

## 綠化中 유채자엽의 색소체 발달에 미치는 Benzyladenine의 效果

陳昌德 · 朴暎植 · 權寧命 · 洪英男  
(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

### Effect of Benzyladenine on Plastid Development of Rape Cotyledons during Greening

Jin, Chang Duck, Young Sik Park, Young Myung Kwon and  
Young-Nam Hong

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

#### ABSTRACT

Developmental changes of chlorophyll-protein (CP)-complex and plastid membrane proteins during the greening of rape (*Brassica napus* L.) cotyledons were examined in order to investigate the effect of benzyladenine (BA) on plastid development. The formation of CP-complexes was slightly promoted by BA treatment in early greening stage, at 24 h and 48 h after illumination. However, BA inhibited the development of CP-complexes at 72 h after illumination. On the profiles of plastid membrane proteins with greening time, it was found that the 24 kd protein was increased and the 56 kd protein was decreased in both water control and BA-treated cotyledons. However, the above two traits were retarded under BA treatment, respectively. From the obtained results, plastid development of rape cotyledon during greening was partially affected by interaction between light and BA dependent on its physiological age.

#### 緒 論

식물체 발달은 빛과 호르몬의 영향을 받게되므로, 최근에는 빛과 호르몬과의 相互作用을 葉綠體 발달수준에서 조사하고 있다. Buschmann and Lichtenthaler (1975)는 IAA와 kinetin에 의한 광합성 단위의 증가를 보고하였고, kinetin이 IAA 보다 큰 효과를 나타냄을 발견하였다. 시토키닌은 세포신장, 저장물질의 분해, 그리고 엽록체, 미토콘드리아, microbody의 발달을 促進시키는 것으로 알려져왔다 (Longo *et al.*, 1978, 1979). Naito *et al.* (1980)은 떼어낸 오이 子葉에 시토키닌을 처리하였을때 엽록소의 축적이 촉진됨을 보고하였고, Axelos and Péaud-Lenoël (1980)은 담배세포 배양시 light harvesting chlorophyll a/b-protein (LHCP) complex의 apoprotein이 시토키닌의 활성포시 분자가 될 수 있음을 示唆하였다. 黃白化 또는 綠化된 호박자엽에서의 색소체 ribosomal RNA의 合成은 BA에 의하여

촉진되며, 특히 BA의 효과가 빛의 효과보다 높게 나타남을 보고하였다 (Mikulovich *et al.*, 1981). Ohya *et al.* (1982)은 떼어낸 오이자엽에서 색소체막 단백질의 變化에 미치는 BA의 효과를 調査하였다. 그러나, 아직까지 葉綠體形成에 미치는 호르몬의 효과에 대하여서는 뚜렷한 결론을 내리지 못하고 있는 실정이다. 따라서 本 研究는 BA에 의한 油菜子葉에서의 CP-complex의 形成과 색소체막 단백질의 變化를 조사하여 綠化과정에서의 BA작용을 알아 보고자 하였다.

### 材料 및 方法

**材料植物 및 生育條件.** 본 실험에 사용된 油菜 (*Brassica napus* L.)는 농촌진흥청 목포지장에서 분양받은 “유달”품종으로 크기, 형태, 색깔이 비슷한 종자를 선별하여 사용하였다. 여과지 (Toyo No. 2) 3장이 들어있는 투명한 폴리프로필렌용기 (11.5×11.5×5.5 cm)에 20 ml의 Hoagland용액 또는 10<sup>-5</sup>M BA를 포함한 Hoagland용액을 넣고 1% sodium hypochlorite 용액에 표면살균된 종자를 파종하여 25±1°C의 暗所에서 3일간 배양하였으며, 그후 각 처리구에 10 ml의 각각의 용액을 재공급하고 7,000 lux의 빛을 12, 24, 48 또는 72시간동안 照射하여 綠化과정을 유도하였다. 이때 사용된 BA의 농도는 엽록소 함량 측정에 최대효과를 나타내는 10<sup>-5</sup>M이었다 (Table 1).

