

Populus 잎절편의 극성분화시 내생 Polyamine의 함량과 Polyamine 생합성 효소의 활성화도 변화

金成鎬·金明苑*·康榮燾·姜濱求·李舜熙

(延世大學校 理科大學 生物學科, *文理大學 生物學科)

Changes in Endogenous Polyamine Levels during Polar Regeneration from *Populus* Leaf Segments

Kim, Sung Ho, Myeong Won Kim*, Young Hee Kang
Bin G. Kang and Sun Hi Lee

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul and

*Department of Biology, Yonsei University, Wonju)

ABSTRACT

Polyamine titers and the activities of arginine decarboxylase(ADC) and ornithine decarboxylase (ODC), enzymes which catalyze rate-limiting steps in polyamine biosynthesis, were investigated during polar regeneration of *Populus* leaf segments. The polar regeneration occurred at the basal cut end of *Populus* leaf segments through cell division around the vascular bundle.

In the process of polar regeneration, the titers of putrescine and spermidine increased rapidly but the content of spermine remained constant. The leaf segments were then divided into three separate parts : the proximal, middle and distal. Spermidine titers showed an increase mainly in the proximal parts where polar regeneration occurred. On the other hand, putrescine titers showed an increase in the other two parts. In the course of polar regeneration, the activities of ADC and ODC increased, the ADC activities being higher than those of ODC. However, ODC activity was higher in the proximal part. Therefore, the spermidine contents and ODC activities are suggested to be related to polar regeneration in *Populus* leaf segments.

서론

식물조직배양 system으로부터의 분화과정에는 몇 종류의 극성(polarity)이 존재한다(Paterson, 1983). 그 중의 하나는 식물의 잎이나 잎의 절편으로부터 plantlet가 재생되는 것이며 이러한 재생은 대부분이 잎의 기부 절단면에서 일어난다 (Cutter, 1962; Dore, 1965; Douglas, 1985; Raju and Mann, 1977). 이러한 잎절편의 기부절단면으로부터 식물체가 재생되는 극성분화 현상 자체는 *Populus*, *Bego-*

nia, *Crassula* 그리고 *Liliaceae* 등의 식물에서 보고되어 있으나(Brossard, 1977; Cutter, 1962; Dore, 1965; Kato and Kawahara, 1972; Rutledge and Douglas, 1988) 그 mechanism은 거의 알려져 있지 않았다. 다만 기부와 단부의 양쪽 절단면 사이에서 분화를 유도하는 물질의 flux 차이가 존재할 것이라는 의견(Douglas, 1985; Paterson, 1983)과 auxin, cytokinin 그리고 gibberellic acid 등의 식물 hormone이 관계한다는 의견(Lee-Stadelmann *et al.*, 1989; Komizerko *et al.*, 1979; Obhildalova *et al.*, 1979; Sebanek *et al.*, 1978)이 있으나 명확한 실험적 뒷받침이 미비한 실정이다.

식물의 생장, 분화 및 발생 등의 생리적 과정은 외부적,

본 연구는 1989년도 문교부 기초과학 연구소 학술 연구조성비 지원에 의한 것임.

물리적 인자와 내부 인자들에 의하여 조절되며 이들은 대개 상호작용을 나타낸다. 내부적 인자로는 식물 hormone 이외에도 생체내에서 생합성되는 다양한 종류의 화학물질들을 들 수 있다(Bagni *et al.*, 1980; Srafini-Fracassini *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 1988). Polyamine은 이러한 물질 중의 하나로서 최근 많은 연구자들의 관심이 집중되고 있다.

