

고추(*Capsicum annuum L.*)의 재분화 단계에 따른 Isozyme 양상에 관한 연구
- 고추 배양세포의 체세포배 형성에 따른 Isozyme 양상의 변화 -

정 현 숙 · 공 현 진 · 박 진 수 · *강 영 희
조선대학교 유전공학과, *연세대학교 생물학과

Studies on the Isozyme Patterns Followed by Redifferentiation
Stages of the Pepper(*Capsicum annuum L.*)
- Changes of isozyme pattern on somatic embryogenesis in cultured pepper cells -

Hyeon Sook Cheong, Hyeon Jin Kong, Gene Sue Park and *Young Hee Kang
Dept. of Genetic Engineering, Chosun Univ., *Dept. of Biology, Yonsei Univ.)

ABSTRACT

The physiological changes of somatic embryogenesis in cultured pepper cells (*Capsicum annuum L.* cv Shinhong) were investigated. The somatic embryogenesis was induced by cultivating the cellus in hormone-free MS medium.

The peroxidase patterns in the somatic embryogenic cells and the culture medium were revealed three and two of cathodic and anodic bands by isoelectric focusing respectively. Activity of peroxidase released into culture medium was 4 times higher than that of 12th day cultured cells. At the heart stage, the isozyme patterns of the MDH and esterase were found to be changed, which were showed by starch gel electrophoresis. It means these isozymes can be used as markers for studying somatic embryogenesis and differentiation.

서 론

식물의 성장과 분화는 hormone 에 의하여 조절되어지는 것으로 알려져 있으며, 특정 대사에 관여하는 효소들과 hormone 의 상호관계에 의해서도 성장과 분화가 유도되리라 생각되어 많은 연구가 진행중에 있으며 (1, 2), 이러한 효소들은 식물의 조직 부위, 기관 그리고 연령 등에 따라서 다양한 isozyme 의 양상을 나타내며, 전기영동적 특성 및 이동도의 변화는 식물의 생리, 생화학적 상태를 판별하는데 이용될 뿐만 아니라 분화, 계통발생, 종에 따른 특성과 식물체의 육종 및 원형질체 융합 등을 판별하는

지표로 이용되고 있다 (3, 4).

최근 고등식물의 분화와 성장 시기에 따른 isozyme 의 다양한 변화와 조직 특이성에 대한 보고 (5)는 식물의 유전자 발현 측면에서 뿐만 아니라 조직배양과 재분화 유도에 따른 isozyme 양상의 변화와 형태발생의 면에서도 중요한 의미가 있다.

오늘날 식물조직의 기내배양을 통한 캘러스 유도와 배양 및 체세포 배발생, 재분화 과정은 대부분의 고등식물에 있어서 생리, 생화학적인 조절기구 및 유전자 발현 기작을 밝히고, 생물공학적 기법을 이용한 유용물질의 대량 생산을 위한 좋은 도구가 되고 있다.

체세포 배형성을 유도하였을 때 일반적으로 globular, heart, torpedo 형태의 단계를 거치며, 배형성은 고농도의 질소원 공급과 auxin 을 결여시킴으로써 유도할 수 있고 세포수준에서 식물의 생장과 분화를 연구하는 유용한 도구로 사용된다 (6, 7). 또한 양극(bipolar) 구조(root and shoot apices) 를 지닌 체세포배는 인공 종자로도 유용하게 이용될 수 있으며 유전적으로 안정한 동일 식물체를 짧은 시간에 다량 증식시킬 수 있다는 잇점이 있어 (8, 9, 10) 많은 연구가 진행 중에 있다. 지금까지 isozyme 의 특성에 관한 연구는 식물체에서 혹은 기관 분화 수준에서 이루어졌으나 세포수준의 분화에 있어서 생리, 생화학적 변화의 지표로 이용할 수 있는 가능성에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않은 상태이다.

