

2004 춘계학술 발표회 논문집
한국 원자력 학회

담배 줄기 조직배양에 있어서 방사선이 캘러스 형성과 기관분화에 미치는 영향

Effect of Gamma-Radiation on Callus Initiation and Organogenesis in the Tissue Culture of *Nicotiana tabacum* L.

신선희, 김진규, 송희섭
한국원자력 연구소,
대전시 유성구 덕진동 150번지

요약

이온화 방사선은 식물의 종자의 발아, 식물의 성장, 꽃 피는 시기, 수확량에 대해서 증가한다는 보고가 있으며, 분화가 진행되는 조직에서 민감하다고 보고 되었다. 이 실험은 담배의 조직에서 callus와 기관 분화가 일어나는 과정 중에서 나타나는 방사선의 효과를 보고자 하였다. 그 결과 callus의 형성에 있어서 2,4-D의 경우 1 Gy에서 callus 성장이 가장 좋았으며, 2,4-D 와 kinetin을 혼합 처리한 경우는 5 Gy에서 생성이 가장 좋았다. 또한 kinetin에 의한 기관분화는 5 Gy에서 가장 좋았으며, 방사선을 조사한 조직에서의 기관 분화된 것은 대조구에 비해 색이 조금 더 진해지고 엽병이 길어지는 것이 관찰되었다.

Abstract

It is generally agreed that ionizing radiations stimulate cell division, growth and development in various organisms including animals and plants. Differentiating tissues are the most sensitive to radiation. The present experiment was carried out to investigate the effects of ionizing radiation on callus initiation and organogenesis from the stem in the culture of *Nicotiana tabacum* L. cv. When the stem segments were cultured on a Murashige and Skoog (MS) medium with 2 mg/L kinetin, with 1 mg/L 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), with 2 mg/L kinetin and 1 mg/L 2,4-D, the shoots and callus were differentiated 14 days after cultivation. Callus was

especially formed on the MS medium with 2,4-D and/or kinetin and the formation was promoted by 1 Gy and 5 Gy of gamma radiation. The formation of the shoot clusters on the MS medium with 2 mg/L kinetin were prominent in the 5 Gy-irradiated groups. It is concluded that that gamma radiation enhanced the callus initiation and organogenesis in the tissue culture of *Nicotiana tabacum* L.

1. 서론

방사선이 생물체에 미치는 영향은 예전부터 많은 연구자들에 의해 연구되어 오고 있는데 각종의 방사선이 생물체의 조직을 투과하였을 때 일어나는 작용성은 방사선의 여기에너지가 생물체에 여러 가지 화학적 변화를 일으킨다고 한다. 그것은 생물체를 구성하고 있는 물질적인 요인 및 물질대사의 분자, 기, 원자 등에 불활성화를 유발하여 생물체의 활성작용에 큰 영향을 끼치는 것이라도 하였다. 고 선량의 방사선은 세포의 원형물질 유동과 막 투과성을 변화시키고, 돌연변이를 유발하는 등 생명체에 유해한 작용을 한다. 방사선의 이런 성질을 의학과 농업 부분에서 널리 이용되어 왔다. 특히, 식품의 멸균, 살충, 육종 등에 고선량의 방사선이 이용되었다¹⁾.