Polyamine은 식물, 동물 및 미생물에 모두 존재하는 생장조절 물질로서 생리적 pH에서 양이온으로 작용하여 음전하를 띤 핵산과 강하게 결합함으로써 핵산을 안정화시켜 주고 핵산의 합성도 촉진함으로써 생장에 관여한다(Altman *et al.*, 1982; Bagni *et al.*, 1981; Bagni *et al.*, 1982; Galston and Kaur-Sawney, 1980; Srafini-Fracassini *et al.*, 1984). 또한 polyamine은 DNase, RNase 등의 핵산 분해 효소와 단백질 분해효소의 활성을 억제하고 합성자체를 억제하기도 한다(Galston *et al.*, 1978; Galston and Kaur-Sawney, 1980). 이외에도 polyamine은 생체막의 구성성분 중 인지질의 음이온 group과 결합하여 막구조를 안정화시켜주고 엽록소의 파괴를 방지하며, 노화를 지연시키는 등의 다양한 기능을 나타내고 있다(Altman, 1982; Naik and Srivastava, 1978; Popovic *et al.*, 1979; Veierskov and Thimann, 1988). 특히 polyamine은 세포분열 촉진(Cohen, 1982; Torrigiani *et al.*, 1987), 발근촉진(Jarvis *et al.*, 1985), 화분관 성장촉진(Bagni *et al.*, 1981; Prakash *et al.*, 1988), 배발생 유도(Montagu *et al.*, 1978; Feirer *et al.*, 1984) 등의 식물의 분화와 발생에도 관여한다. Polyamine 생합성의 조절효소는 arginine decarboxylase(ADC)와 ornithine decarboxylase(ODC)로 알려져 있으며(Altman, 1982; Cohen, 1982) diamine oxidase(DAO)와 polyamine oxidase(PAO)에 의하여 분해되어 pyrroline을 형성시키는 것으로 알려져 있다(Smith, 1985). 이상과 같이 polyamine은 여러 가지 생형현상 전반에 연관되어 있으나, 극성분화 과정에서의 polyamine의 역할은 알려져 있지 않다. 따라서, 본 연구에서는 극성분화가 잘 일어나는 *Populus*를 재료로 극성분화를 유도하면서 극성분화 양상과 함께 polyamine의 함량변화와 polyamine 합성효소인 ADC와 ODC의 활성도 변화를 조사함으로써 극성분화 과정 중 polyamine의 위상에 대하여 알아보려 하였다.

재료 및 방법

실험재료. *Populus*(*Populus nigra* var. *Betulifolia* × *Populus trichocarpa*, NC-5331)를 온실에서 재배하여 terminal bud로부터 아래쪽 3번째 잎 중 길이 3 cm 정도의 어린 잎을 재료로 사용하였다.

극성분화유도. 극성분화는 재료를 무기염류와 vitamin 그리고 NAA(0.01 mg/l), BA(0.2 mg/l)를 포함하는 목본 식물배양배지(Russel and McCown, 1986)에서 배양하면서 유도하였다. 재료는 70% ethanol과 0.5% solum hy-

pochlorite로 멸균처리한 후 증류수로 세척하여 mid vein을 중심으로 0.8 cm × 1.7 cm의 절편을 취한 다음 절편 3개를 30 ml의 베지에서 배양하였다. 배양조건은 18시간의 광기와 6시간의 암기로 하였으며 온도는 27° ± 1°C로 유지하였다.

Polyamine의 추출 및 정량. Thin layer chromatography에 의한 polyamine의 추출 및 정량은 Goren 등(1982)의 방법을 변형하여 시행하였다. 시료에 5% perchloric acid를 가하고 막자사발을 이용하여 4°C에서 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 12,000 × g로 20분간 원심분리하여 그 상정액을 시료원으로 사용하였다. 정량은 시료원 100 μl에 dansyl chloride(5 mg/ml in acetone) 200 μl와 파괴화된 Na₂CO₃ 100 μl를 첨가한 후 잘 섞어서 12시간 이상 상온에서 암처리하여 실시하였다. 처리된 시료에 50 μl proline(100 mg/ml)을 첨가하여 30분간 암실에서 방치한 후 벤젠으로 dansyl 유도체를 추출하여 100 μl를 TLC plate에 점적하였다. 전개용매의 조성은 chloroform : triethylamine(25 : 2, v/v)으로 하였으며 자외선으로 표준시료와 비교하여 끊어내어서 ethylacetate 4 ml로 용출시켜 electron photofluorometer(λEX=360, λEM=500)에서 형광강도를 측정하였다.

Arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase의 추출 및 활성도 측정. Arginine decarboxylase와 ornithine decarboxylase의 추출 및 활성도 측정은 Altman 등(1982)의 방법에 따라 시행하였다. 시료를 10 mM phosphate buffer(pH 7.2)에 0.1 mM DTT, 1 mM pyridoxal-5'-phosphate, 20 mM Na-EDTA 등이 포함된 용액에 넣고 마쇄한 후 12,000 × g에서 20분간 원심분리하여 그 상정액을 효소원으로 사용하였다. 효소반응은 phosphate buffer(pH 7.2) 300 μl, L-[U-¹⁴C] arginine monohydrochloride(Amersham 0.125 μCi, 324 mCi/m mole), L-[U-¹⁴C] ornithine monohydrochloride(Amersham, 0.125 μCi, 285 mCi/mmol), 효소원 200 μl를 12 cm²의 center well이 있는 flask에 넣은 후 silicon 마개로 막아 37°C에 60분간 반응시켰다. 이 때 발생하는 ¹⁴CO₂은 methylbenzethonium hydrochloride 100 μl를 묻힌 Whatman No. 1 paper(1 cm × 2 cm)에 흡수시켰다. 60분간 반응시킨 다음 5% perchloric acid로 반응을 중지시켜서 water bath에 30분간 증탕시킨 후 Whatman paper를 cocktail solution에 넣고 liquid scintillation counter(Packard Tricard-300)로 방사능을 측정하였다.

DNA, RNA, protein의 추출 및 정량. DNA, RNA 및 단백질의 추출은 Schneider(1957)의 방법을 일부 변형하여 시행하였다. 시료 500 mg에 2.0 M NaCl, 10 mM EDTA를 포함한 Tris-HCl buffer(pH 7.0) 5 ml를 가하여 마쇄한 후 10% trichloroacetic acid 30 ml를 가하고 10,000 × g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 10% trichloroacetic acid와 chloroform-methanol 혼합용액(2 : 1, v/v)으로 각각 세번씩 세척한 후 0.4 N KCN 10 ml를 가하여 37°C에서 18시간 동안 가수분해하였다. 가수분해 후 진한 염산 3.4 ml와 10% trichloroacetic acid 10 ml를 가



Fig. 1. Polar shoot regeneration stages in *Populus* leaf segments. A, a leaf segment freshly isolated; B, callus induced at the basal cut end after 7 days of culture; C, 10 days after culture; D, polar shoot regeneration on the callus after 20 days of culture; E, 30 days after culture; F, root regeneration after 45-50 days of culture; G, plantlets transplanted to a small pot with vermiculite; H, typical plants regenerated from *Populus* leaf segment.

하여 혼합한 다음 0-4°C에서 침전이 생길 때까지 방치하고 10,000×g에서 10분간 원심분리한 상정액을 RNA 정량에 사용하였다. 침전물에 다시 10% trichloroacetic acid 2 ml를 가하고 90°C에서 15분간 중탕한 후 10,000×g에서 10분간 원심분리한 상정액을 DNA 정량에 사용하였다. 이 때에 생긴 침전물에 0.2N NaOH 10 ml를 가한 다음 90°C에서 15분간 중탕한 후 10,000×g에서 15분간 원심분리한 상정액을 단백질 정량의 시료로 사용하였다. DNA의 정량은 di-phenylamine 용액을 시료에 가하고 90°C에서 10분간 중탕한 다음 상온에서 냉각하여 600nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준 DNA 용액으로는 calf thymus DNA를 사용하였다. RNA는 orcinol 용액을 시료에 가하고 90°C에서 10분간 중탕한 후 상온에서 냉각하여 670 nm에서의 흡광도를 통하여 비색정량하였다. 표준 RNA 용액으로는 calf liver RNA를 사용하였다. 단백질의 정량은 Lowry 등 (1952)의 방법을 따라 수행하였다.

극성분화시 형태적 변화 관찰. *Populus* 조직절편을 날짜별로 배양하여 0.1 M cacodylate 완충용액으로 조정된

2.5% glutaraldehyde에 전고정하고 0.1 M cacodylate 완충용액으로 2회 세척한 후 1.33% OsO₄를 포함한 0.1 M cacodylate 완충용액으로 후고정하였다. 고정된 절편을 ethanol 농도 상승순으로 50%에서 absolute ethanol까지 탈수한 후 propylene oxide로 치환하여 epoxy resin mixture에 포매하여 만든 block에서 극성분화가 일어나는 부위를 1-2 μm 두께로 semi-section하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

