급염료 및 항균작용, 창상치료 작용, 항궤양작용이 있어 외상약이나 치질의 치료약 등 생약의 원료로 폭넓게 사용되어 왔다. 이는 지치의 근부조직에서 합성되는 붉은 색소를 띠는 2차 대사산물에 의한 것이고, 또 이 물질은 1,4-naphthoquinone인 shikonin이 주성분이라는 사실이 Tajima와 Kuroda에 의해 밝혀졌다 (Tabata et al. 1974). 그러나 이 물질들의 합성은 지치의 근부조직의 코르크층에서만 국한적으로 합성되는 것으로 생체 내에서의

shikonin 생산 증대에 대한 기대가 어렵기 때문에 Tabata 등 (1974)은 최초로 지치조직의 캘러스 배양을 시도하여 auxin의 종류와 광조건의 조절로 캘러스에서의 shikonin 합성을 증가시키는 데 성공하였다. 따라서 식물생체에서의 shikonin 합성의 조절은 어려우나 캘러스 또는 세포 배양에서의 조절이 가능한 것이 확인되었으며, Heide 등 (1989)은 세포 내의 효소활성의 조절로 shikonin 생산을 보다 증가시킬 수 있다고 보고하였다.

지치의 캘러스 또는 세포 배양에서의 shikonin 합성을 증가시키기 위한 선행단계로서는 우선 세포주의 효과적인 증식 체계 확립이 요구되며, 이는 배지조성 및 생장조절물질의 적정농도의 첨가에 의해서도 조절할 수 있겠으나 (Kim and Yu 1991), 방사선 조사 등 폭넓은 방법의 도입으로 세포에 자극을 부여함으로써 세포의 활력을 증대시키는 방법도 고려할

\*Corresponding author. Tel 042-821-5736 Fax 042-823-1382

E-mail yblee@cnu.ac.kr

수 있다.

감마선을 포함한 방사선은 과다하게 발생할 때에는 생체에 방사선 장애를 유발하여 치명적인 장애를 주고 있음은 잘 알려져 있다. 반면, 적절한 선량 하에서는 오히려 발아율 증대 및 생육촉진에 의한 수량증가 (Lee et al. 1998; Kim et al. 2000a), 병에 대한 저항성 및 내한성 등 내재해성 특성의 유발 (Kim et al. 2000b), 양분 및 유용 활성물질 생산의 증대 (Lee et al. 1999b), 개화촉진 및 휴면타파, 후속 고선량 피폭에 대한 저항력 증가 등 다목적으로 이용되고 있으나 (Kim and Lee 1998) 방사선이 캘러스의 생장에 미치는 영향에 대한 보고는 거의 없다.

따라서 shikonin의 효율적인 생산을 위한 캘러스의 대량공급을 위하여 배지 및 배양조건의 확립과 동시에 저선량  $\gamma$ 선 처리에 의한 캘러스 생장효과를 검토하기 위해 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 캘러스 유도

충남 금산 약초시장에서 구입한 지치 (*Lithospermum erythrorhizon*) 뿌리를 70% ethyl alcohol로 수초 간 소독하고 수세한 다음, 25% sodium hypochlorite (Cl 농도 10% 시약) 용액에 20분간 침지소독하고 멸균증류수로 3회에 걸쳐 세척한 뿌리로부터 채취한 유관속 부위의 조직절편을 NAA 5 mg/L가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에 치상하여, 25°C, 16시간 장일조건과 20,000 lux의 광도 하에서 배양하여 캘러스로 탈분화시켰다. 이에 의해 얻어진 캘러스 중 배양기간 3~4주 된 생육이 양호한 캘러스를 선별하여 1~2 g 정도의 크기로 petridish의 정중앙에 수평치상하였다. 모든 실험은 3반복, 3회에 걸쳐 수행하였으며, 배지는 phytigel 0.2%, sucrose 3%를 첨가한 고체배지를 사용하였고, pH는 phytigel 첨가 전에 5.8로 조정하였다.