저수준의 이온화 방사선은 일상생활 중 음식물, 대지, 물, 집, 의류 및 신체에서 일정 수준의 방사선을 계속 방출하고 있으며, 지경과 생활문화에 따라 다소 차이는 있으나 연평균 약 5 mSv의 자연 방사능의 피폭이 있다. 이러한 점으로 미루어보아 저수준의 이온화 방사선은 생명에 따라 필요 불가결한 것이라 말할 수 있다¹⁾. 저선량의 이온화 방사선이 종자에서 성장과 발달의 촉진에 관계가 있다는 실험은 Roentgen에 의해 1895년에 X-선이 발견된 후 몇 년 뒤에 수행 되어졌다²⁾. 종자의 발아, 식물의 성장, 꽃 피는 시기, 식물의 크기와 수확량을 증가 시킨다는 실험은 Breslavets(1946)의 재확인 되었다³⁾. 보통 낮은 수준의 감마선은 동물과 식물이 포함된 여러 가지 생물체에서 세포의 분열과, 성장, 그리고 발달을 촉진 시킨다⁴⁾. 그러나 이러한 식물의 성장과 발달에 대한 방사선 영향은 아직까지 확실히 알려지지 않았으며, 유용한 자료에 대한 논쟁이 계속 되고 있다. 참고로 방사선의 식물 등에서의 성장의 촉진효과는 대조구에 비해 대략 10% 증가 하는 것으로 보고 되었고, 조사된 종자에 의한 곡식의 수확량이 증가한다는 결정적이 증가는 아직 제시 되지 않았다⁵⁾. 최근에는 anomalies의 유도가 발달 단계에 관련 즉, 분화되는 조직에서 가장 민감하다는 새로운 연구결과가 나왔다. 예를 들면 완두콩의 종자의 생장은 감마선을 15-100 Gy로 피복 된 후 저해되었으며⁶⁾, Croci et al.(1991)에는 감마선을 10Gy를 조사한 post dormant garlic cloves에서 현저하게 sprout 생장이 저해되었다고 보고하였다⁷⁾.

식물조직배양에서 주로 사용되어지는 성장조절물질에는 크게 auxin과 cytokinin으로 나눌 수 있는데, auxin은 세포 신장에 관여하여 부정 근, 정아, 배 발생을 촉진시키고

cytokinin은 세포분열에 관여하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 보통 auxin과 cytokinin의 혼합 조성비에 의해 세포분열과 신장이 이루어지고 기관분화가 촉진되는데, auxin의 비율이 높을 때 부정근이 형성 된다⁹⁾.

따라서 본 실험에서는 이러한 이온화 방사선에 대한 식물의 callus의 형성과 기관분화에 미치는 영향을 이해하기 위해 담배를 이용하여 호르몬의 단독, 혼합 처리에 의한 식물체의 callus의 형성과 기관분화에 방사선의 영향에 대해서 실험하였다.

2. 재료 및 방법

식물재료

본 실험의 식물재료는 담배(*Nicotiana tabacum* L. cv.)의 종자를 5% sodium hypochlorite 용액에서 5분간 표면 살균 후, 멸균수로 3회 세척하고 MS 배지에 치상하여 성장조절 상에 옮겨서 발아 시켰다. 성장조절 상 내의 환경조건은 16시간 명 처리와 8시간의 암 처리로 조절된 광주기하에서 온도는 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도는 50-80%로 유지되도록 조절하였다. 발아된 담배는 멸균된 상태에서 담배를 3주간 성장시켜 실험에 사용하였다.

방사선 조사

성장조절 상에서 3주간 멸균된 상태로 배양된 담배의 줄기 마디에 포함된 잎을 엽병만 1-2mm 남기고 제거를 하였으며, 0.5cm로 줄기를 절취하였다. 절취된 절편을 호르몬이 첨가된 배지가 들어있는 petri dish에 넣어 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 12시간, 명 처리와 12시간 암 처리 상태에서 하루 간 배양 후 방사선을 조사하였다. 방사선 조사는 한국원자력연구소의 저준위 조사시설 ^{60}Co 선원장도 약 150 TBq, Panoramic Irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd.)을 이용하여 실험 군 별로 각각 0, 1, 5, 10, 20, 30 Gy 선량을 조사하였다.

담배 캘러스의 형성 및 기관 분화 유도

방사선이 조사 후 각 실험 군 별로 성장조절 상에 옮겨 캘러스 형성 및 기관분화를 유도하였다. 캘러스 형성 및 기관분화를 위한 배지의 조성은 MS (Murashige and Skoog 1962)¹⁰⁾ 기본배지에 3% sucrose, 1%의 plant agar를 첨가하여 사용하였다. 식물 호르몬은 1.0mg/L의 2,4-D(auxin류)과 2.0mg/L의 kinetin(cytokinin류)을 사용하였고, 2,4-D와 kinetin을 복합 처리하여 pH 5.8로 조절하고 121°C 에서 20분간 고압 멸균하였다. 성장조절 상 내의 환경조건은 12시간 명 처리와 12시간의 암 처리로 조절된 광주기하에서 온도는 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도는 50-80%로 유지되도록 조절하였다.

