韓作誌(Korean J. Crop Sci.) 33(2): 122~125(1988)

器內 培養된 半夏의 電氣泳動에 依한 生藥學的 硏究[1)]

1. 電氣泳動法에 依한 半夏 Callus의 蛋白質 및 酵素分析

崔定植* · 柳點鎬* · 朴鶴封* · 金炳武*

Electrophoresis Techniques for Identification of Callus Induced from *Pinella ternata* (Thunb.) Breit[1)]

1. Analysis of protein and Enzymes of Callus Induced from *Pinella ternata* (Thunb.) Breit

Jung Sik Choi*, Jeom Ho Ryu*, Hak Bong Park* and Hyung Moo Kim*

ABSTRACT

A comparative electrophoretic study on protein and several important enzymes of calli induced from stem, intercostal area and minor vein area were conducted in *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.

Soluble protein band patterns of calli induced from stem, intercostal area and minor vein area were distinctly different from those of the corresponding plant parts.

Esterase isozyme patterns of calli induced from stem, intercostal area and minor vein area were different from those of the corresponding plant parts.

Glutamate oxalo-acetate transaminase isozyme patterns of calli grown for 4 weeks induced from 3 plant parts were similar to those of the corresponding plant parts. But a high molecular weight isozyme band appeared in the calli grown for 8 weeks.

Alow molecular weight isozyme band disappeared on the peroxidase isozyme patterns of calli grown for 4 weeks appeared on those of the corresponding plant parts.

緖 言

半夏는 塊莖을 한약제로 利用하는 天南星科의 多年生 초본식물로 繁殖 方法은 基部의 유아와 줄기에서 생기는 自求로 繁殖하며, 塊莖을 다량 增殖시키기에는 다소 어려운 점이 있었으나 최근 組織 培養法을 이용하여 短期間에 다량 繁殖할 수 있는 새로운 科學的인 방법이 모색되고 있다.

崔[3)] 등은 半夏의 組織을 기내 培養하여 Callus의 有機, 기관 분화 및 자구를 增殖하는데 적합한 培地와 培養部位 그리고 培養溫度 및 적정 산농도 등을 調査하였고, 培養後 Callus, Shoot, multiple shoot 및 Root의 기원을 組織學的으로 調査報告한 바 있다.[4)]

組織培養에 의한 培養組織에서 Callus, 기관 분화 및 완전한 植物體 등에 이르는 再分化는 식물의 種類, 生長調節物質의 종류와 농도 그리고 培養部位에 따라 차이가 있으나 組織 절편에서 Callus가 유기된 다음 Meristemoid로부터 Shoot 및 Root가 分化되어 정상적인 植物體가 되는 것이 일반적이다.

이와 같이 Callus의 유기 및 기관의 분화가 이루어지는 것은 培地로부터의 營養物質의 流入은 물

*全北大學校 農科大學(Department of Agronomy, Chonbuk National University).

[1)]이 논문은 1986년도 문교부 자유과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음. 〈88. 3. 28 接受〉

론 조직내에서의 활발한 物質代謝에 대한 결과적인 현상일 것이므로 半夏의 組織培養에 의한 多量增殖의 과학적인 利害를 위해서는 半夏의 組織培養에 대한 生理化學的인 조사가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 半夏의 조직을 部位別로 培養하여 배양기간에 따라 蛋白質 및 몇몇 酵素 등을 acrylamide gel 電氣泳動法으로 분리, 비교하여 半夏의 組織培養에 대한 生理化學的 지견을 얻고자 하였다.

材料 및 方法

培養材料는 半夏의 葉 및 줄기조직을 이용하였고, 培養條件은 제 1 보[3] 에서와 같은 방법으로 實行하였다. 培養期間別에 따른 電氣泳動的 pattern을 조사하기 위하여 MS 基本培地에 2, 4-D 2.0 mg/ℓ Kinetin 0.2 mg/ℓ 을 添加한 배지에 Callus를 계대 培養시키면서 4주 간격으로 材料를 採取하여 急速凍結 乾燥시킨 다음 −20℃에 保管하였다.

試料 精製 : 보관중인 材料를 분쇄하여 0.2 g에 Tris-HCl buffer 2 ml를 첨가하여 24시간 동안 抽出한 다음 10,000 × g으로 30분간 원심분리하여 그 상등액을 電氣泳動試料로 하였다.

