

지치 (*Lithospermum erythrorhizon* S.)의 캘러스배양에서 Shikonin 유도체 생산에 미치는 저선량 γ 선의 효과

황혜연, 김재성¹, 이영복*

충남대학교 원예학과, ¹한국원자력연구소 방사선 이용연구부

Effects of Low Dose Gamma Radiation on the Formation of Shikonin Derivatives in Callus Cultures of *Lithospermum erythrorhizon*

Hye-Yeon Hwang, Jae-Sung Kim¹, Young-Bok Lee*

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

¹Radiation Application Research Team, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea

ABSTRACT The effects of low dosage γ -radiation on the cell growth and the formation of shikonin derivatives were investigated in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* under different medium and light conditions. Gamma radiation significantly affected the cell growth and formation of shikonin derivatives, depending on the culture conditions. In the cell cultures grown on M-9 medium, 2 Gy and 16 Gy of γ -radiation increased the calli growth and the formation of shikonin derivatives, respectively under 16 hr day light condition. When calli were cultured for 60 days in the dark after irradiation of γ -radiation, cell growth was increased at low dosage of 1 Gy and 2 Gy in LS medium containing BA 2 mg/L and IAA 0.2 mg/L. Interestingly, calli grown on M-9 medium by 2 Gy irradiation for 60 days significantly stimulated the formation of shikonin derivatives (13.21 mg/g cell fresh wt), which was approximately 6 times higher than untreated cells.

Key words: *Lithospermum erythrorhizon* S., callus culture, shikonin derivatives, γ -radiation, M-9 medium, LS medium

서 론

지치 (*Lithospermum erythrorhizon*)의 뿌리에서 생산되는 naphthoquinone의 일종인 shikonin은 항균, 소염, 항종양의 기능을 가지고 있는 매우 유용한 천연물질로서 캘러스배양이나 세포배양에 의해서도 다량으로 생산할 수 있는 가능성이 제시되었다 (Tabata et al. 1974). 그러나 이의 세포배양이나 캘러스배양에서 shikonin의 생성은 배양조건에 따라서 많은 차이가 있는 것으로 알려져 있다. Fujita 등 (1981a)은 배지의 조성에 있어 질소원의 종류와 농도에 따라 캘러스에서의 shikonin

생산에 큰 영향을 주어 NH_4^+ N는 어느 수준의 농도까지는 세포의 생장을 촉진하지만 shikonin의 합성은 크게 억제하며, NO_3^- N이 shikonin의 합성을 촉진한다고 보고하였다. 세포 내에서의 shikonin 합성에 영향을 주는 요인은 배지의 질소원 뿐만 아니라 당원에 따라서도 차이가 있고, Yazaki 등 (1997)은 Cu^{2+} 나 ascorbic acid가 shikonin의 합성을 촉진하며, Mizukami 등 (1978)은 고농도의 Ca^{2+} 나 Fe^{2+} 는 캘러스에서의 shikonin의 생산을 억제한다고 보고하고 있으며, LS (Linsmair and Skoog 1965)배지에서 세포의 증식은 촉진되지만 shikonin 생산은 기대할 수 없는 것으로 판단하여 shikonin 생산의 효율성을 높이기 위한 새로운 조성의 M-9배지를 개발하였지만 (Fujita et al. 1981b), M-9배지에서는 세포의 증식을 기대할 수 없기 때문에 세포의 증식은 LS배지에서 시도하

*Corresponding author Tel 042-821-5736, 7829 Fax 042-823-1382
E-mail yblee@cnu.ac.kr

고 M-9배지에서 shikonin의 생산을 하는 2원적인 배양시스템이 도입되게 되었다.

특히 지치의 캘러스로부터의 shikonin합성은 배지의 조성뿐만 아니라 광의 영향도 많이 받아 Heide 등 (1989)은 광배양에서는 캘러스에서의 shikonin합성이 억제되고, 암조건하에서 shikonin의 합성이 증대된다고 보고하였다. 이와 원인은 세포내의 효소의 영향으로서 광이 조사되고 있을 때에는 세포내 shikonin합성의 중간대사과정에서 *p*-hydroxybenzoic acid가 *p*-hydroxybenzoic acid-*O*-glucoside로 전환되어 shikonin으로의 대사과정이 중단되지만, 암조건하에서는 *p*-hydroxybenzoic acid가 *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid로 전환되어 shikonin으로 합성이 진행되기 때문인 것으로 확인하였다 (Figure 1) (Yamamoto et al. 2000).