Table 1. The effect of BA on chlorophyll content in rape seedlings

BA conc. (M)	Chlorophyll content <sup>a</sup> (μg/pair of cotyledons)
10 <sup>-7</sup>	17.2±1.51
10 <sup>-6</sup>	18.6±1.50
10 <sup>-5</sup>	20.4±1.22
10 <sup>-4</sup>	17.2±1.67

Rape seedlings were grown at 25°C under the white light for 5 days.

<sup>a</sup> Each value is a mean of four replicates.

**幼植物의 엽록소 및 카로티노이드 함량측정.** 엽록소는 자엽 1쌍당 0.2 ml의 80% 아세톤을 사용하여 추출한 후 663 nm와 645 nm에서 흡광도를 측정하여 이의 함량을 정량하였다. 카로티노이드 함량은 上記의 方法으로 얻은 용액의 흡광도를 480 nm에서 측정하여 상대 카로티노이드량으로 나타내었다.

**CP-complex의 추출.** 유채 자엽 4g과 30 ml의 50 mM Tricine-KOH 완충액 (0.1% BSA, 0.33 M sorbitol, 10 mM NaCl 포함, pH 7.9)을 waring blender에 넣고 고속으로 5초간 3회 마쇄하였다. 이 마쇄액을 8점의 cheese cloth로 여과한 후 원심분리 (270 g, 3분)하여 얻어진 上澄液을 재원심분리 (1,200 g, 10분)하여 엽록체 pellet을 얻었다. 이때 osmoticum이 없는 5 ml의 50 mM Tricine-KOH 완충액 (pH 7.9)을 사용하여 pellet을 현탁시키고, 다시 원심분리 (1,200 g, 10분)하여 pellet을 얻어 1 ml의 50 mM Tricine-KOH 완충액 (pH 7.9)으로 재현탁시켰다. 이 현탁액을 50 μl 취하여 엽록소를 정량하고 나머지 현탁액에는 50 mM Tricine-KOH (pH 7.9) 4 ml를 첨가해 원심분리 (1,200 g, 10분)하였다. 이때 얻어진 pellet에 chlorophyll: SDS=1:10(w/w)되게 0.0625 M Tris-HCl 완충액 (1% SDS포함, pH 8.2)을 가하여 현탁시킨 후 원심분리 (1,200 g, 10분)하였다. 원심분리 후의 上澄液에 같은 부피의 0.0625 M Tris-

HCl완충액 (5% mercaptoethanol, 5% glycerol, 1% SDS포함, pH 8.2)을 가하여 電氣泳動 試料로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 4°C에서 실시하였다 (Lee *et al.*, 1983).

색소체막 단백질의 추출. 앞의 CP-complex 추출과정에서 얻어진 염색체 pellet에 0.0625 M Tris-HCl 완충액 (2% SDS, 10% glycerol포함, pH 6.8) 0.5 ml를 가하여 현탁시킨 후 1.5 ml 시험관으로 옮기고 100°C의 물에서 1.5분간 증탕시켰다 (Ohya *et al.*, 1981). 여기에서 50  $\mu$ l를 취해 단백질을 정량하고 (Lowry, 1951), mercaptoethanol 25  $\mu$ l와 0.04% bromphenol blue 25  $\mu$ l를 첨가한 후 전기영동 試料로 사용하였다.

