

감자(*Solanum tuberosum*. L) 괴경에 있어서 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해
형질전환된 조직세포의 세포벽 형성과 peroxidase isozyme 양상의 변화

정 현 숙 · 김 영 희 · *표 병 식 · **김 홍 섭 · 김 성 준 · **강 영 희
조선대학교 유전공학과
*동신대학 식품영양학과
**조선대학교 생물학과
***연세대학교 생물학과

Changes of Peroxidase Isozyme Pattern and Formation of Cell Wall of
Hairy Root Induced by *Agrobacterium rhizogenes* from Potato Tuber

Cheong Hyeon Sook, Young Hee Kim, Byoung Sik Pyo*, Hong Sub Kim**,
Sung Jun Kim, ***Young Hee Kang

Department of Genetic Engineering, Chosun University

*Department of Food Science and nutrition, Dongshin University

**Department of Biology, Chosun University

***Department of Biology, Yonsei University

ABSTRACT

Hairy root induced by *A. rhizogenes* from potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) synthesized the agropine and mannopine which were demonstrated with paper electrophoresis. And the starch contents in hairy root were increased gradually following the developmental stage. But protein contents were decreased.

The activity of β -glucan synthetase II (GS II) which is related to the cell wall biosynthesis was stimulated in hairy root on the developmental stage. And chlorpromazine did not influence the activity of GS II while verapamil inhibited about 60% of the activity GS II. Therefore, these results showed Ca^{2+} to be effective factor in the cell wall formation.

Isozyme pattern of peroxidase was investigated in the callus and hairy root induced from potato tuber.

서 론

토양 미생물인 *A. rhizogenes*의 Ri-plasmid T-DNA region이 숙주인 식물 세포의 genomic DNA내로 삽입되어 호르몬 대사에 관여하는 효소합성을 encode함으로써 (1) auxin과 cytokinin등 식물 호르몬 합성을 정상 조직보다 더욱 더 활발하게 유도할 수 있는 hairy root를 형성하게 된다. 이렇게 유도된 hairy root는 식물 호르몬이

없는 배지에서 정상 뿌리보다 훨씬 빠른 성장 속도를 보이며(2,3), callus에 비해 배양 기간이 길어도 염색체의 구조나 핵형이 안정되어(4,5,6,7,8) 비교적 안정된 형질 전환체를 얻을 수 있는 잇점이 있다.

또한 식물 세포에 있어서 탄수화물이 풍부한 세포벽은 세포 생장을 조절하며, 인접해 있는 세포들과 서로 결합함으로써 외부 자극이나 세균 침입에 대한 보호 역할을 한다. 이러한 세포벽은 cellulose, hemicellulose, 펙틴질,

세포벽 단백질, lignin 그리고 callose로 구성되어 있다 (9,10). 식물 세포벽 구성 성분중 cellulose와 hemicellulose 및 callose는 β -glucan synthetase (GS II)에 의해 합성된다 (11,12,13). 세포벽내에 축적되는 callose는 세포나 조직의 회복기작에 관여하며 (14) 생리적 자극이나 세균 감염에 의해서 생성되기도 한다(15). 이러한 세포벽은 식물체의 성장과 분화에 중요한 역할을 한다(16).

한편 Ca^{++} 은 식물체의 필수 원소로서 식물세포의 구조와 생리, 생화학적으로 중요한 역할을 하는 것으로 알려져왔다(17). Ca^{++} 은 pectins과 결합하여 세포벽 구조에 경성을 촉진시키고(18) 또한 세포벽 신장에 있어서 auxin과 길항작용을 하며, 세포벽의 pectin-cross linkage에 대하여 auxin과 상호작용을 하기도 한다(19). 최근 Ca^{++} second messenger 또는 signal substance로서 stimulus-response coupling 효과를 일으켜 target enzyme을 조절하는 것으로도 알려져 있다.

그리고 세포의 성장과 노화, 호르몬 및 감염 등에 의하여 효소학적 다양성을 보이는 peroxidase isozyme은 단백질 수준에서 식물의 성장과 분화에 관련되어지는 효소이다.

