

## 벼 胚發生 細胞의 特性和 胚發生 關聯 遺傳子의 分離 — 胚發生 細胞에 關聯된 同位酵素 特性 —

鄭炳均·白允雄·高庚珉·南佰熙<sup>1</sup>·黃昶<sup>\*</sup>

全南大學校 自然科學大學 生物學科, <sup>1</sup>明知大學校 自然科學大學 生物學科

벼(*Oryza sativa* L. cv. Kye Hwa) 성숙종자에서 유도한 배발생 세포(embryogenic cell, EC)의 동위효소 발현양상과 효소활성을 조사하였다. 배발생 캘러스로부터 확립된 EC 현탁배양은 세포가 동글며 세포질이 충만한 세포들로 이루어졌으나 비배발생 세포(nonembryogenic cell, NEC)의 현탁배양은 크게 신장한 액포화된 세포들로 구성되었다. 이러한 EC와 NEC의 peroxidase, esterase, acid phosphatase 그리고 malate dehydrogenase의 동위효소 양상과 활성도를 분석한 결과 밴드의 수와 특이성 그리고 밴드 활성 등에 현저한 차이를 보여주었으며 또한 이들 동위효소의 효소 활성도 측정 결과 EC에서 훨씬 더 높게 나타났다. NEC에는 나타나지 않은 EC의 특이 밴드와 강한 밴드 활성 그리고 높은 효소 활성 등은 EC의 형태적, 분화능과의 관련성을 내포하고 있다. 이러한 결과들은 이들 효소의 특이 밴드들이 벼에서 EC의 생화학적 표지자로서 사용될 수 있음을 내포하고 있다.

주요어: 배발생 세포, 비배발생 세포, 동위효소

식물 조직으로부터 유기된 캘러스는 형태적 특징과 배발생 능력에 따라 배발생 세포(embryogenic cell, EC)와 비배발생 세포(nonembryogenic cell, NEC)로 분류할 수 있으며(Nabors *et al.*, 1983), 이러한 캘러스의 형태와 재분화능은 유전자 발현에 있어서의 서로 다른 차이를 반영한다(Chen and Luth, 1987). 그런데 EC로의 유기율이 저조하고 NEC로의 전환율이 높은 벼와 같은 주요 작물에서의 EC로의 발달기작 규명과 이로부터 재분화의 극대화는 새로운 품종 개발은 물론 유전자 조작에 의한 신행질의 창출과 도입에 절대적으로 요구되고 있다. 지금까지 EC의 특성에 관한 연구로는 주로 EC로의 발달과 NEC로의 발달구분이 뚜렷한 당근(Chibbar *et al.*, 1988; Franz *et al.*, 1989; Joersbo *et al.*, 1989) 등에서 이루어져 왔으며, EC와 NEC의 선별은 주로 형태적 특징에 의하여 가능하지만 생화학적 지표 또한 매우 유용하다. EC와 NEC의 생리, 생화학적 차이에 대해서는 단백질 양상(Chen and Luth, 1987; Stirm and Jacobsen, 1987), 에틸렌 생성(Wann *et al.*, 1987), 지방산 조성(Warren and Fowler, 1979), antigen (Kiyosue *et al.*, 1990), polyamine 함량(Montague *et al.*, 1978, 1979) 등이 보고되어 있지만 동위효소의 변이는 발생과정이나 생리적 변화에 따라 매우 다양하게 발현함으로써(Scandalios, 1974) 유용한 생화학적 표지자로서 사용될 수 있다. 최근, 생화학적으로

분석할 수 있는 표지 단백질로 peroxidase isozyme(Kay and Basile, 1987; Fransz *et al.*, 1989; Joersbo *et al.*, 1989), esterase isozyme(Chibbar *et al.*, 1988), acid phosphatase(Franz *et al.*, 1989), malate dehydrogenase(Rao *et al.*, 1990), glutamate dehydrogenase(Franz *et al.*, 1989) 등의 발현 양상을 분석하여 그 표지자로 삼고자 하는 연구가 시도되었지만 벼와 같은 단자엽 식물에서의 표지 단백질 발현 양상 등에 관한 EC의 특성에 관한 연구는 매우 미진한 실정이다. 식물은 발생과 성장중에 단백질 발현의 극적인 변화를 받는데(Kumar and Gupt, 1985), peroxidase는 식물의 성장과 분화에 관련되는 효소로 조직과 기관 등에 따라 다양하게 나타나며(Arnison and Boll, 1976; Bassiri and Calson, 1979), 체세포 배발생 과정의 초기 지표로서 알려져 있다(Wochok and Burleson, 1974; Krsnik-Rasol *et al.*, 1982). 특히, esterase는 여러 식물에서 체세포 배발생 과정의 생화학적 표지자로서 알려져 있으며 발생이나 분화에 관여한다(Everett *et al.*, 1985; Chibbar *et al.*, 1989; Coppens and Dewitte, 1990). Acid phosphatase는 Franz 등(1989)에 의해 체세포 배발생 단계에서 독특하게 발현되는 동위효소로 보고되어 있으며 malate dehydrogenase는 Rao 등(1990)이 옥수수에서 EC와 NEC의 특이적 발현양상을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 벼 성숙종자로부터 유기된 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스에서 특이하게 발현되는 peroxidase, esterase, acid phosphatase, malate dehydrogenase 동위효소의 발현 양상과 활성도를 비교, 분석하여 EC 표지자 단백질로서의

