

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. BY4)의 캘러스로부터 *p*-Fluorophenylalanine 저항성 캘러스 선발 및 효소활성도 측정

오승철 · 소웅영 · 조덕이¹ · 오승용² · 양덕춘^{2*}
전북대학교 생물과학부, ¹우석대학교 생물학과, ²한국인삼연초연구원

p-Fluorophenylalanine Resistant Cell Line Selection and Enzyme Activity from Diploid and Haplod calli of *Nicotiana tabacum* cv. BY4

OH, Seung Cheol · SOH, Woong Young · CHO, Duck Yee¹ · OH, Seung Yong² · YANG, Deok Chun^{2*}

Department of Biological Science, Chonbuk National University, Chonju, 560-756, Korea

¹Department of Biology, Woosuk University Chonbuk, 565-800, Korea

²Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

ABSTRACT Calli were induced on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D by using the leaf explants of haploid which were derived from the diploid and haploid of *Nicotiana tabacum* cv BY4. These calli were subcultured on MS medium with the combination of 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L kinetin and 0.1 mg/L BAP. Cell propagation of diploid plants were good in a combination of 2.0 mg/L 2,4-D, 0.1mg/L BAP *in vitro* conditions, suspension cultures were conducted in equal condition. Homogenized suspension cultured cells were smeared 2.0 mL each on MS medium with 0~100 μ M PFP, to select the resistant colony to PFP, and were examined after 10d, 20d and 30d. Measurement of fresh weight of cells after 30d of culture shows that with more concentration of PFP in medium the fresh weight of the cells decreased. In case of diploid, selected callus was the highest *in vitro* treated with 5 μ M PFP. It was higher than control until 100 μ M PFP. The active degree of catalase was the highest *in vitro* with 5 μ M PFP but the lowest *in vitro* with 10 μ M PFP on the other hand, in case of haploid plant, the active degree of peroxidase and catalase was the highest *in vitro* treated with 50 μ M PFP. It's sure that enzyme active degree of between diploid and haploid had big differences.

Key word: Amino acid analogue, catalase, MIC (Minimum Inhibition Concentration), peroxidase, tobacco callus

서 론

돌연변이체는 생리학, 유전학 및 분자 생물학의 문제를 해결하는 데 중요한 연구재료 중의 하나이지만 자연상태에서 어떠한 저해제에 대한 저항성을 나타내는 변이의 출현확률은 매우 낮다. 따라서 인위적으로 돌연변이주를 선발하는 방법이 있다 (Negrutiu et al. 1984; Durand 1990). 돌연변이 유발원

으로는 많은 방법이 있으나 아미노산 유사체를 이용한 저항성 세포주의 선발은 식물체의 육종개발 및 2차 대사산물 생산 효율을 증가시키기 위해 시도되어 왔다 (Widholm 1977; Durand 1990). Lysine의 함량은 모든 곡류작물에서 낮고, 벼와 보리에서는 threonine, 옥수수에서는 tryptophan, 콩과 식물에서는 methionine의 함량이 다른 식물에 비해 부족한 것으로 알려졌다 (Widholm 1977; Gonzales et al. 1984), 이러한 문제점을 해결하기 위한 한 방법으로는 아미노산 유사체 저항성 개체를 선발하는 방법이 제시될 수 있다. 아미노산 유사체 저항성 개체가 특정 아미노산을 과잉생산하는 이유는

*Corresponding author. Tel 042-866-5434 Fax 042-862-2522
E-mail dcyang@gtr.kgtri.re.kr

저항성 개체의 아미노산 생합성 과정에 관여하는 피드백 기능의 변화에 기인된 것으로 알려져 있다 (Widholm 1972). 이러한 변화로 tryptophan과 phenylalanine이 과잉합성되었다는 많은 보고가 있다 (Palmer and Widholm 1975; Berlin and Widholm 1977). Carlson (1973)은 담배의 원형질체에서 돌연변이를 유발시키기 위해 EMS를 처리하여 methionine sulfoximine 저항성 돌연변이체를 선발하였다. 여기서 재생된 식물체는 methionine을 과잉생산하여 wildfire disease를 유발하는 *Pseudomonas tabachi*에 대한 저항성을 나타낸다고 보고되었으며, lysine과 threonine이 첨가된 배지에서 세포를 배양하여 lysine 합성능력이 높은 세포를 선발할 수 있게 되었다.