그러므로 본 실험에서는 *A. rhizogenes*를 감자 (*Solanum tuberosum*)에 접종하여 hairy root를 유도시킨 다음, opine 분석을 통하여 형질전환된 조직과 모조직을 비교하고, 형질 전환된 식물체에서 발생 단계별로 peroxidase isozyme pattern을 조사하여 발현 조절 양상을 규명하고자 하였다. 또한 이 두 조직간의 GS II의 활성 비교를 통하여 발생 초기의 세포벽 형성 과정과 GS활성 증진에 필요한 여러 인자를 찾고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 사용균주

감자(*Solanum tuberosum*) 괴경을 2% sodium hypochlorite 용액에 20분간 표면 살균한 후 무균수로 3회 세척하고 1cm 두께로 절단한 감자절편에 2×10^8 / ml의 *A. rhizogenes*균을 접종하여 27°C에서 암배양 하였다. 유도된 hairy root를 절단하여 300mg / l cefotaxim이 첨가된 MSO 배지에서 배양하였다. 이때 사용된 균주는 *A. rhizogenes* A₄로 감자 추출배지(2% sucrose, 1.4% agar)에서 48시간 진탕 배양하여 사용하였다.

Opine 분석

배양된 hairy root에서 형질전환 유무를 알아보기 위하여 Petit등 (20)의 방법을 변형하여 opine을 검출하였다. 형질전환된 조직을 1% HCl과 95% ethanol 3ml을 첨가하

여 15,000× g에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 동결 건조기에서 감압 증발 시킨후 10 μ l 취하여 Whatman 3 MM paper에 점적하여 수평 전기 영동장치를 사용하여 1,500 V에서 50분간 전개하였다. 전개 용매는 formic acid: acetic acid : H₂O를 30 : 60 : 910의 비율로 조성하였다. 전기영동이 끝난 후 염색액 A(0.25 g AgNO₃ in 200ml Aceton)에 염색시킨 후, 염색액 B(2% NaOH in 30% Methanol)에 담구어 건조 발색 시킨다. 건조 발색시킨 paper는 5% Na₂S₂O₃ 용액에 고정하여 1시간 이상 흐르는 물로 세척한 후 band를 확인하였다.

단백질과 전분 함량 측정

단백질은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry등 (21)의 방법으로 정량하였으며, 전분 함량은 Chaplin의 DNS법 (22)으로 측정하였다.

GS 추출과 활성 측정

시료를 냉각수로 세척하고 같은 무게의 마쇄액(1mM sucrose, 4mM Na-EDTA, 1mM DTT, 25 mM GTP, 5 mM MgCl₂ 등이 포함된 0.1M Tris buffer, pH 8.0)과 혼합하여 마쇄한 다음, 이 마쇄액을 6,800× g에서 15분간 원심분리하고 그 상정액을 다시 40,000× g에서 45분간 원심분리해서 얻은 침전물을 tris 완충액에 현탁하여 조효소원으로 사용하였다. 효소 반응은 시료에서 추출한 조효소와 0.2ml의 uridine diphospho-D-[U-¹⁴C] glucose가 포함된 Tris 완충액을 27°C에서 2시간 반응시킨다. 효소반응 중지를 위해 1ml의 10% trichloroacetic acid를 첨가하여 잘 혼합한 다음 이것을 Whatman GF/C glass filter로 여과한 후 미반응 기질을 세척해 내기 위해서 10% Trichloroacetic acid 용액 3ml씩 3번, 96% ethanol 3ml씩 3번 세척한다. 이 glass filter를 잘 말린후 10ml의 scintillation cocktail solution (PPO, POPOP, Toluene, Triton X-100)에 넣고 scintillation counter로 방사능을 측정하였다(11, 23).