\*교신저자: Fax (062) 520-6872  
© 한국식물학회 [서울] 1995

이용방안을 확립하여 벼 조직배양 기법의 체계적인 발전에 기여하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 캘러스 유도 및 배양

벼(*Oryza sativa* L. cv. Kye Hwa) 성숙종자를 70%(v/v) ethanol과 5%(v/v) sodium hypochlorite 용액에 각각 10분간 침적한 후 무균수로 3회 세척한 다음 2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 3% sucrose, 0.8% agarose가 첨가된 MS(Murashige and Skoog, 1962) 고형배지에 치상하여 27°C 암상태하에서 배양하였으며, 2주 후 배(embryo)로부터 유기된 캘러스만을 Nabors 등(1983)의 방법으로 해부현미경하에서 분리하여 동일 조성의 배지에서 2주 간격으로 4주 동안 배양하였다.

### 배발생 세포의 현탁배양

EC와 NEC로 선별된 캘러스를 2 mg/L 2,4-D, 6 mM proline, 200 mg/L casein hydrolysate가 첨가된 N6 액체배지로 옮겨 120 rpm으로 동일조건하에서 현탁배양하였으며, 1주일 간격으로 배지를 교환해 주면서 새로이 형성된 세포질이 충분한 구형의 배발생 세포만을 선별 배양하였다(Vasil and Vasil, 1984).

### Peroxidase 추출 및 활성도 측정

Peroxidase 추출과 활성도 측정은 Grison과 Pilot(1985)의 방법을 수정하여 사용하였으며, 각 시료를 막자사발로 마쇄시킨 후 66 mM 인산완충용액(pH 6.0)을 첨가하여 12,000 g에서 15분간 원심분리하여 상정액을 조효소원으로 사용하였다. 효소 활성도는 40 mM 인산완충용액(pH 6.5), 10 mM guaiacol과 조효소원을 첨가하여 30°C에서 반응시킨 다음 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 정량은 표준단백질로 BSA를 사용하여 Bradford(1976) 방법으로 정량하였다.

### Esterase 추출 및 활성도 측정

Esterase의 추출과 반응액 조제는 Coppens와 Gillis(1987)의 방법을 변형하여 시행하였으며 각 시료를 막자사발을 이용하여 마쇄시킨 후 100 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.2)을 첨가하여 12,000 g에서 5분간 원심분리하여 얻어진 상정액을 조효소원으로 사용하였다. 효소 활성도는 100 mM 인산완충용액(pH

6.0)에 기질로서  $\alpha$ -naphthylacetate를 사용하였고 fast blue RR salt를 첨가하여 30°C에서 반응시킨 후 290 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Acid phosphatase 추출 및 활성도 측정

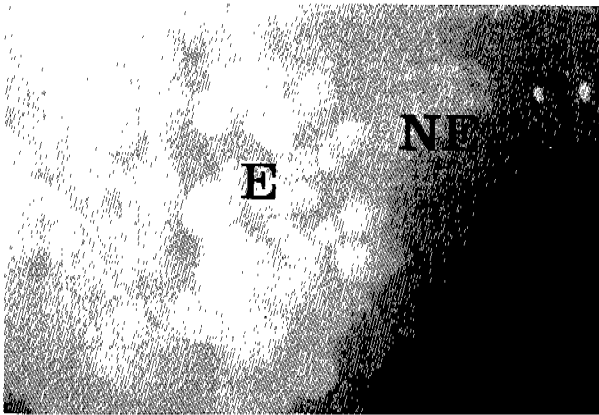
Acid phosphatase 추출과 반응액 조제는 Paul과 Williamson(1987)의 방법을 변형하여 사용하였으며 각 시료를 막자사발을 이용하여 마쇄시킨 후 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF(phenylmethyl sulfonyl fluoride), 5 mM DTT가 첨가된 100 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)을 첨가하여 10,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상정액을 조효소원으로 사용하였다. 추출물의 효소 활성도는 *p*-nitrophenol phosphate(pNPP)를 기질로 사용하여 효소 반응생성물인 *p*-nitrophenol을 비색정량함으로써 측정하였다. 1 mM pNPP가 포함된 50 mM Na-citrate 완충용액(pH 4.6)에 효소액을 가하여 25°C에서 생성되는 *p*-nitrophenol의 흡광도(470 nm)를 측정하였으며 효소단위 1 unit는 25°C에서 1분 동안에 1  $\mu$ mol의 *p*-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 결정하였다.

