

# 대두 기내 배양체의 분화에 대한 생화학적 성분의 변화와 특성 : (I) 대두 기내 배양체의 분화에 대한 단백질, 아미노산 및 peroxidase 동위효소의 변화와 특성

남상해 · 최상욱 · 양민석  
경상대학교 농과대학 농화학과

**초록 :** 대두의 조직배양에서 배양기간중 생화학적 대사산물의 변화와 특성을 조사하기 위하여 개화후 15일된 미숙자엽을 채취하여 기내에서 3주간 배양하였다. 이때의 배양체를 embryogenic callus(EC)와 non-embryogenic callus(NEC)로 구분하였다. EC의 일부는 다시 3주간 계대배양하여 root forming cultures(RFC)와 shoot forming cultures(SFC)로 구분하였으며, EC의 또 다른 일부는 원형질체의 분리에 사용되었으며, 분리된 원형질체는 4주간 배양하였다. 이때 유기된 배양체를 protoplasts로부터 유기된 embryogenic callus(PEC)와 non-embryogenic callus(PNEC)로 구분하였다. 각각의 배양체에 대하여 단백질 및 그 아미노산조성을 조사한 결과, 아미노산의 조성은 NEC와 PNEC에서 보다 EC와 PEC에서 methionine의 함량이 현저히 낮은 반면, phenylalanine의 함량이 높았다. 단백질의 양상은 EC에서는 18KD, NEC에서는 22KD 정도에서 차이가 났다. 또한 각각의 배양체에 대한 peroxidase 동위효소의 활성을 조사한 결과, EC와 PEC에서는 peroxidase isozyme A(piA)의 활성이 높게 나타났으며, RFC와 SFC에서는 peroxidase isozyme B(piB)의 활성이 높았다.

식물의 조직이나 세포, 원형질체 등을 기내 배양할 경우, callus나 측이나, 뿌리 등에서 직접 새로운 기관을 형성하여 식물체 재분화가 이루어지는 경우도 종종 있으나 가장 바람직한 방향은 식물세포배양체나 원형질체로부터 somatic embryogenesis를 거쳐서 완전한 식물체로 분화되는 것이라고 할 수 있다. 그리고 이와같은 분화과정이再现성이 있을 때 미생물에서와 같이 세포수준에서의 형질전환연구를 식물세포에서도 적용할 수 있을 것이다. 최근 식물세포내에 새로운 유전자를 도입하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있으나 새로운 형질을 가진 잡종 식물체를 만드는 데는 어려움이 많다. 즉 식물의 종류나 조직부위에 따른 원형질체의 분리에 관한

문제<sup>1~5)</sup>와 외래 유전자를 직접 주입하기 위한 micro-manipulation 기술과 효율의 한계 뿐만 아니라,<sup>6,7)</sup> 식물세포에 쉽게 전이 될 수 있는 유용한 vector의 개발에 관한 문제<sup>8~13)</sup> 등을 들 수 있겠다. 이러한 문제점에 관한 것은 일단 보류하더라도 식물체로부터 나출된 원형질체의 배양이 성공적으로 수행되어 완전한 식물체로 쉽게 분화되어야 하는 것이 우선된 과제라고 할 수 있겠다. 식물을 조직배양하여 재분화 식물체를 만드는 데는 식물의 종류에 따른 유전인자, 환경조건 및 영양배지 등의 여러가지 요인이 복합적으로 작용할 것이므로 실로 어려운 일이지만 이러한 문제를 배양체에서 직접 생화학적 대사물질을 조사하여 해결하고자 하는 연구는 Stirm과 Jacobson<sup>14)</sup>

---

Key words: Callus, embryogenic & non-embryogenic, peroxidase isozyme, protoplasts, regeneration  
Corresponding author : S. H. Nam