電氣泳動法 : poly acrylamide gel 電氣泳動은 수직식 slab gel 電氣泳動 장치를 이용하였으며 discontinuous buffer system에 따라 resolving gel buffer는 0.1 M Tris-HCl (pH 8.8), stacking gel buffer는 0.125 M Tris-HCl (pH 6.7)을 사용하였고 electrode buffer는 0.5 M Tris-glycine (pH 8.3)을 사용하였다.[11] gel의 농도는 resolving gel 7.5 %, stacking gel 3 %를 사용하였으며 constant current 30 mA로 tracking dye인 bromophenol blue가 약 9 cm정도 이동할 때까지 통하게 하였다.

發色法 : 蛋白質 染色은 gel을 Coomassie Blue R 250 용액 (Coomassie Blue R-250 250 mg, 95 % ethanol 100 ml, 10 % glacial acetic acid 100 ml)에 1시간 沈漬 후 脫色液 (30 % Ethanol, 5 % Acetic acid)에서 Background가 깨끗해질 때까지 脫色하였다.

Esterase 발색은 α-naphthyl acetate (5 mg/10 ml), fast blue RR Salt (5 mg/10 ml)를 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2)에 녹인 발색액에 36℃에서 30분간 沈積시켜 발색시켰다.[6]

Peroxidase 발색은 gel을 발색액 (benzidin Sol. : 0.03 % H_2O_2 : Water = 1 : 1 : 4)에 1분간 침지하였다. benzidin Sol.은 benzidin 1 g, acetic acid 9 ml와 Water 40 ml의 混合 溶液이다.[7]

GOT (Glutamate Oxalo-acetate transaminase)의 발색은 Aspatic acid 250 mg, Ketoglutaric acid 150 mg, Fast blue RR Salt 150 mg을 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 100 ml에 녹인 발색액을 사용하였고, 發色이 끝난 gel은 5 % Acetic acid 용액에 보존하였다.[1]

結果 및 考察

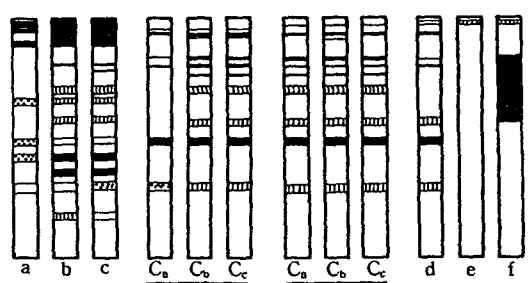
1. 蛋白質 pattern의 비교

半夏 野生品種의 줄기, 葉綠, 細脈 부근 이들 組織의 培養期間別 Callus, 그리고 배양자구, 유아 및 종구 등의 電氣泳動的 蛋白質 분리 樣相은 Fig. 1과 같다.

野生植物體 각 部位別 蛋白質 pattern은 각각 8~10개의 band로 엽록과 細脈은 뚜렷한 차이가 없었으나 이들과 줄기와는 비교적 다른 양상을 보였다.

組織部位別 培養 Callus의 蛋白質 pattern을 보면 4, 8주 계대 배양 Callus 들과 野生植物體 각 組織과의 差異가 현저하였고, 4주 培養 Callus의 경우 엽록과 細脈組織 배양 Callus에서는 동일하였으나 이들과 줄기와는 차이를 보였으며, 8주 배양 Callus에서는 각 組織培養 Callus 모두 동일한 樣相이었다.

배양자구, 유아 및 종구 등의 蛋白質의 電氣泳動的 pattern을 보면 배양자구는 계대 培養時 樣相



Note ; a : stem, b : intercostal area, c : minor vein area, C_a, C_b and C_c : Callus induced from a, b and c, d : tuberlet, e : germ f : tuber

Fig. 1. SDS-gel electrophoretogram of soluble proteins.

과 類似하였으나 유아와 종구와는 아주 다른 結果를 보였다.