따라서 본 실험에서는 고추 잎 절편에서 유도한 callus 를 재료로 하여 배형성을 유도하므로써 세포수준의 변화에 대한 생리, 생화학적 변화의 일부를 알아보고자 배형성 세포내의 peroxidase 와 배지 내에 방출된 peroxidase 활성도를 조사하여 비교 분석하였으며 esterase 와 malate 대사에 관여하는 malate dehydrogenase(MDH) 의 활성 변화와 전기영동적 특성의 변화를 보아 세포 분화시 어떤 isozyme 이 생리, 생화학적 변화에 대한 지표로 이용될 수 있는지를 조사하여 체세포 배발생에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

1. Callus 유도 및 현탁배양

고추 (*Capsicum annum* L. cv sinhong) 종자를 70% ethanol 에 5분, 2% sodium hypochlorite 용액에 15분간 멸균한 후 무균수로 3회 세척하고 두 겹의 여과지를 깔 petridish 에 무균수를 첨가하여 암상태(28℃)에서 발아시켰다. 발아된지 10일된 고추 잎을 1cm 정도 크기로 잘라 2.4-D (1mg/l) 가 첨가된 MS 배지에 배양하여 callus 를 유도하였으며, 유도된 callus 는 생장상태가 좋은 것을 골라 동일 조성의 MS 액체 배지에 넣은 후 항온 수조(28℃, 110rpm) 에서 암상태로 배양하여 배형성을 유도하는 재료로 사용하였다. 현탁배양된 고추 배양 세포에서 배형성을 유도하기 위하여 초기 단계에서는 2.4-D (1mg/l) 가 첨가된 MS 배지에서 10일 간격으로 현탁 배양한 다음 2.4-D 가 결여된 배형성 유도 배지로 옮겨 28℃, 80rpm 의 속도로 현탁배양하

면서 배형성을 유도하였다.

2. Peroxidase 추출 및 활성도 측정

Peroxidase 활성도는 Grison 등(11)의 방법을 수정하여 사용하였다. 각각의 시료 1g(생중량) 당 5ml의 0.066M 인산 완충용액(pH 6.0) 과 석영사를 첨가하여 막자 사발에서 균질화한 다음 18,000×g 에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상침액을 조효소 원으로 하였다. 효소의 활성도는 40mM 인산 완충용액 (pH 6.5), 10mM guaiacol 100 μ l 에 조효소원을 넣어 전체 부피를 3ml 로 하여 30℃ 에서 10분 동안 반응시킨 다음 10mM H₂O₂ 를 첨가하여 470nm 에서 분당 흡광도 변화 최대값을 효소의 활성도로 정하였고, 단백질은 Lowry 등 (12)의 방법으로 정량하였다.

3. 등전점 전기영동 및 activity staining

등전점 전기영동은 Stegeman 과 Park 의 방법 (13)을 수정하여 0.1%의 ampholine 을 포함하는 6% acrylamide gel 윗면에 10%의 sucrose 가 첨가된 조효소원 200 μ l 와 5%의 sucrose 가 첨가된 0.1%의 ampholine(pH 3.5-10)을 층이 분리되도록 점적하여 100volts 에서 1시간, 200volts 에서 3시간 전개시켰다. 양극용액으로는 0.1M H₃PO₄, 음극용액으로는 0.2M NaOH 를 사용하였고, 등전점 전기영동이 끝난 gel 은 activity staining 하여 isozyme 의 band 양상을 비교 분석하였다.

4. Esterase 추출 및 활성도 측정

Coppens 와 Gillis (14)의 방법에 따라 시료 1g당 16.7% sucrose 와 8.3% ascorbate (pH 7.4) 용액 5ml 로 균질화한 다음 15,000×g 에서 5분간 원심 분리하여 상침액을 조효소원으로 사용하였다.

5. Esterase 의 Starch gel Electrophoresis

Everett (15) 등의 방법을 사용하여 gel 용액은 22.5mM Tris, 3.1mM Citrate, 9.5mM Borate, 2mM LiOH (pH 8.3) 로 조성하고 electrode 용액은 190mM Borate, 2mM LiOH 로 조성 하였으며 12.4% (w/v) 의 starch gel 을 사용하여 4℃ 에서 300volts 로 6시간 동안 전개하였다.

6. MDH 추출 및 활성도 측정

Ochoa (16) 방법을 수정하여 시료 1g당 0.06M Tris-citrate 완충용액 (pH 7.0)과 석영사를 첨가하

여 막자사발에서 균질화한 다음 10,000×g 에서 30 분간 (4°C) 원심분리하여 얻어진 상침액을 조효소원으로 사용하였으며, 효소반응액은 0.22 μM NaOH, 0.4 μM oxaloacetic acid, 150 μM 인산완충용액(pH 7.4) 이며 이때 사용한 oxaloacetic acid 는 0.1N NaOH 로 pH 7.0이 되게 적정하여 사용하였다.

7. MDH 의 Starch gel Electrophoresis

Starch gel 전기영동은 esterase 와 같이 Everett (15) 방법을 사용하였으며 continuous buffer system 을 이용하여 300volts 에서 전개하였다.