p-Fluorophenylalanine (PFP)는 phenylalanine을 과잉생산하고, 또한 PFP에 내성을 갖는 세포계는 페놀화합물의 함량이 높게 나타난다. 이러한 페놀화합물이 많이 축적되면 phenylalanine ammonua-lyase (PAL : EC.4.3.1.5)가 높은 활성도를 나타내는 것으로 알려져 있으며, peroxidase (EC.1.11.1.7)와 catalase (EC.1.11.1.6)의 활성도와 관련이 있는 것으로 보고되었다 (Berlin and Widholm 1977).

본 실험에서는 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. BY4)의 반수체와 이배체로부터 유도된 캘러스와 돌연변이 유발원으로 사용중인 PFP를 처리하여 형성된 저항성 세포주를 선발하였고, 정상적인 반수체와 이배체의 캘러스와 PFP 저항성 세포주에 있어서 이들 세포주의 peroxidase와 catalase의 효소활성도를 조사하였다.

재료 및 방법

담배 캘러스 유도 및 배양

한국인삼연초연구원 내 온실에서 유지되고 있는 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. BY4)의 이배체식물과 약배양으로부터 유도된 반수체식물의 잎절편을 캘러스 유도 재료로 하였다. 유도된 반수체 캘러스로부터 식물의 재생, 증식, 검정은 Oh 등 (1994)의 방법에 준하여 실시하였다. 캘러스 유도는 MS기본배지에 sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가하고 성장 조절물질은 2,4-D (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L)처리를 하였으며 pH 5.8로 맞춘 배지에 잎절편을 치상하여 온도 25±1°C, 조도 1900 lux, 광주기는 16/8 h의 조건에서 캘러스를 유도하였다. 캘러스의 증식은 2,4-D와 BAP, 카이네티이 첨가된 배지에서 실시하였다. 현탁배양은 캘러스를 1,000 µm 망에 통과시킨 후 식물생장 조절물질은 계대배양과 같은 동일조건으로 이루어졌으며, 배양조건으로는 shaking incubator에서 25 rpm, 온도 25±1°C로 하였다.

PFP 저항성 세포주 선발

p-Fluoro-DL-phenylalanine (PFP : FW 183.2)은 1~2 mL 1N 염산으로 용해시켜 증류수로 염산과 치환한 다음 0.22 µM membrane filter를 통한 진공여과 후 사용하였으며, 선발 배지에 도말하는 데 사용하는 agarose (Type VII: Low Gelling Temperature)는 0.8%에 2.0 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 포함된 MS액체배지를 삼각 플라스크에 30 mL 넣은 후 습열멸균하였다. 세포는 온도에 대한 스트레스를 적게 받도록 배지가 충분히 식은 후 무균적으로 첨가하였다. 선발배지는 2.0 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 첨가된 MS배지에 PFP를 0~200 µM로 첨가하여 pH를 맞춘 후 습열멸균하여 1회용 페트리디쉬에 25 mL씩 분주하였다. 평판배양에 사용한 재료는 현탁배양 15~20일 후 세포증식이 양호한 처리구를 선발하여 65~100 µm망에 이중여과된 세포를 사용하였다. 그리고 이 세포를 0.8% agarose를 이용하여 PFP (Palmer and Widholm, 1975)가 0~100 µM의 농도로 처리된 선발배지에 2 mL씩 평판배양하였다. 평판배양 후 10, 20, 30일 단위로 선발배지에서 형성되는 PFP 저항성 세포주라 사료되는 colony를 선발, 관찰하였다.

효소활성도 측정

PFP에 대한 저항성 세포주를 선발하여 peroxidase 및 catalase 등의 효소활성도를 측정하였다. 재료는 생중량 1 g을 eppendorf tube에 넣고 완충 용액을 1.4 mL 가한 후 4°C에서 유리봉으로 마쇄한 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 효소액으로 사용하였다. 효소 활성도의 측정은 효소반응액의 흡광도를 spectrophotometer (Beckman DU-6)로 측정하였다. Peroxidase (EC 1.11.1.7)의 활성도는 Chance와 Maehly (1955)의 방법에 준하여 측정하였으며, Catalase (EC 1.11.1.6)는 Yang (1985) 등이 제시한 Decoupling방법으로 측정하였다.