Phenylalanine으로부터 shikonin으로 가는 생합성과정은 내부의 효소의 활성에 의한 영향이 크고, 또 효소의 활성은 배지조건이나 배양조건에 영향을 크게 받는 것으로 확인되었다. Fukui 등 (1992)은 지치의 세포를 LS배지에 배양할 경우 어떠한 naphthoquinone 유사물질도 합성되지 않았으며, geranyl-phenylalanine으로부터 shikonin으로 전환되지 않고 반면에 배지에 다량의 dihydrochinchonin이 축적되고 있음을 밝혔으나, Mizukami 등 (1993)은 methyl jasmonate 처리에 의해 shikonin 합성 증가 효과를 보고하였으며 또한, Mülenweg 등 (1998)은 동일한 LS배지에 methyl jasmonate의 첨가로 shikonin 생합성의 핵심 효소인 *p*-hydroxybenzoate geranyltransferase의 활성이 200배 이상 증가하면서 shikonin 유도체의 생성량이 현저하게 증가되었다고 보고한 바와 같이 배양조건 또는 세포의 자극에 따라 세포내의 효소의 활성이 크게 변하고 이에 따라 shikonin의 합성도 조절되어질 수 있는 것으로 보인다.

한편, 감미산을 포함한 방사선은 생체에 과다하게 발생하면 방사선장해를 유발하여 인체에 치명적인 장애를 주고 있음은 잘 알려져 있지만, 저선량에서는 오히려 발아율을 증대시키고, 생육을 촉진하며, 내재해성 및 유용 활성물질의 함량을 증대시키는 등 식물의 생장과 발육에 촉진효과가 있는 것으로 밝혀져 있다 (Lee et al. 1998a, 1998b, 1999). 이는 세포내의 대사과정에서 저선량의 방사선이 효소의 활성에 자극을 주는 것으로 이해할 수 있으므로 (Lee et al. 2003) shikonin의 효율적인 합성을 위하여 앞에서의 방사선의 효과를 식물체의 외형적인 생육에만 결부시키지 않고 세포내의 효소의 활성을 촉

진시켜 저지에서 합성되는 2차대사물의 합성을 촉진시킬수 있는가에도 연관지어 연구해 볼 가치가 있다. 본 실험에서는 저선량 γ 선 조사가 캘러스의 생장이나 2차대사물의 생산에 어떠한 영향을 주는가와 동시에 이에 수반되는 배지 및 배양 조건에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

지치 캘러스에 대한 저선량 감미선 조사 및 배양

지치 (*Lithospermum erythrorhizon*) 뿌리조직의 배양으로부터 얻어진 캘러스를 계대배양한 후 3~4주간 배양된 캘러스 중에서 생육이 양호한 것을 선별하여 1~2g 정도의 크기로 1회용 Petridish의 정중앙에 수평치상하여 γ 선 처리를 하였다. γ 선 처리는 Hwang 등 (2000)에 의해 얻어진 결과로부터 캘러스의 생육에 양호하였던 선량과 저조하였던 선량을 선별하여 한국원자력연구소에서 보유중인 저준위조사시설 (^{60}Co , 선원강도 150 TBq)을 이용하여 0, 1, 2, 16, 30 Gy의 세기가 되도록 조사하였다. γ 선 조사 후 캘러스는 25°C의 growth chamber (한일, G100D)에서 배양하였고, 배양 후 3, 10 및 21일의 3회에 걸쳐 캘러스를 채취하여 생체중을 측정할 다음 shikonin 유도체의 생성량을 분석하였으며, 추가로 γ 선 조사 후 암배양 조건에서 60일간 장기간 배양한 캘러스를 동시하여 shikonin 유도체의 생성량을 분석하였다. 모든 실험은 3반복씩 3회에 걸쳐 수행하였으며, 배지는 LS (Linsmair and Skoog, 1965)배지와 M-9 (Fujita et al. 1981b)배지를 기본배지로 phytagel 0.2%, sucrose 3%를 첨가한 고체배지를 사용하였고, pH는 phytagel 첨가 전에 5.8로 조정하였다.

본 실험에서 사용한 배지는 Hwang 등 (2000)의 실험에서 얻어진 결과로부터 광에서 생장이 가장 양호하였던 LS배지에 BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 배지를 이용하여 16시간의 광배양으로 캘러스를 배양하였고, 다음으로 Fujita 등 (1981b)에 의해 shikonin의 생장에 양호하다고 보고된 생장조절물질이 첨가되지 않은 M-9배지를 각각 사용하여 γ 선 조사 후 16시간의 광배양과 24시간 암배양을 설정하여 shikonin 유도체 생산효과를 검토하였으며, 또한 LS배지에 BA 2 mg/L와 IAA 0.2 mg/L를 첨가한 배지를 이용하여 암조건으로 캘러

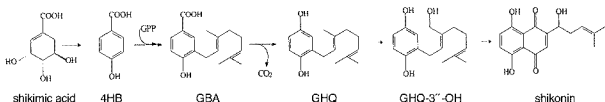


Figure 1. Biosynthetic pathways of shikonin from shikimic acid in higher plants. 4HB, 4-hydroxybenzoic acid; GBA, 3-geranyl-4-hydroxybenzoic acid; GHQ, geranyhydroquinone; GHQ-3'-OH, 3'-hydroxy-geranyhydroquinone; GPP, geranyl-pyrophosphate.