결과 및 고찰

1. Peroxidase 활성도 측정

Peroxidase 는 식물의 성장과 분화에 밀접한 관계가 있는 주요 효소 중의 하나로 식물의 조직 부위, 기관 그리고 연령 등에 따라서 다양한 활성을 보인다고 하였는데 이러한 관점에서 배형성 단계에 따른 세포와 배지 내의 peroxidase 활성을 조사하여 비교 분석하였다.

Fig. 1 은 세포내 peroxidase 활성과 배형성 유도 배지로 방출된 peroxidase 활성을 나타낸 것으로 배형성 세포에서는 globular 형에서 heart 형으로 전환되는 단계에서 가장 높은 활성도 증가를 보였으며 torpedo 형의 배가 나타날 때까지 꾸준히 증가하였

으나, 이후에는 다소 감소하는 경향을 보였다. 배형성 유도배지에 방출된 peroxidase 활성은 배양기간에 비례하여 증가하였으며 전반적으로 세포내의 활성도에 비해 3-4배 정도의 높은 활성을 보였다.

이러한 활성의 변화는 성장곡선과 일치하며 사시나무의 기관분화, 담배 배양세포의 기관 분화와 'Shamout' 오렌지 배주 callus 의 배형성에서 peroxidase 활성이 증가한다는 보고(17)와 일치하고 있어 분화능을 나타내는 하나의 특성으로 간주된다. 또한 당근, 땅콩 등 여러 보고(18, 19)에서 나타났듯이 배양세포에서 peroxidase 는 에너지가 필요한 능동수송에 의하여 배지로 방출되며, 방출된 peroxidase 의 활성증가는 세포내 peroxidase 의 합성 증가를 의미한다는 Nomura 등(20)의 보고와 일치하였다.

2. Peroxidase 의 등전점 전기영동 관찰

Fig. 2 는 발생단계에 따라 배양세포로부터 조효소

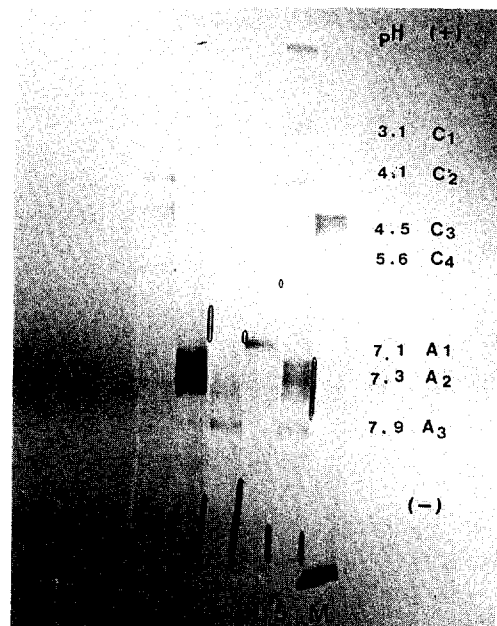


Fig. 2. Isoelectric focusing of peroxidase in embryogenic pepper suspension cultured cells.

C_{1, 2, 3}: Cathodic band number.

A_{1, 2, 3}: Anodic band number.

Lane 1: 0 day, 2: 4th day, 3: 7th day,

4: 10th day, 5: 12th day

Lane M: marker

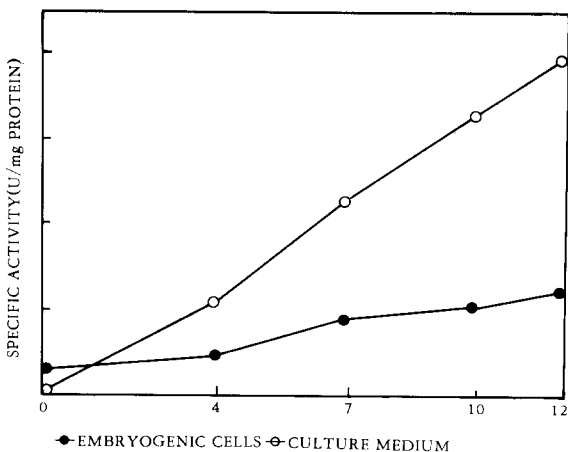


Fig. 1. Changes of peroxidase activity in the embryogenic pepper suspension cultured cells and culture medium.