### Malate dehydrogenase 추출 및 활성도 측정

Malate dehydrogenase 추출과 활성도 측정은 Queiroz-Claret와 Queiroz(1992)의 방법을 변형하여 사용하였으며 시료를 0.2 M Tris 완충용액(pH 7.5)와 혼합하여 마쇄한 다음 10,000 g에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상정액을 사용하였다. 활성도 측정은 1.5 mM NADH를 함유한 Tris 완충용액(pH 7.5)에 7.6 mM oxaloacetate를 포화시켜 25°C, 340 nm에서 측정하였다. 효소단위 1 unit는 1분 동안 1  $\mu$ mol의 NADH를 감소시키는 효소량으로 결정하였다.

### 등전점 전기영동 및 활성 염색

등전점 전기영동은 Stegman과 Park(1979)의 방법을 변형하여 시행하였으며 1% ampholite(Bio Rad, pI 3-10)를 포함하는 6% acrylamide gel을 사용하여 200 V에서 3시간, 400 V에서 1시간 동안 4°C 하에서 진행하였고 이때 양극 용액은 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 음극 용액은 0.2 M NaOH를 사용하여 실시하였다. Peroxidase isozyme의 활성 염색은 Chen 등(1970)의 방법을 변형하여 사용하였으며 50 mM 인산완충용액(pH 7.0)과 1% guaiacol, 0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 혼합하여 발색하였다. Esterase의 발색 반응은 Tanksley와 Orton(1983)의 방법을 변형하여 실시하였으며  $\alpha$ -naphthyl acetate와  $\beta$ -naphthyl acetate 0.05%, fast blue RR salt 0.01%가 첨가된 100 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)



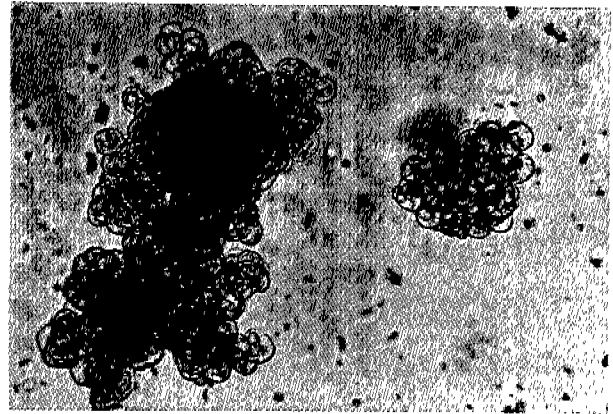
**Fig. 1.** Comparison of embryogenic (E) callus and non-embryogenic (NE) callus induced from rice mature seed on MS solid medium containing 2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin. E callus appears white and compact whereas NE callus yellow to translucent and crystalline.

에서 반응시켜 발색하였으며, 7% acetic acid에서 탈색 및 고정 후 확인하였다. Acid phosphatase 활성 염색은 Franz 등(1989)의 방법을 변형하여 사용하였으며 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, α-naphthyl acetate 0.05%, fast blue RR salt 0.01%가 첨가된 1 M Na-acetate 완충용액(pH 4.8)에서 반응시켜 확인하였다. Malate dehydrogenase 활성 염색은 Rao 등(1990)의 방법을 변형하여 사용하였으며 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 2 mM malate, 1 mM NAD, 0.5 mM MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), 0.1 mM PMS(phenazine methosulfate)가 포함된 0.2 M Tris 완충용액(pH 7.0)에서 반응시켜 확인하였다. 이때 겔의 pH 구배는 표준단백질을 사용하여 측정하였으며, 표준단백질로는 phycocyanin(pI 4.45, 4.65, 4.75), β-lactoglobulin B(pI 5.1), bovine carbonic anhydrase(pI 6.0), human carbonic anhydrase(pI 6.5), equine myoglobin(pI 6.8, 7.0), human hemoglobin A(pI 7.1), human hemoglobin C(pI 7.5), lentil lectin(pI 7.8, 8.0, 8.2), cytochrome c(pI 9.6)를 각각 사용하였다.