3. 결과 및 고찰

캘러스의 형성

담배의 절편의 캘러스의 형성은 cytokine을 첨가하지 않고 auxin만을 첨가한 배지에서와 auxin과 cytokinin을 혼합하여 첨가한 각 배지에서 배양한 결과 조금씩 다른 결과를 나타내었다.

2,4-D에 의한 callus 형성

2,4-D만 첨가된 배지에서는 배양 14일 전부터 캘러스가 형성되는데 형태적으로 보면 2,4-D와 kinetin을 혼합 처리한 캘러스와는 다른 형태를 나타낸다. 즉 혼합 처리한 캘러스의 경우 녹색을 띄면서 세포들이 보이지 않으나 2,4-D만 있는 배지에서의 캘러스의 경우는 부정근이 발아하는 모양처럼 생긴 캘러스를 형성하며, 흰색을 나타낸다(Fig.1, Fig.2). 이는 담배의 조직에서 다른 호르몬의 첨가 없이 옥신을 단독 첨가 시에는 배양한 조직이 세포분열이 일어나지 않고 세포만 현저히 커지는 현상이 나타난다는 결과 때문으로 보인다¹¹⁾. 방사선 선량에 따른 차이는 캘러스의 형성은 방사선 1 Gy가 가장 좋으며, 20, 30 Gy에서는 캘러스가 거의 나오지 않았고 조직이 갈변이 많이 되었는데 갈변의 정도는 30 Gy에서 가장 심하였다(Table 1). 또한 3주 정도가 지남에 따라서 몇몇 조직에서 작은 shooting이 일어나는데 shooting 된 잎은 0.0 Gy에서는 정상적인 잎 모양을 나타낸 반면 방사선을 쬐인 잎 모양은 엽병이 많이 길어진 것을 관찰할 수 있었다(data 미제시). 그런 시간이 지나도 그 잎은 성장하지 않은 것이 관찰되었으며, 이것은 2,4-D에 의한 영향으로 2,4-D는 기관분화를 거의 하지 않고 단순히 캘러스 형성만을 촉진 시킨다^{12,13)}는 결과와도 일치하는 것이다.

Table 1. Effect of gamma ray on the formation of callus the stem segments of *Nicotiana tabaccum* L. cv.