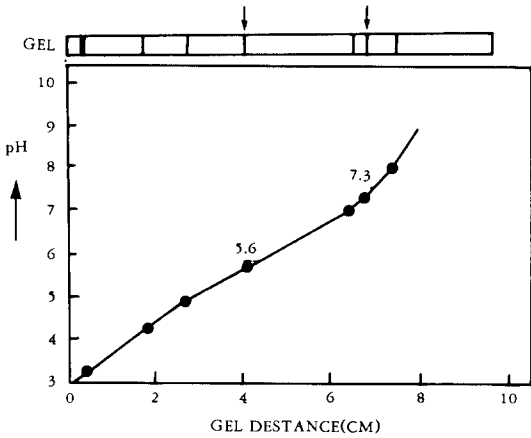


Fig. 3. Isoelectric points of peroxidase in the embryonic pepper suspension cultured cells. (ampholine, pH 3-10)

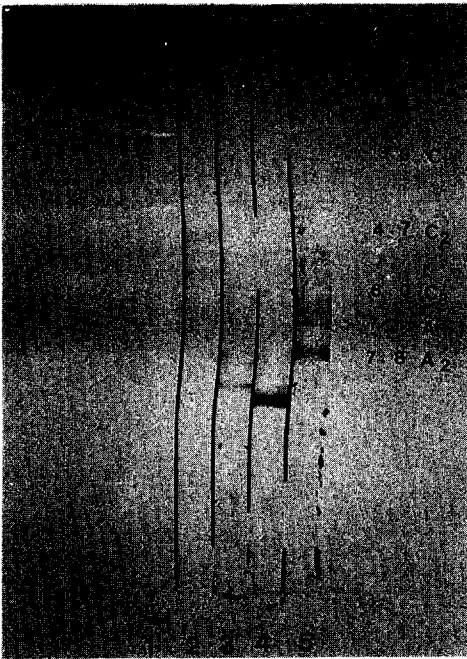


Fig. 4. Changes of peroxidase pattern on differentiation stage in embryonic pepper suspension cultured medium. C_{1, 2, 3}: Cathodic band number. A_{1, 2}: Anodic band number.

원을 추출하여 세포내 peroxidase isozyme 양상을 알아보려고 등전점 전기영동을 하여 activity staining 한 것이다. 배양 10일째에 pH 7.1의 A₁ band가 새롭게 나타나고(Fig. 3), 배양 12일째 torpedo 단계의 세포에서 C₁, C₂, A₁, A₂, A₃ 등 주요 band가 모두 관찰된 것으로 보아 가장 높은 활성을 나타내고 있음을 전기영동 상태에서도 관찰할 수 있었다.

Fig. 4는 배지에 방출된 peroxidase를 등전점 전기영동한 결과인데 총 5개의 주요 band가 관찰되었고, 각 band의 pH 값은 3.3, 4.7, 6.0, 7.1, 7.6이었다(Fig. 5). 대부분의 고등식물에서 peroxidase는 발생단계에 따라 조절된다고 알려져 왔으며(21), 담배에서 기관형성이 진행되는 동안 peroxidase의 함량과 band의 수가 변화하며 이러한 변이는 형태적인 변화와 밀접한 관계가 있다는 보고(22)에 견주어 보아 peroxidase는 고추 배양세포의 배형성 과정에서 형태적 변화에 따른 생리적 대사에 강하게 작용한 것으로 사료되어진다.

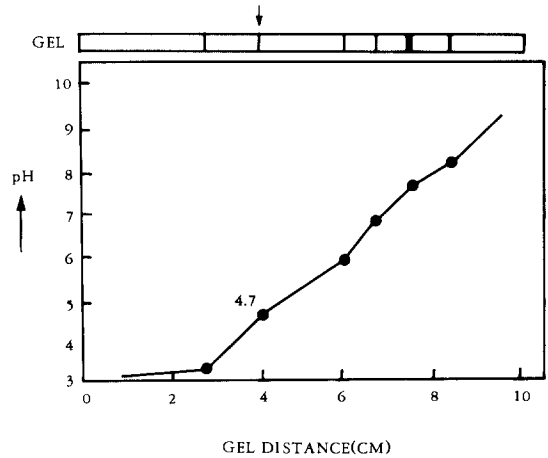


Fig. 5. Isoelectric points of peroxidase in the embryonic pepper suspension cultured medium.