Peroxidase 활성도 측정과 등전점 전기영동

Peroxidase 활성도는 Grison (24) 방법을 수정하여 형질 전환된 조직을 50mM phosphate buffer (pH 6.0)에서 균질화 시킨 후 원심분리 (24,000× g 20분 4°C)하여 상정액을 조효소원으로 사용하였다. 효소의 활성도는 40mM phosphate buffer (pH 6.5), 10 mM guaiacol, 10 0 μ l 조효소원을 첨가하여 전체 부피가 3ml되게 하여 10분간 반응시킨 후 10mM H₂O₂를 첨가하여 470nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 활성도는 1분간 흡광도의 변화로 정하였다. 또한 등전점 전기

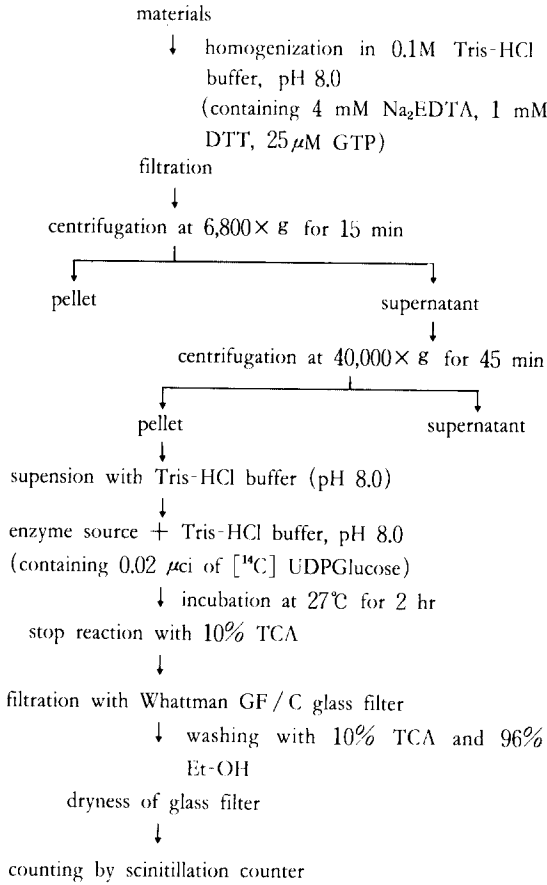


Fig. 1. Extraction and assay of β -glucan synthetase in potato hairy root

영동은 Stegeman과 Park (25) 및 Chen등 (26)의 방법을 변형하여 0.1% ampholine을 첨가한 6% acrylamide gel에 10% sucrose가 첨가된 조효소원 200 μ l를 loading하여 100V에서 1시간 200V에서 3시간 동안 4°C에서 진행하였으며, 양극용 매로는 0.01M H₃PO₄, 음극용매로는 0.2M NaOH를 이용하였다. 등전점 전기영동이 끝난 gel을 activity staining하여 peroxidase isozyme pattern을 관찰하였고 각 band를 1cm 간격으로 절단하여 pH 7.0 증류수에 용출 시킨 다음 pH 구배를 측정하였다.

Peroxidase 발색

등전점 전기 영동이 끝난 gel은 1% guaiacol이 포함된 50mM 인산 완충용액(pH 6.0) 8ml에 30분간 방출한 다음 0.2% H₂O₂ 용액 2ml을 첨가하여 band를 조사하였다. 이때 band는 15분 이내에 확산되므로 발색되는 즉시

관찰하였다(29).

결과 및 고찰

식물 세포 배양 및 형질전환 유도

감자(*Solannum tuberosum*) 괴경에 *A. rhizogenes*를 접종하여 배양 2-4주 후에 Fig. 2와 같이 hairy root가 나타났다. 그러나 같은 조건하에서 같은 감자로 형질전환

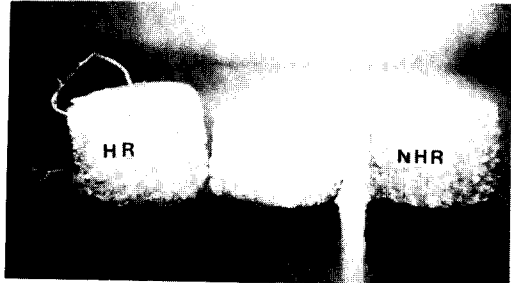


Fig. 2. Hairy roots Induced from potato tuber after 2 weeks inoculated with *A. rhizogenes*. HR hairy root form after inoculation of *A. rhizogenes*. NHR hairy root didnot form after inoculation of *A. rhizogenes*.

