

# Garden Orach 조직배양에서 적색 캘러스의 증식에 미치는 배지, 호르몬 및 PFP의 영향

이주경, 조운상, 박철호, 윤경민

강원대학교 농과대학

## Effects of Media, Hormones, and PFP on the Proliferation of Red Callus in Leaf Tissue Cultures of Garden Orach(*Atriplex hortensis* L.)

Ju Kyoung Lee, Youn Sang Cho, Cheol Ho Park, and Kyoung Min Yoon

College of Agriculture, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea

### Abstract

The effects of medium, hormones, and PFP on the proliferation of red callus in leaf tissue cultures of Garden orach(*Atriplex hortensis* L.) was investigated. As a result, 88% of leaf tissues formed callus on MS medium containing 2mg/ℓ 2,4-D. Fresh weight of callus was higher on MS medium than on B<sub>5</sub> and NN media. It was also found that 2, 4-D was more effective than Dicamba and Picloram. The optimum concentrations of hormones for callus proliferation depended on culture media. Isolated red callus grew markedly both on MS medium supplemented with 1-2mg/ℓ 2, 4-D and B<sub>5</sub> medium containing 2-4mg/ℓ 2,4D. Callus proliferated on B<sub>5</sub> and NN media containing Dicabma 1mg/ℓ as well as on the same media containing 2mg/ℓ Picloram. The addition of PFP concentrations of 2, 5, and 40mg/ℓ respectively to culture medium caused increase of callus fresh weight, especially under light condition.

Key words : PFP, tissue culture, *Atriplex hortensis*.

### 緒 言

서양에서 garden orach 또는 mountain spinach라고 하며 중국에서 山菠菜라고 하는 *Atriplex hortensis*는 시금치처럼 식용이 가능하며 유럽에서(특히 프랑스)는 채소로 재배되기도 하는 1년생 초본식물이다. 줄기가 직립하며 초장이 1-2m까지 자라고 전초가 적자색을 띠어 관엽식물로서 화단에 재식되기도 한다<sup>13)</sup>.

우리나라에 자생하는 명아주과의 *Atriplex*속 식물에는 가는갯능쟁이(*A. gmelini*)와 갯능쟁이(*A. subcordata*) 등 두종이 알려져 있는데<sup>7)</sup> 이들은 모두 녹색의 잎과 줄기를 가지고 있어 *A. hortensis*와는 구별된다. Garden orach의 전초에 함유된 적자

색소 성분은 betalain으로 밝혀져 있다<sup>8)</sup>. 이 Betalain은 중심자목(Centrospermae)에서만 얻어지는 수용성 색소로서 적색에서 자색까지 색상이 다양하다. 이 색소는 합성색소에 비하여 건강에 대한 안전성과 경제적 잇점 때문에 비교적 열처리가 약한 식품과 음료의 천연색소원으로 사용될 수 있다<sup>8,9)</sup>.

이와 같이 색소를 생산하는 염료식물을 대량재배하여 생즙을 색소원으로 이용할 수 있으나 식물의 포장재배에 따른 노력, 비용, 색소생산공정 등 농업여건을 감안할 때 기내에서 식물의 배양조직으로부터 천연색소를 생산하는 것이 보다 효율적일 것으로 사료된다<sup>10,11)</sup>.

일반적으로 식물의 조직배양에 있어서 캘러스의

유도 및 생장에 관여하는 이화학적 요인에는 온도, 습도, 광, 이산화탄소의 농도, 배지조성, pH, 식물생장조절제 등이 있으며 캘러스의 양호한 생장은 이들 제요인의 적정수준에서의 상호작용에 의해서 이루어진다.

따라서 본 연구는 garden orach의 엽육조직배양을 통한 적색소 고생산세포주를 선발하기 위하여 우선 적색소 캘러스의 효율적인 증식에 필요한 배지 및 호르몬의 적정조건을 구명하고 돌연변이 물질인 PFP(para-fluorophenylalanine)의 캘러스 생장에 대한 영향을 검토한 것이다.

