

대두 Protoplast의 세포벽 합성과 세포분열에 대한 Cytokinin의 영향

류기중 · 김형옥 · 박창규* · 김창오

제주대학교 농화학과 · *서울대학교 농화학과
(1987년 7월 1일 수리)

Effects of Cytokinin on Cell Wall Regeneration and Cell Division of Soybean Protoplasts

Ki-Jung Yoo, Hyoeng-Ok Kim, Chang-Kyu Park* and Chang-Oh Kim

Department of Agricultural Chemistry, Cheju National University, Cheju

*Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

Effects of benzyladenine (BA) on viability, cell wall regeneration and division of soybean (*Glycine max*, Var. Acme) protoplasts isolated from suspension cells of cotyledonary callus were investigated. The uptake of BA by the protoplasts was also studied. BA increased protoplast viability, and promoted cell wall regeneration and cell division. The level of BA in protoplasts was increased to a maximum at about 20 hour incubation and 2/3 of the total amount of BA accumulated in protoplast was absorbed within 6 hours.

서 론

Miller 등¹²⁾에 의하여 1955년 Kinetin이 식물세포의 분열을 촉진한다는 것이 보고되고, Letham¹⁰⁾에 의하여 1963년 천연의 세포분열촉진 물질인 Zeatin이 발견된 이래 Kinetin Zeatin 및 benzyladenine을 포함한 cytokinin류 화합물들이 일반적으로 식물의 세포분열을 촉진한다는 것이 알려졌다. 특히 어떤 조직이나 callus들의 생장은 배지중의 cytokinin 함량에 비례한다는 것이 알려졌다고, 이것을 기초로 한 cytokinin류 화합물의 생물검정법도 확립되었다.^{13,11)} 그러나 많은 사람들의 노력에도 불구하고 cytokinin류 화합물이 세포분열에 어떻게 관여하고 있는지에 대하여는 아직까지 잘 알려지지 않고 있다.

최근에 kinetin이 특정 단백질의 합성을 저해하며 kinetin에 의하여 조절되는 이단백질은 glucan

을 분해하는 β -1,3-glucanase의 작용이 있는 것으로 알려져^{5,7)} 주목되는데, glucan은 세포벽성분의 하나로 세포벽합성의 초기에 빠른 속도로 세포벽에 축적되는 점^{6,8)}을 고려할 때 cytokinin류 화합물들이 세포벽합성에 영향을 줄 가능성이 있다. 물론 세포벽 합성이 세포분열과 어떤 관계에 있는지는 잘 알려져 있지 않아, kinetin의 β -1,3-glucanase 조절작용이 세포분열과 어떤 관계에 있는지 알 수 없으나 식물에 있어서 정상적인 세포분열은 세포벽이 없는 상태에서는 잘 일어나지 않음을 감안하면 kinetin의 β -1,3-glucanase 조절작용은 kinetin의 세포분열 촉진작용과 관련이 있을 것으로 보인다.

본 실험에서는 cytokinin류 화합물이 세포벽합성에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위하여 대두 protoplast의 세포벽 재생에 대한 benzyladenine (BA)의 영향을 조사하였고, 아울러 protoplast의 viability와, 세포분열에 대한 BA의 영향과 proto-

* 이 논문은 1986년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

plast에 의한 BA의 흡수특성에 대하여 조사하였다

재료 및 방법

대두 품종은 Asian Vegetable Research and Development center (Taiwan)로부터 분양 받은 Acme를 사용하였고, callus는 Miller의 방법¹³⁾ 대로 대두유묘의 자엽조직으로부터 유기 시켰으며 3~4 주일 간격으로 계대배양하여 사용하였다. Callus 성장에 대한 benzyladenine(BA)의 영향은 Miller의 방법¹³⁾에 준하여 조사하였는데, 암조건으로 배양한 점과 배양기간을 28일로 한 점이 달랐다. 본 실험에서 BA는 0.2 μ ultrafilter로 여과하였고 그 외의 배지는 autoclave에서 120°C, 20분간 살균하여 사용하였다.