결 과

PFP 저항성 세포주 선발

이배체는 PFP 5 µM 처리구에서 배양 10일째가 되면서 노란색의 colony가 형성되었으며 그 크기는 직경 2 mm 정도였고 colony의 출현빈도는 매우 높았다. 배양 30일째가 되면서 대조구보다는 약간 저조하였지만 큰 차이는 없었다 (Table 1). PFP 10 µM 처리구에서도 PFP 5 µM 처리구와 마찬가지로 큰 차이는 없었고 PFP 25 µM 처리구에서는 배양 10일째가 되면서 페트리디쉬당 최소 20개 정도 형성되었고 배양 20일째 이후로는 colony의 출현빈도가 양호하였다. PFP 50 µM

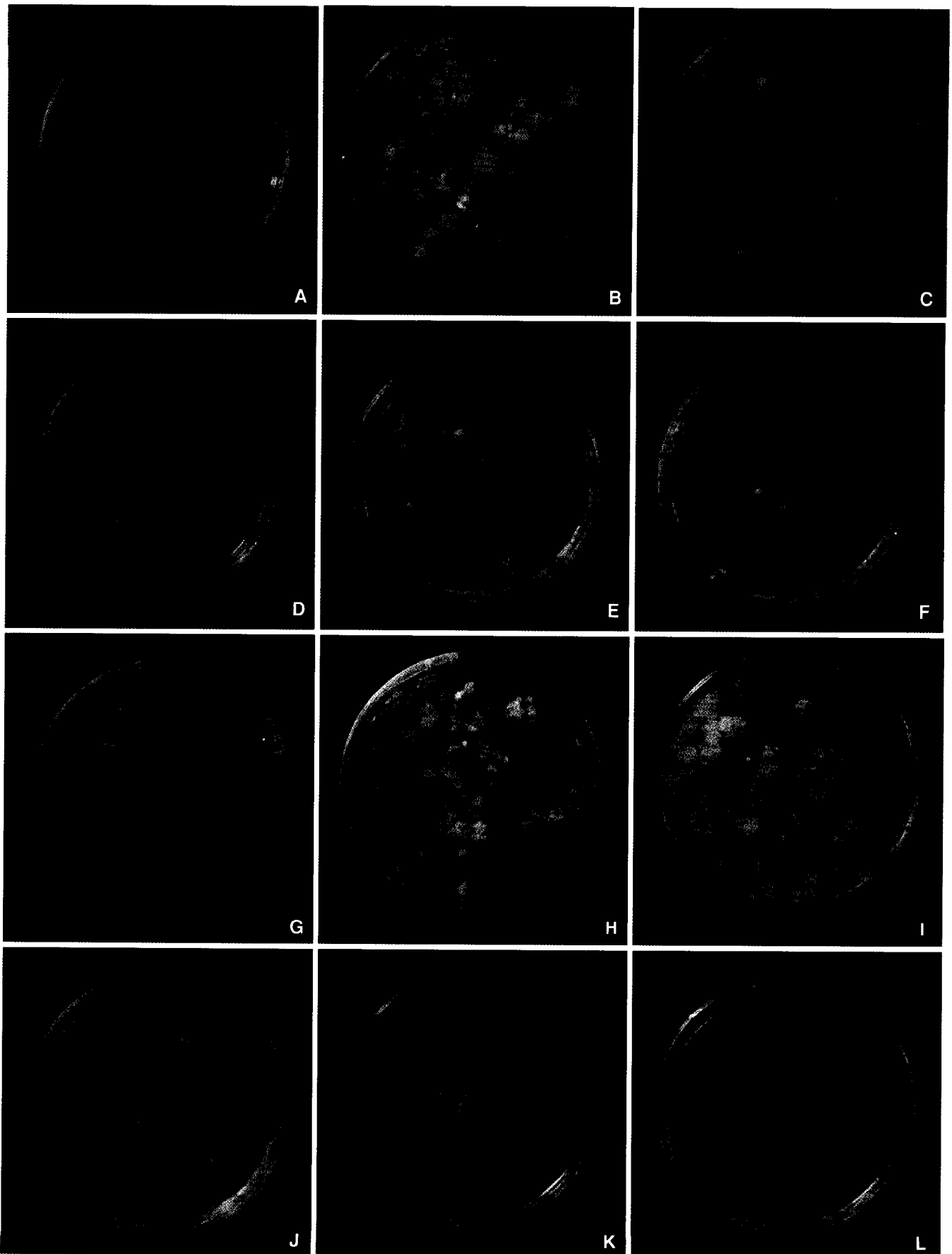


Figure 1. Callus formation from cell clump on the selection medium containing various concentration of *p*-fluorophenylalanine after 5-week. Cell clump derived from diploid plant (A-F), or from haploid plant (G-L). A, G: *p*-fluorophenylalanine free, B-F, H-L: various concentration of *p*-fluorophenylalanine (5, 10, 25, 50, 100 μ M).

처리구에는 배양 20일째 부터 colony가 출현되었으나 PFP 100 μM 처리구에는 그보다 낮은 경향으로 배양 20일째가 되면서 페트리디쉬당 65~70개의 colony가 형성되었고, 그 이후로도 숫자는 일정하게 유지가 되었다. PFP 200 μM 처리구에 있어서는 colony가 전혀 나타나지 않았으므로 본 실험에 있어서는 MIC의 설정은 PFP 100 μM 처리구로 설정하였다 (Figure 1A~F).

한편 반수체는 이배체와 비교하여 성장과 colony의 출현빈도율은 저조하였다. 이배체가 배양 10일째 되면서 colony가 형성된 반면 반수체는 대체로 배양 20일째 이후로부터 colony가 형성되었다. PFP 5 μM 처리구에서는 배양 20일째 colony의 형성이 매우 좋았으며 그 이후로도 성장이 왕성하였다. PFP 10 μM , PFP 25 μM 처리구의 경우도 PFP 5 μM 처리구인 경우와 비슷한 양상을 보였다. 그러나 PFP 50 μM 처