스를 배양하였다.

아울러 1차실험의 결과에서 γ 선 처리에 의한 shikonin 유도체의 함량은 암조건에서 양호하였음이 인정되어, BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 LS배지, BA 2 mg/L와 IAA 0.2 mg/L를 첨가한 LS배지 및 M-9배지에서 암조건으로 60일 동안 장기간 배양한 후, γ 선 조사에 의한 shikonin생산효과를 검토하였다.

Shikonin 유도체의 함량 분석

γ 선을 조사한 후 배양한 지치의 캘러스조직을 채취하여 생체중을 측정하고 다음 Mizukami 등 (1977)의 방법에 따라 소량의 chloroform을 첨가하여 유발로 잘 마쇄한 후 30 mL의 chloroform으로 4°C의 암상태에서 24시간 추출한 다음 여지 (Watman No. 2)로 여과하였다. 추출액은 약 2 g의 MgSO₄를 첨가하여 수분을 제거시킨 후 evaporator를 이용하여 35°C에서 5 mL가 되도록 진공농축시켰다. 채취한 5 mL의 농축액으로부터 50 μ L를 채취하여 약 30분간 건조시킨 다음, 2.5% KOH 1 mL를 첨가하고 약 15분간 강하게 흔들어 용해시킨 후 spectrophotometer (Ultraspec, Pharmacia Biotech)로 622 nm에서 shikonin 유도체의 함량을 측정하였다. 단위는 캘러스 생체중당 함량치로 환산하여 표시하였다.

결과 및 고찰

γ 선 조사 후 BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 LS배지에서 16시간 광조건으로 배양한 캘러스의 성장 및 shikonin 유도체의 생성량을 측정해 본 결과, 배양한 지 3일이 경과하면서 캘러스 생장은 16 Gy 처리구를 제외하고 모든 선량에서 대조구에 비해 약간의 증가효과를 보이기 시작하였다. 또한, 21일이 경과된 후에는 Figure 2A에서와 같이 2 Gy 처리구에서 캘러스생장에 현저하게 높은 증가율을 보였고, 1 Gy 처리구와 16 Gy 처리구에서도 각각 40.6%와 37.3%의 증가율을 보였다. 그러나 캘러스의 성장양상과는 달리 shikonin 유도체의 생성량은 배양 후 3일과 10일에는 16 Gy 처리구에서 양호하였으나 21일이 경과되었을 때는 30 Gy 처리구에서 그 효과가 가장 양호하여 광조건의 LS배지에서 배양할 경우에도 저선량 γ 선의 조사에 의해 shikonin의 합성이 증가될 수 있음을 보여 주었으며, 다음으로는 16 Gy 처리구에서 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 캘러스생장이 가장 양호하였던 2 Gy 처리구를 볼 때 세포의 분열에 의한 성장세와 shikonin 유도체의 합성과는 비례적이지 않음을 확인할 수 있었다.

캘러스를 M-9배지에 치상하여 16시간의 광조건으로 배양한 결과, Figure 3에서와 같이 배양을 시작한 초기의 캘러스 생장은 2 Gy 처리구에서 대조구에 비해 다소 증가를 보였을 뿐, 다른 처리구에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 10일이 경

과되면서 캘러스의 생장은 1 Gy 처리구와 2 Gy 처리구에서 뚜렷한 효과를 보였다. 이러한 현상은 21일이 지난 후에도 비슷하게 나타나 캘러스의 성장양상은 BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 LS배지에서 광조건으로 배양한 캘러스의 성장율과 같이 2 Gy 처리구에서 현저한 효과가 인정되었다. 그러나 이 처리구에서의 실제 증가율은 BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 LS배지에 비해 절반수준으로 배지의 종류에 따라 캘러스의 성장증식에 큰 차이를 보였다. Shikonin의 합성은 캘러스의 성장율과는 다르게 16 Gy 처리구에서 높은 수치를 보여 지치에서의 shikonin의 합성은 암조건에서 양호하다는 결과 (Fujita et al. 1981b)와 같이 광조건의 배양에서 대조구에서는 shikonin 유도체의 생성이 낮았지만 γ 선을 처리함으로써 광조건에서도 shikonin의 합성이 증가될 수 있음을 보여주고 있다.