**결 과**

**캘러스 유도 및 현탁배양**

계화벼의 성숙종자로부터 배발생 캘러스를 유도하기 위해 벼 종자를 2,4-D 2 mg/L 및 kinetin 0.5 mg/L가 첨가된 MS 배지에 치상하여 27°C 암상태에서 배양한 결과 형태적으로 희고 단단한 배발생 캘러스와 황갈색의 부드러운 비배발생 캘러스의 두 종류가 유도되었다(Fig. 1). 이러한 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스를 2,4-D 2 mg/L, proline 6 mM, 200



**Fig. 2.** Embryogenic cell suspension cultures were established in N6 liquid medium after 4 months induced from rice mature-seed derived embryogenic callus. Cells of embryogenic suspension culture were composed of densely cytoplasmic and rounded.

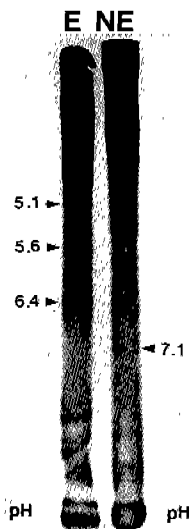


**Fig. 3.** Nonembryogenic cell suspension cultures were established in N6 medium after 4 months induced from rice mature-seed derived nonembryogenic callus. Cells of nonembryogenic suspension culture were composed of large and elongated.

mg/L casein hydrolysate가 첨가된 N6 배지에 옮겨 3개월 동안 현탁배양한 결과 배발생 캘러스의 배지에서는 세포질이 충만하고 둥근 모양의 빠르게 성장하는 세포들이 얻어졌지만(Fig. 2), 비배발생 캘러스의 배지에서는 세포질이 적고 세포가 신장된 비교적 느리게 성장하는 세포들이 나타났다(Fig. 3).

**Peroxidase 동위효소 양상 및 활성도 측정**

EC와 NEC의 peroxidase 동위효소 양상을 확인하기 위하여 등전점 전기영동한 결과(Fig. 4), peroxidase 동위효소 양상은 pI 3-10의 범위에서 다양하게 나타났지만 밴드수와 강도 그



**Fig. 4.** Peroxidase isozyme pattern analysed on isoelectric focusing in a pH range 3-10 from embryogenic (E) cells and non-embryogenic (NE) cells of rice.

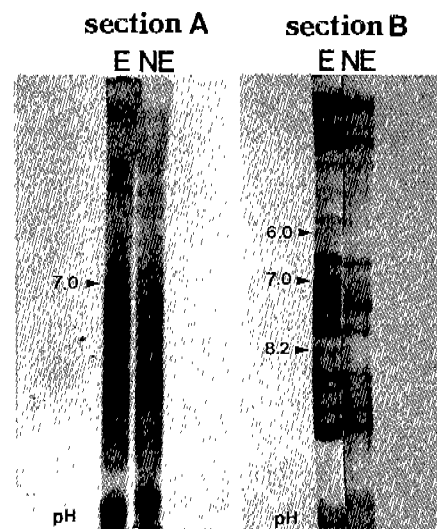
**Table 1.** The enzyme activities of peroxidase and esterase in embryogenic (E) and nonembryogenic (NE) suspension cultured cells

Enzyme	Cell	Protein (mg)	$A_{470}/\text{min}$
Peroxidase	E	0.17	0.84
	NE	0.16	0.38
Esterase	E	0.15	1.35
	NE	0.13	0.83

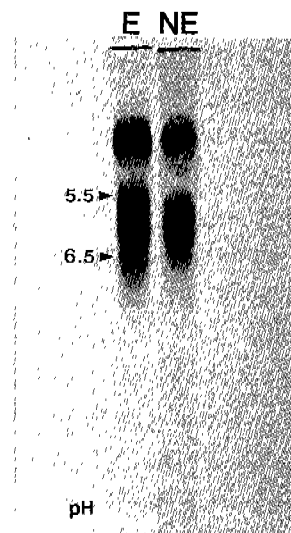
리고 밴드 특이성에 있어서 EC와 NEC의 두드러진 차이를 보여주었다. 총 밴드 수에 있어서 EC는 16개, NEC는 13개로 나타났으며 12개의 밴드가 공통적으로 나타났다. 특히 pI 5.1, 5.6, 6.4는 EC에 있어서, pI 7.1은 NEC에 있어서 각각 특이적인 양상을 보여주었다. 또한 pI 3-5 범위의 동위효소들은 매우 활성이 강하게 나타나는 반면, pI 6-7 범위의 동위효소들은 낮은 활성을 보여주었다. 효소의 활성도 측정 결과 EC는 NEC보다 훨씬 더 높게 나타났다(Table 1).

