

***Streptanthus tortus* 배양세포에서 미생물 Elicit가 사부형성에 미치는 영향**

조봉희

수원대학교 자연과학대학 생명과학과, 기능성생명소재 연구소

Effect of the Elicit of Microorganism on the Formation of Phloem in Suspension Cultures of *Streptanthus tortus*

Bong-Heuy Cho

Department of Life Science, Center for smart Bio-Materials, the University of Suwon, Suwon 445-890, Korea

ABSTRACT Extracts of *Escherichia coli* as a elicit were treated to suspension cultures of *Streptanthus tortus* in order to observe the effect on the phloem development. By the elicit treatment, cell wall, sieve endoplasmic reticulum (SER) and p-protein were normally synthesized, but the structure of amyloplast was changed from a round form to irregular and swollen unhealthy form with a tiny starch granular. Oil drops were new synthesized and accumulated in a large oleoplast and proteins were also accumulated in a single membrane. The concentration of sucrose in the phloem, which was induced during the elicit treatment, was higher than normally developed phloem cells. These results suggest that phloem cells might be changed in the normal cycles of metabolism of lipids, carbohydrates and proteins to overcome during the elicit stress.

Key words: Phloem formation, elicit stress, oil drop, oleoplast

서 론

식물에서 사부는 광합성 산물을 장거리 수송하여 전 식물체에 공급하는 중요한 임무를 수행한다. 사부는 조직배양 세포로부터 유도 가능하며 (Cho 1996), 조직배양 세포로부터 유도된 사부는 식물체에 존재하는 사부와 같이 광합성 산물을 수 십 m의 높이까지 이동시킬 수 있는 구조적인 특징은 갖추지 못했지만 식물체와 같이 원통형의 구조로 되어 있고, 기능적으로는 식물체에 존재하는 사부의 기능과 같다 (Cho 1998).

유조직 세포로부터 사부가 발달되는 동안 세포 내의 존재하는 소기관들의 구조와 생리 생화학적인 변화가 동반된다. 핵막과 액포 등이 분해되고, 엽록체는 전분이 많이 축적되어 있는 amyloplast로 변화되고, amyloplast와 미토콘드리아의 형태는 타원형에서 원형으로 변화되고, sieve element reticulum (SER)

과 p-protein 등이 새로 합성된다 (Cho 1996). 유조직 세포에서 사부로 발달되는 초기에 일어나는 핵막의 분해는 동물세포에서 볼 수 있는 apoptosis 진행과정 (Tomei and Cope 1991)과 매우 유사하다 (Cho 1996). 특히 사부의 발달과정에서 일어나는 apoptosis 현상은 동물의 순환계에서 산소를 운반하는 적혈구 세포에서 일어나는 programmed cell death (PCD)현상과 매우 유사하다 (Cho 1996).

동물에서 PCD현상은 일반적으로 일어나는 일로 생명체의 발달과정과 여러 다른 기관의 발달에 중요한 역할을 담당한다 (Hengartner et al. 1992; Horvitz et al. 1982; Wolf and Ready 1991). 식물에서는 PCD현상에 대하여는 잘 알려져 있지 않다. 다만 식물이 미생물의 침입을 받으면, 식물은 침입자에 대하여 hypersensitive response (HR)를 나타내고, HR은 PCD를 활성화시켜서 식물세포의 빠른 고사를 유도한다 (Greenberg et al. 1994).

미생물의 침입에 대한 식물체의 반응은 침입 부위와 침입 부위에서 멀리 떨어져 있는 전 식물체에 많은 생리 및 생화학적인 변화를 동반한다 (Malamy et al. 1992).