극성분화유도. *Populus* 일절편을 목본식물 배양배지 (Russel and McCown, 1986)에서 배양하면서 일절편의 기부 절단면에서 부정아가 재생되는 극성분화를 유도하였다(Fig. 1). 배양 6-7일째에 일절편의 기부 절단면에서 증늑을 중심으로 callus가 유도되었으며 14-16일째에는 이 callus로부터 부정아가 형성되었다. 또한, 배양 45-40일경에는 배지조성의 변화가 없어도 뿌리가 형성되었고 이 식물체를 화분에 옮겨둘 때 정상적인 성장을 하였다. 그리고 이 재생된 *Populus*는 모식물체와 비교할 때 엽선, 엽저 그리고 엽연의 잎의 외형과 거치 등의 형태적 차이는 없었다. 한편 절편의 크기와 모양을 달리하면서 배양하여도 극성분화가 유도되었는데 이로써 *Populus* 일절편으로부터의 극성분화는 절편의 크기, 모양에 관계없이 일어나는 것을 알 수 있었다. 또한, 조직절편을 작게할수록 callus의 형성없이 기부 절단면에서 직접 부정아가 분화되는 현상을 확인할 수 있었으며, 이 경우 부정아의 형성이 배양 후 10일 정도에서 일어나 극성분화가 다소 빠르게 진행되었다.

극성분화 부위의 형태적 변화. *Populus*의 일절편에서 극성분화가 일어나는 기부 절단면을 날짜별로 관찰하여 극성분화가 개시되는 시기와 극성분화에 관여하는 특성 세포부위 그리고 그 부위에서의 형태적 변화에 대하여 조사하였다(Fig. 2). *Populus* 일절편의 기부 단면을 증늑을 중심으로 관찰하였을 때 유관속 구조가 뚜렷하게 나타났다. 엽육조직이 좌우로 연결되어 있었으며 목부와 사부 그리고 구형의 세포들로 구성된 후각조직이 관찰되었다(Fig. 2A). 배양 1일째부터 기부절단면 유관속의 유조직 세포를 중심으로 세포분열이 개시되는 것이 관찰되었다(Fig. 2B). 배양 7일째에는 대조구와 비교할 때 엽육조직에는 변화가 없었으며 abaxial 부위와 adaxial 부위는 구형의 세포들이 일부 남아 있었으나 유관속 부위는 세포분열이 급격히 진행되어 본래의 유관속 구조가 보이지 않았고 유관속 주위에서 새롭게 형성된 세포들은 부정형의 형태로써 callus와 같은 구조를 하고 있었다(Fig. 2C). 배양 10일경에는 배양 7일과 큰 차이는 없었으나 세포분열이 훨씬 더 진행되어 있으며 유관속 부위에는 새로운 형태의 세포들이 형성되기 시작하였다(Fig. 2D). 배양 13일째에는 유관속 부위에서 새로운 동도조직이 분화되는 것이 관찰되었다(Fig. 2E).