Protoplast는 callus를 현탁배양한 세포로부터 분리하였다. 부유배양배지는 Gamborg 등의 B-5배지⁹⁾에 성장조절제로서 2.4~2.0mg/l와 kinetin 0.5mg/l를 첨가한 것을 사용했고 27 \pm 1°C에서 120rpm으로 진탕하여 암조건으로 배양하였다. 계대배양은 7~10일 간격으로 하였고, protoplast를 분리할때는 4일 간격으로 2회 계대배양한 세포들을 사용하였다. Protoplast의 분리는 Constabel이 당근 protoplast 분리에 이용한 방법¹⁰⁾에 따랐으나 세포벽분해효소로서 Onozuka R-10 (Yakult Honsha Co. Japan)과 pectoylase Y-23(Seishin Pharm Co. Japan)을 각각 2%와 0.25% 되게 사용한 점과 세척 및 배양배지에 Coconutmilk와 kinetin을 넣지 않았고 sorbitol 대신 manitol을 사용한 점이 달랐다. Protoplast는 별도 인큐비 없는 경우에는 27 \pm 1°C 암조건에서 정치배양 하였고 protoplast밀도는 1 \times 10⁵ 개/ml로 하였다.

Protoplast의 viability와 세포벽 재생은 Bornman의 방법¹¹⁾에 준하여 각각 fluorescein diacetate와 calcoflour white를 처리하여 UV-lamp가 부착된 현미경하에서 형광을 내는것을 해아려 측정하였다. 세포분열은 protoplast가 세포벽을 재생하고 분열하여 세포 덩어리가 형성하기 시작한 13일째 현미경하에서 형태로보아 분열중에 있는 것을 계수하여 조사하였다.

protoplast의 BA흡수 특성은 방사능 표지화합물인 6-benzylamine(8-¹⁴C) purine (1.85~2.2 GBq/m mol, Amersham)을 protoplast 용액에 4.6 \times 10⁶cpm/ml 되게 첨가하고 시간별로 protoplast의 일정량을 분리하여 그 방사능을 측정하여 조사하

였다. 방사능이 있는 배지로 부터 protoplast를 분리하는데에는 Darmstadt의 방법¹²⁾을 이용하였다. 방사능은 액체섬광계수기(Berthold, LB 5004)로 측정하였는데, Scintillation cocktail은 Bray용액¹⁴⁾을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. Callus생장과 세포분열에 대한 BA의 영향

Miller¹³⁾는 대두(Acme)자엽조직으로부터 유기시킨 callus의 성장량이, 배지중의 kinetin농도가 약 4 \times 10⁻³ppm부터 10ppm까지의 범위에서는, kinetin 농도에 대수를 취한 값에 비례한다는 실험결과를 토대로 cytokinin류화합물의 생물검정법을 확립하였다. 그러나 callus의생육반응은 cytokinin의 종류에 따라 다소 차이가 있고 callus 배양조건에 따라서도 다르다.

본 실험에서는 Miller의 실험에서와는 달리 cytokinin으로서 BA를 사용하여 암조건으로 배양했을때 BA가 callus 성장에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 1.에서 callus 성장량은 생체무게와 건물무게를 측정하여 나타낸 것이다.

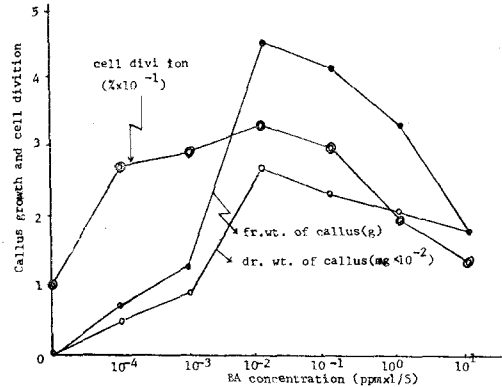


Fig. 1. Effects of BA on the growth of callus and the cell division

Fig. 1.에서 보는 바와 같이 BA가 없는 배지에서는 callus가 거의 자라지 않았다. 이와달리 BA를 첨가한 배지에서는 농도가 0~0.05ppm인 범위에서, 농도가 높을수록 callus의 생체무게와 건물무게가 모두 커서 BA에 의해 callus생장이 촉진된 것으로 나타났다. 그러나 본실험의 결과는 callus 성장을 촉진하는 농도범위가 kinetin¹³⁾에서와는 다소 다르다. BA에 의해 callus생장이 촉진되었다는 것은 BA가 세포분열을 촉진한 결과일 수도 있고

