

대두 기내 배양체의 분화에 대한 생화학적 성분의 변화와 특성 : (II) 대두 기내 배양체의 분화에 대한 지질의 변화와 특성

남상해 · 양민석

경상대학교 농과대학 농화학과

초록 : 개화후 15일된 대두미숙종자를 배양하였을때 callus의 형성에 적당한 온도는 24~27 °C였으며, NAA를 생장조절제로 사용하였을때 embryogenic callus(EC)가 많이 형성되었다. 또한 EC를 계대배양하였을때 BA 2mg/l 사용한 배지에서는 shoot가, IAA 2mg/l 사용한 배지에서는 root가 많이 형성되었으나, BA 2mg/l IAA 2mg/l를 동시에 사용한 배지에서는 callus의 형성만 왕성할 뿐, 기관분화의 기미는 보이지 않았다. 배양체에 함유되어 있는 total lipid는 온도가 낮은 배양조건일수록 많았으며, callus의 생육이 왕성한 24~27°C에서 glycolipid, phospholipid, free sterol의 함량이 다소 많아졌으며, embryogenic structure가 많이 생겨날 때에는 free sterol의 함량이 많았다. 배양체의 지방산 조성은 EC에서 불포화 지방산의 함량이 많았으며, 불포화도는 0.837이었다. 또한 sterol조성에서도 EC에서 cholesterol의 함량이 다른 배양체에서보다 현저히 높았다.

식물 육종법에 있어서 최대의 난점인 이중 식물간의 불화합성과 유용형질의 도입에 대한 문제를 원형질체 융합이나 유전자조작 등의 방법에 의해 해결하고자 하는것은 대부분의 식물세포가 전체형성능을 가지고 있을 것이라는 전제하에서 가능한 것이다. 지금까지 담배, 토마토, 페추니아 등과 같은 일부 식물에서는 기내 재분화에 관한 연구가 상당히 진전되어 있으나¹⁻³⁾, 주요 농작물에 대해서는 대단히 미흡한 실정이다. 뿐만 아니라 간혹 재분화가 성공한 경우에도 생리 활성물질의 변화나 생화학적 대사과정을 근거로 한 再現性있는 체계를 확립한 경우는 드물다. 특히 대두에 대한 이 분야의 연구는 최근들어 활발하게 진행되고 있으나⁴⁻⁸⁾, 진정한 체세포 조직으로부터 식물체 재분화는 상당히 난해한 것으로 알려져 있다. 본 연구는 개화후 15일된 대두의 미숙자엽을 배양하여 배양체의 특징별로 생화학적 대사산물을 조사함으로써, 재분화에 관여하는 내적인자를 규명함과 동시에 再現性있는 분화체계를 확립하고자 하였다. 즉, 식물세포의 분열과 성장,

기관형성시에는 많은 종류의 생리활성물질이 필요할 것으로 예상되는데, 여기서는 세포막의 형성에 필수적이라고 할 수 있는 lipid가 대두세포의 생장과 기관분화시의 변화와 특성에 대하여 조사하였다⁹⁾.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 대두 [*Glycine max.* (L) Merr.]는 「금전조생」으로서 경상대학교 농과대학 온실에서 구입하였다. 개화후 15일된 미숙종자를 채취하여 70% (v/v) ethanol에 1분, 3% (v/v) sodium hypochlorite에 3분간 침적하여 표면살균하였으며, 살균된 미숙종자를 절개하여 배부분을 제거한 자엽부위만을 사용하였다.