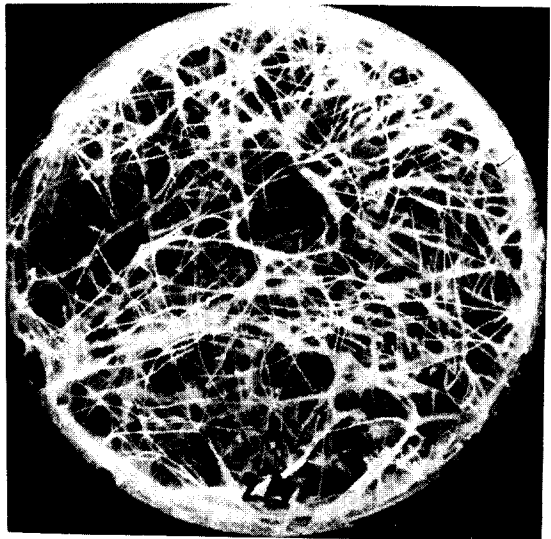


Fig. 3. Hairy root cultured on MS medium containing 300mg/l of cefotaxime for 30 days.

을 유도하였으나 Fig. 2(NHR)와 같이 hairy root가 형성되지 않는 것도 있었다. 이는 *A. rhizogenes*의 Ri-plasmid 상의 T-DNA가 감자 괴경의 genomic DNA내로 삽입되지 않았음을 알 수 있었다. 감자 절편에서 유도된 hairy root를 MSO 배지에서 배양한 결과는 Fig. 3과 같았다.

Opine 분석

*A. rhizogenes*에 의해 유도된 hairy root가 형질전환되었다면 일반 감자 괴경에서는 나타나지 않은 α -아미노산과 케톤산의 유도체인 opine이라는 특수한 아미노산이 생성되는데 이는 Agrobacteria의 탄소원과 질소원으로 이용되는 중요한 영양 공급원이다. 특히 *A. rhizogenes* strain A4는 agropine type으로 형질전환된 hairy root는 agropine과 mannopine을 합성한다. 따라서 hairy root의 형질전환 여부를 알아보기 위해서 opine 합성 유무를 본 것으로 일반 괴경에서는 opine이 검출되지 않았으나, hairy root에서는 mannopine과 agropine이 검출되었다

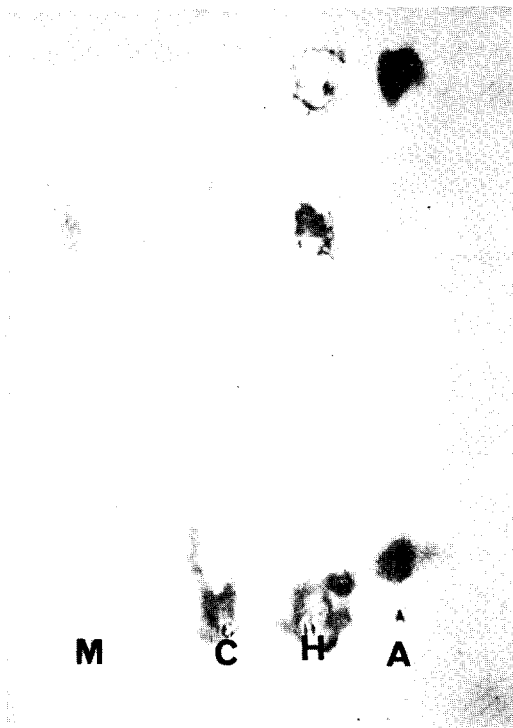


Fig. 4. Paper electrophoresis analysis of extracts from hairy roots of potato tuber.
C: control H: hairy root
A: agropine M: mannopine

(Fig. 4). 이는 Ri-plasmid의 T-DNA의 발현에 의해 식물 조직에 opine 합성이 이루어 진다는 보고(2)에 비추어 볼때 *A. rhizogenes*에 의해서 형질 전환이 이루어졌음을 알 수 있었다.