### 材料 및 方法

Alberta대학의 Devonian Botanic Garden으로부터 종자를 분양받아 온실에서 pot재배한 garden orach 'Magenta'를 공시하였다. 3엽기의 유엽을 채취하여 70% ethanol에 1분간, 5% sodium hypochlorite용액에 5분간 침지소독하여 살균수로 3회 세척한 후 무균상내에서 잎을 5×5mm 정도의 크기로 잘라 시험판내 고형배지에 치상하였다. MS기본배지에 2, 4-D 2mg/l를 첨가하고 3%의 sucrose를 함유한 MS 기본배지에서 캘러스를 유도하였다. 4주후에 캘러스유기배지에서 유도된 캘러스를 직경 5-6mm의 조각으로 나누어 생체중을 잰 다음 세가지 배지(MS, B<sub>5</sub>, NN)에서 세가지의 옥신(2,4-D, dicamba, picloram)을 농도별(1,2,4mg/l)로 첨가한 배지에 옮겨 1주간 배양한 후 생체중 증가율을 배로 나타냈다. 증식된 캘러스 가운데 적색소를 나타내는 캘러스만을 분리하여 전술한 바와 같은 세가지 호르몬을 세농도 수준으로 첨가한 세가지 배지에 계대배양하여 적색소 캘러스의 성장량을 생체중 증가율(배)로 나타냈다. 한편 캘러스 생장에 대한 PFP의 효과를 알아보기 위하여 명, 암조건에서 2, 4-D 1mg/l를 함유한 MS배지에 PFP를 농도별(0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80mg/l)로 첨가한 배지에 직경 5-6mm의 캘러스 조각을 치상하여 1주후에 생체중 증가율(배)을 조사하였다. 모든 처리는 3반복으로 하여 처리간 평균치를 비교하였다. 명배양은 온도 25°C, 일장 24시간, 광도 1,000Lux의 배양실에서 실시하였다.

### 結果 및 考察

치상한 garden orach의 유엽조직으로부터 5일째에 캘러스가 형성되기 시작하였으며 치상 4주후에 조사한 결과 160개의 절편체 중에서 141개로 부터 캘러스가 형성되어 88%의 캘러스 유기율을 나타냈다. 캘러스는 조직이 연하고 대부분 무색과 적색이 혼재하는 캘러스가 유기되었으며 드물게 담녹색을 띠는 부분도 관찰되었다. 색소에 관계없이 캘러스의 증식을 목적으로 호르몬 처리를 달리 한 세종류의 배지에 계대배양한 결과(그림 1) 배지별로는 MS배지에서 캘러스의 생체중 증가율이 가장 높았으며 그 다음은 B<sub>5</sub>와 NN 배지 순이었다. 호르몬의 종류와 농도에 따른 차이는 처리간에 현저히 나타났다. 호르몬은 2, 4-D가 dicamba와 picloram에 비하여 캘러스 증식에 효과적이었다. 2,4-D 2mg/l를 첨가한 MS 배지에서 213배의 가장 높은 캘러스 증가율을 보였으며 B<sub>5</sub>배지에서는 2,4-D의 농도가 높아질수록 약간씩 캘러스 증가율이 둔화된 반면 NN배지에서는 오히려 2,4-D의 농도가 증가함에 따라 캘러스의 증가율이 향상되었다. Dicamba를 사용한 경우에는 B<sub>5</sub>배지에서 비교적 캘러스 생장이 양호하였으나 농도간에 일정한 경향이 없이 편차가 심하게 나타났다.

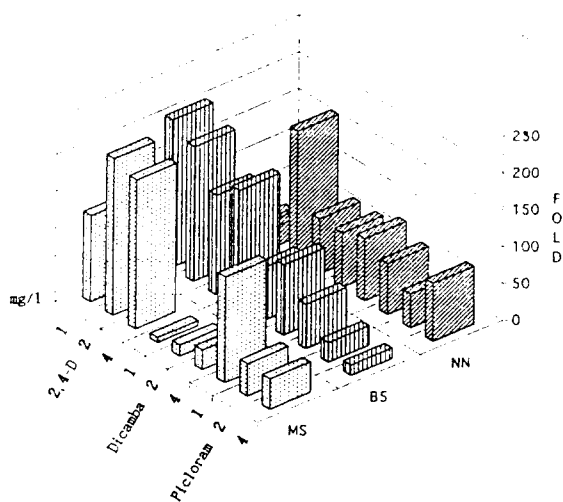


Fig. 1. Effects of media and hormones on proliferation of callus derived from leaf tissues of *Atriplex hortensis* L.