3. Esterase isozyme 양상

Fig. 6은 esterase의 분화특이적 발현에 대한 관련 여부를 알아보려고 발생단계별로 esterase를 추출하여 수행한 starch gel 전기영동 사진이며, Fig. 7은 발생단계에 따른 esterase의 효소활성의 변화를 나타낸 것이다. 배양 4일에는 거의 변함이 없다가 배양 7일부터 활성이 증가하여 배양 10일에는 효소활성이 급격히 증가하였는데 이는 Fig. 7의 st-

arch gel 전기영동상에서도 효소활성이 높아짐에 따라 band 의 양도 증가함을 확인할 수 있었다.

Esterase 는 식물의 중심주에서 분화의 marker (15) 이며 당근세포 배양에서는 배발생시 marker 로 확인되었고 1984년 Chibbar 등(22)은 당근세포 배형성에 유리한 MS 배지에 배양하여 배의 형성 단계에 따라 esterase 의 양상을 조사하여 체세포 배형성의 marker 로 보고(23)한 바 있다.

4. Malate dehydrogenase 활성도 및 isozyme 양상

Fig. 8 은 MDH 의 효소활성을 나타낸 것으로 전반적으로 효소활성이 낮은 편이었으며 배양 기간이 경과됨에 따라 점차 감소하였다. 그러나 7일에는 MDH 활성이 다소 증가하는 경향이 나타났는데, 이는 Fig. 9 의 starch gel 전기영동상에서도 확인할

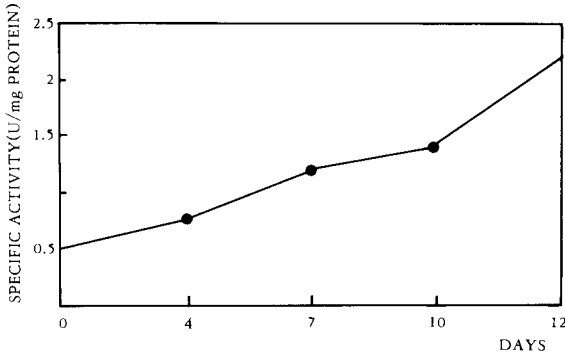


Fig. 6. Changes of esterase activity in embryogenic pepper suspension cultured cells.

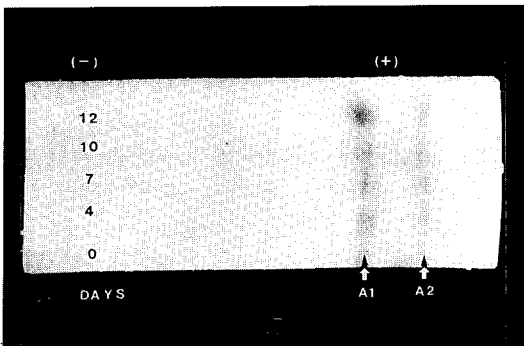


Fig. 7. Starch gel electrophoretic patterns of esterase in embryogenic pepper suspension cultured cells.
 A₁: Anodic band 1
 A₂: Anodic band 2

수 있었으며, 체세포 배형성 중 heart stage 에서 NADP⁺가 NADPH 로 전환되면서 CO₂ 순환을 촉진하고 있기 때문에(24)MDH 활성도의 증가를 보였으리라 생각된다. 또한 MDH 가 전반적으로 낮은 활성을 보인 것은 배양세포가 malate 를 체내에 축적시키므로써 삼투제로 이용하여 세포분열과 세포팽창을 조절하고 있기(25) 때문이라고 사료되며, 옥수수 와 자작나무의 분화와 배양시기에 따른 MDH isozyme 의 변화 양상에 대한 보고(26, 27)로 미루어 볼 때 MDH isozyme 양상이 체세포 배발생에 따라 변화될 수 있음을 시사하였다.

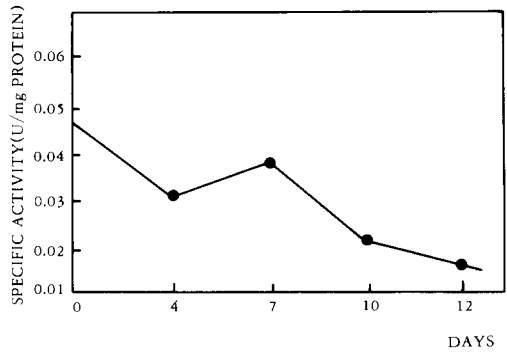


Fig. 8. Malate dehydrogenase activity in embryogenic pepper suspension cultured cells.