*Corresponding author Tel 031-220-2482 Fax 031-222-9385

E-mail

식물체와는 달리 조직 배양세포는 무균 상태에서 수행되므로 일반적으로 미생물의 침입을 받은 세포는 더 이상 세포분열을 하지 못하고 고사되는 것으로 알고 있다. 그러나 배양세포가 미생물에 침입을 받으면 실제로는 즉시 고사되는 것이 아니라 일단 생리 및 생화학적 변화를 일으키면서 구조적인 변화가 동반될 것이다. 지금까지는 미생물 또는 elicitor의 오염으로 인하여 유도되는 배양세포의 구조적인 변화에 대하여 언급된 바가 없으므로 본 연구에서는 사부의 발달 동안 미생물 elicitor를 오염시키므로 유발되는 구조에 변화를 추적하고 elicitor의 오염초기에 일어나는 생리적인 변화를 연구하고자 하였다. 특히 사부의 발달동안 PCD현상이 진행되고, 사부는 핵이 없는 상태로 설탕의 축적과 수송을 수행하므로 (Cho 1996), elicitor 처리로 유조직 세포에서 사부로 분화 발달하는 동안 설탕의 농도변화를 추적하여 사부발달과의 관계를 알고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 배양조건

유리 Petri dish에 여과지를 이중으로 깔고 멸균시킨 후 멸균 증류수를 부었다. *Streptanthus tortus* 씨는 1% NaOCl로 10분간 멸균한 후 멸균 증류수로 3번 세척한 후 25°C 암소에서 5일간 발아시켰다 (Cho 1987), 발아된 유식물로부터 자엽을 분리시켜 5 mm 크기의 절편으로 자른 후 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에 4 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L NAA가 함유된 배지를 이용하여 암소에서 캘러스를 유도시켰다. 유도된 캘러스 5 g을 MS 기본배지에 2 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L NAA와 1 mg/L kinetin이 함유된 사부분화 액체배양액에서 사부를 유도시켰다.

배양세포에 elicitor의 처리

Nutrient agar culture에서 배양된 *Escherichia coli* strain 23725 stock culture로부터 1 mL을 멸균된 분화용 배지로 옮긴 다음 잘 저어주고 2500 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전 pellet을 사용하였다. 이 과정을 3회 반복하였다. 멸균된 분화용 배지로 cell density를 1×10^6 /mL가 되도록 맞추었다. Sonicator는 pellet를 70% ethanol로 소독한 다음 희석된 미생물은 20%에서 9초간 6회 sonication을 실시하여 마쇄액을 얻었다 (French pressure에서 15,000 pound per square inch에서 마쇄). 모든 행위는 clean bench 안에서 수행되었다. 사부 유도배지에다 스트레스를 주기 위해서 autoclave가 완료된 100 mL 배양액에 마쇄한 액 1 mL를 주입시키고, 유조직 배양세포 5 g을 첨가하였다. 배양조건은 25°C 암소에서 300 rpm으로 흔들며 주었다. 모든 시료는 3회 반복 실험할 수 있도록 각각의

시료를 준비하였다.

당류의 추출과 분석법

주어진 시간에 조직배양 세포 1 g을 꺼내어 filtration 시킨 후 당류가 제거된 배지로 세척하였다. 미리 준비한 80% 에틸알코올 1 mL를 넣고 입구를 봉한 다음 60°C에서 1시간 동안 용해성인 당류를 추출하였다. 20,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 당류 분석할 때까지 -20°C에서 보관하였다. 설탕은 Van Handel (1968) 방법인 anthrone 시약에 의해 분석하였다. 배양 0일은 같은 조건하의 유조직 세포에서 측정된 것이다.