실험방법

조직배양

살균된 자엽부위를 2×2mm² 정도의 크기를 잘라

Key words: Soybean, embryogenic and non-embryogenic, lipid, fatty acid, sterol

Corresponding author : S. H. Nam

Table 1. Media used for soybean immature cotyledon culture

Medium	Compositions				
	Basal salts	Vitamins	Growth regulators(mg/l)		Other
CFM1 ^{a)}	B5 ^{c)}	MS ^{d)}	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 ^{b)}	MS	MS	IAA 2.0	BA 0.1	Agar 0.8%
CRM2	MS	MS	IAA 2.0	BA 2.0	—
CRM3	MS	MS	IAA 2.0	BA 2.0	—

a) Medium for callus formation from tissue

b) Medium for plant regeneration of callus

c) Gamborg et al. medium¹⁰⁾

d) Murashige & Skoog medium¹¹⁾

Table 1에 표시된 배지(CFM1-CFM3)에 치상하여 하루중 16시간의 조명과 18, 21, 24, 27, 30, 33°C의 항온실에서 배양하였다. 3주후의 배양체는 embryogenic callus(EC)와 non-embryogenic callus(NEC)로 구분하여, 이 중에서 EC를 분화배지(CRM1-CRM3)에 계대배양하였다. 2주후에는 배양체에서 기관분화가 일어나기 시작하여 3주후에는 root forming cultures(RFC)와 shoot forming cultures(SFC)로 구분이 가능하였다. 수거된 각 시료의 보관은 -70°C의 freezing dryer에서 완전히 건조시켜 분석에 사용할 때까지 deep freezer에 보관하였다.

지질추출

각각의 배양체 50g(dry wt.)에 대하여 200ml의 acetone을 가하여 진탕(48hr, 26°C, 120rpm)함으로써 추출하였으며, 배양체와 분리하기 위하여 glass filter를 통하여 여과하였다. 이 용액을 감압회전농축기(vacuum rotary evaporator)로서 대부분의 용매를 제거한 뒤, 감압 desicator에서 恒량이 될때까지 방치하였다. 이때 각 배양체로부터 추출한 지질의 무게를 측정하여 total lipid의 양을 구하였다.

지질의 결합형태별 분리

Total lipid의 일부를 Grunwald method¹²⁾로 행하여 결합형태별 지질을 분리하였다. 즉 지질 1g에 대해 95% ethanol(sp. gr=0.816)과 n-hexane (sp. gr=0.667)을 50ml씩 가하여 각각의 층으로 분리추출하였다. 그 뒤 n-hexane층의 분리는 전¹³⁾의 방법에 따라

thin layer chromatography(TLC)법으로 분리하였는데 steryl ester(SF), triglyceride(TG), free fatty acid(FFA), free sterol(FS) 및 phospholipid(PL)로 분리되었으며, ethanol층의 glycolipid와 함께 6개의 fraction으로 분리하였다.

지방산과 sterol의 분리

추출정제한 total lipid 1g에 대해 ethanol에 녹인 0.3% H₂SO₄용액을 50ml 가하고 90°C의 water bath에서 12시간 환류시켜 가수분해한 후, ethanol에 녹인 10% (w/v) KOH 용액 50ml을 가하고 30분간 김화하였다. 이 용액에 diethylether로서 3회 반복추출하여 diethylether층(sterol)과 H₂O층(fatty acid)으로 분리하였다. diethylether층은 감압 농축하여 TLC하였으며, H₂O층은 methyl orange를 지시약으로 하여 0.2N-HCl로서 산성화 한 다음 diethylether를 가하여 fatty acid를 회수하고 감압농축하였다.

Sterol의 결합형태별 분리

분리한 sterol을 전¹³⁾의 방법에 따라 TLC법으로 결합형태별로 4,4-dimethylsterol, 4-monomethylsterol과 4-desmethylsterol로 분리하였다.

지방산의 methylation

추출 정제한 각각의 지방산에 methanol에 녹인 1% (w/v) para-toluene sulfonic acid 용액 50ml을 가하여 85~90°C의 water bath에서 30분간 환류시켜 지방산을

methy화 한후 diethylether로서 재추출한 다음 감압 농축하여 GLC하였다.