이 완두콩의 callus로부터 체세포배 발생을 통한 재분화에 관여하는 marker protein의 양상을 조사한 것 외에는 흔하지 않다. 그러나 sterol<sup>15)</sup>, 영양물질<sup>16)</sup> 및 기타 생장조절물질<sup>17-19)</sup> 등을 배지에 첨가하여 그 생육상태를 조사한 것과 기내 배양체가 아닌 식물체에서 생화학적 대사물질을 조사한 것은 종종 볼 수 있다. 이러한 연구들을 토대로 하여 본 연구는 대두 조직의 기내 배양중 재분화에 관여하는 단백질, 아미노산 및 peroxidase 동위효소 등의 변화를 알아봄으로써 식물세포의 분화능을 높여 줄 수 있는 방법과 재현성있는 재분화체계를 확립하는데 기여하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 대두[Glycine max. (L.) Merr.]는 「금전조생」을 온실에 파종하여 개화후 15일된 미숙종자를 채취하여 사용하였다.

### 조직배양 및 분석용 시료의 준비

채취된 미숙종자를 70% (v/v) ethanol에 1분, 3% (v/v) sodium hypochlorite에 3분간 침적하여 표면 살균하였으며, 멸균증류수로 3~4회 표면에 묻은 약품을 세척하였다. 살균된 미숙종자를 절개하여 배부분을 제거한 자엽부위만을  $2 \times 2\text{mm}^2$  정도의 크기로 잘라 Table 1에 표시된 배지(CFM1-CFM3)에 치상하여 하루중 16시간의 조명과  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도가 자동으로 조절되는 항온실에서 배양하였다. 3주후의 배양체를 embryogenic callus(EC)와 non-embryogenic callus(NEC)로 구분하였으며, 이중에서 EC의 일부를 분화배지(CRM1-CRM3)에 계대배양하여 3주후에 배양체에는 다수의 기관이 분화되어 이 배양체를 root forming cultures(RFC)와 shoot forming cultures(SFC)로 구분하였으며, 다른 일부는 0.1% cellulase R10(Onozuka, Japan)와 1% Macerozyme R10(Yakult, Japan)을 함유한 CPW7M buffer로서 원형질체를 분리하여 생장 조절제의 농도를 달리한 배지(PCM1-PCM3)에서 배양하였다. 다시 4주가 경과한 후, 배양체는 EC와 NEC로 구분이 가능하였는데 이때의 배양체를 embryogenic and

non-embryogenic callus derived from protoplasts (PEC & PNEC)라고 하였다. 분석용 시료는 배지와 분리한 즉시  $-70^\circ\text{C}$ 에서 동결건조하여 분석에 사용할때까지  $-20^\circ\text{C}$ 의 냉동고에 보관하였다.

SOYBEAN IMMATURE COTYLEDON

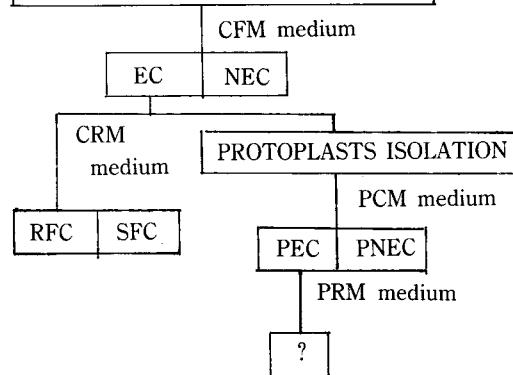


Fig. 1. Schematic diagram for experimental procedure.

### 단백질 분석

동결건조된 시료에서 단백질의 추출은 50mM sodium phosphate buffer(pH7.4)를 사용하였으며, 추출물중 비단백물질을 제거하기 위하여 phenol로서 표화된 증류수와 methanol에 녹인 0.1M ammonium acetate로서 재추출하여  $-20^\circ\text{C}$ 의 냉동고에 24시간 동안 두었다. 이때 생겨난 침전물은 methanol에 녹인 ammonium acetate로서 3회, acetone로서 1회 행구어 준 후 0.2% (v/v) SDS와 5M urea를 포함하는 Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 용해하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. HPLC 분석은 Waters HPLC로서 Model 590 Solvent Delivery, U6K Injector, Model 481 LC Spectrophotometer (280nm)와 Model 730 Data Modules로 구성되어 있으며, column은 Dupont Zorbax GF-250 (9.4mm i.d.  $\times$  25cm)를 사용하였으며, mobile phase는 0.2M phosphate buffer solution (pH 7.0)/0.1% sodium azide로서 flow rate는 1.0 ml/min로 하였다.<sup>20)</sup>