세포의 비대를 촉진한 결과일 수도 있다. 그래서 본 실험에서는 callus생장량 증가가 BA의 세포분열 촉진 결과인지를 보기 위하여 protoplast 배양배지의 BA농도를 달리하여 세포분열 정도를 조사하였다. 그 결과 Fig. 1.에서 보는 바와 같이 BA는 세포분열을 촉진한 것으로 나타났고 그 경향은 callus 성장에서와 대체로 유사하였다. 이러한 결과로 미루어 보면 BA에 의해 촉진된 callus의 생장은 BA의 세포분열촉진작용과 관련이 있는 것으로 나타났다.

2. Protoplast의 viability에 대한 BA의 영향

Protoplast를 배양할때 분열능력이 있는 세포의 비율은 배양초기의 protoplast의 viability에 영향을 많이 받으므로 protoplast의 배양초기에 BA가 viability에 주는 영향을 조사하였다. Fig. 2.는 BA농도를 달리한 배지에서 배양한 protoplast viability를 배양시간별로 나타낸 것이다.

BA가 없는 배지의 Viable protoplast수는 배양시간이 경과함에 따라 급격히 감소하여 약 4시간 후에는 대부분의 protoplast가 죽었다. 이에 반해 BA를 첨가한 배지에서 배양한 protoplast의 viability는 배양시간에 따른 감소율이 BA가 없는 배지에 비해 작아, BA 50ppm의 경우는 4시간 후에도 약 90%의 viability를 보였고, 20시간 후에도 약 20%의 viability를 보였다. 또 50ppm을 제외하고는 BA농도가 높을수록 viability가 높아 BA는 protoplast의 viability 감소를 억제하는 것으로

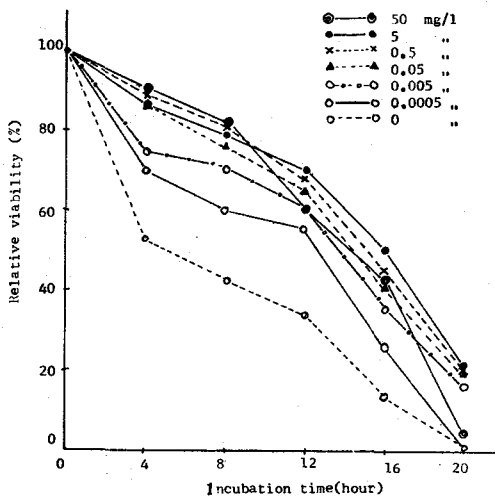


Fig. 2. Effects of BA on the viability of protoplasts

나타났다. 이것으로 보아 앞에서 본 BA의 세포분열 촉진효과는, 어느정도 BA의 viability감소에 대한 억제작용에 기인된 것으로 생각된다.

3. Protoplast의 세포벽재생에 대한 BA의 영향

Fig. 3.은 protoplast의 세포벽재생에 주는 BA의 영향을 조사한 것인데, 전체 protoplast에 대한 세포벽재생 protoplast의 비율(%)을 시간별로 나타낸 것이다. Protoplast의 세포벽재생은 80%이상 배양후 12시간 이내에 이루어졌고, BA가 없는 배지에서 배양한 것보다 BA를 첨가한 배지에서 배양한 protoplast의 세포벽재생율이 높았다. 세포벽재생 protoplast의 비율이 15%에 도달하는데 걸리는 시간은 BA가 없는 배지에서는 8시간이었으나 BA 10mg/l에서는 4시간으로 세포벽재생속도가 2배 정도 빨랐다. BA를 첨가한 배지의 protoplast 세포벽재생을 BA가 없는 배지의 것에 대한 비율로 나타낸 Fig. 4.에서 보면, 세포벽재생이 BA에 의해 촉진된 것이 잘 나타나 있는데, 특히 배양 4시간에서 BA에 의한 세포벽재생 촉진효과가 BA없는 배지의 것에 비해 현저한 차이를 보여, BA는 세포벽합성초기에 영향을 많이 주는 것으로 나타났다.