#### Esterase 동위효소 양상 및 활성도 측정

Esterase 동위효소 양상은 EC와 NEC의 가장 확실한 차이를 보여주었는데 특히 EC는 NEC보다 많은 밴드수와 특이성 그리고 강한 밴드활성을 나타냈다(Fig. 5).  $\alpha$ -Naphthyl acetate의 염색에 의한 14개의 밴드는 공통적으로 나타났지만 pI 6.0, 7.0, 8.2는 EC에서 매우 특이적으로 나타났다.  $\beta$ -Naphthyl acetate 염색에 의해서는 13개의 밴드가 공통적으로 나타났지만 pI 7.0



**Fig. 5.** Characterization of esterase isozyme pattern analysed on isoelectric focusing in a pH range 3-10 from embryogenic (E) cells and nonembryogenic (NE) cells of rice. Section A is stained with  $\alpha$ -naphthyl acetate, and section B is stained with  $\beta$ -naphthyl acetate.



**Fig. 6.** Acid phosphatase isozyme pattern analysed on isoelectric focusing in a pH range 3-10 from embryogenic (E) cells and non-embryogenic (NE) cells of rice.

이 EC에서 특이적으로 관찰되었으며 전반적으로 EC는 NEC보다 훨씬 더 강한 밴드활성을 보여주었다. Table 1은 EC와 NEC에 따른 esterase 활성도를 측정한 결과로 EC에서 더 높은 것으로 나타났다.

#### Acid phosphatase 동위효소 양상 및 활성도 측정

(Amison and Boll, 1976; Everett *et al.*, 1985; Coppens and Gillis, 1987). 이러한 esterase 동위효소의 EC 특이 밴드양상과 활성이 이후 체세포 배발생 과정의 조절인자로 작용한다고 하였는데(Coppens and Gillis, 1987), 이렇게 배양조건이나 분화단계에서 매우 특이적으로 나타나는 esterase 동위효소의 밴드양상과 활성은 벼 세포배양시 EC와 NEC 형성 그리고 이후 EC의 체세포 배발생 경로와 NEC의 기관분화에 있어서 각각 서로 다른 특이적인 생리적 작용을 나타내며 아울러 esterase 동위효소는 분화와 발생에 따라 독특하게 발현되는 중요한 표지자인 것으로 사료된다.

EC와 NEC의 acid phosphatase 동위효소 양상은 밴드 특이성과 활성도에 있어서 각각 차이를 보여주었으며 pI 5.5, 6.5가 EC에 있어서 특이적으로 나타났고 또한 높은 비활성도를 보였는데, Franz 등(1989)은 EC의 특이 밴드가 체세포 배단계에서 나타난 밴드 양상과 유사하게 존재하는 것으로 보고하였으며, 본 실험 결과 나타난 EC의 특이 밴드가 그러한 분석과 유사한 것으로 사료된다.

또한 malate dehydrogenase는 총 7개의 밴드중 3개의 밴드가 EC에 특이적으로 존재함으로써 EC와 NEC의 밴드 양상이 크게 다른 것으로 확인되었는데, Rao 등(1990)도 EC와 NEC 사이에서 각각 특이적인 밴드를 관찰하여 보고한 바 있다. 특히 pI 4.8, 5.4는 매우 약한 밴드활성을 보여주고 있어 EC에서만 특이적으로 존재하는 것인지 확실치 않으나 pI 5.4는 EC에 특이적이면서 매우 강한 밴드 활성을 보여주고 있어 EC의 생화학적 특성을 나타내는 주된 밴드로 여겨진다.

이러한 효소 외에도 glutamate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase 등이 분석되었으나(데이터 미제시) 옥수수 등에서 의 보고(Everett *et al.*, 1985)와는 달리 발현양상의 뚜렷한 차이를 볼 수 없었는데, 이는 품종이나 배양 조건 등에 따라 다양하게 발현하는 결과로 보여지며 또한 벼에 있어서 EC와 NEC 형성에 옥수수 등의 것과는 다른 특이 단백질의 관여를 내포하고 있다.

현재 이러한 배발생 세포에 대한 기원은 잘 이해되지 않고 있지만 EC와 NEC는 동일한 genotype, explant 그리고 동일한 배양조건으로부터 유도되어 동일한 배양조건하에서 배양한 미분화 상태의 세포임에도 불구하고 이러한 동위효소 발현양상의 분명한 차이는 형태적으로 명확한 특징을 갖는 EC와 NEC의 특이 단백질이 대사 과정에 관여하는 서로 다른 유전자 발현에 의해서 조절된다는 것을 보여주고 있으며(Chen and Luthe, 1987), 몇몇 보고들은 체세포 배발생 과정에 관여하는 특정 단백질들이 형태적인 차이가 나타나기 전에 이미 EC에 존재할 것으로 보고하였는데(Giuliano and Terzi, 1985; Wilde *et al.*, 1989), 본 실험 결과 나타난 이러한 생화학적 차이는 EC의 밴드 양상과 활성이 체세포 배발생을 통한 식물체 제

분화에 연관된다는 보고(Coppens and Dewitte, 1990)를 고려할 때 EC와 NEC의 이후 각각 서로 다른 분화과정을 의미하며 특히 EC에서 나타나는 특이 밴드와 강한 밴드활성 그리고 높은 효소활성 등이 아마도 체세포 배발생 과정의 주된 인자가 될 것으로 사료된다.