전자현미경적 방법

현탁배양 세포 1 g을 25 mM 인산 완충액 (pH 6.0)으로 잘 세척한 후 5% glutar aldehyde로 2시간 고정하였다. 사부원형질체는 효소가 제외된 해리용 용액에 5% glutar aldehyde가 함유된 용액에서 2시간 고정시킨 후, 25 mM 인산나트륨 완충액 (pH 6.0)으로 3회, 증류수로 2회 세척한 다음 2% OSO_4 로 1시간 30분 처리하였고, 동일 완충액으로 3회, 증류수로 2회 세척하였다. 단 원형질체는 삼투압을 단계적으로 낮추면서 세척하였다. 2% uranyl acetate로 30분 처리한 후 10% 아세톤 ~ 95% 아세톤의 농도 순으로 탈수시켰다. 100% 아세톤으로 3회 처리하여 완전히 탈수된 시료를 Spurr's plastic으로 포말한 후 다이아몬드 칼로 10 μm 크기로 잘랐다. 염색은 uranylacetate와 lead citrate로 이중 염색하였다 (Cho 1988).

결과 및 고찰

Elicitor가 사부형성에 미치는 영향

돌연변이가 일어난 *Arabidopsis* 식물 잎에 avirulent 미생물을 감염시키면, HR 증상이 나타나 1 일 이내에 감염부위가 극부적으로 고사되고, 같은 식물의 wild type 잎에 virulent 미생물을 감염시키면 생체막에 가벼운 상처를 동반한 ion linkage가 발생하고, chlorosis 현상이 나타난다. 그러나 환경 조건에 따라서 wild 식물 잎에서도 avirulent 미생물을 감염시키면, 1 일 이내에 세포고사 현상이 발견된다 (Greenberg et al. 1994). 조직배양 세포는 오염에 예민하고, 유조직 세포보다는 사부세포가 스트레스에 더 예민하다 (Cho 1996). 그러므로 사부가 발달되는 동안 스트레스를 받으면 사부의 구조와 생리적인 변화가 일어날 것으로 추측하여 사부 발달과정에 elicitor를 처리하여 변화하는 구조를 관찰하였다. Figure 1은 elicitor가 없는 사부배지에서 정상적으로 분화된 사부세포들로 세포질 안에는 p-protein이 묻혀 있거나 산재되어 있고, 새로 형성된 사부

세포벽 주변에는 sieve endoplasmic reticulum (SER)들이 관찰되었다. 전분이 들어있는 amyloplast들과 미토콘드리아는 등근 모양을 하고 있었다. Elicitor가 첨가된 사부유도 배지에서 자란 세포에서도 사부가 유도되었고, 새로 합성된 사부 세포벽 주변에 SER이 산재되어 있는 것은 정상적으로 유도된 사부세포와 동일하였다 (Figure 2). 그러나 elicitor가 첨가된 배지에서 유도된 사부세포에는 큰 oleoplast 안에 oil이 가득히 축적되어 있었다. 식물이 스트레스를 받으면 막지질대사에 변화가 일어난다. 즉, 식물에다 chilling 스트레스를 주면 phospholipid의 농도가 급속히 감소하고, free fatty acid (free FA)의 농

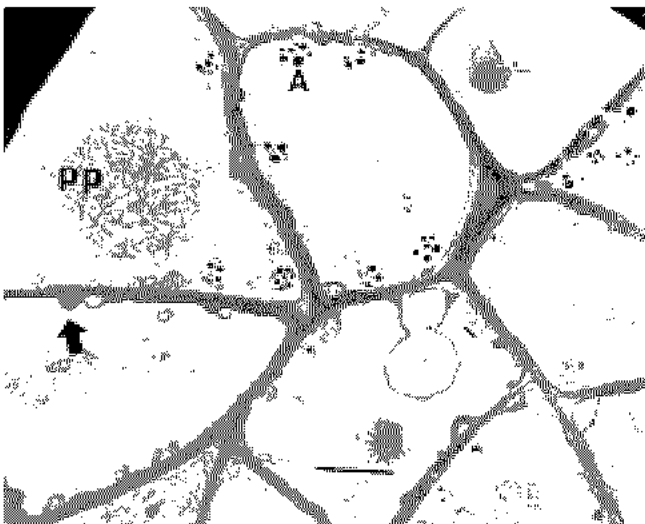


Figure 1. The initiation of phloem cells on 10 days after cultures of *Streptanthus tortus*. New cell wall was surrounded by sieve endoplasmic reticulum (SER). Bar = 0.38 μ m. A, amyloplast; pp, p-protein; arrow, SER.