Picloram의 경우에는 MS배지에서 1mg/ℓ의 농도만이 144배의 캘러스 증가를 가져왔고, 나머지 처리에서는 15배에서 79배까지의 대체로 낮은 증가율을 보였다. 이것은 이들 세가지 배지의 조성을 비교할 때 질소원(NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>)의 함량에 차이가 있고 총질소량도 B<sub>5</sub>와 NN배지의 2배 가량되므로 이와 관련이 있을 것으로 추론된다. 호르몬은 일반적으로 식물의 절편체로부터 캘러스를 유기하기 위하여 2, 4-D가 주로 많이 쓰이고 있으나<sup>10,11)</sup> 작물에 따라서는 dicamba와 picloram도 캘러스 유기<sup>1,2)</sup> 및 녹색캘러스의 장기배양<sup>4)</sup> 등에 효과가 있는 것으로 알려졌다.

증식된 캘러스로부터 적색 캘러스만을 분리하여 같은 종류의 여러가지 배지조건에서 캘러스를 배양한 결과(그림 2) 2, 4-D 2mg/ℓ를 첨가한 MS배지(123배)와 B<sub>5</sub>배지(58배)가 캘러스 성장에 가장 효과적이었다. MS배지에서 dicamba와 picloram은 농도에 상관없이 캘러스 증식이 저조하였으며 B<sub>5</sub>와 NN배지에서는 dicamba가 1mg/ℓ 농도에서 캘러스 증식이 양호한 반면 picloram은 2mg/ℓ 농도에서 양호하였다. 캘러스의 성장에 있어서 그림 1에서의 결과와 부분적으로 차이를 보인 것은 질소원의 종류와 양 및 조합비율 등이 캘러스의 성장과 색소생산 양면에 영향을 미치기 때

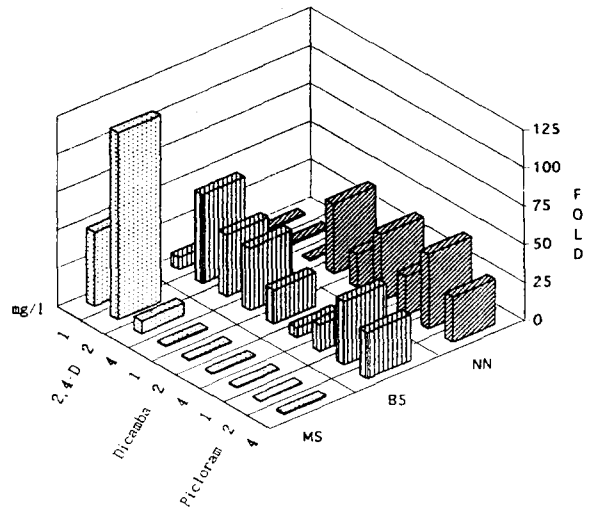


Fig. 2. Effects of media and hormones on proliferation of red callus for a week.

문인 것으로 보여진다<sup>3,9)</sup>. 본 실험에서 처리에 따른 betalain의 정성 및 정량은 시도되지 않았지만, 그림 3에서 보는 바와 같이 배지 및 호르몬 처리에 따라 적자색 캘러스의 빈도가 달랐고 혼합색상 캘러스의 경우에는 캘러스내 적자색 부분의 분포에 가시적인 차이가 있었다. MS와 B<sub>5</sub>배지에 2, 4-D 2mg/ℓ가 첨가된 배지에서 배양한 캘러스가