리구인 경우에는 배양 20일부터 colony가 형성되고 그 이후로 성장이 왕성하여 일정하게 유지가 되었다. 반면 PFP 100 μM 처리구에서, 또는 그 이상의 농도 처리구 (PFP 200 μM , PFP 300 μM)에서는 colony의 형성이 전혀 나타나지 않아서 MIC의 설정은 PFP 50 μM 로 설정하였다 (Figure 1G~L). 그러므로 처리구 농도가 증가할수록 형성된 colony의 크기, 형성빈도가 저조하였고 이배체의 경우와 차이를 나타내었다. 이때 PFP 단독처리시 MIC는 이배체 경우 100 μM 로 반수체에서는 50 μM 로 설정하였다 (Table 1). 또한 각각의 MIC에서 생중량은 PFP 100 μM 에서는 7.66 g을 나타내었으며, PFP 50 μM 에서는 5.93 g으로 비슷하였으나 이배체와는 켈러스의 형성이 저조하였다 (Figure 2).

저항성 세포주의 효소활성도

이배체와 반수체 켈러스로부터 PFP 처리시 형성되는 저항성세포주의 효소활성도의 측정에서 (Figure 3 A, B), Peroxidase의 경우 이배체는 대조구와 비교하여 PFP 5 μM 처리구에서 가장 높았으며 다른 처리구에서는 비슷한 양상을 나타내었다. 반수체는 PFP 50 μM 처리구에서 높았다. Catalase의 경우 이배체는 대조구와 비교하여 PFP 5 μM 처리구에서, 반수체는 PFP 50 μM 처리구에서 높았다.

Table 1. Effect of *p*-fluorophenylalanine on the formation of colonies from diploid and haploid callus of *Nicotiana tabacum* cv. BY4.

PFP Conc. (μM)	Days of treatment					
	10		20		30	
	Di	Ha	Di	Ha	Di	Ha
Control	+++	+	+++	+++	+++	+++
5	++	+	+++	+++	+++	+++
10	++	+	+++	++	+++	+++
25	+	-	++	++	+++	+++
50	-	-	++	+	+++	++
100	-	-	+	-	++	-
200	-	-	-	-	-	-

- : None (>5) + : Low (>10) ++ : Good (>150) +++ : Excellent growth (200<)
 Di : callus derived from leaf of diploid plant, Ha : callus derived from leaf of haploid plant.