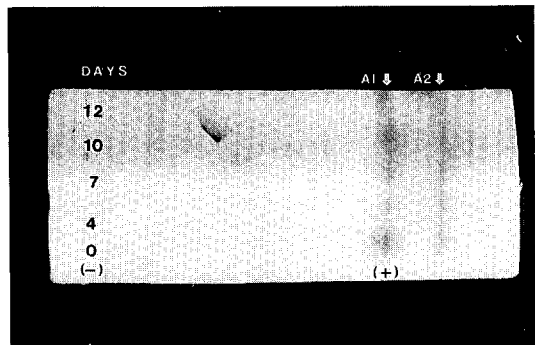


Fig. 9. Starch gel electrophoretic pattern of Malate dehydrogenase in embryogenic pepper suspension cultured cells.
 A₁: Anodic band 1
 A₂: Anodic band 2

요 약

본 연구는 고추 잎 절편으로부터 유도한 callus 로

부터 체세포 배형성에 따른 peroxidase, esterase 및 MDH의 활성 및 전기영동적 변화를 비교 분석하여 세포분화에 따른 생리, 생화학적 변화를 알아보고자 하였다.

고추 잎 절편에서 유도된 callus는 호르몬이 첨가되지 않은 MS 액체배지에서 체세포배를 유도하였을 때 배양 7일째 peroxidase, esterase, MDH의 효소 활성이 가장 높게 나타났으며 특히 peroxidase의 활성도는 배양 12일째 세포내에 비해 배로 방출된 효소의 활성이 4배 정도 높았다. 이와같이 체세포 배형성에 따른 isozyme의 활성도 및 전기영동적 양상의 배형성과 재분화 과정을 연구하는데 유용할 것으로 사료된다.

감 사

이 논문은 1991년 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Katsuaki, I., (1982), In "Plant tissue culture" (ed. A. Fujiwara). pp. 215.
- Nanda, N. N. and N. F. Kaur, (1973), *Plant & Cell Physiol.* **14** : 207.
- Scandalios, J. G., (1974), *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25** : 225.
- Wetter, L. and J. Dyck, (1983), In. *Handbook of plant cell culture.* pp. 607.
- Gillikin, J. W. and J. S. Graham, (1991), *Plant Physiol.* **96** : 214.
- Fujimura, T. and A. Komamine, (1980b). *New Phytol.* **86** : 213.
- Caligo, M. A., V. N. Ronchi and M. Nozzolin, (1985), *Differentiation* **17** : 193.
- Ammirato, P. V., (1983), *BioTechnology* **1** : 68.
- Ho. W. and I. K. Vasil, (1983), *Protoplasma* **118** : 189.
- Hacciuss, B., (1978), *Phytomorphology* **28** : 74.
- Grison, R. and P. E. Pilet, (1985), *J. Plant Physiol.* **118** : 189.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. L. Randall, (1951), *J. Biol. Chem.* **193** : 265.
- Stegeman, H. and W. M. Park, (1979), *A. Acker, Dflanzen.* **148** : 446.
- Coppen, L. and E. Gillis, (1987), *J. Plant Physiol.* **127** : 153.
- Everett, N. P., N. J. Wach and D. J. Ashworth, (1985), *Plant Sci.* **41** : 133.
- Ochoa, S., (1955), In : *Methods in Enzymol.* Vol. I. Academic Press. London. pp. 735.
- Benger, R. G., (1985), *Plant Physiol.* **77** : 221.
- Van, H., r. Band, and J. Lobarzewski, (1982), *Plant Sci. Lett.* **27** : 59.
- Chibbar, R. N., R. Cella., D. Albani, and R. B. Van Hustea, (1984), *Plant Physiol.* **75** : 956.
- Nomura, K. and A. Komamine, (1985), *Plant Physiol.* **79** : 988.
- Powell, B. L., Pickering J. W., S. H. Wendwe, and E. C. Smith, (1975), *Phytochemistry* **4** : 1715.
- Chibbar, R. N., J. Shyluk, and F. Constabel, (1988), *J. Plant Physiol.* **133** : 367.
- Chibbar, R. N. and R. B. Van Huystee, (1984), *Plant Physiol.* **75** : 956.
- Kishor, P. B. K. and A. R. Mehta, (1988), *Plant & Cell Physiol.* **29** : 255.
- Plumb-Dhindsa, P. L., R. S. Dhindsa and T. A. Thorpe, (1979), *J. Exp. Bot.* **30** : 759.
- Strivastaba, P. S. and A. Steinhauter, (1981). *Z. Dflanzenphysiol.* **103** : 341.
- Seeni, S. and A. Granam. (1981). *Plant & Cell Physiol.* **22** : 969.