이러한 결과는 벼 체세포 배발생 과정에 대한 EC와 NEC를 구별짓는 초기 배양환경의 표지자로서 사용될 수 있을 것이며 앞으로 이러한 두 세포 사이의 형태적 그리고 분화능에 관련된 EC 및 NEC에 대한 단백질 및 유전자에 대한 연구가 더욱 더 상세히 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 사 사

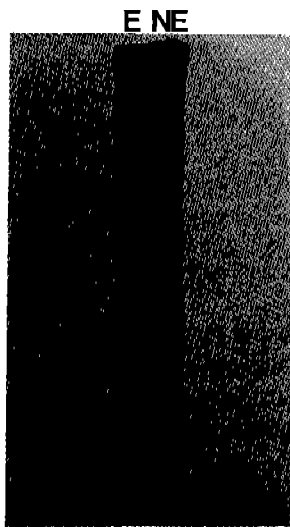
본 연구는 1994년도 과학재단 연구비(941-0500-022-2) 지원에 의해 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

- Amison, P.G. and W.G. Boll. 1976. The effect of 2,4-D and kinetin on the peroxidase activity and isoenzyme pattern in cotyledon suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender). *Can. J. Bot.* **54**: 1857-1867.
- Bassiri, A. and P.S. Carlson. 1979. Isozyme patterns in tobacco plant parts and their derived calli. *Crop Sci.* **19**: 909-914.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Chen, L.J. and D.S. Luthe. 1987. Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Sci.* **48**: 181-188.
- Chen, S.L., R. Towill and J.R. Loewenberg. 1970. Isozyme patterns in developing *Xanthum* leaves. *Physiol. Plant.* **23**: 434-443.
- Chibbar, R.N., P.L. Polowick, W.J. Newsted, J. Shyluk and F. Georges. 1989. Identification and isolation of a unique esterase from the medium of non-embryogenic cell line of cultured carrot cells. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **18**: 47-53.
- Chibbar, R.N., J. Shyluk, F. Georges, C.S. Mallard and F. Constabel. 1988. Esterase isozymes as markers of somatic embryogenesis in cultured carrot cells. *J. Plant Physiol.* **133**: 367-370.
- Cordewener, J., H. Booij, H. Van Der Zandt, F. Van Engelen, A. Van Kammen and S. De Vries. 1991. Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta* **184**: 478-486.
- Coppens, L. and D. Dewitte. 1990. Esterase and peroxidase zymograms from barley (*Hordeum vulgare* L.) callus

**Table 2.** The enzyme activities of acid phosphatase and malate dehydrogenase in embryogenic (E) and nonembryogenic (NE) suspension cultured cells

Enzyme	Cell	Protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)
Acid phosphatase	E	4.27	6.7	1.57
	NE	3.87	4.2	1.09
Malate dehydrogenase	E	4.29	2.2	0.51
	NE	3.94	1.9	0.48



**Fig. 7.** Profile of malate dehydrogenase isozymes were visualized with separation on isoelectric focusing in a pH range 3-10 from embryogenic (E) cells and nonembryogenic (NE) cells of rice.

Acid phosphatase 동위효소 양상은 EC와 NEC에 있어서 유사하게 나타남으로써 밴드양상은 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 6). 총 6개의 밴드가 나타났으며 이중 pI 5.5, 6.5의 밴드가 EC에서 특이적으로 나타났으며 EC의 모든 밴드는 NEC에 비해 강한 활성을 보여주었다. 활성도 측정결과 EC에서 더 높은 것으로 나타났다(Table 2).

**Malate dehydrogenase 동위효소 양상 및 활성도 측정**

Malate dehydrogenase 동위효소 양상에 있어서 총 7개의 밴드가 나타났으며(Fig. 7) EC와 NEC는 4개의 밴드를 공유하고 3개의 밴드가 EC에 특이적으로 나타났다. EC의 특이 밴드중 pI 4.8과 pI 5.0은 매우 약하게 나타났지만 pI 5.4의 밴드는 매우 강한 활성을 보여주었다. 활성도를 측정한 결과 EC에서 약간 더 높은 것으로 나타났다(Table 2).