생장속정. 3 cm 정도의 어린 *Populus* 잎을 증늑을

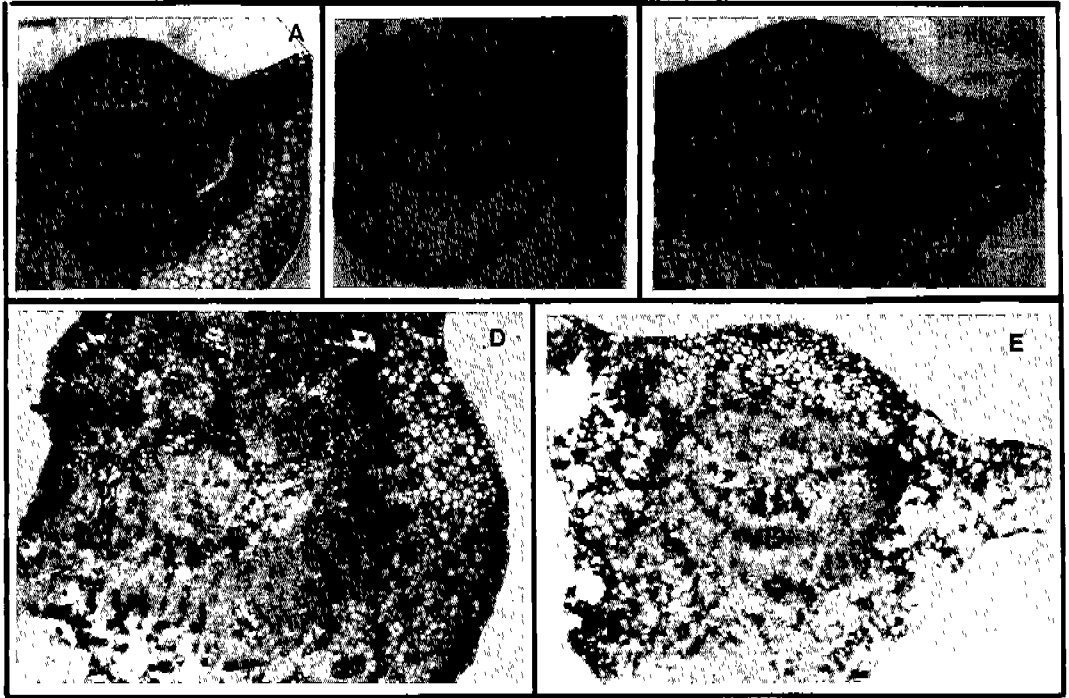


Fig. 2. Transverse sections of the basal cut end of *Populus* leaf segment. A, typical midvein with phloem (P), xylem (X) and collenchyma cells (C); B, 1 day-old culture, cell division (arrow) initiated around the vascular bundle; C, 7 days-old culture, callus (arrow) initiated around the vascular bundle; D, 10 days-old culture, rearrangement around the vascular bundle made; E, vessel element (VE) differentiated around the vascular bundle.

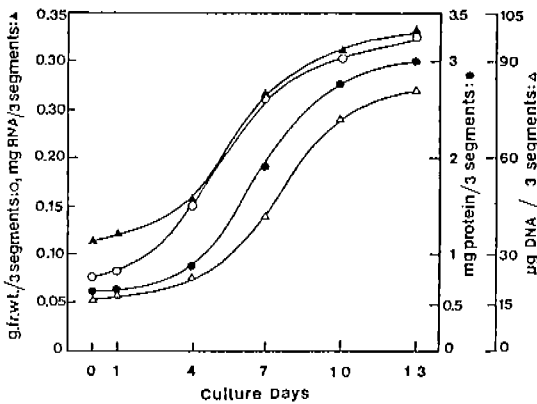


Fig. 3. Changes in fresh weight, DNA, RNA and protein content during polar regeneration as a function of time. ○ - ○, fresh weight; △ - △, DNA content; ▲ - ▲, RNA content; ● - ●, Protein content.

중심으로 0.8 cm×1.7 cm의 절편을 만들어 절편 3개를 woody plant culture medium에서 배양하여 극성분화를

유도하면서 fresh weight, DNA, RNA 그리고 단백질의 정량을 통해 생장을 측정하고 결과 생장곡선은 일반적인 S 자형 곡선을 나타냈다(Fig. 3). 배양 4일에서 10일까지는 지수적 성장을 보였으며 배양 13일경에는 정지상에 도달하였다. 이는 배양 4일에서 10일 사이에 극성분화가 일어나는 부위인 기부 절단면에서 세포분열이 왕성하게 일어나는 것과 밀접한 관계가 있음을 암시하여 준다. 또한, 13일경부터는 생장이 정지상에 들어가고 절편의 선단부위에서는 necrosis가 시작되며 14일경부터는 부정아의 분화로 인한 새로운 대사의 진행이 예상되므로 이후의 생리실험은 부정아가 출현하기 직전인 13일까지를 실험구로 설정하였다.

Polyamine의 함량변화. 식물, 동물 및 미생물에 존재하여 생장조절 물질로서의 다양한 기능을 나타내는 polyamine은 식물의 분화와 발생에도 관계하여 세포분열 촉진(Cohen, 1982; Torrigni *et al.*, 1987), 발근촉진(Jarvis *et al.*, 1985), 화분관 성장촉진(Bagni *et al.*, 1981; Prakash *et al.*, 1988), 배발생 유도(Montague *et al.*, 1978; Feirer *et al.*, 1984) 등의 다양한 기능을 나타낸다. 그러나 극성분화 system에서의 polyamine의 역할은 연구되어 있지

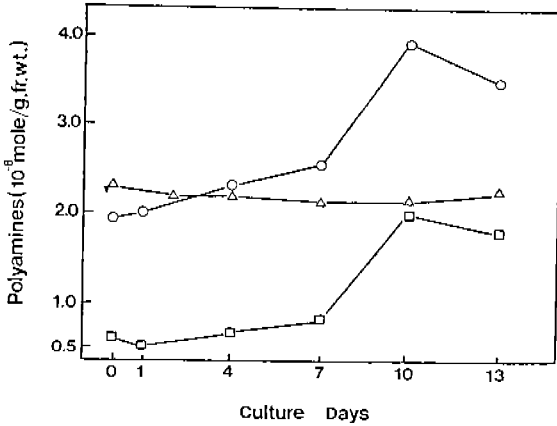


Fig. 4. Changes in polyamine titers during polar regeneration from *Populus* leaf segments. □ - □, putrescine; ○ - ○, spermidine; △ - △, spermine.