$\gamma$ 선처리는 캘러스를 치상한 후, 한국원자력연구소 보유 저준위조사시설 ( $^{60}\text{Co}$ , 선원강도 150TBq)을 이용하여, 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 30 Gy의 세기가 되도록 1, 6시간 처리하였으며, 조사선량율은 Fricke dosimeter로 측정하였다. 이 때 방사선량이 발생중심지에서 일정하게 캘러스에 조사되도록 하기 위하여 캘러스를 petridish 중앙에 치상하였다.  $\gamma$ 선을 처리한 캘러스는 25°C의 growth chamber (한일, G100D)에서 배양한 후, 3, 7, 14, 21일간의 간격으로 생체중을 측정하였다.

### 배지 조성 및 영향

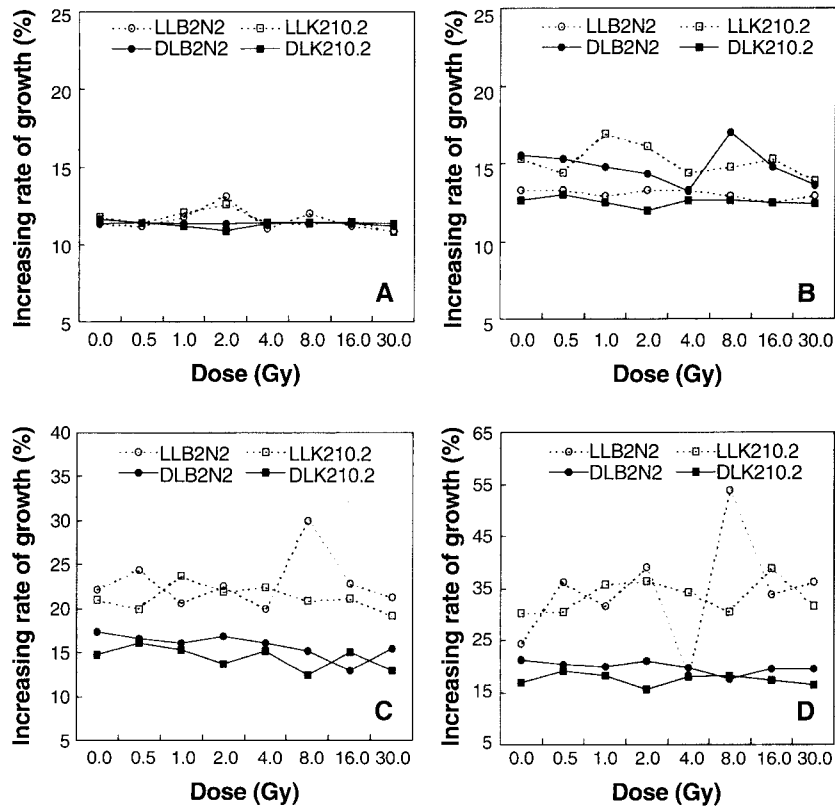
본 실험에서 사용한 배지는 Lee 등 (1999a)에 의해 발표된 BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 LS배지 (LB2N2배

지)와 Tabata 등 (1974)에 의해 캘러스 배양에 양호하다고 발표되었던 kinetin 2 mg/L 및 IAA 0.2 mg/L가 첨가된 LS배지 (LK2I0.2배지)에서의 생육 차이를 비교하였고, LK2I0.2배지에서의 kinetin 대신에 BA 2 mg/L가 첨가된 LS배지 (LB2I0.2배지)의 차이를 비교 검토하였다. 아울러 LB2N2배지와 BA의 농도 간의 차이에 의한 캘러스의 생장효과를 비교하기 위하여 BA와 NAA의 농도를 각각 1 mg/l로 낮추어 첨가한 LS배지 (LB1N1배지)를 비교하였으며, kinetin 2 mg/L, IAA 0.2 mg/L의 농도를 동일하게 첨가한 LS배지와 MS배지 (MK2I0.2배지)를 비교하였다. 끝으로 Fujita 등 (1981)에 의해 shikonin의 생성에 양호하다고 발표되었던 생장조절물질이 첨가되지 않은 M-9배지에서의 효과를 검토하였다. 모든 실험에서  $\gamma$ 선처리에 의한 캘러스의 생장효과와 동시에 16시간 일장의 명배양과 24시간의 암조건의 영향에 관하여도 검토하였다.