	0.0 Gy	1.0 Gy	5.0 Gy	10 Gy	20 Gy	30 Gy
Callus formation	++	++++	+++	+++	+	+
Browning rate	-	+	+	+	++	+++

++++, excellent; +++ , good; ++ moderate; +, rare; - none

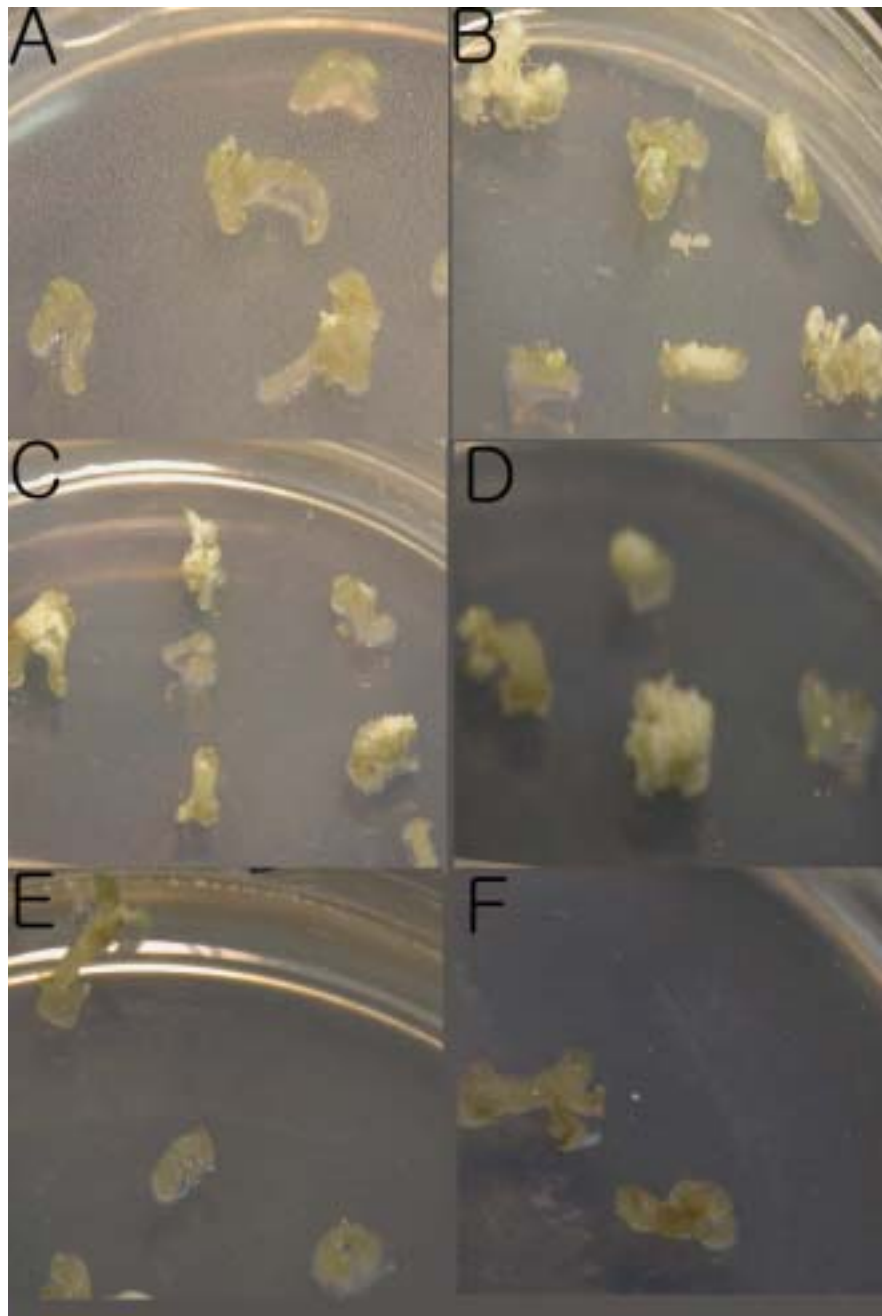


Figure. 1. Photographs of the formed callus on MS medium added with 1mg/L 2,4-D from the stem segments of *Nicotiana tabaccum* L. cv. A, control group, B~F, irradiated groups (B; 1, C; 5, D; 10, E; 20 and F; 30 Gy , respectively)

2,4-D+Kinetin에 의한 callus 형성

한편 auxin(2,4-D 1mg/L)에 cytokinin(kinetin 2mg/L)을 혼합배지에서는 호르몬을 각각 처리한 것에 비해서 개체가 통통해 지면서 2주가 지나면서 캘러스가 형성되기 시작하였다. 캘러스의 형태는 약간 노란색과 푸른색을 띤다. 캘러스의 형성 정도는 다른 호르몬의 방사선 처리와 마찬가지로 1, 5Gy에서 가장 좋은 캘러스의 형성을 나타냈다(Table 2) 이는 2,4-D를 단독 처리하였을 때 캘러스의 형성이 1 Gy에서 가장 좋았던 것과 Kinetin을 처리하였을 시에는 5 Gy에서 가장 좋았던 결과가 합쳐져서 이런 결과를 얻은 것 같다. Shooting나 rooting 같은 기관의 분화는 확실히 눈에 보이는 것으로 나타나지는 않았다. 또한 다른 호르몬 처리와 다른 것은 호르몬을 처리하지 않은 것과 각기 단독으로 처리한 것의 경우 방사선량이 20 Gy, 와 30 Gy이는 비슷한 기관 분화나 캘러스의 형성 정도를 나타냈으나 호르몬을 혼합 처리한 것의 경우 30 Gy에서는 거의 캘러스가 형성되지 않고 있으나 20 Gy의 경우에는 방사선을 처리하지 않은 것보다 캘러스의 성장이 좋을 것을 볼 수 있다 (Fig. 2). 이것은 방사선에 대한 식물의 저항력이 호르몬을 단독으로 처리하였을 때보다는 혼합으로 처리하였을 때 저항성이 증가한다고 생각이 되어진다.