電氣泳動 實驗. Laemmli (1970) 방법을 기초로 하여 SDS-PAGE를 실시하였다. CP-complex 分離의 경우, stacking gel이 없이 separation gel만을 사용하였다. 이 경우 gel의 조성은 0.1% SDS, 0.025% N, N, N, N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) (v/v), 0.025% ammonium persulfate를 포함하는 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8) 완충액을 이용한 10% acrylamide gel (acrylamide: N, N'-methylene bisacrylamide=37.5:1, w/w)이었다. 전극조 완충액은 0.025 M Tris와 0.192 M glycine (pH 8.3, 0.1% SDS포함) 용액을 사용하였다. 전기영동은 처음 10분간은 1 mA/tube로 하고, 그후 3 mA/tube로 4°C 暗所에서 실시하였다. 분리된 CP-complex는 Gilford 250 spectrophotometer로 675 nm와 650 nm에서 scanning하여 검정하였다. 색소체막 단백질의 분리는 6.5 cm 길이의 8% separation gel과 1 cm 길이의 3% stacking gel (0.125M Tris-HCl포함, pH 6.8)을 이용하였으며 전극조 완충액은 CP-complex 분리 경우와 동일하였다. 전기영동은 stacking 때는 50 V 정전압에서 행하였고, 다음 단백질분리 때는 100 V로 실시하였다. 분리된 단백질은 570 nm에서 走査하였다.

## 結 果

綠化中 자엽의 엽록소 및 카로티노이드 含量變化. 3일간 暗發芽시킨 幼植物에 72시간 동안 연속 光照射하였을 때 BA처리를 하지 않은 대조구와 BA처리구에서 자엽의 엽록소 및 카로티노이드 함량변화는 Fig. 1과 같았다. Figure 1에서 보는 바와같이 72시간의 綠化過程동안 엽록소 및 카로티노이드 함량은 대조구보다 BA처리구에서 높은 값을 나타내었다.

CP-complex형성. SDS-PAGE에 의한 고등식물의 CP-complex는 기본적으로 2종류로 분류되어 왔다. 즉, P700-chlorophyll a-protein complex (CP I)와 light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex (CP II 혹은 LHCP)로 구분된다 (Markwell *et al.*, 1978). 本 實驗에서는 3일간 暗發芽시킨 유채자엽을 72시간 동안 연속 광조사하여 유도되는 녹화과정중 나타나는 CP-complex형성에 미치는 BA효과를 조사하였다 (Fig. 2). 光照射

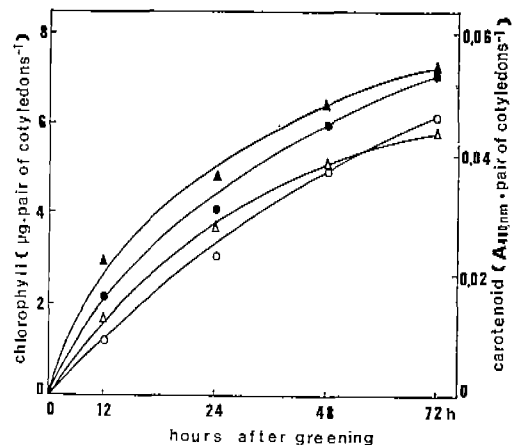


Fig. 1. The effect of BA on chlorophyll (○, ●) and carotenoid content (△, ▲) in the cotyledons during greening of rape seedlings. Control (○, △), BA (●, ▲).

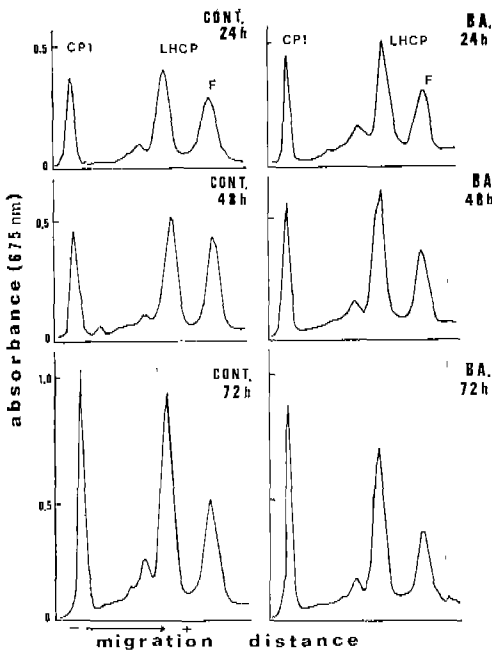


Fig. 2. Densitometer scan of chlorophyll-protein complexes separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis from rape cotyledons during greening: CONT.; -BA, BA; +BA, CPI; P700 chlorophyll a-protein complex, LHCP; light harvesting chlorophyll a/b-protein complex, F; free chlorophyll.