**고 찰**

동위효소는 식물조직 배양에 있어서 매우 민감한 표현형 및 인자형 표지자로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 기내에서의 분화 등을 연구하는데 사용 가능하며, 특히 EC와 NEC의 동위효소 양상 분석은 배양중에 발현되고 유지되는 생화학적 특징과 분화과정중에 일어나는 생리, 생화학적 변화를 해석하는데 매우 유용하다(Scandalion, 1974). 본 실험에서는 EC와 NEC에 따른 peroxidase, esterase, acid phosphatase 및 malate dehydrogenase 동위효소의 밴드양상과 활성도를 비교, 분석하였는데, peroxidase 동위효소는 pI 5.1, 5.6, 6.4가 EC에 특이적으로 나타났으며 pI 7.1이 NEC에 특이적으로 나타났다. 그리고 전반적으로 EC의 밴드 활성이 NEC의 것보다 훨씬 더 강하게 나타났는데, 특히 pI 6.4는 EC의 특이 밴드로서 매우 강한 활성을 나타냈다. 이러한 결과들은 각 동위효소의 상대적 함량이 생리적 상태에 따라 변화하였음을 나타내는 것을 의미한다. Joersbo 등(1989)은 EC의 특이밴드와 강한 밴드 활성이 체세포 배발생과정을 유도하는데 관여하는 것으로 확인하였으며 EC와 NEC의 특이 밴드가 이후 서로 다른 분화과정을 일으키는데 관여할 것으로 보고하고 있다(Kay and Basile, 1987; Coppens and Dewitte, 1990; Rao *et al.*, 1990). 특히 Cordewener 등(1991)은 당근에서 체세포 배발생이 억제된 세포가 peroxidase에 의해서 회복될 수 있음을 확인하였는데 이는 peroxidase가 체세포 배발생에 직접적으로 관여하는 중요한 효소라는 것을 나타내고 있다. 아직 이러한 동위효소 각각의 역할에 대해서는 그 조절 양상이 알려지지 않았으나 EC와 NEC의 밴드 특이성은 peroxidase가 서로 다른 유전자의 발현 조절을 받고 있음을 의미하며 적어도 서로 다른 두 세포의 형태적 그리고 이후 분화과정에 직접적으로 관여할 것으로 사료된다.

Esterase 동위효소 양상에 있어서  $\alpha$ -naphthyl acetate는 choline esterase에 의해서만 활성 염색이 되지만  $\beta$ -naphthyl acetate는 aryl과 choline esterase를 염색할 수 있다(Chibbar *et al.*, 1988). 본 실험에서  $\alpha$ -naphthyl acetate에 의한 밴드양상은 pI 6.0, 7.0, 8.2가 EC에서만 매우 특이적으로 나타났으며,  $\beta$ -naphthyl acetate에 의한 밴드양상은 EC에 있어서만 pI 7.0이 매우 특이적으로 존재하였는데 pI 7.0은 서로 다른 염색에 의한 공통적인 특이 밴드 양상과 더불어 매우 강한 밴드 활성을 보여주어 EC의 생화학적 특성을 반영하는 주된 밴드로 여겨진다. 또한 EC에 있어서 높은 활성이 보여졌는데, Chibbar 등(1988)은 당근 세포의 배형성 단계에 따라 esterase 활성을 조사하여 체세포 배발생 과정의 표지자로 보고하였다. 또한 보리, 옥수수, 당근 등의 세포분화와 배양조건 등에 따라 esterase의 전기영동 양상이 다르게 나타난다고 보고된 바 있다