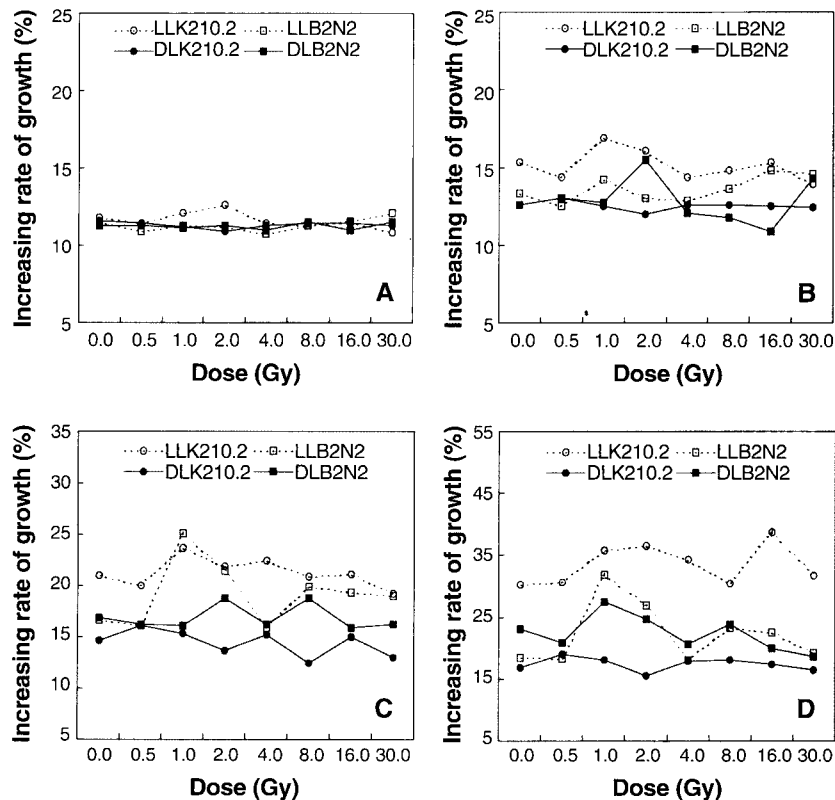
## 결과 및 고찰

저선량 방사선 조사 후 LB2N2배지와 LK2I0.2배지에서 명배양과 암배양한 캘러스의 생장을 본 결과, Figure 1에서와 같이  $\gamma$ 선 조사 후 7일이 경과되면서 명과 암의 생장에 대한 차이가 나타나기 시작하였다. 배양을 시작한 지 14일이 경과하였을 때 명배양에서는 암배양하였을 때에 비하여 생장물의 뚜렷한 증가효과를 보였다. 배양 후 21일이 경과하였을 때 공시한 두 배지 모두에서 명배양에서 캘러스의 생장이 효과적이었다.  $\gamma$ 선 조사에 의한 효과에 있어서도 21일 경과 후에 LB2N2배지는 8 Gy, LK2I0.2배지에서는 16 Gy의 특정 선량에서 생장물의 증가효과가 인정되었고, 같은 효과가 있는 특정 선량에 있어서도 배지조성에 따른 차이가 인정되었다. 이때 LB2N2배지의 경우 4 Gy에서는 오히려 생장이 떨어지는 경향을 보이고 있는데 이러한 현상은 다른 연구 결과(Kim et al. 2000a; Kim et al. 2000b)에서도 나타나는 현상으로 그 원인에 관하여는 검토의 필요가 있다.

저선량  $\gamma$ 선이 LK2I0.2배지와 LB2I0.2배지에서 명배양과 암배양한 캘러스의 생장효과를 비교한 결과, Figure 2에서와 같이  $\gamma$ 선 조사 후 7일이 경과되면서 명과 암의 생장에 대한 차이가 나타나기 시작하여 배양 14일 후의 LLB2I0.2배지에서는 명배양 시 암배양하였을 때에 비하여 생장물의 증가가 높게 나타났다. 배양 후 21일이 경과하였을 때, 명배양에서는 LK2I0.2배지에서, 암조건에서는 LB2I0.2배지에서 캘러스의 생장이 효과적임을 알 수 있다.  $\gamma$ 선 조사에 의한 캘러스 생장에 대한 21일 배양 후의 효과에 있어서도 LK2I0.2배지에서는 16 Gy, LB2I0.2배지에서는 1 Gy의 특정 선량에서 생장물의 증가효과가 인정되었으며, 같은 효과가 있는 특정선량에 있어서도 배지조성에 따라 차이가 있었다. 아울러 명배양에서는 BA보다 kinetin이, 암배양에서는 kinetin보다 BA가 효과



**Figure 1.** Effect of  $\gamma$  radiation on the increasing rate of growth of *L. erythrorhizon* callus after culture for 0 (A), 7 (B), 14 (C), and 21 days (D) on the LS medium supplemented with BA 2 mg/L and NAA 2 mg/L (LB2N2) and on the LS medium with kinetin 2 mg/L and IAA 0.2 mg/L (LK210.2) in the dark (closed, D) or light (opened, L).