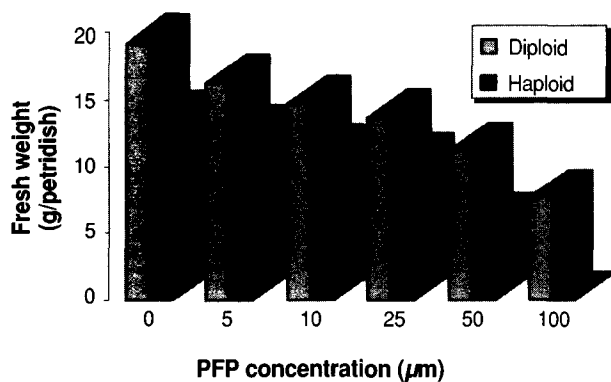


Figure 2. Effect of *p*-fluorophenylalanine on the growth of diploid and haploid callus derived from *Nicotiana tabacum* cv. BY4 on MS medium.

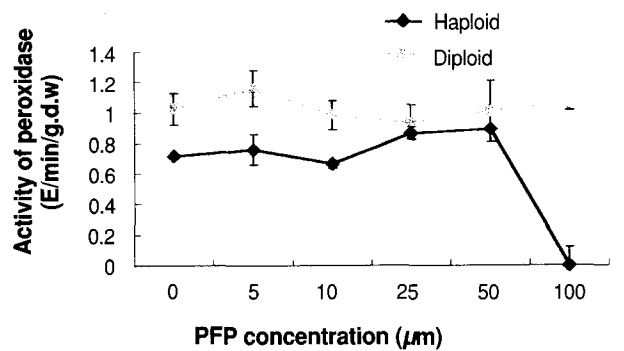
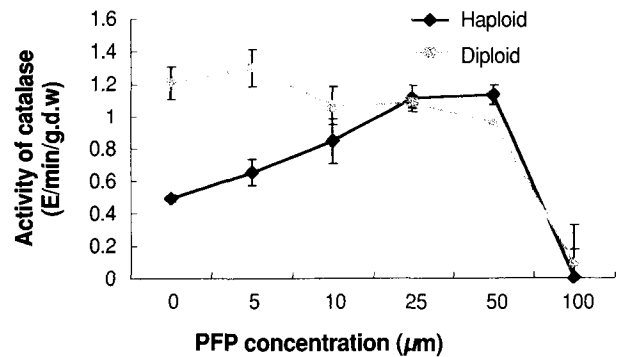


Figure 3. Activities of catalase and peroxidase of haploid and diploid calli treated with *p*-fluorophenylalanine of *Nicotiana tabacum* cv. BY4.

고 찰

배양세포에 처리된 PFP 농도가 증가할수록 형성되는 colony의 크기, 형성빈도, 켈러스 증식은 대조구보다는 저조한 생장률을 나타내었다. 그리고 PFP 단독처리시 설정한 최하저해농도는 이배체와 반수체 간에 100 μ M 및 50 μ M로 뚜렷한 차이를 나타냈다. 반수체 식물이 이배체 식물보다 더 저조하였고, 이배체 식물에서는 생중량이 점차 감소하였는데 반수체는 그 차이가 심하였다. 이러한 결과는 반수체 식물의 특성과 PFP의 처리에 의한 독성효과 때문으로 보인다. 이러한 결과는 이배체 담배에서 최하 저해농도 49 μ M에서 반수체는 생존하지 못한다고 하는 Gupta와 Carlson (1972)의 보고와 농도 차이는 있었으나 저해 경향은 유사하게 나타났다. 담배와 당근세포의 생장은 100 μ M PFP에서는 완전히 저해를 받지만 일단 선발된 저항성 세포주는 PFP가 없는 배지에서도 저항성을 유지하는 것으로 알려졌다 (Palmer and Widholm 1975). 반수체 *Nicotiana sylvestris* 식물에서 유도된 세포주가 이배체 식물에서 유도된 세포주보다 PFP에 대한 저항성이 더욱 강함을 보고하였다 (Dix and Street 1974).