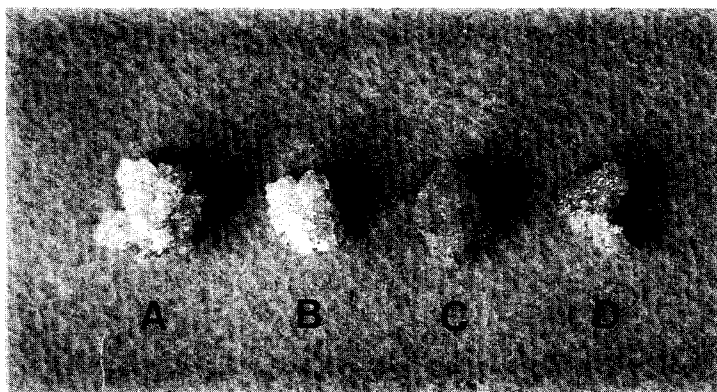


Fig. 3. Pigmented callus cultured on different combinations of medium and hormone.

- A. callus cultured on B<sub>5</sub> medium containing 2, 4-D 2mg/ℓ .
- B. callus cultured on NN medium containing picloram 2mg/ℓ .
- C. callus cultured on MS medium containing 2, 4-D 2mg/ℓ .
- D. callus showing browning and discoloration after 2-month culture without subculture.

운데 전체가 적자색소를 띠거나 혼합색상 캘러스 내에 적자색을 띠는 부분이 비교적 많은 캘러스를 관찰할 수 있었다. 그러나 배지 및 호르몬 처리에 따른 배양세포의 색소함량에 대한 검토가 요구되며 이는 추후의 연구에 기대한다. 한편 본 실험에서 8주 이상 주기적으로 계대배양을 하지 않은 경우에는 어느 처리를 막론하고 세포가 갈변화되면서 색소도 사라지는 것을 볼 수 있었다. 이것은 세포의 성장능과 색소생성과의 관계를 간접적으로 시사하는 것으로 사료된다. PFP는 돌연변이 유발물질로서 여러 작물에서 주로 염색체의 수적 변이를 유기하는데 효과가 있는 것으로 알려져 있으며<sup>6,12)</sup> 신<sup>12)</sup>과 홍과 신<sup>6)</sup>은 저농도(5mg/l)의 PFP는 조직배양에서 염색체의 변이 없이 캘러스의 성장을 촉진하는 일종의 호르몬과 유사한 작용을 하는 것으로 추론하였다.

그림 4에서 보는 바와 같이 명조건에서 2, 5, 20, 40mg/l, 암조건에서 20mg/l 등 일정 농도의 PFP처리가 무처리에 비하여 캘러스 성장을 촉진하였음을 알 수 있다. 그러나 생체중 증가에 농도의 증감에 따른 일정한 경향은 없었으므로 추가적인 면밀한 검토가 요구된다. 그리고 본 실험에서 PFP처리구 및 무처리구에서 광이 캘러스의 성장을 촉진하고 육안으로도 암배양에서 보다는 명배양에서 현저하게 적색 캘러스의 생합성 빈도가 높은 것이 관찰되었다. 이것은 대부분의 중심자목 식물들의 betalain 생합성 과정에 있어서 빛이 필

수적인 요인임<sup>5)</sup>을 뒷받침해 주는 결과이다. 백등<sup>9)</sup>은 red beet의 모상근 배양에서 광조사가 성장율의 감소를 초래하였고, 색소합성에 필요한 요인임을 보고하였으나 본 실험에서는 광이 캘러스의 성장과 색소합성 양면에 효과를 나타냈다.

### 摘 要

Garden orach의 염색조직배양과 PFP의 혼용을 통한 적색소고생산세포주의 선발을 위하여 적색캘러스의 증식에 적합한 배지 및 호르몬의 종류 및 농도, PFP의 영향을 구명하고자 하였다.

1. MS+2mg/l 2,4-D 배지에서 치상 유엽편으로부터 88%의 캘러스 유기율을 나타내었다.

2. 배지별 캘러스 생체중 증가율은 MS배지에서 가장 높았고 그 다음은 B<sub>5</sub>와 NN순이었다. 호르몬은 2, 4-D가 dicamba와 picloram에 비하여 캘러스 증식에 효과적이었다. 최적농도는 배지 및 호르몬 종류에 따라 차이가 있었다.