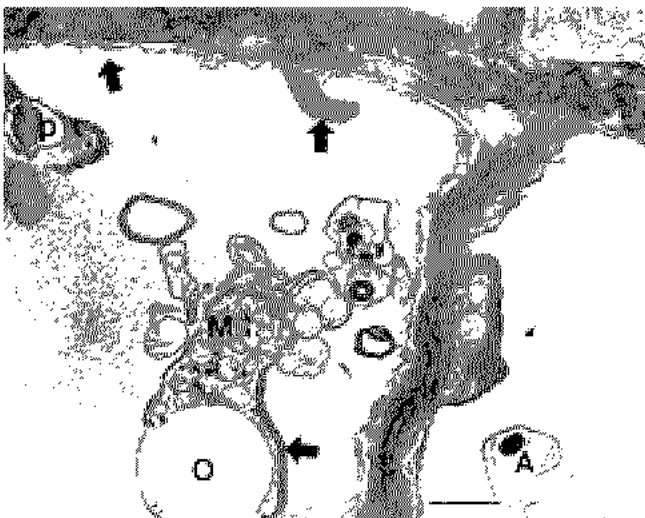


Figure 2. Developing phloem cells in the presence of elicitor on 10 days after cultures of *streptanthus tortus*. The oleoplast was filled with a drop of oils. Protein was accumulated in a single membrane. Amyloplast with a tiny starch granular was irregular and swollen, unhealthy form. Bar = 0.80 μ m. O, oleoplast; A, amyloplast; M, mitochondria; P, protein, arrow, SER.

도가 증가되는 동시에 지용성인 antioxidant, α -tocopherol과 ascorbic acid의 농도가 증가된다. 이 물질들은 chilling에 대한 저항력과 관계가 있다 (Senaratna et al. 1988). Chilling 스트레스하에서 세포에는 ethylene이 생산되고, phospholipid와 glycolipid를 구성하는 불포화지방산의 농도가 감소되고, phospholipase D의 활성도가 증가된다 (Parkin and Kuo 1989). 당근 조직배양 세포에서도 sugar-starvation 스트레스를 주면, 배양액에 ethylene이 생성되고, ethylene은 phospholipase D의 활성도를 증가시킨다 (Lee et al. 1998). Phospholipase의 증가는 생체막 지질의 분해를 의미하며, phospholipid의 분해는 세포내에 free FA의 농도와 phosphoric acid의 농도를 증가시킨다 (Senaratna et al. 1988). 사부세포에서도 elicitor에 반응하여 phospholipid를 분해하여 free FA를 oleoplast에 축적시킨 것으로 생각된다. 생체가 스트레스를 받으면, 스트레스 종류와는 거의 상관없이 생체막의 구성성분인 지질의 분해가 유발되는 것으로보아 앞으로 더 연구해야 될 부분으로 생각한다.

대조구 사부세포에서 amyloplast안에는 전분이 많이 축적되어 있었고 등근 모양이나 (Figure 1), elicitor 처리한 사부세포에서는 amyloplast의 모양이 불규칙하고 부풀어 오른 느낌을 주는 건강하지 못한 상태로 그 안에는 전분이 적게 축적되어 있었고, 미토콘드리아는 oleoplast 주위에 밀집되어 있었다 (Figure 2). 사부세포 안에는 사부세포에만 있는 57 kDal의 β -amylase가 존재하며 (Wang et al. 1995), 아마도 elicitor처리하에서 β -amylase의 활성화로 전분을 분해시켜 필요한 대사작용을 수행하였을 것이고, 미토콘드리아는 새로운 지방 합성에 기여할 것으로 생각된다.