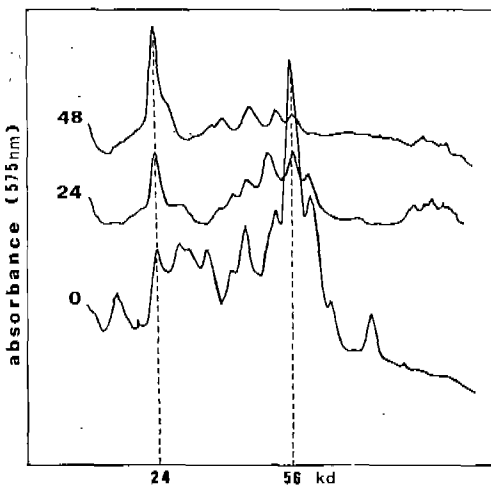


Fig. 3. Electrophoretic profiles of plastid membrane proteins from cotyledons treated with Hoagland for 72 h in the dark and then for 0, 24, or 48 h in the light.

24시간째에는 대조구에 비해 BA처리구에서 LHCP량의 뚜렷한 증가를 보였으며, 48시간째에도 CPI와 LHCP량이 많아졌음을 보이고 있다. 그러나 광조사 72시간째에는 오히려 BA처리구에서 CPI와 LHCP량이 현저하게 적어지는 결과를 보였다.

색소체막 단백질의 변화様相. 3일간 暗發芽시킨 유식물의 자엽에 광처리하기 시작하여 0시간, 24시간, 48시간째의 색소체막 단백질의 변화를 대조구와 BA처리구에서 비교 조사하였다(Figs. 3 and 4).

Ohya *et al.* (1981)은 SDS-PAGE方法에 의하여 오이자엽 색소체막에서 약 30개의 막단백질 band를 분리한 바 있으나, 본 유채 자엽의 색소체막 단백질에서는 20여개의 band가 분리되었다. Figure 3과 4에서 보는 바와 같이 전반적으로 24 kd의 단백질이 綠化過程이 進行됨에 따라 현저히 증가하였으나, 반면에 56 kd의 단백질은 빠른 속도로 감소함을 보여주고 있다. 특히 24 kd 단백질량의 증가는 녹화과정에서 진행됨에 따라 BA의 효과가 오히려 낮게 나타나고 있다.

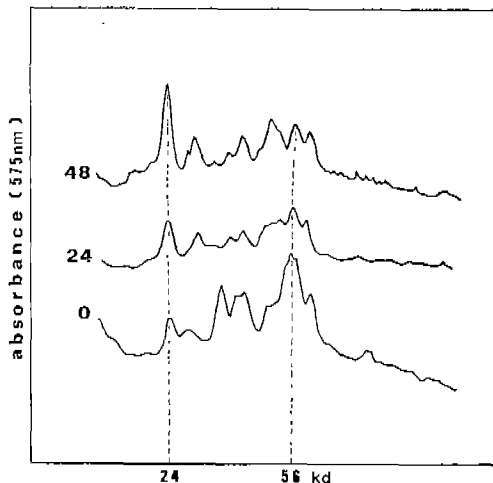


Fig. 4. Electrophoretic profiles of plastid membrane proteins from cotyledons treated with BA for 72 h in the dark and then for 0, 24, or 48 h in the light.