지방산과 sterol의 gas liquid chromatography (GLS)

지방산과 sterol의 조성을 분석하기 위하여 사용한 gas liquid chromatograph는 Shimadzu 6AM으로서 분리용 column(glass 2m×3mm i.d.)은 각각 15% DEGS와 3% OV-17을 충전하였으며, 이동상으로서의 carrier gas는 N₂를 60ml/min, detector는 flame ionization detector를 사용하였다. 이때의 column과 detector의 온도는 지방산 분석의 경우 164℃와 180℃, sterol을 분석할 때는 263℃와 280℃였다.

GC-MASS에 의한 cholesterol의 동정

Cholesterol의 존재를 확인하기 위하여 GC-MASS (Shimadzu QP-1000)를 사용하였다. 즉 2% silicon OV-17 on chromosorb W, AW, DMCS를 충전한 column(glass, 1.5m×3mm i.d.)을 사용하였으며, ionization mode는 electron impact(EI), carrier gas는 He을 40ml/min, column oven과 injection port의 온도는 각각 250℃와 300℃였다.

결과 및 고찰

대두조직배양

온실에서 양육한 대두에서 개화후 15일된 미숙종자를 채취하여 배부분을 제거한 순수한 자엽부위만을 절취하여 3종류의 배지(CFM1-CFM3)와 온도를 달리한 6가지 배양조건(18, 21, 24, 27, 30, 33℃)에서 배양한 후, 3주가 경과한 배양체는 온도가 낮은 조건일수록 짙은 녹색을 띠면서 치밀한 조직의 callus가 형성되었으며, 24℃와 27℃의 조건에서는 모든 배지에서 callus의 형성이 왕성하였으나, 2,4-D와 IAA를 성장조절제로 사용한 CFM1과 CFM2배지에서는 EC의 형성이 왕성하지 못한 반면, NAA를 성장조절제로 사용한 CFM3배지에서는 EC가 많이 형성되었다. 따라서 EC의 형성에는 2,4-D나 IAA보다 NAA를 사용하는 것이 embryogenesis에 좋은 영향을 미칠 것으로 사료되었으며, 배양에 최적온도조건은 24~27℃ 정도인 것으로 생각된다.

배양온도 및 배지종류별로 유기된 배양체의 특징은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. The states of cultures induced on cultural temperature and different medium at 3 weeks after culturing from soybean immature cotyledon

Medium-Temp.	Cultures colors ^{a)}	Friability ^{b)}	No. of EP ^{c)}
CFM1-18	G	+++	-
CFM1-21	G	+++	2
CFM1-24	GY	++	4
CFM1-27	GY	++	7
CFM1-30	YG	+	3
CFM1-33	Y	+	-
CFM2-18	G	+++	1
CFM2-21	G	++	2
CFM2-24	GY	++	7
CFM2-27	GY	++	8
CFM2-30	YG	+	4
CFM2-33	Y	+	1
CFM3-18	G	+++	1
CFM3-21	G	+++	2
CFM3-24	GY	++	18
CFM3-27	GY	++	20
CFM3-30	YG	++	9
CFM3-33	Y	+	2

a) G : green, GY : yellowish green, YG : greenish yellow, Y : yellow

b) + : friable, ++ : intermediate, +++ : compact

c) No. of embryogenic part per a cluster

여기서 배양체를 EC와 NEC로 구분하였는데, 구분이 확실한 CFM3-18, CFM3-21과 CFM3-33을 NEC, CFM3-24와 CFM3-27을 EC로 하였다. 그리고 EC의 일부를 분화배지(CRM)에 계대배양하였다. 계대배양 후 2주가 경과하였을 때부터 배양체에서 기관분화가 일어나기 시작하여 3주후에는 RFC와 SFC로 구분이 가능하였는데, 이때의 기관형성은 IAA를 2mg/l 사용한 CRM1배지에서는 대체로 root가 발생하였으며, BA를 2mg/l 사용한 CRM3배지에서는 다수의 shoot가 발생하는 경향이였다. 그러나 IAA 2 mg/l과 BA 2mg/l을 사용한 CFM3배지에서는 callus의 형성만 왕성할 뿐 기관분화의 기미는 보이지 않았다.