Hairy root 발생 단계에 따른 전분과 단백질 함량의 변화

전분과 축적은 감자 괴경 생식의 정확한 indicator라고 하였는데 이러한 관점에서 hairy root 발생 단계에 따라 전분 함량 및 단백질 함량을 비교 조사해 본 결과 Fig. 5와 같이 전분함량은 일반 감자 괴경보다 발생 7일째의 hairy root에서 가장 낮았으며, 발생 초기보다 발생이 진행됨에 따라 점차 증가하는 경향을 나타냈다. 또한 단백질의 함량은 발생에 따라 점차 감소하는 경향을 보였으며 발생 7일째 가장 높은 함량(4.7mg/gr.fr.wt)을 보였다. 이같은 결과는 감자의 괴경에 존재하는 저장 단백질의 분석을 통한 유용한 형질 전환 시스템 확립에 기초 자료가 되며, 고등 식물의 발생을 이해하는데 큰 효과를 얻으리라 사료된다.

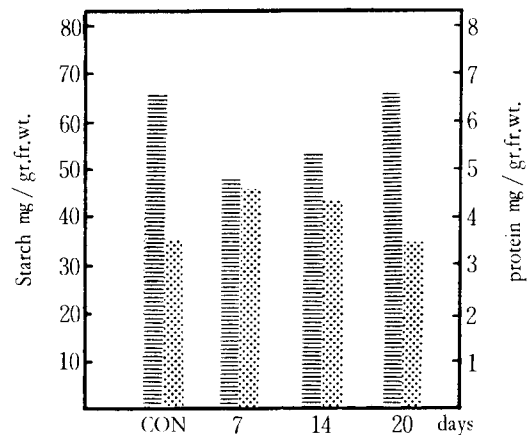


Fig. 5. The changes of starch and protein contents in transformed hairy root on the developmental stage.

β -glucan synthetase II 활성도

Fig. 6은 세포벽 형성에 관여하는 callose 합성 효소인 β -glucan synthetase II의 활성도를 hairy root 발생 단계에 따라 조사한 것으로 GS II의 활성이 점차 증가되었으며, 20일째에는 발생 초기보다 약 3배 이상 촉진됨을 나타내었다. 또한 Ca^{2+} 의 GS II 활성에 대한 영향을 알아보고자 Ca^{2+} channel blocker 인 verapamil과 Ca^{2+} 이 calm-

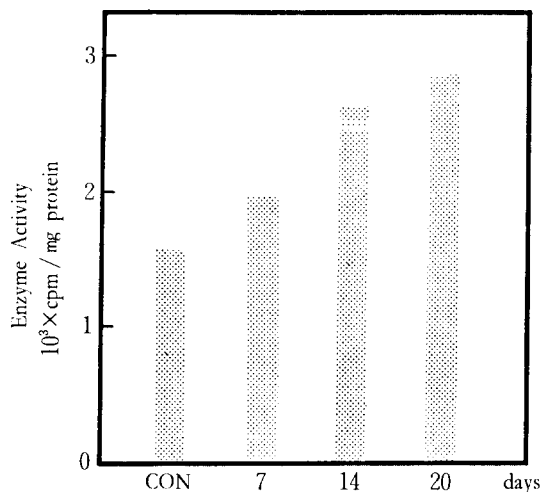


Fig. 6. The changes of β -glucan synthetase II activity in potato hairy root cells on the developmental stage. Each cells were cultured at 27°C in MS medium.