### 아미노산분석

분석용 시료의 무게를 정확히 달아 1회용 ampoule에 넣은 뒤 6N-HCl을 가하여  $110 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 정확히 조절되는 heating block에서 24시간 동안 가수분해하였다. 가수분해된 시료를 미세한 공극의 glass

filter를 통하여 여과한 후 95~100°C의 water bath에서 증발건조 시켰다. 잔유물은 pH 2.2로 맞추어 둔 sodium citrate buffer를 2ml가하여 완전히 용해시킨 뒤 공극이 0.2μm의 membrane filter를 사용하여 불순물을 제거하고 amino acid autoanalyzer (LKB4150)로서 그 조성을 분석하였다.<sup>21)</sup>

### Peroxidase 동위효소

시료(fr. weight) 1g에 대해 1M sucrose와 0.056M 2-mercaptopropanoic acid 포함된 0.2M Tris·HCl buffer (pH 8.5) 1ml을 가하고 미리차게해둔 mortar에서 마쇄한 후 원심분리(12000rpm, 4°C, 10min)하여 상등액을 전기영동용 시료로 사용하였다. 전기영동은 7% (w/v) acrylamide 농도의 2 × 160 × 180 (mm)의 slab gel을 사용하여 각 1lane당 30μl씩의 추출액을 주입하여 4°C에서 180V로 5시간 전개하였다. gel의 염색은 3-amino-9-ethylcarbazole을 사용하여 염색하였으며 각 동위효소의 활성은 densitometer(Joyce Loebl)로서 540nm의 파장으로 측정하여 상대적인 활성을 비교하였다.<sup>22)</sup>

### 결과 및 고찰

#### 대두조직배양

대두종자를 과종하여 개화 후 15일된 미숙종자를 채취하여 그 자엽부위만을 절취하여 CFM에서 배양한 결과, 3주후의 배양체는 모든 배지에서 callus의 형성이 왕성하였으나, EC의 형성은 생장조절제로서 NAA 2mg과 BA 0.5mg을 함유한 CFM3 배지에서 가장 많았다. 이러한 점을 미루어 볼 때 EC의 형성은 cytokinins보다 auxin류의 생장조절제에 영향을 많이 받아 2,4-D나 IAA보다 NAA를 사용할 때 더욱 효과적이며 embryogenesis가 용이하여 기관분화의 가능성이 높을 것으로 생각되었다.

여기서 얻은 EC 및 NEC의 일부는 분석용 시료로 사용하기 위하여 동결건조하여 보관하였으며, 다른 일부는 분화배지(Table 1, CRM1~CRM3)에 계대배양 또는 원형질체의 분리에 사용하였다. EC를 분화배지에서 3주 가량 배양하였을 때 배양체에서 shoot와 root가 발생하기 시작하였는데 IAA를 많이 사용한 CRM1배지에서는 다수의 root가 발생하는

Table 1. Media used for soybean immature cotyledon and protoplasts culture

Medium	Compositions			
	Basal salts	Vitamins	Growth regulators(mg/l)	Other
CFM1 <sup>a)</sup>	B5 <sup>e)</sup>	MS <sup>f)</sup>	2,4-D 1.0, BA 0.5	Agar 0.8%
CFM2	MS	B5	IAA 2.0, BA 0.5	—
CFM3	MS	MS	NAA 2.0, BA 0.5	—
CRM1 <sup>b)</sup>	MS	MS	IAA 2.0, BA 0.1	—
CRM2	MS	MS	IAA 2.0, BA 2.0	—
CRM3	MS	MS	IAA 2.0, BA 2.0	—
PCM1 <sup>c)</sup>	8P-KM <sup>g)</sup>	8P-KM	2,4-D 1.0, BA 0.5	Agarose 0.7%
PCM2	8P-KM	8P-KM	IAA 2.0, BA 0.5	—
PCM3	8P-KM	8P-KM	NAA 2.0, BA 0.5	—
PRM1 <sup>d)</sup>	8P-KM	8P-KM	IAA 2.0, BA 0.1	—
PRM2	8P-KM	8P-KM	IAA 2.0, BA 2.0	—
PRM3	8P-KM	8P-KM	IAA 0.2, BA 2.0	—