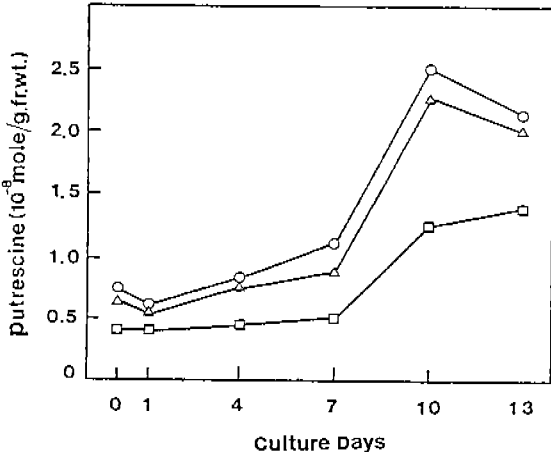


Fig. 5. Changes in putrescine titers during polar regeneration in the three separate parts of *Populus* leaf segments. □ - □, proximal part; △ - △, middle part; ○ - ○, distal part.

않다. 따라서 본 연구에서는 *Populus* 일절편으로부터 극성분화를 유도하면서 극성분화 부위의 해부학적 변화와 함께 polyamine 함량변화의 양상을 비교함으로써 polyamine의 극성분화 관련여부에 대하여 알아보았다(Fig. 4). 극성분화가 진행되는 동안 diamine인 putrescine과 triamine인 spermidine의 함량이 상당히 증가하였다. 그러나, tetramine인 spermine의 함량은 전혀 변화가 없었다. 한편, putrescine과 spermidine의 증가양상은 거의 유사하였으나 spermidine의 양이 putrescine보다 배양기간 동안 약 2배 정도로 높게 유지되었다. 이러한 putrescine과 spermidine의 증가양상은 생장극선과 유사하다. 또한, 배양 4일에서 10일 사이에 극성분화가 일어나는 부위에서 세포분

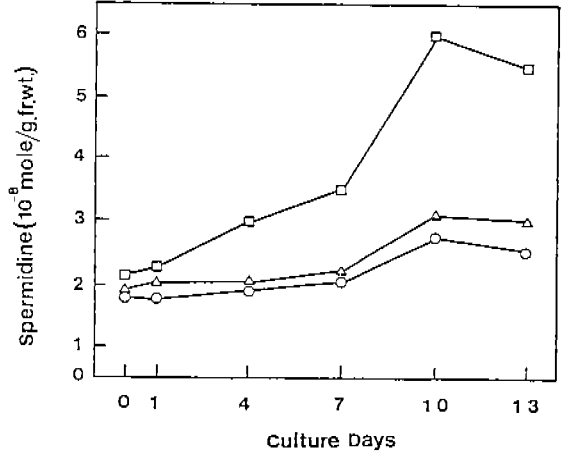


Fig. 6. Changes in spermidine titers during polar regeneration in the three separate parts of *Populus* leaf segments. □ - □, proximal part; △ - △, middle part; ○ - ○, distal part.

열이 급격히 일어나는 것과 putrescine과 spermidine의 함량변화도 이 기간에는 급격히 증가하는 것을 비교하여 볼 때 극성분화에는 putrescine과 spermidine이 관계하리라 하는 가능성이 시사되었다. 그리고 배양 13일째에 putrescine과 spermidine의 함량이 약간 감소하였는데 이는 이 시기에 necrosis가 일어나는 것과 관련이 있는 것으로 생각된다. 그림 4의 결과는 배양기간에 따른 일절편 전체의 내생 polyamine의 함량을 조사한 것이다. 그러나 극성분화는 절편의 절단 하부에서만 유도된다. 이는 일절편 각 부위별로 극성분화에 대한 특이성이 다르다는 것을 시사하는 것이며 따라서 각 부위별로 polyamine의 함량도 상이할 것이라는 가정하에 polar 일절편을 극성분화가 일어나는 기부절단 부위와 극성분화가 일어나지 않는 중간부위 그리고 선단부위의 세부위로 나누어 각 조직에 있어서의 polyamine의 함량변화를 조사하였다(Figs. 5 and 6). 먼저 putrescine의 함량변화를 각 부위별로 조사하였을 때 중간부위와 선단부위에서의 putrescine의 함량변화는 거의 유사한 양상을 나타냈다. 배양 1일째 약간 감소하였다가 그 이후로는 서서히 증가하여 배양 7일에서 10일 사이에는 급격히 증가하였으며 10일 이후에는 약간 감소하였다. 한편, 극성분화가 일어나는 절단하단부에서는 배양 7일까지 putrescine의 함량변화가 거의 없었고 배양 7일 이후에는 약간씩 증가하는 양상을 보였다. 또한 중간부위와 선단부위에서는 putrescine의 함량이 높게 나타나고 절단 하단부위에서는 낮게 나타남으로써 극성분화 과정 중 putrescine의 함량증가는 주로 극성분화가 일어나지 않는 중간부위와 선단부위의 증가로 인한 것임을 알 수 있었다(Fig. 5). 극성분화 과정 중 spermidine의 각 부위별 함량변화는 putrescine과 상이한 양상을 나타냈다. Putrescine의 함량은