액포안에는 단백질이 축적되어 있는데 (Figure 2), 생체에 freeze를 처리하면, acid phosphatase가 증가되고, 이 단백질은 액포에 저장되거나 또는 막과 연결되어 있어 단백질의 분해를 촉진시킨다 (Moriyasu and Ohsumi 1996). 또한 NaCl, freeze와 ABA에 의해서 유도된 antistress 단백질인 osmotin은 pathogenesis-related 단백질과 매우 유사하며 (Singh et al. 1989), endochitinases, endo- β -1,3-glucanases, osmotins 등과 유사하다 (Hon et al. 1995). 스트레스하에서 단백질의 축적은 아마도 불필요한 단백질을 분해시켜 아미노산으로부터 필요한 새로운 단백질을 합성하는데 이용할 것으로 생각한다.

Elicitor에 의한 당류의 변화

Chilling 스트레스 (Senaratna et al. 1988), sugar-starvation 스트레스 (Lee et al. 1998)와 NaCl, freeze와 pathogen (Singh et al. 1989) 스트레스 등은 ethylene을 생산하여 phospholipase와 acid phosphatase를 유도하여 지질과 단백질 대사 및 당류대사를 변화시켜서 스트레스에 대항한다.

식물체의 사부에서는 이당류인 설탕은 발견되나 환원당인 포도당이나 과당은 없는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 실제로 유조직에서 유도된 사부를 순수 분리하여 분석한 결과

Table 1. Change of sucrose concentration in the induced phloem cells during the phloem development by edding of 1 mL elicit in the medium of suspension cultures of *Streptanthus tortus*. Elicit was prepared from *Escherichia coli*.

Days of culture	Sucrose concentration of phloem cells (mole/mL packed cell)				
	0	6	10	15	20
- elicit	0.31 ± 0.16	0.67 ± 0.12	0.84 ± 0.47	1.12 ± 0.37	0.84 ± 0.44
+ elicit	0.31 ± 0.16	0.92 ± 0.23	1.31 ± 0.29	1.10 ± 0.25	0.69 ± 0.36

는 식물체와 같이 설탕은 존재하나 환원당인 단당류는 발견되지 않았다 (Cho 1998). 이는 유조직 세포로부터 사부세포로 발달하는 동안 환원당 운반자는 사라지고, 설탕 운반자가 새로 유도된다 (Cho 1998). 또한 사부세포에만 존재하는 β-amylase (Wang et al. 1995)는 사부에 이당류가 존재할 것을 암시하는 좋은 증거가 된다. 사부의 발달동안 유조직 세포내에 존재하는 당의 농도는 사부유도 외부배지에 설탕을 처리하든지 또는 단당류를 처리하든지 상관 없고, 다만 세포 내에 축적되어진 설탕에 농도가 중요한 역할을 한다 (Cho 1992). 유조직 세포는 사부유도배지로 옮긴 다음 6일만에 사부세포가 관찰되었다 (Cho 1996). 사부세포에 존재하는 설탕의 농도는 elicit를 처리한 사부세포에서 농도가 높다 (Table 1). 그러나 배양 10일 이후부터는 elicit 처리된 사부세포의 설탕농도가 대조구보다 낮다. 그 이유는 사부세포내의 소기관들이 파괴되기 때문이다 (Data not shown). 식물체에서는 광합성 작용으로 합성된 단당류에서 설탕을 합성하여 사부내에 loading되지만, 조직배양 세포에서는 단당류로 수송된 후 세포질내에서 설탕을 합성하여 (Cho 1998) 사부에 loading 시키는 점이 차이가 있다. Figure 2에서 amyloplast 안에 축적된 전분의 농도가 대조구와 비교해서 매우 낮은 것으로 미루어 보아 스트레스 처리로 인해 유조직 세포에서 사부세포로 발달하는동안 스트레스를 받은 세포는 전분을 분해시켜서 설탕을 생산하여 사부 세포질에 축적시켜서 세포를 보호하는 것으로 추정한다.