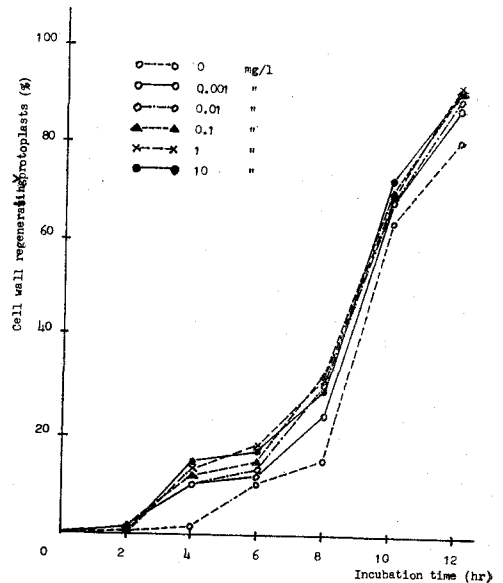


Fig. 3. Effects of BA on cell wall regeneration of soybean protoplast. Timecourse change in cell wall regenerating protoplasts.

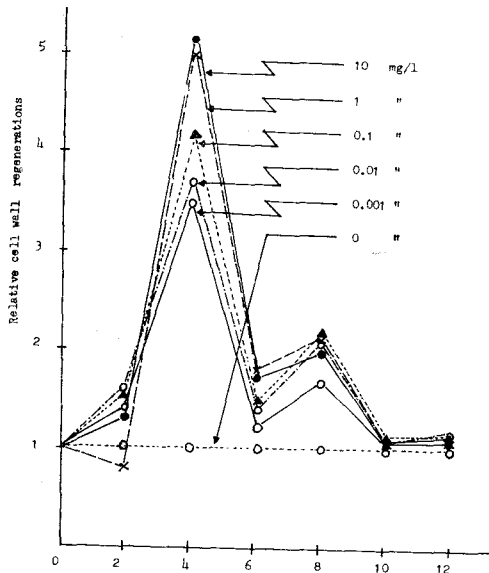


Fig. 4. Relative cell wall regenerations of protoplasts cultured on BA added media compared with those cultured on BA free medium.

Felix와 Menis⁷⁾ 그리고 Eichholz등⁵⁾이 담배 callus에서 β -1,3-glucanase가 kinetin에 의하여 그 합성이 억제되었다고 보고한 결과 β -1,3-glucanase가 세포벽 성분의 하나인 glucan을 분해한다는 점을 고려하면, kinetin과 마찬가지로 cytokinin의 하나인 BA에 의하여 세포벽재생이 촉진된 것은 BA가 β -1,3-glucanase의 합성을 억제하여 glucan의 분해가 방지되어 나타난 결과로 추정해 볼 수 있다. 더구나 glucan은 세포벽 합성초기에 빠른 속도로 합성된다는 Eschrich⁶⁾, Fincher와 Stone⁸⁾ 등의 보고와 BA의 세포벽재생 촉진작용이 세포벽재생 초기에 뚜렷하다는 본 실험의 결과는 이러한 생각을 뒷받침해 준다. 물론 본 실험의 결과만으로 충분한 근거가 될 수 없으므로 보다 직접적인 증거가 제시되어야 할 것이다.

4. Protoplast에 의한 BA의 흡수

Protoplast는 세포벽이 없다는 점에서 세포벽이 있는 callus 세포나 다른 정상세포와 구별되어 물질의 흡수능력에서도 차이가 있을 것으로 예상되는데, protoplast에 의한 BA의 흡수특성은 protoplast의 viability나 세포벽재생에 있어서의 BA의 작용을 밝히는 데에 중요한 정보가 된다. Fig. 5.