Table. 1. The effects of verapamil and chlorpromazine on GD II activity of potato hairy root cells

Treatment	GS II activity (cpm / mg protein)	
	cpm	% control
Control	1,290	100
Chlorpromazine 10 μ M	1,110	86
100 μ M	1,250	96.8
Verapamil 0.1mM	600	46.5
1 mM	560	43.4

The cells were incubated for 4 hrs at 27°C in MS medium.

odulin 과 복합체를 이루어서 효소에 작용하는지의 여부를 조사하고자 calmodulin inhibitor인 chlorpromazine을 처리하여 *in vivo* 실험한 결과 chlorpromazine 처리구에서는 GS II의 활성화에 별 영향을 미치지 않은 것으로 보아 본 실험에서는 GS II의 활성화가 calmodulin과 관계없이 Ca²⁺이 free ion으로 작용함을 알 수 있었고, verapamil 처리구에서는 약 60% 정도 감소 됨을 관찰 할 수 있었는데 이는 Ca²⁺이 GS II의 활성을 촉진시키는 결과를 보여 주었다(Table. 1).

Peroxidase 활성도

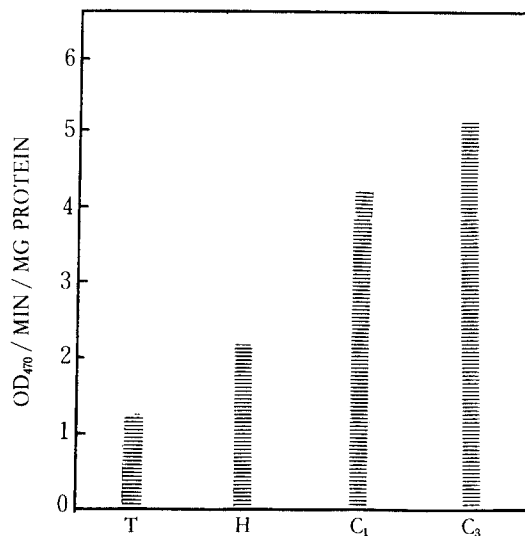


Fig. 7. Changes of peroxidase activity in hairy root induced by *A. rhizogenes* and callus cultured on modified MS medium containing 10mg/l NAA and 2mg/l 2,4-D

T: potato tuber H: hairy root
C₁: callus cultured for 1 week
C₃: callus cultured for 3 weeks

Fig. 7은 감자 괴경으로부터 *A. rhizogenes*에 의해 형질전환된 hairy root와 MS 변형 배지 (NAA 10mg/l, 2,4-D 2mg/l)에서 배양한 callus를 비교하여 peroxidase 활성도를 측정 한 결과이며 hairy root 에서는 일반 감자 괴경에서보다 활성도가 높았으며, 특히 callus 에서 peroxidase 활성이 월등히 높게 나타났다. 이는 peroxidase 가 대사중 산화에 관여하고 있으며, 특히 auxin 은 분화시에 필요한 효소 단백질 합성의 전사 수준에서 영향을 미친다는 보고 (27)를 고려해 볼 때 callus 배양 시 이용된 auxin이 peroxidase 활성을 촉진 시킨 것으로 사료된다.

Peroxidase Isozyme 양상의 변화

각 조직에서 조효소원을 추출하여 등전점 전기 영동을 한 다음 peroxidase activity staining을 하여 isoyme 양상을 조사하였다(Fig. 8). 일반 감자 괴경에서는 5개의 isoyme band가 나타났고, hairy root에서는 새로운 2개의 band가 나타났으며 1주 배양한 callus에 비해 3주 동안 배양한 callus에서는 3개의 새로운 band가 나타났음을

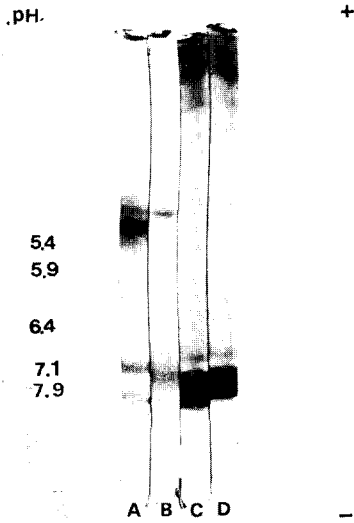


Fig. 8. Isozyme pattern of peroxidase.
 A: control B: hairy root
 C: callus cultured for 1 week
 D: Callus cultured for 3 weeks