## 考 察

유채자엽의 녹화과정중 빛과 BA의 相互作用 및 엽록체 발달에 관한 분자생물학적 기작을 밝히기 위해서 CP-complex形成과 색소체막 단백질의 변화를 조사하였다. 식물체 발달에 대한 호르몬 조절을 구명하기 위하여 여러 研究者들은 그 발달과정이 비교적 잘 정립된 체계를 찾아왔으며 그 대상중의 하나가 엽록체이다. 특히 여러 연구자들이 엽록체 발달에 미치는 시토키닌의 특징적인 생화학적 효과를 조사하여 왔다 (Guern and Péaud-Lenoël, 1981).

Grebanier *et al.* (1979)은 녹화과정중 옥수수의 색소체막의 變化를 조사하여 특징적인 세 부류의 단백질 변화를 관찰하였다. 즉, etioplast에 존재하다가 녹화과정이 진행되면서 사라지는 것, etioplast에 없거나 또는 소량으로 존재하다가 녹화과정중에 뚜렷이 증가하는 것, 그리고 etioplast와 엽록체 모두에 존재하는 것으로 區分하였다. 옥수수의 경우, 첫째에 해당되는 것이 36 kd 단백질이었고, 두번째가 24 kd와 48 kd 단백질, 셋째가 59 kd와 56 kd 단백질이라하였다.

본 실험에서도 녹화과정에 따라 24 kd 단백질이 뚜렷이 증가되는 것을 볼 수 있었다. 녹화과정중 LHCP apoprotein이 증가한다는 보고 (Apel, 1979; Apel and Klopstsch, 1978)와 이 apoprotein의 분자량이 완두는 27~28 kd (Eaglesham and Ellis, 1974; Siddell and Ellis, 1975), 상치는 25 kd와 27.7 kd (Henriques and Park, 1976), 오이는 24 kd (Ohya *et al.*, 1981) 그리고 담배는 25 kd (Alxelos and Péaud-Lenoël, 1980)라는 사실로 미루어 보아 아마도 유채의 24 kd 단백질이 LHCP-apoprotein임에 틀림없다. 이와같은 LHCP-apoprotein은 엽록체 lamellar막을 구성하는 전체 단백질량의 25%를 차지하면서 단일 폴리펩티드 성분으로는 가장 크다. 특히 LHCP-apoprotein의 증가는 떼어낸 오이 자엽에 BA를 처리하였을 때 처리하지 않은 경우보다 뚜렷하였고 (Ohya *et al.*, 1981), 또한 Alxelos and Péaud-Lenoël (1980)은 LHCP-apoprotein이 시토키닌 활성의 molecular marker라고까지 주장하고 있으나, 본 실험에서는 BA처리구에서 LHCP-apoprotein이 녹화과정이 진행됨에 따라 대조구에 비해 뚜렷한 증가현상을 보이지 않았으며 녹화과정 후기에서는 오히려 BA가 억제효과를 보이고 있다 (Figs. 3 and 4). 이와같은 결과를 오이 자엽을 暗所에서 배양한 후 장기간 光처리하거나 연속적인 光조건하에서 BA처리하는 대조구에 비하여 grana stacking이 적은 엽록체가 형성된다는 보고 (Ohya *et al.*, 1982)와 관련지어 볼때, BA의 효과는 자엽의 생리적 연령에 따라 다르게 나타남을 보여준다.

또한 유식물 자엽에 대한 시토키닌 효과는 그 식물체에서 떼어낸 자엽에 대한 효과와 다르게 나타날 수 있다고 예상할 수 있다. 왜냐하면 intact자엽에서는 內在 시토키닌 함량이 발아초기에는 적다가 그후 뿌리로부터의 이동으로 인해 증가하므로 충분한 生長後의 intact 자엽은 높은 내재 시토키닌 함량을 지닐 가능성이 있다 (Longo *et al.*, 1984). 그러므로 외부에서 가해진 시토키닌이 발달중인 자엽에 있어서 최저농도를 넘어 오히려 시토키닌의 효과를 저해할 수도 있다. 실제로 Longo *et al.* (1984)은 수박 유식물의 intact자엽과 떼어낸 자엽의 발달에 대한 BA처리 효과를 비교한 바, 떼어낸 자엽 발달에 훨씬 큰 촉진효과를 보였으나 intact자엽에서는 별다른 효과를 나타내지 않았다. 그러므로 유채의 intact자엽에 BA