Table 4. Effect of gamma ray on the formation of callus from the stem segments of *Nicotiana tabaccum* L. cv.

	0.0 Gy	1.0 Gy	5.0 Gy	10 Gy	20 Gy	30 Gy
Callus formation	++	++++	++++	+++	+++	+

++++, excellent; +++, good; ++ moderate; +, rare; - none

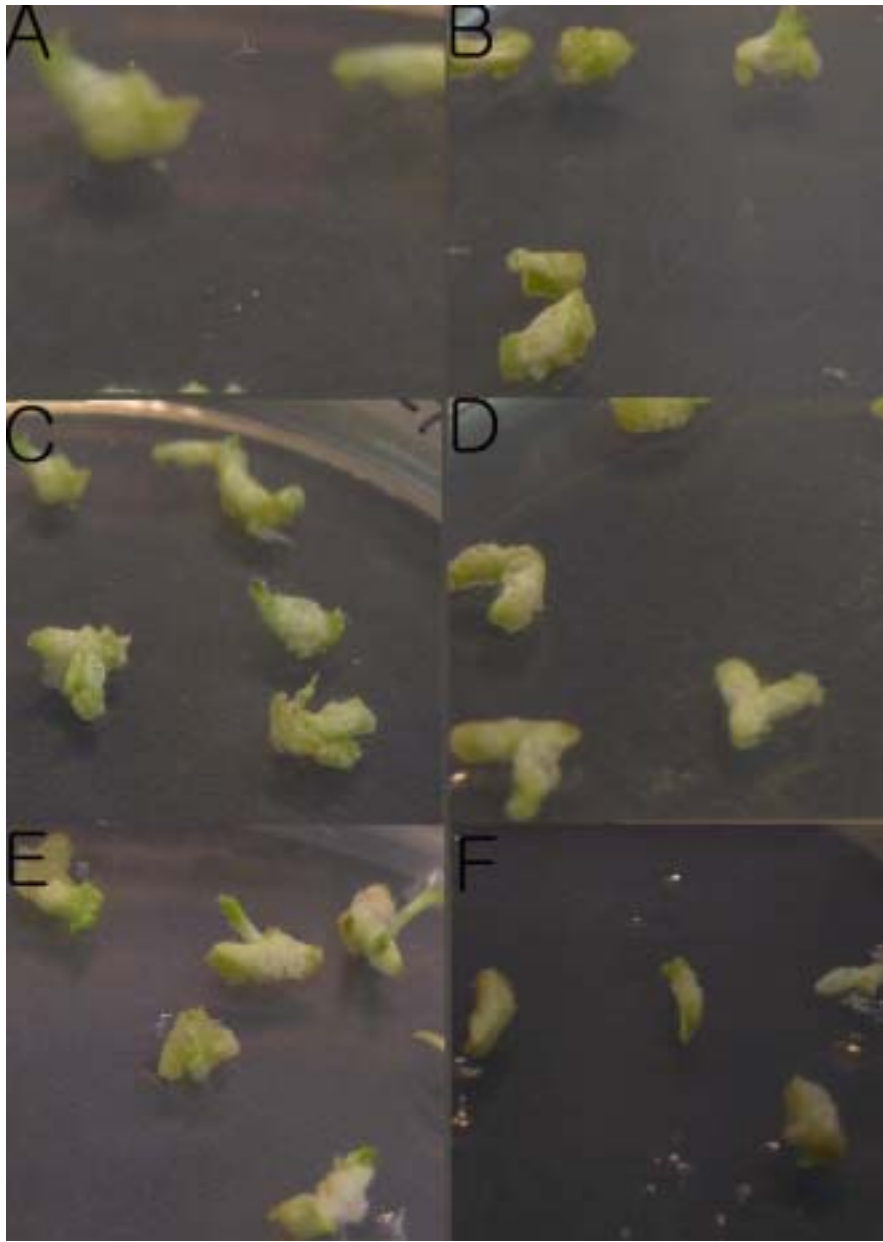


Figure. 2. Photographs of the formed callus on MS medium added with 2mg/L kinetin, 1mg/L 2,4-D from the stem segments of *Nicotiana tabaccum* L. cv. A, control group, B~F, irradiated groups (B; 1, C; 5, D; 10, E; 20 and F; 30 Gy , respectively)