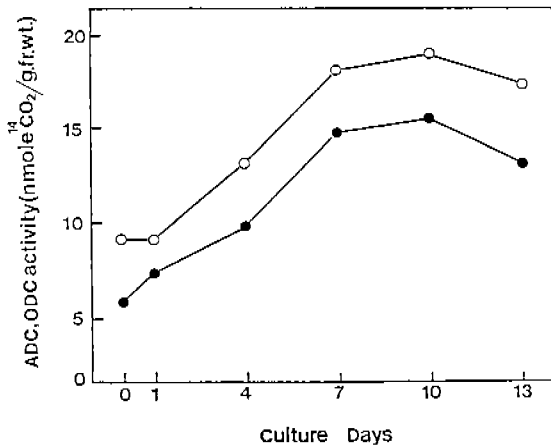


Fig. 7. Changes in ADC and ODC activities during polar regeneration from *Populus* leaf segments. ○—○, ADC; ●—●, ODC.

중간부위와 선단부위에서 높고 극성분화 부위인 하단부위에서 낮은 반면 spermidine은 하단부위에서 배양일이 경과함에 따라 상당히 증가하였고 중간부위와 선단부위는 거의 변화가 없었다. 이로써 극성분화 과정 중의 spermidine의 함량증가는 주로 하단부위에서의 증가에 기인하는 것으로 나타났다(Fig. 6). 일반적으로 식물의 성장과 분화시 polyamine의 함량은 급격히 증가하는 것으로 알려져 있다. *Vigna*의 엽육조직으로부터 추출된 원형질체가 세포분열을 함에 따라 polyamine의 함량이 급격히 증가하였고 노화가 일어날 때에는 polyamine이 감소하였다(Kaur-Sawney *et al.*, 1985). 또한 *Helianthus tuberosus*의 휴면타파시에도 polyamine의 함량증가가 수반되었으며(Kaur-Sawney *et al.*, 1982), 이밖에도 담배 현탁배양세포의 세포분열(Heimer *et al.*, 1979), *Phaseolus*의 화아형성(Palavan and Galston, 1982), 옥수수 뿌리와 보조의 형성(Dumotier *et al.*, 1983), 노란요소분화(Phillips *et al.*, 1987), 당근의 배형성(Fimberg *et al.*, 1984) 등의 경우에서 polyamine의 함량증가가 보고된 바 있다. 한편 polyamine 각각의 생체내 농도는 식물의 성장과 분화의 양상과 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다(Bachrach, 1970; Galston, 1983). 지금까지 연구된 바에 의하면 일반적으로 세포분열이 왕성하게 일어나는 부위에서는 spermidine 또는 spermine의 함량이 급격히 증가하고 세포분열이 일어나는 부위에서는 putrescine의 함량이 상당히 증가하는 것으로 알려져 있다(Dumotier *et al.*, 1983; Kaur-Sawney *et al.*, 1985; Shen and Galston, 1985). 또한 Feirer 등(1984)은 spermidine이 식물의 분화와 발생에 중요한 역할을 한다고 보고한 바 있다. 이상의 결과를 기초로 할 때 본 실험에서 극성분화가 일어나는 절단 하단부에서 spermidine의 함량증가가 급격히 일어나고 극성분화가 일어나지 않는 중간부위와 선단