**Figure 2.** Effect of  $\gamma$  radiation on the increasing rate of growth of *L. erythrorhizon* callus after culture for 0 (A), 7 (B), 14 (C), and 21 days (D) on the LS medium supplemented with kinetin 2 mg/L and IAA 0.2 mg/L (LK210.2) and on the LS medium with BA 2 mg/L and IAA 0.2 mg/L (LB210.2) in the dark (closed, D) or light (opened, L).

가 더 양호하였다.

저선량  $\gamma$ 선 처리 후 BA와 NAA의 농도에 차이가 있는 LB2N2배지와 LB1N1배지에서는 배양 후 7일이 되면서 명과 암에 의한 차이가 나타나기 시작하였고, 14일이 경과되면서 증가 폭이 더 크게 나타났다. 21일이 지난 후에는 LB2N2배지와 LB1N1배지 간의 명, 암의 차이가 뚜렷이 나타나 두 배지 모두 암배양에서보다는 명배양에서 효과가 있음이 확인되었다 (Figure 3). 그러나  $\gamma$ 선 조사에 의한 캘러스 성장에 대한 효과면에서는 비록 캘러스의 성장증가율 수치는 LLB2N2배지보다 LLB1N1배지에서 좋은 것으로 나타났으며, 8 Gy에서 가장 효과적이었다. LLB1N1배지에서는 대조구에 비해 효과가 없었던 것으로 보아 BA와 NAA의 농도는 각각 2 mg/L가 효과적이었음을 확인할 수 있었다. 또한 특정 선량에 대해서도 성장률의 증가 효과가 있었음을 확인할 수 있었다.

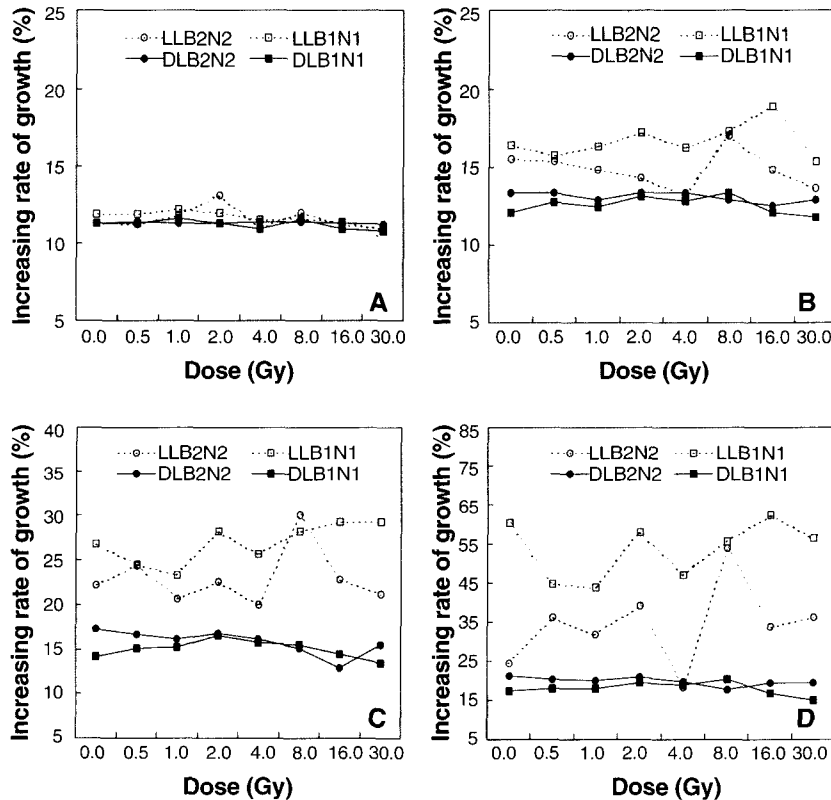
Kinetin 2 mg/L와 IAA 0.2 mg/L를 각각 동일하게 포함한 LS (LK2I0.2)배지와 MS (MK2I0.2)배지로 구분하여 무처리구인 두 배지 간의 차이에 의한 캘러스의 성장을 비교하였을 때 Figure 4에서와 같이 7일이 지나면서 명과 암의 차이가 커지기 시작하여 14일 후는 명암의 성장의 차이가 크게 나타났으나,  $\gamma$ 선 조사구에서의 성장의 차이는 명배양에서만 나타났다. 21일이 경과한 후에는 명배양에서는 LK2I0.2배지의 16 Gy에서 MK2I0.2배지에서는 0.5 Gy에서 캘러스의 생