기관지 분화

Auxin을 첨가하지 않고 Cytokine류 인 kinetin 만을 2.0 mg/L 첨가한 배지에서는 캘러스 형성이 미약하게 나타났을 뿐만 아니라 root의 발달 없이 수많은 shooting을 되는 것을 관찰할 수 있었다. 방사선량에 따른 shooting rate는 5 Gy 조사하였을 때 0.0보다 shooting이 되는 개체의 수가 증가한 것을 알 수 있었다(Table 3). 20, 30 Gy에서 역시 다른 처리를 한 것과 마찬가지로 다른 방사선량에 비해서 조직에서 shooting 되는 것이 1주일 이상 늦고 캘러스의 상태도 좋은 것이 아니면 갈변 역시 나타난다. 또한 shooting 된 잎을 살펴보면 MS 배지의 분화된 잎보다 잎의 색은 짙고, 작은 것을 볼 수 있다.(Fig. 3) 이러한 형태는 방사선의 양이 증가할수록 나타나며 또한 잎의 가장자리가 주름지고 엽병이 길어지는 특징을 보였다. 이러한 특징은 방사선 조사량이 많을수록 심해지는 것을 알 수 있었는데 방사선이 잎의 분열조직에 영향을 주어서 잎 모양이 주름지고 엽병이 길어지는 것으로 추측이 되며, 이런 결과에 대한 잎을 고정을 통한 잎의 조직의 관찰이라 같은 자세한 실험이 있어야 할 것으로 생각된다.

Table 3. Effect of gamma ray on the organogenesis from the stem segments of *Nicotiana tabaccum* L. cv.