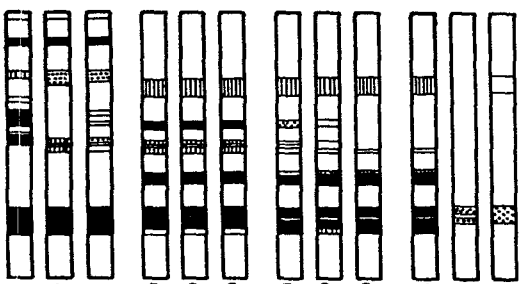
2. Esterase pattern의 비교

野生植物體의 각 조직과 이들 組織由來의 Callus와 배양자구, 유아 및 종구 등의 Esterase 同位酵素의 電氣泳動的 차이를 보면 Fig. 2와 같다.

野生植物體 각 조직에서 Esterase의 band 수는 줄기 11개, 엽록 8개, 세맥 10개로 차이를 보였는데 일부 band의 위치가 一致하는 경향이었다.

4주 培養 Callus에서는 band 수가 9개로 組織別 差異가 없었으나 8주 培養 Callus에서는 細脈組織에서 1개의 band가 소실되어 8개의 band를 보였다.

배양자구, 유아 및 종구간의 Esterase pattern을 비교해 보면 배양자구와 계대배양 Callus 간의 pattern은 비교적 類似하였으나 배양자구와 유아 및 종구에 있어서는 차이가 뚜렷하였다.



Note ; Refer to Fig. 1.

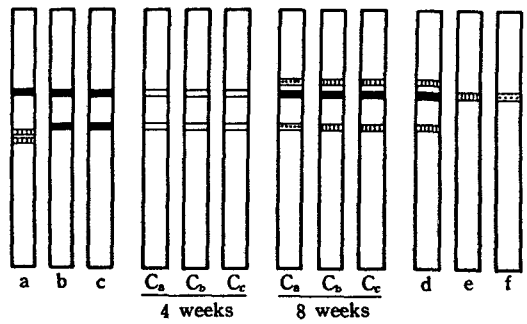
Fig. 2. Esterase isozyme patterns on polyacrylamide gel.

3. GOT (Glutamate oxalo-acetate transaminase) pattern의 비교

野生植物體의 줄기, 엽록 및 세맥의 절편과 이들 組織由來 Callus의 GOT 同位酵素의 電氣泳動的 변화를 조사해 본 結果는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 GOT의 同位酵素는 줄기 절편에서 band 수가 3개였으나, 엽록과 세맥에서는 2개로 같은 결과를 보였다.

또한 4주 培養한 줄기, 엽록 및 세맥 組織由來의 Callus 들에서의 GOT 양상은 GOT band 수가 모두 2개였고, band의 위치도 同一하였으나 8주 배양 Callus 들에서는 4주 배양 Callus의 GOT band보다 분자량이 약간 작은 band 1개가 더 生



Note ; Refer to Fig. 1.

Fig. 3. GOT isozyme patterns on polyacrylamide gel.

成되었는데 이러한 樣相은 줄기, 엽록 및 細脈 由來 Callus에서 모두 동일하였다.

배양자구에서의 GOT 양상은 8주 배양 Callus의 것과 同一하였으나 유아와 종구에서는 中間部位의 단 1개의 band만 출현하여 배양자구와는 GOT band pattern이 현저히 달랐다.

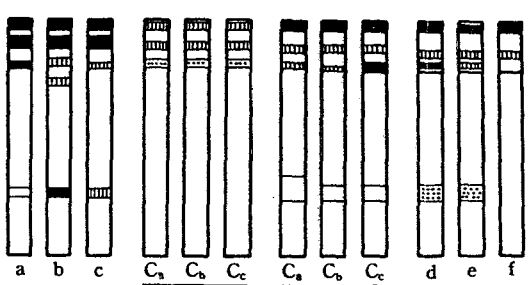
4. Peroxidase pattern의 비교

野生植物體 각 조직부위의 Peroxidase의 pattern은 Fig. 4와 같다.

줄기와 細脈地域에서는 4개의 band를 보였으며 엽록강역에서는 5개의 band를 보였다.

4주 배양 Callus에서는 모두 3개의 band가 同一하게 出現하여 각 組織由來 Callus 간 差異가 없었고, 8주 培養 Callus에서는 分子量이 큰 1개의 약한 band가 더 출현하였으나 각 組織由來 Callus 간에 band의 농담에 차이가 있을 뿐 band수나 出現部位는 거의 同一하였다.