장이 양호하였으나, 암배양에서는 두 배지 간의 성장의 흐름의 차이가 크지 않았다.  $\gamma$ 선 조사에 의한 캘러스의 성장효과에 있어서도 명배양에서는 특정 선량에서 성장률의 증가효과가 인정되었고, 같은 효과가 있는 특정 선량에 있어서도 배지 조성에 따른 차이가 인정되었다.

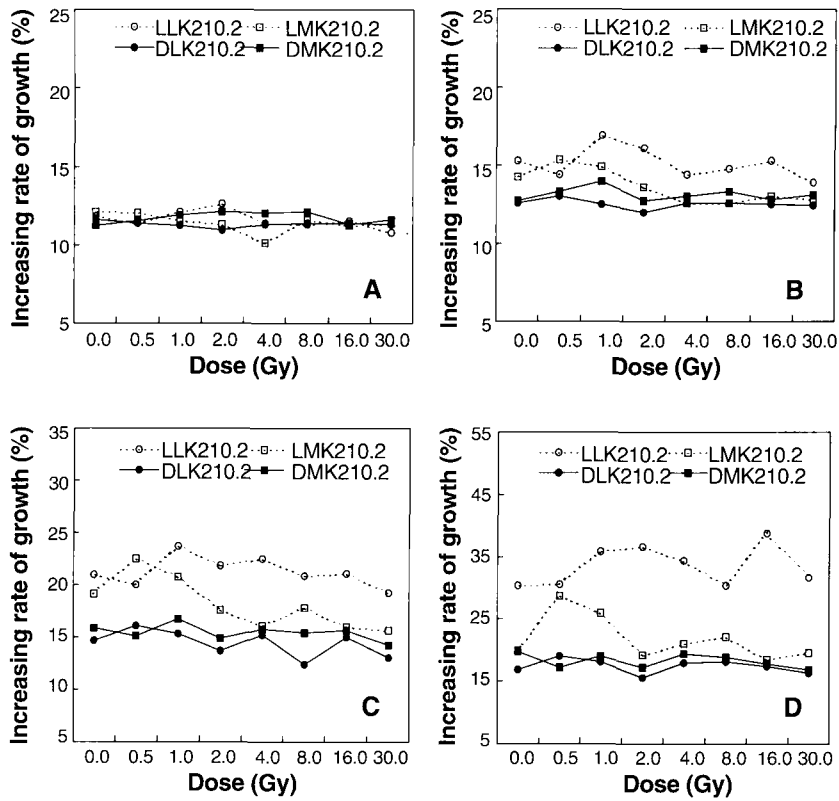
$\gamma$ 선 조사에 의한 M-9배지에서의 명·암조건에 따른 캘러스 성장에 미치는 효과는 Figure 5에서와 같이 배양 후 7일 경과 시까지는 큰 차이를 볼 수가 없었으나, 배양 후 14일이 경과하면서 증가의 폭이 크게 나타났으며, 21일이 경과하였을 때 명배양시 암배양에서보다 특정선량에 대해 캘러스 생장이 증가를 보여, 30 Gy에서 캘러스 성장 촉진효과를 확인할 수 있었다.

지치의 캘러스 증식과 shikonin의 생산과는 서로 상반되는 경향이 있는 것으로 지치의 세포를 LS배지에서 배양할 경우 캘러스의 증식은 유도되었으나 shikonin의 생산은 실패하였으며, 이의 원인은 LS배지의  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 의 함량이 높고,  $\text{Cu}^{2+}$ 의 낮기 때문이며 (Fujita et al. 1981; Yazaki et al. 1987), 이로 인하여 세포의 액포에 다량의 *p*-hydroxybenzoic acid-*O*-glucoside가 축적되고 phenylalanine에서 shikonin으로 넘어가는 path way가 차단되는 것으로 밝혀졌다 (Heide et al. 1989; Tabata et al. 1996; Yazaki et al. 1997).