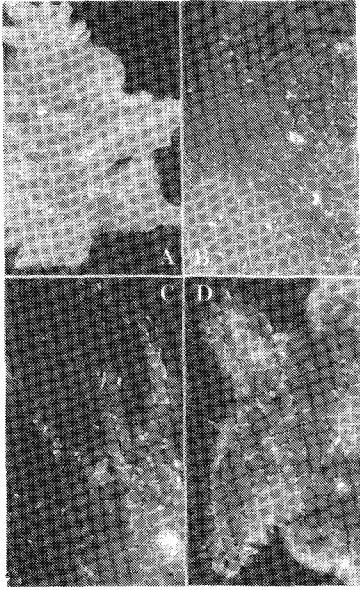


Fig. 1. Cultures derived from soybean immature cotyledons were detached from the plant on 15th days flowering.

A : EC, B : NEC, C : RFC, D : SFC, bar response : 2mm

조지방 함량 및 결합형태별 지질조성

각 배양체별 분석시료의 조지방 함량과 TLC법으로 분리한 결합형태별 지질조성은 Table 3과 같다.

각 배양체별 total lipid의 함량은 대체로 배양온도가 낮을수록 많았으며, 배양 최적온도인 24~27°C에서의 배양체에는 13.2~16.7% 정도의 lipid가 함유되어 있었다. 또한 total lipid를 결합 형태별로 분리하였을 때는 TG의 함량이 전체의 70% 가량으로 가장 많았다. 그러나 callus의 생육이 왕성한 24~27°C에서는 TG의 함량이 다소 낮아진 반면, GL, PL, FS의 함량은 다소 많아졌다. 이는 GL이나 PL이 세포막형성에 필수적인 물질이기 때문인 것으로 사료되며, FS의 함량이 많아진 것과 embryogenic structure가 가장 많이 생겨난 것과 일치하는 것으로 보아 FS가 embryogenesis에 좋은 영향을 미칠 것으로 생각된다.

배양체의 지방산 조성

배양체의 형태적 특징별로 지방산의 조성을 분석하여 지방산이 배양체의 기관분화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

Table 3. Total lipid contents and lipid components of each cultures

Medium-Temp.	Total lipid (dry wt.) (%)	Lipid components (%)						
		GL ^{a)}	SE ^{b)}	TG ^{c)}	FFA ^{d)}	FS ^{e)}	PL ^{f)}	Others
CFM1-18	21.3	3.2	1.4	75.3	3.3	1.5	4.4	10.9
CFM1-21	20.2	4.9	1.2	77.2	4.1	1.8	5.7	5.1
CFM1-24	16.7	6.7	1.9	66.6	3.7	2.0	9.4	9.7
CFM1-27	15.2	8.4	1.7	65.7	2.9	2.4	12.6	6.3
CFM1-30	12.6	7.4	0.8	69.0	3.6	1.9	8.7	8.6
CFM1-33	12.3	6.0	0.6	71.5	4.0	1.5	6.7	9.7
CFM2-18	22.4	2.8	1.9	76.7	4.5	1.8	3.1	9.2
CFM2-21	21.6	5.3	2.0	74.9	4.0	2.0	3.9	7.9
CFM2-24	15.4	7.1	2.2	68.0	4.7	2.7	8.7	6.6
CFM2-27	14.3	8.0	2.7	69.2	3.6	2.5	11.0	3.0
CFM2-30	12.1	5.4	1.4	70.1	3.5	2.0	7.3	10.3
CFM2-33	11.4	3.8	1.0	73.7	4.0	1.9	5.9	9.7
CFM3-18	20.9	3.0	1.3	71.2	4.7	2.0	4.5	13.3
CFM3-21	17.4	4.1	2.1	76.8	4.3	1.8	5.1	5.8
CFM3-24	13.2	8.4	2.8	64.5	3.8	2.4	7.4	10.7
CFM3-27	14.3	7.9	2.5	60.4	4.0	2.5	9.8	12.9
CFM3-30	11.6	7.2	1.7	70.0	3.7	2.0	7.0	8.4
CFM3-33	10.0	2.7	0.9	79.1	3.6	1.7	6.4	5.6