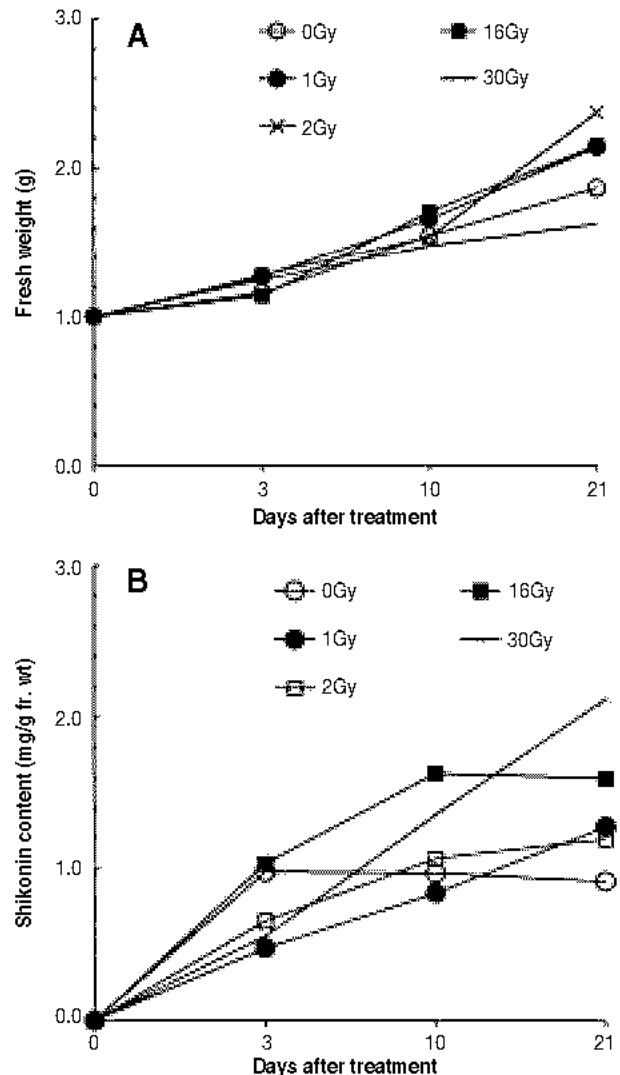


Figure 2. Effect of various γ -radiation doses on the cell growth (A) and the formation of shikonin derivatives (B) in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* grown on LS medium containing BA 2 mg/L and NAA 2 mg/L. The calli were grown for 3 weeks under 16 hours day light after γ -radiation treatment.

암조건에서 M-9배지에서서의 shikoinin 생산효과가 크다 (Fujita et al. 1981b)는 것을 고려하여 BA 2 mg/L과 IAA 0.2 mg/L을 첨가한 LS배지와 비교하여 실험한 결과, 배양을 시작한 초기부터 각 처리구가 비슷한 경향으로 캘러스가 생성하여 배양 후 21일이 경과되었을 때에는 Figure 4에서의 같이 M-9배지에서의 1 Gy 처리구와 16 Gy 처리구에서 대조구에 비해 다소 양호한 증가세를 보였을 뿐 전체적인 성장 증가는 광배양보다 저조함을 보였고, 기대했던 것 같이 대조구에 비해 캘러스의 생성증가율에는 효과가 없었다. Shikoinin 유도체의 생성량은 대조구에 비해 γ 선 조사에 따라 전체적으로 높은 수치를 보였고, 특히 30 Gy 처리구에서는 배양 후 3일이 경과되면서 대조구나 다른 선량구에 비해 shikoinin 유도체의 생성량이 높게 나타나기 시작하였고, 21일이 경과하였을 때에는 1.43 mg의 가장 높은 함량을 나타내어 대조구에 비해 2배

에 가까운 증가치를 보였을 뿐 아니라, 2 Gy 처리구 및 16 Gy 처리구에서도 높은 수치를 보이고 있어 저치의 캘러스배양에서 γ 선 처리에 의한 shikoinin 유도체 합성의 촉진효과가 인정되었다. 그러나 γ 선을 조사한 후 BA 2 mg/L과 IAA 0.2 mg/L을 첨가한 LS배지에 처상한 후 21일간 배양하였을 때에는 어느 선량에서도 캘러스의 생성이나 shikoinin 유도체의 생성에 뚜렷한 효과를 보이지 않아 (Figure 5) γ 선 조사의 효과도 배지 등 배양하는 환경에 따라 많은 차이를 보이는 것으로 나타났다.

저선량 γ 선의 조사에 의해 생체내의 peroxidase나 catalase의 활성이 증가된다는 보고가 있으나 (Lee et al. 2003), 본 실험의 경우에서 나타난 저선량 γ 선의 효과가 shikoinin의 합성 과정에서 어느 부위의 효소를 활성화시킨 결과에 연루된 것인가에 대해서도 관심이 부여된다.