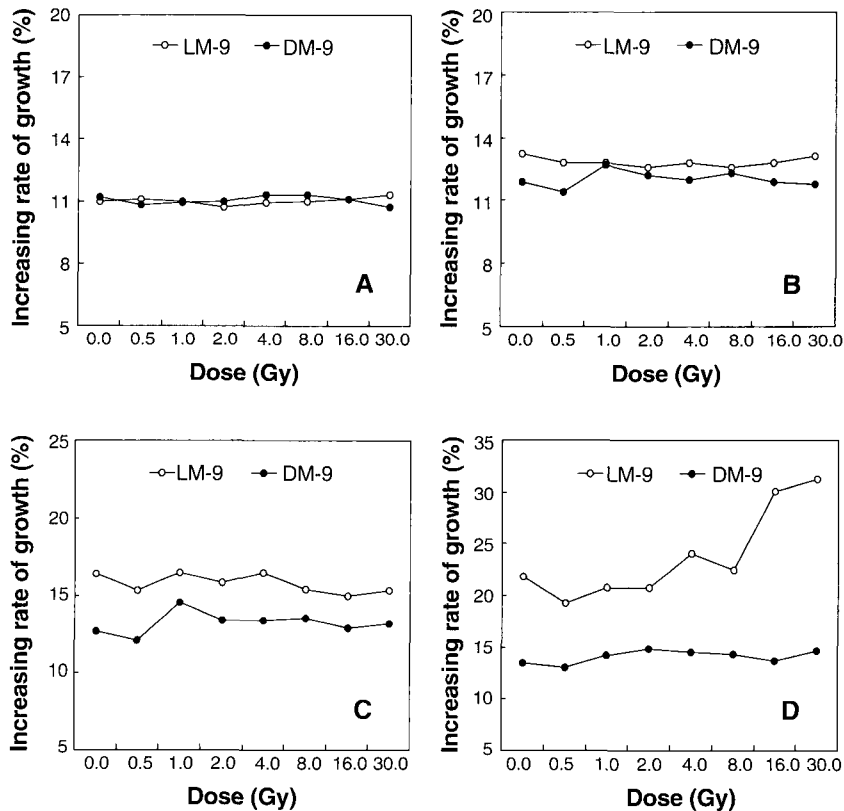
이상의 결과로 볼 때, 캘러스의 성장증가율이 가장 좋았던 배지로는 LB1N1배지로 60% 정도의 성장증가율을 보였으나,



**Figure 3.** Effect of  $\gamma$  radiation on the increasing rate of growth of *L. erythrorhizon* callus after culture for 0 (A), 7 (B), 14 (C), and 21 days (D) on the LS medium supplemented with BA 2 mg/L and NAA 2 mg/L (LB2N2) and on the LS medium with BA 1 mg/l and NAA 1 mg/l (LB1N1) in the dark (closed, D) or light (opened, L).



**Figure 4.** Effect of  $\gamma$  radiation on the increasing rate of growth of *L. erythrorhizon* callus after culture for 0 (A), 7 (B), 14 (C), and 21 days (D) on the LS medium supplemented with kinetin 2 mg/L and IAA 0.2 mg/L (LK210.2) and on MS medium with kinetin 2 mg/L and IAA 0.2 mg/L (MK210.2) in the dark (closed, D) or light (opened, L).



**Figure 5.** Effects of  $\gamma$  radiation on the increasing rate of growth of *L. erythrorhizon* callus after culture for 0 (A), 7 (B), 14 (C), and 21 days (D) on hormone-free M-9 medium in the dark (closed, DM-9) or light (opened, LM-9).

본 실험 목적에 따른  $\gamma$ 선 처리에 의한 성장증가율이 가장 좋은 효과적인 배지로는 명배양에서 대조구에 비해 2배의 성장증가율을 나타낸 LB2N2배지가 좋았고, 암배양에서는 LB2I0.2배지가 좋았다. 또한 M-9배지에서도  $\gamma$ 선 조사에 의해 캘러스의 성장에 다소의 효과가 있었다.