a) Medium for callus formation from plant tissue, b) Medium for plant regeneration of callus, c) Medium for cell division and callus formation from naked protoplasts, d) Medium for plant regeneration of callus derived from protoplasts, e) Gamborg et al. medium<sup>16)</sup>, f) Murashige & Skoog medium<sup>19)</sup>, g) Kao & Michayluk medium<sup>23)</sup>

양상을 보였으며, BA를 많이 사용한 CRM3배지에서는 shoot가 발생하는 곳도 있었다. 그러나 IAA 2mg과 BA 2mg을 사용한 CRM2배지에서는 callus의 생장단 왕성할 뿐 기관분화의 기미는 보이지 않았다. 이때 shoot와 root가 발생한 한덩어리의 배양체를 각각 SFC, RFC라고 하였다. 또한 EC에서 원형질체를 분리하여 PCM배지에 배양하였을 때, 3~4일 후부터 세포분열을 관찰할 수 있었으며, 4주후에는

EC와 NEC로 구분이 가능하였다. 이때에도 역시 생장조절제로서 NAA 2mg과 BA 0.5mg을 사용한 PCM3배지에서 EC의 형성상태가 가장 양호하였다. 원형질체를 배양하여 생겨난 배양체를 식물조직으로부터 생겨난 EC 및 NEC와 구분하기 위하여 각각 PEC, PNEC라고 하였다. PEC를 분화용배지(Table 1, PRM1~PRM3)에 계대배양하였으나 기관분화는 확인하지 못하였다.

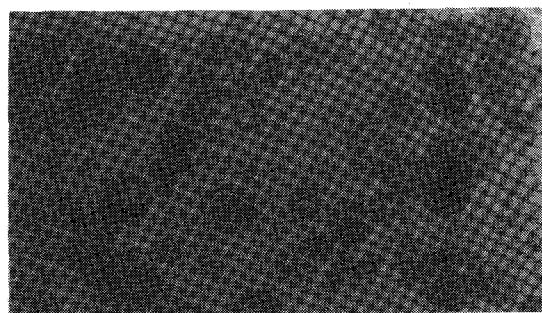


Fig. 2. Isolated protoplasts from EC derived from soybean immature cotyledon.

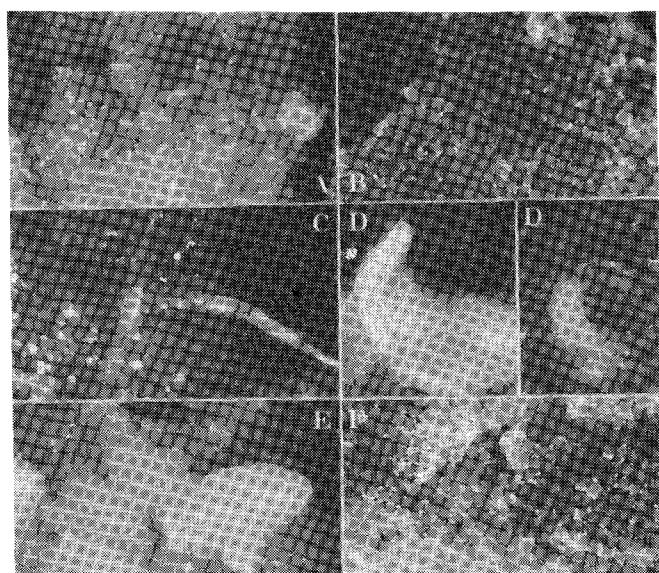


Fig. 3. Cultures derived from soybean immature cotyledon and protoplasts isolated from EC.

A : EC, B : NEC, C : RFC, D : SFC, E : PEC, F : PNEC, bar response : 2 mm

### 아미노산 조성

배양단계 및 특징별로 구분한 배양체(EC, NEC, RFC, SFC, PEC, PNEC)의 아미노산의 조성은 Table 2와 같다.