Mizukami (1978), Fujita 등 (1983)에 의해 보고된 바와 같

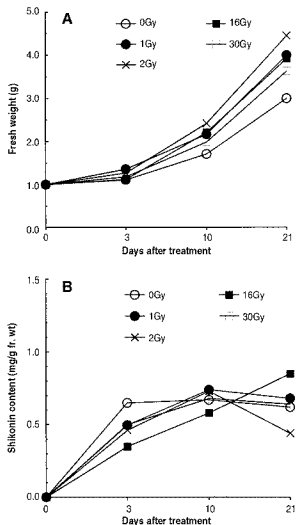


Figure 3. Effect of various γ -radiation doses on the cell growth (A) and the formation of shikoinin derivatives (B) in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* grown on M-9 medium. The calli were grown for 3 weeks under 16 hours day light after γ -radiation treatment.

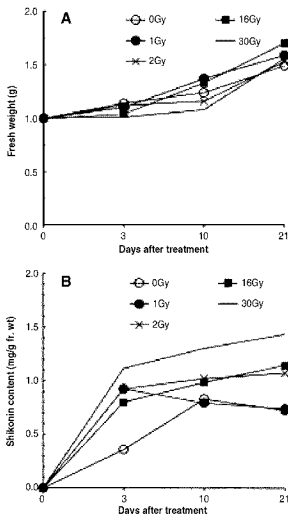


Figure 4. Effect of various γ -radiation doses on the cell growth (A) and the formation of shikoinin derivatives (B) in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* grown on M-9 medium. The calli were grown for 3 weeks in the dark after γ -radiation treatment.

이 식물의 세포배양은 안정된 세포주를 확보할 때까지는 계대배양 동안에 viability가 변할 수 있으며, 세포주가 확보된 후에도 오랜 시간이 경과됨에 따라 2차대사 산물의 생산성이 퇴화될 수 있다는 연구보고와, Lee (1990)에 의해 발표된 바와 같이 암배양한 세포의 생장은 3일째부터 급격히 증가하여 11일째에 최대에 이르렀고 그 이후로는 오히려 생체중에 대해 상대적으로 감소하였다는 보고가 있다. 본 연구의 선행의 결과에서 캘러스의 생체중 증가율에 대한 shikonin 유도체 생산효과는 광배양에서보다 암배양에서 더 효과적이었음을 고려하여 γ 선 조사 후 캘러스를 60일 동안 지속적으로 배양한 결과, Figure 6에서와 같이 캘러스의 성장증가율은 암배양에서의 BA 2 mg/L와 IAA 0.2 mg/L를 첨가한 LS배지에서의 Figure 5에서와 같이 21일간의 배양과는 현저하게 다른 결과를 보여 대조구와 1 Gy 처리구 및 2 Gy 처리구에서 양호한 성장증가율을 보였다. 16 Gy 처리구와 30 Gy 처리구에서 성장증

가율이 오히려 BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 LS배지에 비해서도 저조한 경향을 보였다. BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 LS배지에서는 대조구에 비해 큰 차이는 보이지 않았지만, 16 Gy에서 가장 양호한 증가율을 보였고, 30 Gy에서는 성장증가율이 저조하였다. 반면에 M-9배지에서는 전체적으로 캘러스의 성장에는 대조구에 비해 큰 차이가 인정되지 않았다. 그러나 shikonin 유도체 생산효과에 있어서는 21일간의 배양실험에서 나온 결과와는 다르게 Figure 6과 Figure 7에서와 같이 BA 2 mg/L와 IAA 0.2 mg/L를 첨가한 LS배지에서는 대조구를 비롯하여 1, 2, 16 Gy 처리구에서는 거의 차이가 없었으나, 30 Gy 처리구에서 shikonin 유도체 생성에 효과를 보였고, BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 LS배지에서는 특정 선량간의 차이가 거의 없었다. M-9배지에서는 대조구에 비해 2 Gy 처리구에서는 13.21 mg으로 약