## 적 요

본 실험은 지치 (*Lithospermum erythrorhizon*)의 뿌리조직으로부터 유도한 캘러스에  $\gamma$ 선을 조사하여 배양기간과 배지조성 및 명·암배양의 조건에 따라  $\gamma$ 선 조사가 캘러스 성장촉진 효과가 있는지를 검토하고자 수행하였다.

지치의 캘러스 생장은 전체적으로 암배양에서보다 명배양에서 효과적이었다.  $\gamma$ 선 조사에 의한 효과에 있어서는 LLB2N2배지의 8 Gy에서 캘러스의 성장에 효과가 가장 좋았고, LLK2I0.2배지에서는 16 Gy에서 캘러스 성장효과가 좋았지만 암배양에서의  $\gamma$ 선처리 효과는 없었다. 명배양에서 LS 배지에 BA 1 mg/L와 NAA 1 mg/L를 첨가할 경우, BA 2 mg/L와 NAA 2 mg/L를 첨가할 때보다 캘러스의 성장효과가 있었으나, 암배양에서는 차이가 없었다. 특정선량에 대한 BA와 NAA의 농도에 있어서는 각각 2 mg/L가 효과적인 것으로 나타났다. MK2I0.2배지는 0.5 Gy와 1 Gy에서 캘러스의 성장에 효과적이었으나, 기본배지의 종류에 있어서는 MS배지보다 LS배지에서 더 효과적이었다. M-9배지에서는 명배양에서도 캘러스의 생장은 저조하였으나, 16 Gy 및 30 Gy에서 캘러스의 생장이 30% 이상 증가하였다. 암배양에서는  $\gamma$ 선 조사에 의한 캘러스의 성장효과는 거의 없었다.

사사 - 본 연구는 2000년도 한국원자력연구소 지원 연구비(과제번호 : 2000차체-위탁-3)에 의한 '방사선을 이용한 shikonin 생산성 향상 기술개발' 과제로 수행되었으며, 그 결과의 일부임.

## 인용문헌

Fujita Y, Hara Y, Suga C, Morimoto T (1981) Production of shikonin

derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* II. Plant Cell Rep 1:61-63

Heide L, Nishioka N, Fukui H, Tabata M (1989) Enzymatic regulation of shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. Phytochemistry 28:1873-1877

Kim SG, Yu HJ (1991) Production of shikonin derivatives by cell lines of *Lithospermum erythrorhizon*. Kor J Plant Tiss Cult 18(5):313-321

Kim JS, Lee YB (1998) Ionizing radiation hormesis in crops. Kor J Environ Agri 17(1):76-85

Kim JS, Lee EK, Song JY, Kim HG, Lee YB (2000a) Induction of resistance against *Phytophthora* bright of pepper by low dose gamma ray radiation. Korean J. Environ Biol 18(1):47-51

Kim JS, Lee EK, Back MH, Kim DH, Lee YB (2000b) Influence of low dose  $\gamma$  radiation on the physiology of germinative seed of vegetable crops. Kor J Environ Agri 19(1):58-61

Lee EK, Kim JS, Lee YK, Lee YB (1998) Effect of low dose  $\gamma$ -ray irradiation of the germination and growth in red pepper (*Capicum annuum* L.). J Kor Soc Hort Sci 39(6):670-675

Lee EK, Kim JS, Choi YJ, Hwang HY, Lee YB (1999a) Effects of plant growth substaces and lighting on callus growth of *Lithospermum erythrorhizon*. Kor Soc Plant Tiss Cult P-4-1:8

Lee HS, Yoo SH, Kwon SY, Kim JS, Kwak SS (1999b) Gamma radiation-induced changes of antioxidant enzymes in callus culture of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Kor J Plant Tiss Cult 26:53-58

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-479

Tabata M, Mizukami H, Hiraoka N, Konoshima M (1974) Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Phytochemistry 13:927-932

Yazaki K, Fukui H, Takeda K, Tabata M (1987) Regulation of shikonin production by glutamine in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. Plant Cell Rep 6:131-134

Yazaki K, Takeda K, Tabata M (1997) Effects of methyl jasmonate on shikonin and dihydroechinofuran production in *Lithospermum* cell cultures. Plant Cell Physiol 38:776-782

(접수일자 2001년 11월 8일)