를 처리하여 그 효과를 조사한 본 실험에서도 이미 조직내에 존재하는 內在 호르몬으로 인하여 일어나는 호르몬들의 상호작용으로 오히려 외부에서 가해진 BA가 녹화과정 후기에서는 방해작용을 하는 것으로 생각된다.

다음으로 고등식물의 엽록체 lamellar 구조와 크게 관련을 맺고 있는 것이 두가지의 중요한 CP-complex인 CP I 과 CP II (혹은 LHCP)이다. CP I 과 CP II 에는 각각 결합된 색소의 양이 다르고, 엽록소와 카로티노이드의 상대함량, 아미노산의 조성, 분자량, 그리고 광합성에서의 역할이 서로 다르다 (Henriques and Park, 1977; Markwell *et al.*, 1978). 일찍이 Alberte and Naylor (1975)는 黃白化된 jack bean의 제 1엽에 BA처리후 光을 주어 녹화과정을 일으켰을 때 BA가 CP-complex형성 촉진에 큰 효과가 없음을 보고하였으나, 본 실험에서는 BA의 효과가 녹화과정 초기 (48시간 光처리이내)에서 대조구에 비하여 BA처리구에서 CP I 과 CP II (LHCP)의 증가 및 상대적인 free chlorophyll함량의 감소로 나타났다. 그러나 녹화과정 후기인 72시간 때에는 전체적으로 대조구에 비하여 CP I 과 CP II 증가가 억제되는 결과를 보이는 두가지 양상을 나타냈다 (Fig. 2). 즉 BA효과는 녹화초기 과정에서만 촉진효과를 나타냄을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 유채자엽의 색소체 발달에 대한 BA의 효과는 자엽의 생리적 연령에 따른 호르몬에 대한 감수성의 변화에 의하여 다르게 나타남을 알 수 있었다.

### 摘 要

색소체 발달에 미치는 BA의 효과를 밝히기 위하여 綠化過程中인 油菜 (*Brassica napus* L.) 子葉의 CP-complex형성과 색소체막 단백질의 變化를 調査하였다. CP-complex형성은 녹화과정 초기인 光照射시 24시간과 48시간 때에 BA처리에 의하여 약간 촉진 되었으나 녹화후기인 72시간 때에는 억제되었다. 색소체막 단백질의 경우에는, 녹화과정에 따라 대조구와 BA처리구 모두에서 24 kd 단백질의 증가현상 및 56 kd 단백질의 감소현상이 나타났다. 그러나, BA처리시 위 두현상은 각각 지연 되었다. 이러한 결과로 미루어보아, 녹화중 유채 자엽의 색소체 발달은 생리적인 연령에 따라 빛과 BA의 상호작용에 의해 부분적으로 영향 받는다는 것을 알 수 있었다.

### 參 考 文 獻

- Alberte, R.S. and A.W. Naylor. 1975. The role of cytokinins in chloroplast lamellar development. *Plant Physiol.* 55:1079-1081.
- Apel, K. and K. Kloppstech. 1978. The plastid membrane of barley. Light-induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of light-harvesting chlorophyll a/b binding protein. *Eur. J. Biochem.* 85:581-588.
- Apel, K. 1979. Phytochrome-induced appearance of mRNA activity for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of barley (*Hordeum vulgare*). *Eur. J. Biochem.* 97:183-188.
- Axelos, M. and C. Péaud-Lenoël. 1980. The apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b complex of tobacco cells as molecular marker of cytokinin activity. *Plant Sci. Lett.* 19:33-41.
- Buschmann, C. and H.K. Lichtenthaler. 1975. Hill-reaction of chloroplasts from *Raphanus* seedling