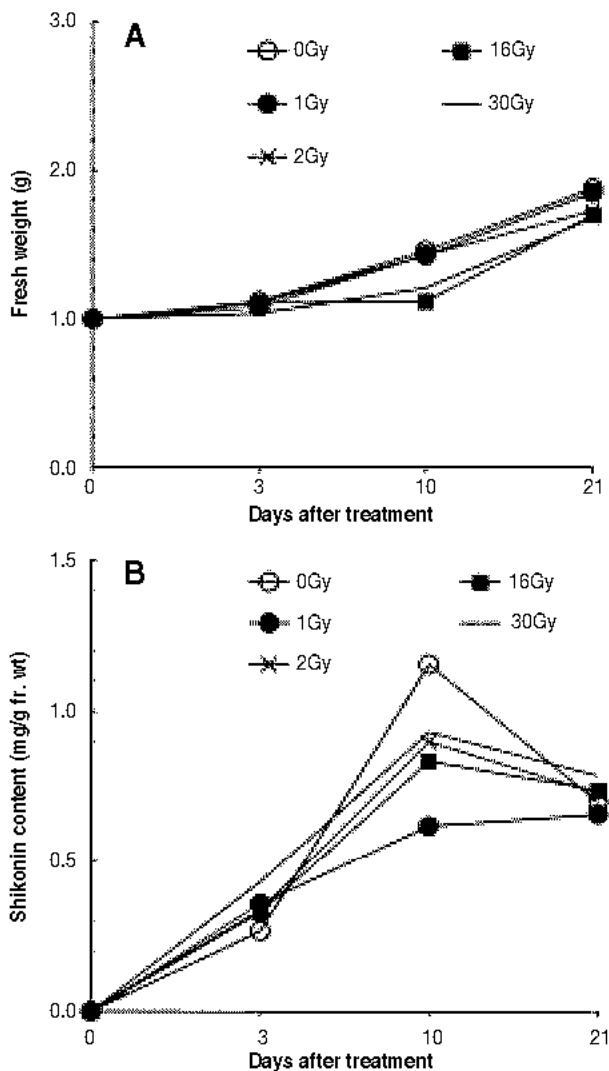


Figure 5. Effect of various γ -radiation doses on the cell growth (A) and the formation of shikonin derivatives (B) in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* grown on LS medium containing BA 2 mg/L and IAA 0.2 mg/L. The calli were grown for 3 weeks in the dark after γ -radiation treatment.

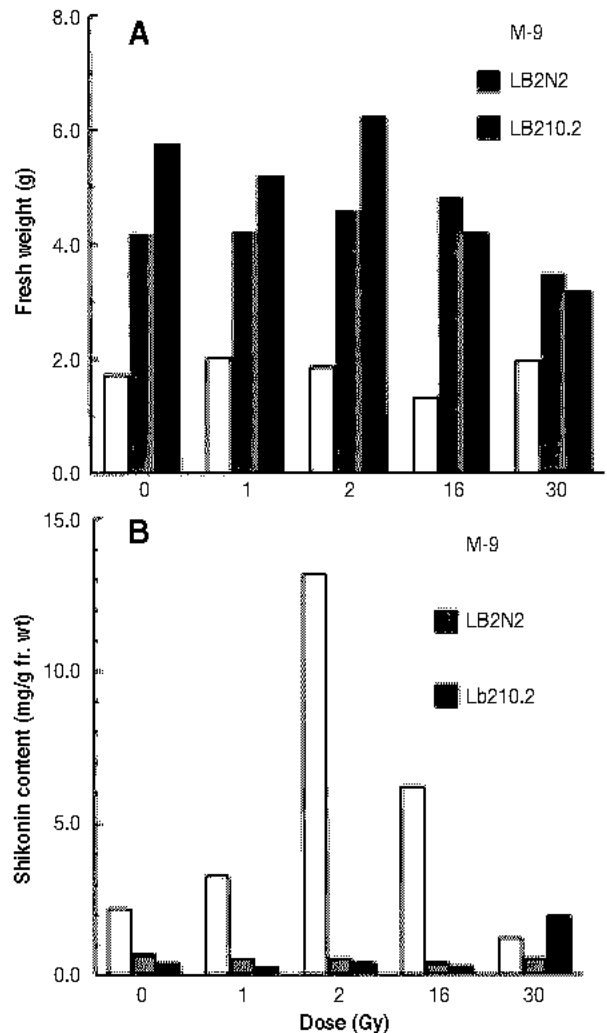


Figure 6. Effect of various γ -radiation doses on the cell growth (A) and the formation of shikonin derivatives (B) in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* grown on three different media. The calli were grown for 60 days in the dark after γ -radiation treatment. LB2N2 and LB2I0.2 mean LS medium containing BA 2mg/L and NAA 2 mg/L, and LS medium containing BA 2 mg/L and IAA 0.2 mg/L, respectively.