	0.0 Gy	1.0 Gy	5.0 Gy	10 Gy	20 Gy	30 Gy
Shooting rate	+++	++++	++++	+++	++	+

++++, excellent; +++, good; ++ moderate; +, rare; - none

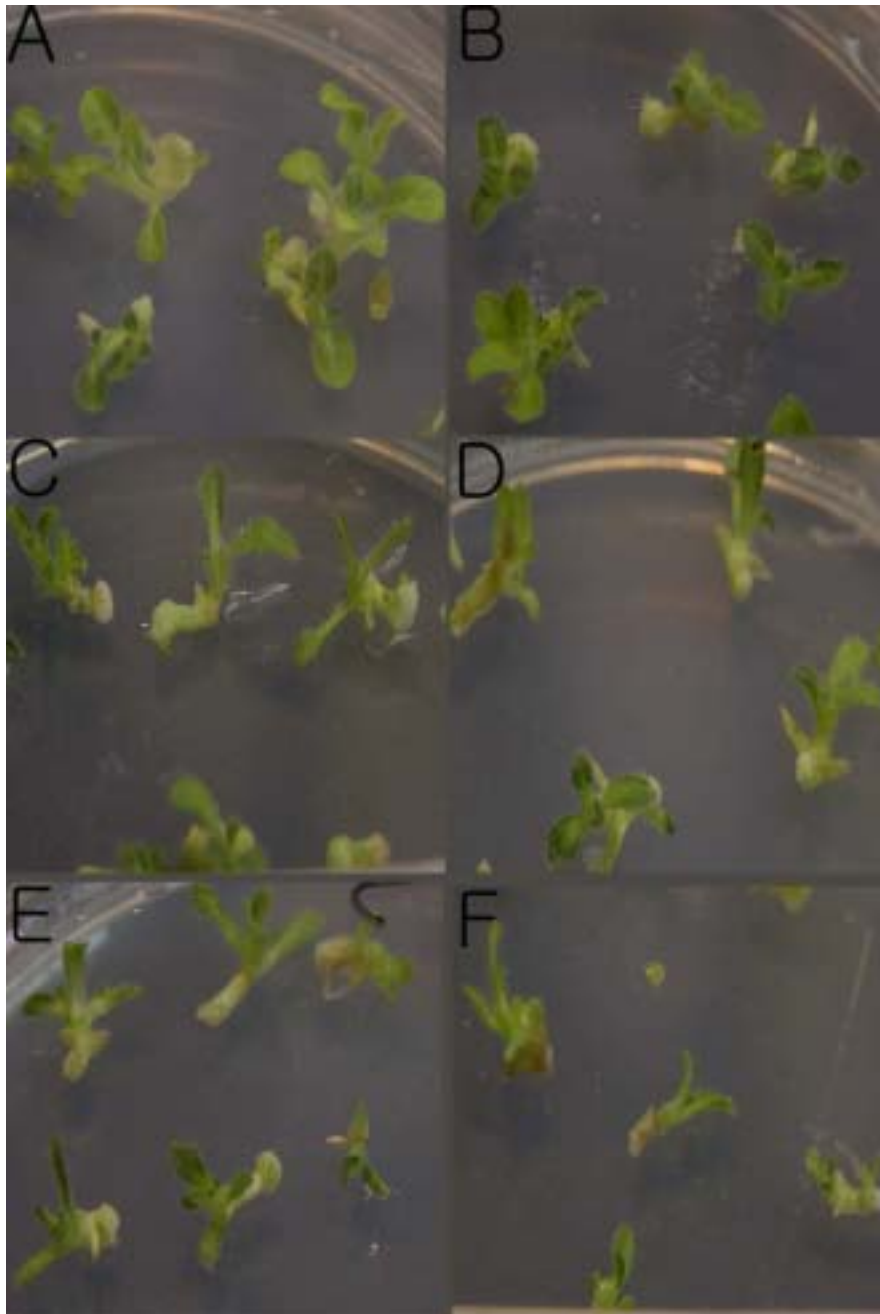


Figure. 3. Photographs of the formed callus on MS medium added with 2mg/L kinetin from the stem segments of *Nicotiana tabaccum* L. cv. A, control group, B~F, irradiated groups (B; 1, C; 5, D; 10, E; 20 and F; 30 Gy , respectively)

4. 참고 문헌

1. 한국 원자력 연구소, 방사선이용 생물활성 증진효과 연구, (1995)
2. R. Zaka, C. Chnal, M. T. Misset, Effect of low doses of short-term gamma irradiation on growth and development through two generation of *Pisum sativum*, *Science of the Total Environment* 320, 121-129 (2004)
3. L. B. Breslavets, *Plants and X-rays*, Moscow: Acad Sci USSR Press, (1946).(Translation Americans Institute of Biological Sciences, 1960)
4. T. D. Luckey, *Hormesis with ionizing radiation*, Boca Raton Florida: CRC Press, (1980)
5. M. W. Miller, Radiation hormesis in plants, *Health Phys*, 52, 607-616(1987)
6. G. Bagi, P. Bornemisza-Pausperhi, E. Hidvigi, Inverse correlation between growth and degrading enzyme activity of seedlings after gamma and neutrom irradiation of pea seeds. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 53, 507-519 (1988)
7. C. Croci, J. Arguello, N. Curvetto, G. Orioli, Changes in peroxidases associated with radiation-induced sprout inhibition in garlic(*Allium sativum* L.) *Int J Radiat Biol*, 59, 551-557 (1991)
8. M. W. Miller, and W. M. Miller, Radiation hormesis in plants, *Health Physics* 52(5), 607-616 (1987).
9. K. K. Ussuf, and P. M. Nair, Effect of gamma irradiation on indole acetic acid synthesizing system in potatoes, *Phytochemistry*. 10(5), 929-937 (1971).
10. T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant* 15, 473-497(1962)
11. Cromo OJ, Peter JE, Sharp WR, Interactions phytohormones on the control of growth and root morphogenesis in cultured *Phaseolus vulgaris* leaf explants. *Turrialba* 26, 232-236 (1976)
12. Peters JE, Crocomo OJ, Sharp WR, Effects of caffeine and nicotine on the callus growth and root morphogenesis of tissue cultures. *Turrilba* 86, 337-341 (1976)
13. Cho DY, Soh WY, Adventitious root formation from the hypocotly of *Phaseolus vulgaris* *Kor J Plant Tiss* 8, 23-26 (1981)