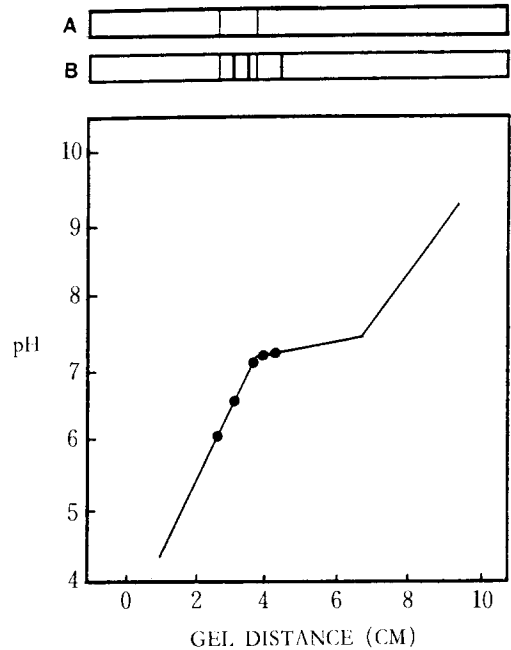


Fig. 10. Isoelectric points of peroxidase in callus cultured on modified MS medium containing NAA 10mg/l, 2,4-D 2mg/l.
 A: callus cultured for 1 week
 B: callus cultured for 3 weeks

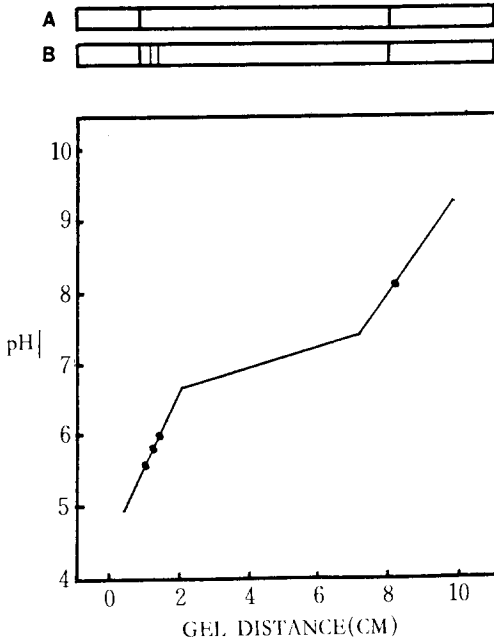


Fig. 9. Isoelectric points of peroxidase in hairy root.
 A: control B: hairy root

관찰하였다. 아울러 peroxidase isozyme 각각의 등전점을 조사하기 위하여 pH 7.0으로 적정한 증류수가 용출한 결과 acrylamide tube gel 상의 pH 구배에서 hairy root에서는 pI 5.4, 5.9의 등전점을 가진 새로운 band가 나타났으며 (Fig. 9), 3주 동안 배양한 callus에서 새로 나타나는 pI 6.4, 7.1, 7.4의 새로운 band의 양상을 볼 수 있었다 (Fig. 10). 이렇게 새로이 형성된 peroxidase isozyme은 분화과정과 관계되며 특히 shoot나 근분화시에 포함되는 유조직 세포의 발달과 연관된다고 보고(28)를 고려해볼 때 새로운 peroxidase isozyme은 감자의 분화에 관여하리라 사료된다.

요 약

감자(*Solannum tuberosum*) 괴경에 *A. rhizogenes*를 접종하여 암소에서 배양한 결과 2-4주 후에 hairy root가 유도되었다. 유도된 hairy root는 opine 분석을 통해 agropine과 manopine이 검출되어 형질이 전환되었음을

확인하였으며, 발생이 진행됨에 따라 단백질은 점차 감소되었고, 전분은 점차 증가함을 보였으며, GS·II의 활성 또한 발생단계에 따라 증가함을 보였다. Ca²⁺ channel blocker 인 verapamil 처리구에서는 약 60% 정도 GS II의 활성이 감소 되었으며, calmodulin inhibitor인 chloropromazine 처리구에서는 GS II의 활성에 별 영향을 미치지 않았다.