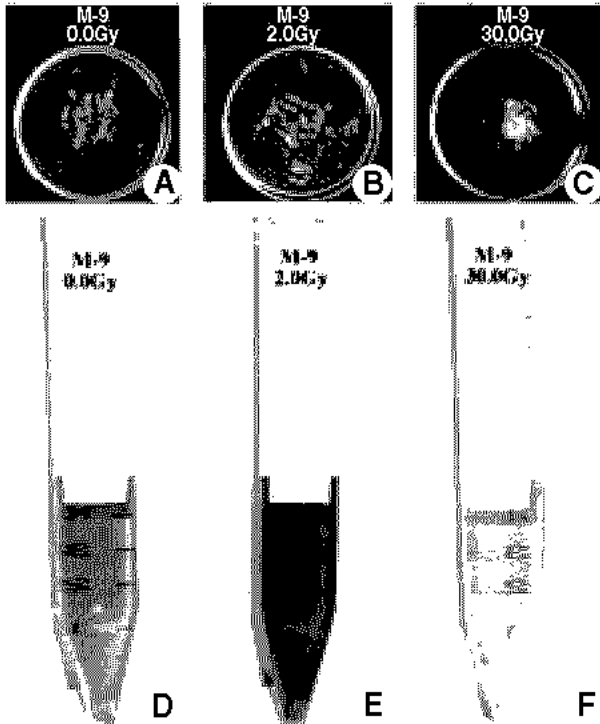


Figure 7. The red pigment of chloroform extract from *Lithospermum erythrorhizon* grown on M-9 medium for 60 days after γ -radiation treatment. A and D, 0 Gy; B and E, 2 Gy; C and F, 30 Gy.

600%이상의 증가율을 보여 이 선량에서 shikonin 유도체의 생산이 매우 효과적임을 알 수 있었다. 그 다음으로는 16 Gy 처리구에서 6.25 mg을 보인 반면 30 Gy 처리구에서는 BA 2 mg/L와 IAA 0.2 mg/L를 첨가한 LS배지에서 배양시와는 다르게 가장 저조한 수치를 보였다.

60일간의 배양에서 얻어진 결과를 볼 때, 암조건에서 특정 선량에 대한 켈러스의 성장증가율의 효과는 BA 2 mg/L와 IAA 0.2 mg/L를 첨가한 LS배지의 대조구와 2 Gy 처리구에서 가장 좋았고, BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 LS배지에서는 16 Gy 처리구에서 다소 양호하였으며, M-9배지에서는 켈러스의 생장이 거의 인정되지 않았다. 반면 shikonin 유도체의 생산의 효과는 BA 2 mg/L와 IAA 0.2 mg/L를 첨가한 LS배지는 30 Gy 처리구에서 다소 좋았으며, BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 LS배지에서는 거의 효과가 인정되지 않았고, M-9배지에서는 2 Gy에서 매우 양호한 효과가 있었음을 확인하였다.

이상의 실험의 결과를 종합해 볼 때, 켈러스 성장 및 shikonin 유도체의 생성량은 오랜 기간이 지나 지속적으로 증가하는 양상도 볼 수 있었지만, 어느 일정 기간이 지나면 오히려 상대적으로 감소하는 경향도 볼 수 있었다. 또한 shikonin 유도체의 생성량은 켈러스 성장과 비례적으로 증가되지는 않았고, 배지상의 Cu^{2+} 나 Ca^{2+} 등 특정 무기이온의 가감으로 shikonin의 합성에 많은 차이를 보일 뿐 아니라 미생물 elicitor나 hexadecane 등의 공급으로 shikonin 유도체의 합성을 몇 배로 증가

시킬 수 있고 (Fu and Lu 1999), 또한 methyl jasmonate를 처리할 경우에는 Cu^{2+} 이온이 필수적이 아닌 것으로 (Yazaki et al. 1997) 미루어 세포내에서의 shikonin 유도체의 합성은 *p*-hydroxybenzoate geranyltransferase와 같은 체내 핵심효소의 기능을 어떻게 활성화시킬 수 있는가에 관심이 있다고 보고 있다 (Yazaki et al. 1997). 특정 저선량 γ 선의 조사도 하나의 hormetin으로서 (Kim and Lee 1998) 켈러스의 생장이나 shikonin 유도체의 생성에 촉진적인 효과를 얻을 수 있음이 확인되었으며, 특히 2 Gy 처리를 조사한 후 M-9배지에서 장기간 암배양할 경우 저선량 γ 선 조사효과가 뚜렷하게 나타난 것이 확인되었다.

적 요

지치의 켈러스에 0, 2, 16, 30 Gy 처리구의 저선량 γ 선을 조사한 후 배지조건을 다르게 배양하면서 shikonin 유도체의 생산효과를 검토하였다. 저선량 γ 선의 효과는 배지의 종류나 배양환경에 따라 차이를 보였다. 16시간의 장일조건에서, BA 2 mg/L 및 NAA 2 mg/L를 첨가한 LS배지에서의 켈러스생장 증가효과는 2 Gy 처리구에서, shikonin 유도체의 함량은 30 Gy 처리구에서 높았다. M-9배지에서는 켈러스의 성장효과는 1 Gy에서, shikonin 유도체의 함량은 2 Gy 처리구에서 매우 양호한 효과를 보였으나 1 Gy 처리구나 30 Gy 처리구에 비해 큰 차이는 보이지 않았다. 24시간의 암조건으로 3주간 배양하였을 경우에 M-9배지에서 BA 2 mg/L와 IAA 0.2 mg/L를 첨가한 LS배지와 같이 켈러스의 성장에는 차이가 인정되지 않았으나 shikonin 유도체의 생산은 2 Gy 처리구에서 현저한 증가를 보였으며, 30 Gy 처리구와 16 Gy 처리구에서도 좋은 결과를 보였다.