배양자구와 유아의 Peroxidase isozyme banding pattern은 8주 배양 Callus와 비슷하였으나 종



Note ; Refer to Fig. 1.

Fig. 4. Peroxidase isozyme patterns on polyacrylamide gel.

구와는 差異가 있었다.

한편, Beckman[2] 등은 同一한 個體內에서 組織과 生長單位에 따른 Peroxidase pattern의 變化에 대한 보고에서 Drosphila에서 Ees Esterase의 同位酵素는 생장단계에 따라 새로운 變化가 출현된다고 하였으며, Galston[8] 등은 Pisum Sativum에서 Peroxidase 同位酵素 pattern이 組織에 따라 band의 有無가 다르다고 하였다.

이상의 결과를 綜合하여 볼 때 조직부위에 따라 蛋白質 및 酵素의 banding pattern의 多樣性을 나타냈는데 이는 組織部位別 특이성에서 基因된 것으로 생각된다.

이와 관련하여 Callus의 발생 후에 나타나는 蛋白質 및 酵素의 pattern도 본래 組織部位의 기원에 따라 각각 相異하게 나타날 것으로 생각되는데 본 실험에서는 각 조직 由來 Callus에서의 電氣泳動的 양상이 類似했던 점으로 보아 蛋白質 및 酵素의 특이성이 각 유래기관에 따라 다르다 할지라도 半夏에 있어서 계대 배양에서 誘導된 Callus는 동일한 培養條件, 특히 人爲的으로 調節된 同一 조성 및 濃度의 호르몬 조건하에서는 각 기관별 특이성이 어느정도 減鎖된 것으로 생각되나 이에 대한 자세한 情報는 추후의 實驗에 의해 補完되어야 할 것으로 생각된다.

또한, 배양자구의 蛋白質 및 數種의 酵素의 電氣泳動的 band 출현 양상은 培養 Callus와 類似하나 유아 및 종구와는 차이를 보이는 것은 발생기원 및 培養條件에서 오는 결과라 생각된다.

摘 要

半夏의 組織部位別 培養期間에 따른 蛋白質 및 4種의 重要 酵素에 대한 電氣泳動的 特性의 比較研究 結果는 다음과 같다.

1. 各 組織 由來 Callus의 蛋白質 pattern은 野生植物體 各 組織과 현저한 差異가 있었다.

2. 各 組織 由來 Callus의 Esterase isozyme pattern은 野生 植物體 各 組織과 뚜렷한 差異가 있었다.

3. 各 組織 由來 4週 培養 Callus의 GOT isozyme pattern은 野生植物體 各 組織과 비슷하였으나 培養 8週 Callus에서는 分子量이 큰 새로운 isozyme band 1개가 出現하였다.

4. 各 組織 由來 4週 培養 Callus의 Peroxidase isozyme band pattern에서는 野生植物體各 器官에서 出現했던 1개의 分子量이 작은 band가 나타나지 않았다.

引 用 文 獻

1. Arulsekar, S. and D.E. Parfitt. 1986. Isozyme analysis procedures for stone furits' almond, grape, walnut, pistachio, and fig. Hostscience, Vol. 21(4) : 928-933.
2. Beckman, L., and F.M. Johnson. 1964. Variations in larval alkaline phosphatase controlled by Aph alleles in Drosophila Melanogaster. Genetics 49 : 829-835.
3. 崔定植·羅義植. 1986. 半夏의 組織培養에 관한 硏究. I. 植物 各 部位別, 温度, pH 및 培地別 試驗. 全北大學校 農大論文集 17 : 13-20.
4. _____. _____. 金永斗·韓光洙. 1986. 半夏의 組織培養에 관한 硏究 II. 器官分化의 組織學的 硏究. 全北大學校 農大論文集 17 : 21-25.
5. Davis, B.T. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. New York Academy Sci. 121 : 434-443.
6. Gebriel, O. 1971. Locating enzymes on gels. Methods in Enzymology XXII. Academic Press, New York.
7. 朴元穆·高榮嬉·兪瑛淮·李章容. 1982. 大豆種子의 紫斑病 感染과 Peroxidase 活性度變化. 한국식물보호학회지 21(1) : 23-26.
8. Siegl, S.M. 1966. The biochemistry of lipnin formation physiol. Plantarum 8 : 30-32.