EC와 NEC, PEC와 PNEC의 아미노산의 조성을 비교해 보면, EC, PEC에서의 methionine의 함량은 현저히 낮은 반면, phenylalanine의 함량은 NEC, PNEC의 배양체에서보다 2배 정도로 높았다. 그리고 RFC와 SFC의 아미노산의 조성을 비교해 보면 tyrosine과 Cystein의 함량은 SFC에서 다소 높았다. 배양단계에 따른 아미노산의 함량은 초기배양단계(EC & NEC)에서 aspartic acid의 함량이 현저히 높았으나 Glutamic acid, alanine, phenylalanine을 비롯한 대개의 아미노산이 기관분화된 후기배양단계 (RFC & SFC)에서 대체로 높았다. 이러한 결과로 미루어

볼 때, 배양체의 embryogenesis에는 phenylalanine이, organogenesis에는 aspartic acid를 제외한 대개의 아미노산이 좋은 영향을 미칠 것으로 사료되었다.

### 단백질 분석

각각의 배양체로부터 추출한 protein에서 배양체의 분화에 영향을 미칠 것으로 판단되는 protein을 지적하기는 곤란하였다. 그러나 Fig. 4에서와 같이 EC, NEC군에서 추출한 protein을 HPLC로서 분리한 chromatogram을 보면, 공히 분자량 35,000이하의 작은 단백질로서 구성되어 있었으며, EC군에서는 분자량 18,000정도에서, NEC군에서는 분자량 22,000정도에서 차이를 보였다. 이것은 초기배양에서 EC군의 형성에 관여하는 단백질은 분자량이 18,000정도인 것으로 추정된다.

Table 2. Amino acid compositions of cultures during soybean immature cotyledon and protoplasts culture

Amino acids	Cultures					
	EC	NEC	RFC	SFC	PEC	PNEC
Asp	22.5	23.0	16.6	17.3	21.9	20.8
Thr	4.2	4.0	4.3	4.4	4.3	4.1
Ser	6.2	6.2	6.4	6.3	6.3	6.4
Glu	10.9	10.4	11.7	11.9	11.0	10.4
Pro	5.0	5.5	5.3	5.0	4.9	5.7
Gly	6.5	6.5	6.8	6.9	6.6	6.4
Ala	8.6	8.7	10.5	9.3	8.4	8.8
Cys	—	—	—	0.2	—	—
Val	6.4	6.9	6.7	6.4	6.6	7.0
Met	0.7	1.2	0.5	0.9	0.8	1.5
Ile	3.8	3.6	4.3	4.1	3.9	3.7
Leu	6.0	6.0	6.5	6.7	6.1	6.1
Tyr	0.0	1.9	1.7	2.2	1.9	2.0
Phe	2.9	1.2	3.3	3.3	3.1	1.6
His	4.5	5.1	5.2	5.1	4.4	5.3
Lys	6.0	6.5	6.8	6.3	6.2	6.8
Arg	3.8	3.3	3.7	3.6	3.6	3.4