^{a)} Glycolipid, ^{b)} Steryl ester, ^{c)} Triglyceride, ^{d)} Free fatty acid, ^{e)} Free sterol, ^{f)} Phospholipid

Table 4. Fatty acid compositions of each cultures derived from soybean immature cotyledons detached from plant on 15th days after flowering

Cultures	Distribution of fatty acids (relative %) ^{a)}						UFA/TFA ^{b)}
	Palmitic acid	Palmitoleic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid	
EC	4.7	2.8	10.6	31.0	19.0	25.9	0.837
NEC	10.3	2.0	18.7	24.5	18.9	20.8	0.695
RFC	9.1	3.7	17.6	26.8	20.0	19.0	0.722
SFC	7.5	4.3	18.4	25.6	19.6	18.2	0.723

^{a)} Fatty acid percentage of total fatty acid

^{b)} Unsaturation rate of fatty acid : the sum of unsaturated fatty acid/the sum of all fatty acid

대두 배양체의 fatty acid는 90% 이상이 탄소의 사슬수가 16~18개 정도의 것이었다. 각 배양체의 fatty acid의 조성을 보면 EC의 경우에 palmitic(16:0), stearic acid(18:0)의 함량이 낮았으나, oleic(18:1), linolenic acid(18:3)의 함량이 다른 배양체에 비해 높았다. 또한 EC의 경우에는 fatty acid의 불포화도(UFA/TFA)가 0.837로서 다른 배양체의 0.695~0.723보다 현저히 높았다. 따라서 불포화지방산인 oleic, linolenic acid가 전체 지방산의 불포화도를 높이는 주요인으로 작용함으로써 callus의 embryogenesis에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

배양체의 sterol조성

Sterol의 분석 결과에서는 가지과의 일부 작물을 제외하고는 거의 존재하지 않은 것으로 알려진 cholesterol이 EC, RFC와 SFC에서 검출되어 GC-MASS로서 동정하여 확인하였다.

Grossmann 등¹⁴⁾에 의하면 생육저해제만 첨가한 배지와 생육저해제와 함께 cholesterol, campesterol, stigmasterol 및 sitosterol을 각각 10⁻⁴M과 10⁻⁵M씩을 첨가하여 배양하였을때, 10⁻⁵M의 cholesterol과 10⁻⁴M의 stigmasterol을 생육저해제와 함께 첨가한 배지군에서 생육저해현상이 거의 나타나지 않았다고 보고하였다. 이것은 cholesterol이나 stigmasterol이 생육저해제와의 길항작용때문이라고 생각할 수도 있겠으나, 이러한 sterol들이 생육을 촉진하는 작용을 하기 때문에 상대적으로 생육저해현상이 나타나지 않는다고 할 수도 있을 것이다. 또 Graebe¹⁵⁾에 의하면, 이러한 sterol들이 미성숙 호박의 endosperm에서 gibberellin합성의 전구물질인 kaurene의 산화단계를 촉진