- as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis. *Plant Sci.* **67**: 97-105.
- Coppens, L. and E. Gillis.** 1987. Isozyme electrofocusing as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis in callus tissue of *Hordeum vulgare* L. *J. Plant Physiol.* **127**: 153-158.
- Everett, N.P., N.J. Wach and J. Asworth.** 1985. Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of the maize inbred. *Plant Sci.* **41**: 133-140.
- Fransz, P.F., N.C.A. de Ruijter and J.H.N. Schel.** 1989. Isozyme as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus cultures of maize. *Plant Cell Rep.* **8**: 67-70.
- Grisson, R. and P.E. Pilot.** 1985. Cytoplasmic and isoperoxidase in growing maize roots. *J. Plant Physiol.* **118**: 189-199.
- Giuliano, G. and M. Terzi.** 1985. Somatic Embryogenesis. Incremento Produttività Risorse Agricole, Roma, pp. 39-43.
- Joersbo, M., J.M. Andersen, F.T. Okkels and R. Rajagopal.** 1989. Isoperoxidase as marker of somatic embryogenesis in carrot cell suspension cultures. *Physiol. Plant.* **76**: 10-16.
- Kay, L.E. and D.V. Basile.** 1987. Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *J. Plant Physiol.* **84**: 99-105.
- Kiyosue, T., J.G. Dong, S. Satoh, H. Kamada and H. Harada.** 1990. Detection of embryogenic cell antigen in carrot. *Plant Cell Physiol.* **31**: 947-950.
- Krsnik-Rasol, M., S. Jelaska and D. Serman.** 1982. Isoperoxidase-Early indicators of somatic embryoid differentiation in pumpkin tissue. *Acta Bot. Croat.* **41**: 33-39.
- Kumar, R. and V.P. Gupta.** 1985. Isozyme studies in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Theor. Appl. Genet.* **70**: 107-110.
- Montague, M.J., T.A. Armstrong and E.G. Jaworski.** 1979. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. 1. Changes in arginine decarboxylase activity. *J. Plant Physiol.* **62**: 430-433.
- Montague, M.J., J.W. Koppenbrink and E.G. Jaworski.** 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. 1. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *J. Plant Physiol.* **62**: 430-433.
- Murashige, T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 73-497.
- Nabors, M.W., J.W. Heyser, T.A. Dykes and K.J. Demott.** 1983. Long duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. *Planta* **157**: 385-389.
- Paul, E.M. and V.M. Williamson.** 1987. Purification and properties of acid phosphatase-1 from a nematode-resistant tomato cultivar. *J. Plant Physiol.* **84**: 399-403.
- Queiroz-Claret, C. and O. Queiroz.** 1992. Malate dehydrogenase forms a complex with and activates phosphoenolpyruvate carboxylase from crassulacean acid metabolism plants. *J. Plant Physiol.* **139**: 385-389.
- Rao, K.V., P. Suprasanna and G.M. Reddy.** 1990. Biochemical changes in embryogenic and non-embryogenic calli of *Zea mays* L. *Plant Sci.* **66**: 127-130.
- Scandalios, J.G.** 1974. Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**: 255-258.
- Stegeman, H. and W.M. Park.** 1979. Rice protein patterns. Comparison by various PAGE-technique in slabs. *A. Acker Pflanzen.* **148**: 446-454.
- Stirn, S. and H.J. Jacobsen.** 1987. Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Rep.* **6**: 50-54.
- Tanksley, S.D. and T.J. Orton.** 1983. Enzyme activity staining. In *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Vol. 1. S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 469-516.
- Vasil, V. and I.K. Vasil.** 1984. Isolation and maintenance of embryogenic cell suspension cultures of gramineae. In *Cell Culture and Somatic Genetics of Plants*, Vol. 1. I. K. Vasil (ed.), Academic Press, New York, pp. 152-158.
- Wann, S.R., M.A. Johnson, T.L. Noland and J.A. Carlson.** 1987. Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst. *Plant Cell Rep.* **6**: 39-42.
- Warren, G.S. and M.W. Fowler.** 1979. Changing fatty acid composition during somatic embryogenesis in cultures of *Daucus carota*. *Planta* **144**: 451-454.
- Wilde, H.D., W.S. Nelson, H. Booij, S.C. Vries and T.L. Thomas.** 1988. Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta* **176**: 205-211.
- Wochok, S.Z. and B. Burleson.** 1974. Isoperoxidase activity and induction in cultured tissue of wild carrot. A comparison of proembryos and embryos. *Physiol. Plant.* **31**: 73-75.

(1994. 12. 27 接受)

---

Characterization and Cloning of Genes Related to  
Embryogenic Cells in Rice

- Characterization of Isozymes Related to Embryogenic Cells -

Jung, Byung Kyun, Yun Woong Paek, Kyeong Min Ko,  
Baek Hie Nahm<sup>1</sup> and Baik Hwang\*

*Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea; and*

*<sup>1</sup>Department of Biology, Myongji University, Yongin 449-791, Korea*

ABSTRACT

Embryogenic cell (EC) suspension cultures derived from mature seed-embryo of rice (*Oryza sativa* L. cv. Kye Hwa) were used for the expression patterns of isozyme and enzyme activity. EC suspension cultures were composed of cells that were densely cytoplasmic, potentially embryogenic. However, nonembryogenic cell (NEC) cultures were composed of large, elongated and vacuolated cells. These cells were analyzed for the isozyme pattern and enzyme activity of EC and NEC. Isozyme patterns of peroxidase, esterase, acid phosphatase and malate dehydrogenase exhibited striking difference in the total number of bands, specificity and intensity of band. Also, these isozymes showed very high activity in the EC. Specific band, band activity and higher enzyme activity of isozyme in EC was absent or low in NEC, which may indicate an association of these specific isozymes with morphological characterization and totipotency of embryogenic cells. These results indicate that specific pattern and activity of enzyme in EC could probably be used as a biochemical marker of EC in rice.

*Keywords* : embryogenic cell, nonembryogenic cell, isozyme

---

\*Corresponding author: Fax +82-62-520-6872