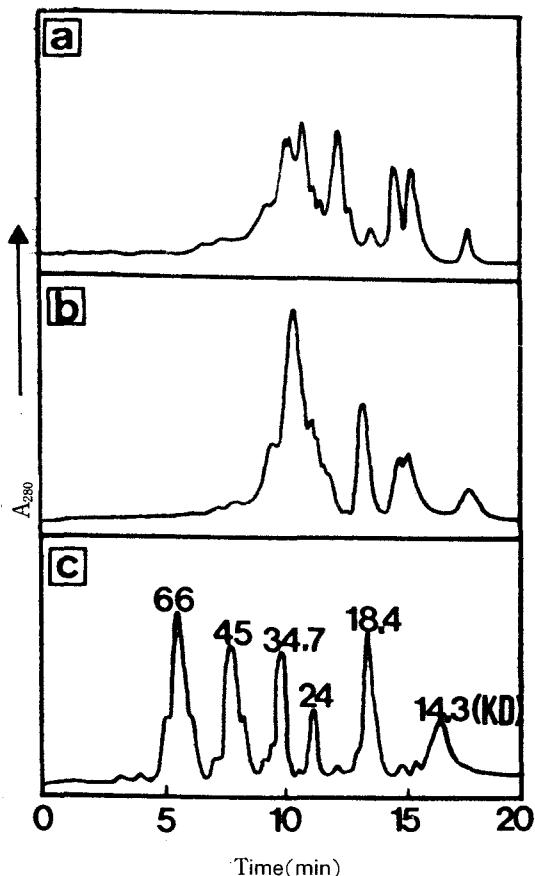


Fig. 4. HPLC chromatogram of protein extracted from EC & NEC derived from soybean immature cotyledon.

a : NEC derived from tissue, b : EC derived from tissue, c : protein standard

#### Peroxidase 동위효소 분석

Galston<sup>24)</sup>이나 Kay<sup>22)</sup> 등이 peroxidase가 식물의 생장과 분화에 관련된 효소라고 주장하여 왔으나 아직도 각 peroxidase isozyme의 진정한 생리적인 기능은 밝혀지지 않고 있다. 그러나 이러한 효소의 변화를 배양단계별로 조사해 봄으로서, 식물조직배양에서 바람직한 방향(plant tissue—callus—embryogenesis—organogenesis—regenerated whole plant)으로 진행되는지의 기준이 될 수 있을것이며, 배양이 원하는 방향으로 진행되지 않을때 배양조건의 변경에 대한 지표가 될 수도 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 각각의 배양체에 대하여 peroxidase를

전기영동법으로 분리하여 나타난 동위효소를 densitometer로서 상대적인 activity를 측정한 chromatogram을 Fig. 5에 나타내었다. EC와 PEC군에서의 peroxidase 동위효소는 peroxidase isozyme A(piA)의 활성이 두드러지게 높은 반면 piB-piG의 활성은 비교적 낮았으나, piB의 활성은 기관분화된 RFC와 SFC에서 두드러지게 높았다.

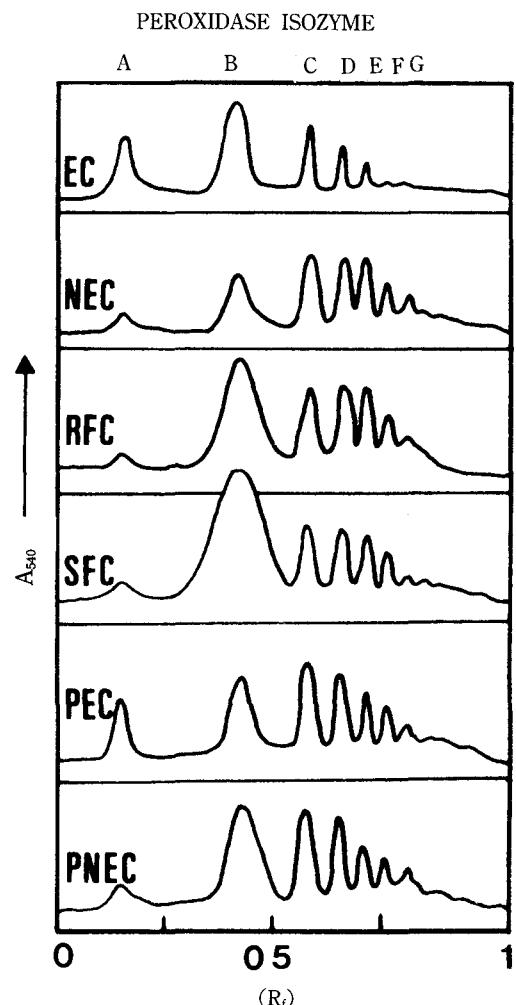


Fig. 5. Chromatogram of peroxidase isozyme patterns of each cultures by densitometer.

따라서 배양체의 EC군의 형성이나 embryogenesis에는 piA가 필수적일 것으로 생각되며, piB는 배양체가 기관분화하는데 관여하는 것으로 사료된다.