PFP가 처리된 배양세포 중 반수체 식물이 저항성 세포주로서 먼저 선발할 때에는 그 유도율이 이배체에 비해 낮았으나 일단 선발된 세포주는 다른 생장저해제를 처리한 실험에서 생존을 등 여러 실험조건보다 양호하였다. 이러한 특징은 반수체의 형질에서 기인되는 것으로 사료되며, 이러한 반수체를 이용한 돌연변이를 유발시켜 유용한 형질을 선발한 것이 육종의 한 수단으로 이용되고 있다 (Oh 1994). 자연상태에서 특정 성장저해제에 대한 자연돌연변이율은 $10^{-6} \sim 10^{-8}$ 으로 낮기 때문에 따라서 인위적으로 돌연변이 유발원을 처리하여 돌연변이의 빈도를 증가시키고 있다 (Durand 1990). 오 (1994)는 담배의 이배체와 반수체 켈러스를 사용하여 PFP 저항성 세포주를 선발하고 이러한 세포주를 고농도의 카드뮴이 첨가된 배지와 PFP와 카드뮴이 조합처리된 처리구로부터 카드뮴 저항성 세포주를 선발하기도 하였다. 이러한 실험결과 아미노산 유사체는 돌연변이 유발원으로서도 가능성이 제시될 수도 있었다 (Widholm 1984). 아미노산 유사체를 처리하여 배양된 세포와 식물체 사이에는 아미노산 생합성에 관여하는 동위효소의 발현에 차이가 있는 것으로 알려져 있다 (Widholm 1980). 본 실험에서 사용한 PFP는 정상식물체보다 PFP가 처리된 저항성 세포주가 phenylalanin ammonium-lyase (PAL)의 활성도가 높다는 보고가 있다 (Gatherdole and Street 1976; Berlin and Widholm 1977). PAL의 활성도는 PFP에 민감하거나 저항성을 띤 담배켈러스와 phenylalanine을 과다하게 합성하는 담배켈러스에서 측정하였을 때 PFP의 저항성 담배켈러스는 PFP에 민감성을 나타내어 죽는 것보다 PAL의 활성도가 10~20배 높음을 알 수 있었으며, 계속된 배양에도 증가현상을 보였다. 또한 *Acer pseudopla-*

*tanus*에서 PFP 저항성 세포주를 선발하여 PAL의 활성도가 높아짐을 알 수 있었다 (Gatherdole and Street 1976). 본 실험 결과 PAL의 활성과 관계가 있으며 페놀화합물과 IAA의 함량을 조절하는 peroxidase와 중금속과 같은 독성의 해독에도 관련이 있는 catalase의 활성도를 조사한 결과 각 처리구에 있어서 효소활성도는 대조구에 비해서 높은 활성도를 나타내었으며 (Somashakaraiyah et al. 1992), 이배체와 반수체 간에도 차이가 있었다. 이러한 실험결과 반수체를 이용하는 것이 돌연변이 선발에 효과적임을 알 수 있었다. 또한 아미노산 유사체를 사용하여 선발된 세포주는 식물체내의 높은 효소활성도를 발현하므로 이를 사용하여 2차 대사산물 생산의 효율을 증가시킬 수 있다. 그밖에도 공업지대와 같은 오염지역, 간척지와 같은 불량토양, 그리고 제초제 저항성에 대한 연구 등과 같은 여러 분야에 폭넓게 응용되리라 사료된다.