- growth with  $\beta$ -indoleacetic acid and kinetin. *In*, Proc. 3rd Int. Congr. Photosynthesis. M. Avron (ed) Vol. I, Elsevier, Amsterdam. pp.753-756.
- Eaglesham, A.R.J. and R.J. Ellis. 1974. Protein synthesis in chloroplasts II. Light-driven synthesis of membrane proteins by isolated pea chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta* 335:396-407.
- Grebanier, A.E., K.E. Steinback and L. Bogorad. 1979. Comparison of the molecular weight of proteins synthesized by isolated chloroplasts with those which appear during greening in *Zea mays*. *Plant Physiol.* 63:436-439.
- Guern, J. and C. Péaud-Lenoël, 1981. Metabolism and molecular activities of cytokinins. Springer Verlag, Berlin. pp.241-316.
- Henriques, F. and R. Park. 1976. Identification of chloroplast membrane peptides with subunits of coupling factor and ribulose-1,5-diphosphate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 176:472-478.
- Henriques, F. and R. Park. 1977. Polypeptide composition of chlorophyll-protein complexes from lettuce. *Plant Physiol.* 60:64-68.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227:680-685.
- Lee, C.B., Y.N. Hong and Y.M. Kwon. 1983. Formation of chlorophyll-protein complexes in greening rape cotyledons. *Kor. J. Bot.* 26:91-99.
- Longo, G.P., C.P. Longo, G. Rossi, A. Vitale and M. Pedretti. 1978. Variation in carbohydrate and lipid content and in osmotic potential of watermelon cotyledons treated with benzyladenine. *Plant Sci. Lett.* 12:199-207.
- Longo, G.P., M. Pedretti, G. Rossi and C.P. Longo. 1979. Effect of benzyladenine on the development of plastids and microbodies in excised watermelon cotyledons. *Planta* 145:209-217.
- Longo, G.P., R. Fantelli, C.P. Longo, G. Rossi, I. Azzolini and G. Firovano. 1984. Effect of benzyladenine on development of derooted watermelon seedlings. *Physiol. Plant.* 62:615-620.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Markwell, J.P., S. Reinman and J.P. Thornber. 1978. Chlorophyll-protein complexes from higher plants: A procedure for improved stability and fractionation. *Arch. Biochem. Biophys.* 190:136-141.
- Mikulovich, T.P., E.R. Romanko, S. Yu-Selivankina, I.M. Kukina and R. Wollgiehn. 1981. Cytokinin action on RNA synthesis in chloroplasts. *In*, Metabolism and molecular activities of cytokinins. J. Guern and C. Péaud-Lenoël (eds.), Springer Verlag, Berlin. pp.287-297.
- Naito, K., T. Takahashi, Y. Endo and S. Shimizu. 1980. Benzyladenine-induced chlorophyll formation in etiolated cucumber cotyledons: Differential responses of  $\delta$ -aminolevulinic acid formation to inhibitors of RNA and protein synthesis in darkness and then after illumination. *Z. Pflanzenphysiol.* 97:309-316.
- Ohya, T., K. Naito and H. Suzuki. 1981. Effect of benzyladenine on change in plastid membrane proteins of etiolated cucumber cotyledons during greening. *Z. Pflanzenphysiol.* 102:167-172.
- Ohya, T., K. Naito and H. Suzuki. 1982. Combined effect of benzyladenine and potassium on the level of light-harvesting chlorophyll a/b protein in detached cucumber cotyledons. *Z. Pflanzenphysiol.* 108:39-47.

- Siddell, S.G. and R.J. Ellis. 1975. Protein synthesis in chloroplasts. VI. Characteristics and products of protein synthesis *in vitro* in etioplast and developing chloroplasts from pea leaves. *Biochem. J.* 146:675-685.

(1986. 10. 18 接受)