## 사사

본 연구는 한국과학재단의 기초연구비 지원에 의

한 것으로 이에 깊은 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. Brenner M.L. : Annu. Rev. Plant Physiol., 32 : 511 (1981)
2. Cocking, E.C. : Nature, 187 : 196 (1960)
3. Kao, K.M., W.A. Keller and R.A. Miller : Experimental Cell Res., 62 : 338 (1970)
4. Lu, D.Y., S. Cooper-Bland, D. Pental, E.C. Cocking and M.R. Davey : Z. Pflanzenphysiol., 111 : 289 (1983)
5. Negruitiu, I., M. Jacobs and M. Caboche : TAG, 67 : 289 (1984)
6. Lawrence, W.A. and D.R. Davies : Plant Cell Reports, 4 : 344 (1985)
7. Morikawa, H. and Y. Yamada : Plant Cell Physiol., 26(2) : 229 (1985)
8. Hain, R. : Plant Cell Reports, 3 : 60 (1984)
9. Lee, S.H., C.H. Lim : Genetica-breedea, Gyeongsang Nat'l Univ., 8 : 67 (1989)
10. McCormick, S. : Plant Cell Reports, 5 : 81 (1986)
11. Muller, A., T. Manzara and P.F. Lurgum : Biochem. and Biophysic. R.C., 123(2) : 458 (1984)
12. Owens, L.D. and D.E. Cress : Plant Physiol., 77 : 87 (1985)
13. Uchimiya, H. : Mol. Gen. Genetics, 205 : 1 (1986)
14. Stirn, S. and H.J. Jacobson : Plant Cell Reports, 6 : 50 (1987)
15. Grossmann, K., E.W. Weiler and J. Jung : Planta, 164 : 370 (1985)
16. Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima : Exp. Cell Res., 50 : 151 (1986)
17. Connell, R.J.A. and D.E. Hanke : Planta, 170 : 161 (1987)
18. Graebe, J.E. : "In 'Plant Growth substances,'" Academic Press, London New York, San Francisco, pp. 71~80 (1982)
19. Murashige, T., and F. Skoog : Physiol. Plant., 15 : 473 (1962)
20. Laemmli, U.K. : Nature, 227 : 680 (1970)
21. Yu, Y.G., C.H. Chung, A. Fowler and S.W. Suh : Arch. Biochem. Biophys., 265 : 466 (1988)
22. Kay, L.E. and Basile, D : Plant Physiol., 84 : 99 (1987)
23. Kao, K.N., F. Constabel, M.R. Michayluk and O.L. Gamborg : Planta, 120 : 215 (1974)
24. Galston, A.W., and Davis, P.J. : Science, 163 : 1288 (1970)

**Changes and characteristics of the biochemical components on the differentiation of soybean cell tissue cultures: (1) Changes and characteristics of the proteins, amino acids and peroxidase isozymes on differentiation of soybean cell tissue cultures**

Sang-Hae Nam, Sang-Uk Choi and Min-Suk Yang (Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea)

**Abstracts :** In order to investigate the changes and characteristics of biochemical metabolic substances of soybean tissue culture during the cultural period, immature cotyledons were detached from the plant on 15th days after flowering and cultured *in vitro* for 3 weeks. The cultures were classified into embryogenic(EC) and non-embryogenic callus(NEC). A part of the EC lines were subcultured for another 3 weeks and classified into root forming(RFC), and shoot forming cultures(SFC). Another part of the EC lines were used for isolation of protoplasts, which were subsequently cultured *in vitro* for 4 weeks. The cultures were classified into embryogenic(PEC) and non-embryogenic callus(PNEC) derived from the protoplasts. The cultures of EC and PEC lines showed higher phenylalanine content and lower methionine content than those of NEC and PNEC. At organ differentiation stage, both cultures showed the content of aspartic acid decreased, while the other amino acids increased as a whole. The protein pattern analysis of the cultures revealed that EC and NEC lines contained distinctive polypeptides, with mass of ca.18KD for EC and ca.22KD for NEC respectively. The EC and PEC lines also showed high activity of peroxidase isozyme A(piA), while the RFC and SFC lines showed that of peroxidase isozyme B(piB).