켈러스를 60일간 암조건으로 장기배양을 한 결과, 단기간의 배양에서 저조하였던 처리구에서 기간의 경과에 따라 후기에 shikonin의 생성이 증가하는 현상이 보였다. 결과적으로, 지치의 켈러스배양에서 shikonin 유도체의 생성량은 켈러스 생장과 비례적으로 증가되지 않는 것이 확인되었다. 암조건에서 60일간 장기간 배양하였을 때 켈러스의 생장은 BA 2 mg/L와 IAA 0.2 mg/L를 첨가한 LS배지에서 전반적으로 양호하였으며, 저선량 γ 선 조사에 의한 shikonin 유도체의 생산에 있어서는 특히 2 Gy 처리구로 조사한 후 M-9배지에서 암조건으로 배양할 경우 효과가 현저하였고 다음으로 16 Gy 처리구에서도 효과가 양호하였음이 확인되었다.

사사 - 본 연구는 한국원자력연구소 지원에 의한 '방사선을 이용한 shikonin 생산성 향상 기술개발' 과제로 수행되었으며, 그 결과의 일부임.

인용문헌

- Fu XQ, Lu DW (1999) Stimulation of shikonin production by combined fungal elicitation and *in situ* extraction in suspension cultures of *Amebia euchroma*. *Enzyme Microb Tech* 24: 243-246
- Fujita Y, Hara Y, Ogino T (1981a) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep* 1: 59-60
- Fujita Y, Hara Y, Suga C, Morimoto T (1981b) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep* 1: 61-63
- Fujita Y, Maeda Y, Suga C (1983) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. III. Comparison of shikonin derivatives of cultured cells and shikonin. *Plant Cell Rep* 2: 192-193
- Fukui H, Tani M, Tabata M (1992) An unusual metabolite, dihydroechinofuran, released from cultured cells of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* 31: 519-521
- Heide L, Nishioka N, Fukui H, Tabata M (1989) Enzymatic regulation of shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Phytochemistry* 28: 1873-1877
- Hwang HY, Kim JS, Lee YB (2000) Effects of low dose γ -radiation on callus growth of *Lithospermum erythrorhizon*. *Kor J Plant Tiss Cult* 28: 305-310
- Kim JS, Lee YB (1998) Ionizing radiation homesis in crops. *Kor J Environ Agr* 17: 76-83
- Lee EK, Kim JS, Lee YB (1998a) Effects of low dose γ -ray irradiation on the germination and growth in red pepper (*Capcium annuum* L.). *J Kor Soc Hort Sci* 39: 670-675
- Lee EK, Kim JS, Lee YK, Lee YB (1998b) The acceleration of germination in welsh onion seed irradiated with the low dose γ -ray radiation. *Kor J Environ Agr* 17: 215-219
- Lee EK, Kim JS, Baek MH, Kim DH, Lee YB (1999) Effects of low dose γ -ray irradiation on the callus suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Kor J Plant Tiss Cult* P-4-2: 9
- Lee HY, Kim JS, Baek MH, Yoo JC, Kwon ST (2003) Effects of low dose γ radiation on the physiological activities of radish (*Raphanus sativus* L.) during early growth and the reduction of ultra-B stress. *J Kor Soc Hort Sci* 43: 314-320
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18: 100-127
- Mizukami H, Konoshima M, Tabata M (1977) Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. *Phytochemistry* 16: 1183-1186
- Mizukami H, Konoshima M, Tabata M (1978) Variation in pigment production in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. *Phytochemistry* 17: 95-97
- Mizukami H, Tabira Y, Ellis BE (1993) Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* 12: 706-709
- Mülenweg A, Meizer M, Li SM, Heide L (1998) 4-Hydroxybenzoate 3-geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*: Purification of a plant membrane-bound prenyltransferase. *Planta* 205: 407-413
- Tabata M, Mizukami H, Hiraoka N, Konoshima M (1974) Pigment formation in callus culture of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* 13: 927-932
- Yamamoto H, Yazaki K, Inoue K (2000) Simultaneous analysis of shikimate-derived secondary metabolites in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 738: 3-15
- 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 2003년 7월 9일, 수리일자 2003년 9월 5일)