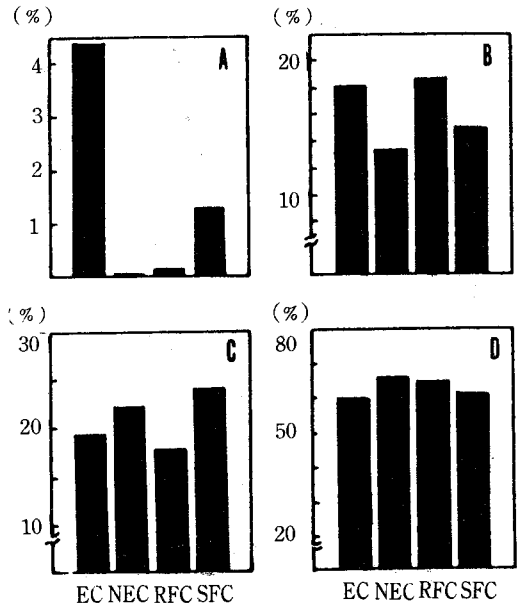


Fig. 2. Distribution of sterols of each cultures derived from soybean immature cotyledons detached from plant on 15th days after flowering.

A : cholesterol, B : campesterol, C : stigmasterol, D : sitosterol

하는 역할을 한다고 하였다. 본 연구에서는 배양초기단계의 EC에서 cholesterol이 다량 검출되었으며, 분화단계인 RFC, SFC에서도 약간 검출되었으므로 cholesterol이 배양체의 regeneration과 밀접한 관계가 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 기초연구비 지원에 의한 것으로 이에 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. McCormick, S. : Plant Cell Reports, 5 : 81 (1986)
2. Kim J.C., S.K. Lee, and K.W. Lee : Korean J. Bot., 30(1) : 1 (1987)
3. Kriüger L. S., and I. Porykus : Plant Molecular Biology Reports, 5 : 298 (1987)
4. Barwale, Ü.B., H.R. Kerns and J.M. Widholm : Planta, 167 : 473 (1986)
5. Owens, L.D. and D.E. Cress : Plant Physiol., 77 : 87 (1985)
6. Connett, R.J.A. and E.E. Hanke : Planta, 170 : 161 (1987)
7. Clarkson, D.T., K.C. Hall and J.K. Roberts : Planta, 149 : 464 (1980)
8. Gamborg, O.L., B.P. Davis and R.M. Stah-
lhut : Plant Cell Reports, 2 : 209 (1983)
9. Selim, K. : J. Sci. Food Agri., 37 : 652 (1986)
10. Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima :
Exp. Cell Res., 50 : (1968)
11. Murashige, T., and F. Skoog : Plant Physiol.,
15 : 473 (1962)
12. Grunwald, C. : Plant Physiol., 45 : 663 (1970)
13. 전영식 : 경상대 석사학위논문 (1984)
14. Grossmann, K., E.W. Weiler and J. Jung :
Planta, 164 : 370 (1985)
15. Graebe, J.E. : In 'Plant Growth substances'
Academic Press, London NewYork, SanFranci-
sco, pp.71~80 (1982)

**Changes and characteristics of the biochemical components on the differentia-
tion of soybean cell tissue cultures: (II) Changes and characteristics of the
lipid on the differentiation of soybean cell tissue cultures**

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

Abstract : When cultured soybean immature seed on 15th days after flowering, suitable tem-
perature in formation of callus were 24~27°C, and embryogenic callus(EC) were generated
at medium containing NAA with growth regulators, and then, results were subcultured the
EC, a plenty of shoots and roots were formed at medium supplemented BA 2mg/l and IAA
2mg/l, respectively, however when used at medium the same time supplemented BA 2mg/l
and IAA 2mg/l, formation of cullus was energetic, and a symptom of organization was not
showed. Total lipid contents include in each cultures were increased at low temperature of cultural
conditions as much as possible, but glycolipid, phospholipid, free sterol contents were a little
increased at 24~27°C, and free sterol content was increased at a case of embryogenic structure
were generated. In fatty acid compositions in each cultures, the contents of unsaturated

fatty acid were plenty in EC, and unsaturation rate was 0.837. Besides, in sterol compositions, cholesterol content was remarkably high in EC than that of other cultures.