한편 peroxidase 활성은 3주 동안 배양한 callus에서 가장 높았으며, peroxidase 양상은 hairy root에서는 pI 5.4, 5.9의 band가 나타난 반면, 3주 동안 배양한 callus에서는 pI 6.4, 7.1, 7.4의 새로운 band를 얻었다.

감 사

본 연구는 1990년도 불교부 기초과학 연구 조성비 지원으로 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

1. F. F. White., B. H. Taylor, G. A. Huffman, M. Gorben and E. Nester, 1985. *J. Bacteriol.* 164:33-44.
2. T. Yoshikawa and T. Furuya, 1987. *Plant Cell Reports.* 6: 449-453.
3. A. Parr and J. D. Hamill, 1987. *Plant. phytochemistry.* 26 (12): 3241-3245.
4. E. I. Aird., J. D. Hamill and M. J. C. 1988. *Plant cell, Tissue and organ culture* 15:47-57.
5. H. Kamada., N. Okamura, M. Satake, H. Harada, and K. Shimomura, 1986. *Plant Cell Reports.* 5: 239-242.
6. F. Knopp., A. Strauss, and Berlin, J., 1982. *Plant Cell Reports.* 7: 590-593.
7. Y. Mano., S. Nabehsima, C. Masui, and H. Obekawa, 1986. *Agri. Biol. Chem.* 50(11): 1715-1722.
8. D. Tepfer and J. Temp, 1981. *Paris.* 292: 153-156.
9. J. L. Hall., T. J. Flowers and R. M. Roberts, 1982. *Long Man Press.* pp. 430-432.
10. Preston, R. B. 1979. *Plant Physiol.* 30: 55-78.
11. L. Cerenius and K. Soderhael. 1984. *Physiol. plant.* 60: 247-252.
12. D. P. Delmer. 1987. *Plant physiol.* 38: 259-290.
13. G. Luteregger and D. J. Mevins. 1985. *Plant physiol.* 77: 175-178.
14. M. Kauss and W. Jeblick., 1986. *Plant science.* 43: 103-107.
15. W. M. Dugger and S. B. Garcia. 1984. *Plant Biochem.* pp. 91-134.
16. S. Amino., Y. Takeuchi and A. Komamin. 1985. *physiol. plant.* 64:202-206.
17. P. K. Helper. and R. O. Wayne. 1985. *Plant physiol.* 36: 397-439.
18. B. A. Levine and D. C. Dalgarno. 1983. *Biochem. Biophys. Acta.* 726: 187-204.
19. R. E. Clenand and D. L. Rayle. 1977. *Plant physiol.* 60:709-712.
20. A. Petit., A. Bekaloff and J. Tempe. 1986. *Mol. Gen. Genet.* 202:388-393.
21. O. H. Lowry., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. *J. Biol. Chem* 193:265-275.
22. M. F. Chaplin and J. F. Kennedy. 1986. Carbohydrate analysis a practical approach, IRL Press.
23. J. D. Walton and P. M. Ray. 1982. *Planta.* 156: 302-308.
24. R. Grison and P. pilet. 1985. *J. Plant physiol.* 118 : 189-199.
25. H. Stegeman and W. M. Park. 1979. *A. Acker. Dflanz en.* 148: 446-454.
26. S. Chen., Towill and J. R. Loewenberg. 1970. *Physiol. plant.* 23: 434-443.
27. I. Katsuaki. 1982. *In Plant Tissue Culture* (ed. A. Fujiwara) pp. 215-216.
28. Miller, O. L. J. R., B. A. Hamkalo, and C. A. Thomas, JR., 1970. *Science.* 169:392-395.

(Received; February 21, 1991, Accepted; April 30, 1991)