적 요

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. BY4)의 이배체 식물과 약배양으로부터 유도된 반수체 식물의 잎절편을 사용하여 0.5 mg/L 2,4-D 단독처리구에서 켈러스를 유도한 후, 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L Kinetin 및 0.1 mg/L BAP를 조합처리하여 계대배양을 하였다. 이배체에서는 2.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L 카이네틴의 조합처리구에서, 반수체는 2.0 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP 조합처리구에서 세포증식이 양호하였으므로, 현탁배양도 동일조건에서 실시하였다. 세포괴를 균일하게 한 현탁배양세포를 *p*-Fluorophenylalanine (PFP)이 5~100 μ M의 농도로 단독처리한 배지상에 2.0 mL씩 평판배양하여, 10, 20, 30일 후 PFP의 처리에 대한 저항성 colony를 조사하였다. 배양 30일 후 세포주의 생중량을 측정한 결과 PFP의 농도가 높아질수록 감소하였다. 선발된 켈러스는 이배체서 peroxidase의 활성도가 5 μ M PFP 처리시에 가장 높았는데 100 μ M PFP 처리까지는 대조구보다는 높았다. Catalase의 활성도는 5 μ M PFP 처리시 가장 높았으나 100 μ M PFP 처리시 가장 낮았다. 한편 반수체에서는 peroxidase와 catalase의 활성도는 50 μ M PFP 처리시 가장 높게 나타나서 이배체와 반수체 사이에 효소활성의 차이는 뚜렷했다.

인용문헌

- Berlin J, Widholm JM (1977) Correlation between phenylalanine ammonia lyase activity and phenolic biosynthesis in *p*-fluorophenylalanine-sensitive and -resistant tobacco and carrot tissue cultures. *Plant Physiol* 59:550-553
- Carlson PS (1973) Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science* 180:1366-1368

- Day AW, Jones JK** (1971) *p*-fluorophenylalanine-induced mitotic haploidization in *Ustilago violacea*. Genet. Res., Camb. **18**:299-309
- Durand JL** (1990) Mutagenesis: EMS treatment of cell suspensions of *Nicotiana sylvestris*. In JW Pollard, JM Walker, eds, Methods in Molecular Biology, Vol 6, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press pp 431-441
- Gatherdole RWE, Street HE** (1976) Isolation, stability and biochemistry of a *p*-fluorophenylalanine-resistant cell line of *Acer pseudoplatanus* L. New Phytol. **77**:29-41
- Gonzales RA, Das PK, Widholm JM** (1984) Characterization of cultured tobacco cell lines resistant to ethionine, a methionone analog. Plant Physiol. **74**:640-644
- Gupta N, Carlson PS** (1972) Preferential growth of haploid plant cells in vitro. Nature **239**:86
- Negrutiu I, Jacobs M, Caboche M** (1984) Advances in somatic cell genetics of higher plants-the protoplast approach in basic studies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants. Theor. Appl. Genet. **67**:289-304
- Ochoa-alejo N, Salgado-garciglia R** (1990) Increased capsaicin content in PFP-resistant cells of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports **8**:617-620
- Oh SC** (1994) Selection of cadmium resistant cell line and plant regeneration from callus *Nicotiana tabacum* cv. BY4. M.S. thesis, Chunbuk National University, Chonju
- Oh SC, Soh WY, Cho DY, Yang DC** (1994) Enzyme activity in plant regeneration from diploid and haploid calli of *Nicotiana tabacum* cv BY4. Korean J. Plant Tissue Culture **21**(6):333-339
- Palmer JE, Widholm JM** (1975) Characterization of carrot and tobacco cell cultures resistant to *p*-fluorophenylalanine. Plant Physiol. **56**:233-238
- Salgado-garciglia R, Lopez-gutierrez F, Ochoa-alejo N** (1985) NaCl-resistant variant cells isolated from sweet potato cell suspensions. Plant Cell Tissue Organ Culture **5**:3-12
- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK** (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. Physiol. Plant. **85**:85-89
- Sung ZR** (1979) Relationship of indole-3-acetic acid and tryptophan concentration in normal and 5-methyltryptophan resistant cell line of wild carrots. Planta **145**:339-345
- Widholm JM** (1972) Cultured *Nicotiana tabacum* cells with an altered anthranilate synthetase which is less sensitive to feedback inhibition. Biochim. Biophys. Acta **261**:52-58
- Widholm JM** (1977) Relation between auxin autotrophy and tryptophan accumulation in cultured plant cells. Planta **134**:103-108
- Widholm JM** (1980) Differential expression of amino acid biosynthetic control isozyme in plants and cultured cells. In : F. Sala, eds, Plant Cell Culture; Results and Perspectives. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam pp. 157-157
- Widholm JM** (1984) Induction, selection, and characterization of mutants in carrot cell cultures. In IK Vasil, ed, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol 1. Academic press, Inc pp 563-570

(접수일자 2001년 3월 2일)