3. 분리된 적색캘러스는 MS+1, 2mg/l 2, 4-D, B<sub>5</sub>+2, 4mg/l 2, 4-D 처리에서 캘러스 생장이 양호하였으며 dicamba는 세가지 배지 공히 1mg/l에서 양호하였고 picloram은 B<sub>5</sub>와 NN배지에서 모두 2mg/l 처리가 효과적이었다.

4. 캘러스 성장에 대한 PFP의 효과는 명조건에서는 2, 5, 40mg/l의 PFP처리가 무처리에 비하여 캘러스 증식에 효과가 있었으며 암상태에서는

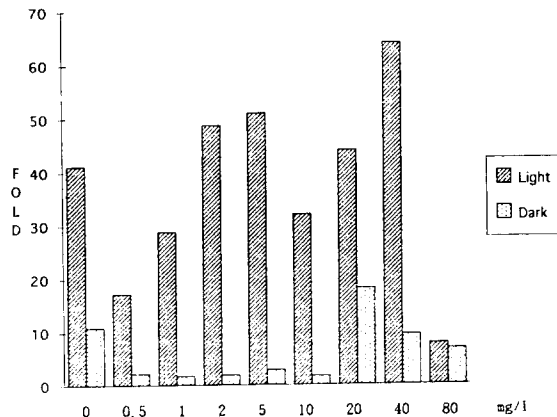


Fig. 4. Effect of PFP on growth of callus under light and dark for a week.

20mg/ℓ 처리구에서만 효과가 인정되었다.

#### 引用文獻

1. Carman J. M., Jefferson N. E. and Campbell W. F. 1987. Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. II. Quantification of genetic addenda and other culture variable effects. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 12:95-110.
2. Conger B. V., Hileki L. L., Lowe K. W., and Carabia J. V. 1982. Influence of different auxins at varying concentrations on callus induction and growth from embryo and leaf tip explants in Graminae. *Enviro. Exp. Bot.* 22:39-48.
3. Do Chi Bao and Cormier Francois 1991. Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a production medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27:169-174.
4. Fitch M. M. and Moore P. U. 1990. Comparison of 2, 4-D and picloram for selection of long term totipotent green callus cultures of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* 20: 157-163.
5. Girod P. A., Zryd J. P. 1987. Clonal variability and light induction of betalain synthesis in red beet cell cultures. *Plant Cell Reports* 6:27-30.
6. 홍순관, 신영범. 1993. PFP(Para-fluorophenylalanine) 처리에 의한 담배(*Nicotiana tabacum* L.) 배양조직의 유전적 변이, 강원대 농업과학연구소 논문집 4:145-152.
7. 이창복. 1983. 대한식물도감, PP.316-317, 향문사.
8. 林孝三, 1980. 식물색소-實驗, 研究 手引. PP. 367-372 養賢堂.
9. 백윤웅, 안준철, 정병균, 김수용, 황백. 1993. Red beet (*Beta vulgaris* L.)의 모상근 배양에 의한 betalain 생산. *식물조직배양학회지* 20(3):159-165.
10. 선정훈, 정재동. 1994. 꽃기린(*Euphorbia splendens* Bojar) 배양세포로부터 화청소의 대량생산 및 동정. *식물조직배양학회지* 21(2):77-84.
11. 소은희, 채영암. 1993. 쪽의 청색색소 생산을 위한 캘러스 유기와 배양. *한육지* 25(2):133-138.
12. 신영범. 1991. Para-fluorophenylalanine(PFP) 처리에 의한 작물의 염색체 변이, I. 배지, PFP 및 호르몬이 메밀 및 담배 callus 유기 및 생장에 미치는 영향. *한육지* 23(2):145-152.
13. 堀田 滿. 1989. 世界有用植物事典 PP.130 平凡社.

(접수일 : 1994.11.19)