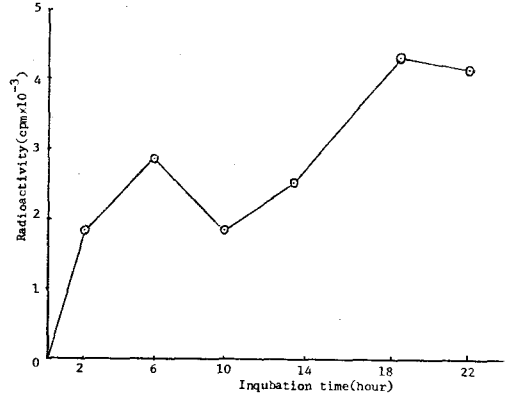


Fig. 5. The Uptake of BA by protoplasts.

는 방사능 동위원소로 표지된 BA를 배지에 첨가하여 protoplast일정량이 흡수한 BA의 양을 시간별로 나타낸 것이다.

Protoplast에 의한 BA의 흡수량은 배양시간이 경과됨에 따라 대체로 증가해서 약 20시간이 되었을 때 최고치에 이르러 BA흡수는 비교적 단시간내에 일어나는 것으로 보였다. 특히 23시간까지 흡수된 전체량의 2/3가 6시간 이내에 흡수된 것으로 나타나 초기의 흡수속도가 큰 것으로 생각되었는데, 이 결과와 배양초기의 세포벽재생이 BA에 의하여 현저하게 촉진된 점을 관련지어 생각할 때 세포벽합성은 세포내의 cytokinin 수준에 영향을 받는 것으로 생각되었다.

초 록

대두(*Glycine max* var. Acme)의 자엽조직에서 유래된 callus의 부유배양세포로부터 protoplast를 분리하고, 이들 protoplast의 viability, 세포벽재생 및 세포분열에 대한 benzyladenine(BA)의 영향과 protoplast에 의한 BA의 흡수특성을 조사하였다. Protoplast의 viability는 BA처리에 의하여 증가되었고, 세포벽재생과 세포분열 그리고 callus의 성장도 BA처리에 의하여 촉진되었다. Protoplast에 의하여 흡수된 BA의 양은 BA 처리후 약 20시간에 최대에 이르렀고, 이 중에서 약 2/3가 6시간 이내에 흡수되었다.

참 고 문 헌

1. Bornman, C.H. and Bornman, J.F. (1985), The physiological properties of plant protop-

- lasts. ed. by Pilet, P.E. pp. 29~36 Springer, Berlin
2. Bray, G.A. (1960) *Analytical Biochem.* 1, 279~285.
3. Constabel, F. (1982), *Plant tissue culture methods*, 2nd ed, ed. by Wetter, L.W. and Constabel, F, pp. 38~48 Nat. Res. Con. Saskatchewan, Canada
4. Darmstadt, G.L., Balke, N.E., Schrader, L. E. (1983) Birkhauser, Basel, *Protoplasts 1983 poster proceedings*, ed by potrykus, I. et al. pp. 202~203.
5. Eivhholz, R., Harper, J., Felix, G. and Meins, F. (1983) *planta*, 158, 410~415.
6. Eschrich, W. (1975), *Encyclopdia of plant physiol.*, Vol. 1, ed. by Zimmerman, M.H. and Milburn, J.A., pp. 39~56, Springer-verlag, Berlin
7. Felix, G. and Meins, F. (1985), *Planta*, 164, 423~428.
8. Fincher, G.B. and Stone, B.A. (1981), *Encyclopedia of plant physiology*, Vol. 13B, ed. by Tanner, W. and Loewus, F.A., pp. 68~132 Springer-Verlag, Berlin
9. Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968) *Exp. cell Res.*, 50, 148~151.
10. Letham, D.S. (1963), *Life Sci.*, 2, 569~573
11. Manos, D.J. and Goldwaite, J. (1976), *Plant physiol.*, 57, 894
12. Miller, C.O., Skoog, F., Vonsaktza, M.H. and Strong, F.M. (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1392.
13. Miller, C.O., (1963), *Modern method of plant analysis Vol. 6*, ed. by Linskens, H. F. and Tracey, M.V., pp. 194~202, Springer, Berlin