적 요

Streptanthus tortus 배양 세포에서 유조직 세포로부터 사부가 발달하는 시기에 *Escherichia coli* 추출물 (elicit)를 처리하여 사부의 발달에 미치는 영향을 조사하였다. Elicit 처리에 의해 세포벽, sieve endoplasmic reticulum (SER)과 p-protein은 정상적으로 합성되었으나, 적은 전분 granular를 가진 amyloplast는 원형에서 불규칙하고 부풀어오른 건강하지 못한 모양으로 구조가 변형되었다. Oil 방울은 새로 합성되어 oleoplast 안에 축적되었고, 단백질도 single membrane 안에 축적되었다. Elicit로 유도된 사부세포안에 설탕의 농도는 정상적으로 발달한 사부세포보다 더 높았다. 사부세포는 elicit 스트레스에 대항하여 지질, 탄수화물과 단백질 대사를 변화하여 elicit 스트레스에 대항하는 물질들을 새로 합성하는 것으로 생각한다.

인용문헌

Cho BH (1987) Analysis of the low affinity system of the uptake of fructose in suspension culture cells. *Kor J Bot* 30: 277-285

Cho BH (1988) Effects of 2,4-D on phloem formation and differentiation of *Streptanthus* cells in suspension culture. *Kor J Plant Tiss Cult* 15: 217-223

Cho BH (1992) The role of sugars on phloem formation in *Streptanthus* suspension cultured cells. *Kor J Plant Tiss Cult* 19: 205-208

Cho BH (1996) Phloem differentiation in cell culture of *Streptanthus tortus*. *Kor J Plant Tiss Cult* 23: 107-111

Cho BH (1998) Isolation of phloem cell and active transport of sucrose by isolated phloem and parenchyma cells of *Streptanthus tortus* suspension culture. *Kor J Plant Tiss Cult* 25: 7-11

Greenberg JT, Guo A, Klessig DF, Ausubel FM (1994) Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77: 551-563

Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR (1992) *Caenorhabditis elegans* gene Ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 358: 494-499

Hon WC, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC, Yang DCC (1995) Anti-freeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* 109: 879-889

Horvitz HR, Ellis HM, Sternberg PW (1982) Programmed cell death in nematode development. *Neurosci Comment* 1: 56-65

Lee SH, Chae HS, Lee TK, Kim SH, Shin SH, Cho BH, Cho SH, Kang BG, Lee WS (1998) Ethylene-mediated phospholipid catabolic pathway in glucose-starved carrot suspension cells. *Plant Physiol* 116: 223-229

Malamy J, Henning J, Klessig DF (1992) Temperature dependent induction of salicylic acid and its conjugated during the resistance response to tobacco mosaic virus infections. *Plant Cell* 4: 359-366

Moriyasu Y, Ohsumi E (1996) Autophagy in Tobacco suspension cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiol* 111: 1233-1241

Murashige RD, Skoog E (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-497

Parkin KL, Kuo SJ (1989) Chilling-induced lipid degradation in cucumber (*Cucumis sativa* L. cv Hybrid C) fruit. *Plant Physiol* 90:

- 1045-1056
- Senaratna T, Mackay CE, Mckersie BD, Fletcher RA (1988) Uniconazole-induced chilling tolerance in tomato and its relationship to antioxidant contents. *J Plant Physiol* 133: 56-61
- Singh NK, Nelson DE, Kuhn D, Hasegawa PM, Bressan RA (1989) Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiol* 90: 1096-1101
- Tomei SD, Cope FO (1991) Apoptosis of the molecular basis of cell death. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 193-246
- Van Handel E (1968) Direct microdetermination of sucrose. *Anal Biochem* 22: 280-283
- Wang Q, Monroe J, Sjolund R (1995) Identification and characterization of a phloem-specific β -amylase. *Plant Physiol* 109: 743-750
- Wolf T, Ready DF (1991) Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development* 113: 825-839

(접수일자 2003년 2월 11일, 수리일자 2003년 5월 2일)