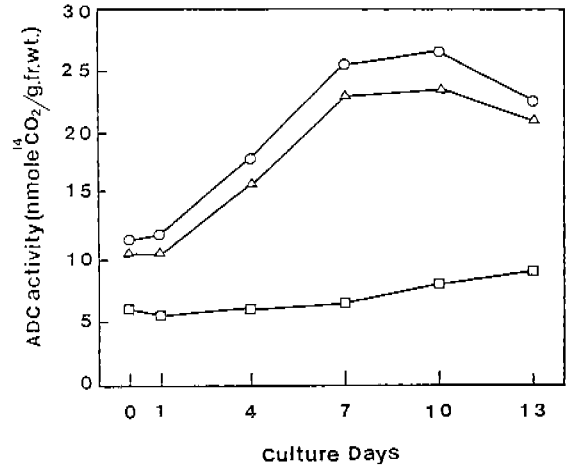


Fig. 8. Changes in ADC activities during polar regeneration in the three separate parts of *Populus* leaf segments. □—□, proximal part; △—△, middle part; ○—○, distal part.

부위에서 putrescine의 함량증가가 일어나는 것은 극성분화가 일어나지 않는 부위에서는 주로 세포분열이 일어나고 절단 하단부에서는 극성분화에 필요한 세포분열이 왕성하게 일어나는 것과 관련이 있으며 이로부터 극성분화에는 spermidine이 직접적으로 관여한다고 가정할 수 있다. 그러나 지금까지 수행된 polyamine에 대한 연구가 안고 있는 근본적인 문제로서 극성분화 과정시 polyamine 특히 spermidine의 함량증가가 극성분화의 원인이 되는지 아니면 결과로 나타나는 현상인지에 대해서는 더 많은 연구가 수행되어야 한다고 생각한다.

Arginine decarboxylase와 ornithine decarboxylase의 활성도 변화. 동물과 미생물의 경우 diamine인 putrescine은 대부분 ornithine decarboxylase에 의하여 L-ornithine으로부터 합성되며(Bachrach, 1970; Pegg and McCown, 1982) putrescine으로부터 triamine인 spermidine과 tetramine인 spermine이 합성된다(Cohen *et al.*, 1982; Smith, 1985). 한편 식물에 있어서는 arginine decarboxylase에 의하여 putrescine이 합성된다는 것이 일반적인 견해이다(Heimer, 1979; Torrigiani *et al.*, 1987). 그러나 세포분열이 왕성하게 일어나는 식물조직에서는 주로 ornithine decarboxylase에 의하여 putrescine이 합성된다고 알려져 있다(Cohen *et al.*, 1982; Tiburcio *et al.*, 1987). 본 실험에서는 *Populus* 일절편으로부터의 극성분화 과정 중 polyamine의 함량변화(Fig. 4)와 함께 arginine decarboxylase와 ornithine decarboxylase의 활성도 변화를 조사하였다(Fig. 7). 일반적으로 식물세포에서 나타나는 현상처럼 전 배양기간 동안 ADC의 활성도가 ODC의 활성도보다 높았다. 그리고 특히하게도 두 효소의 활성도 증가 양상은 서로 거의 유사하여 배양 1일에서 7일까지는 지

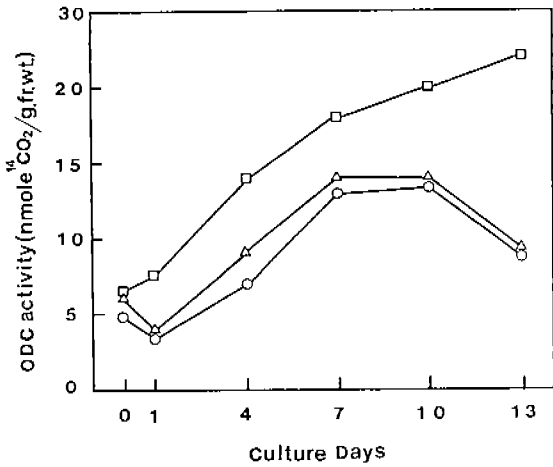


Fig. 9. Changes in ODC activities during polar regeneration in the three separate parts of *Populus* leaf segments. □-□, proximal part; △-△, middle part; ○-○, distal part.

속적으로 활성도가 증가하였으며 7일에서 10일 사이에서는 거의 일정한 수준을 유지하였고 배양 13일째에는 약간 감소하는 경향을 나타냈다. Polyamine의 함량변화와 ADC와 ODC의 활성도 변화를 비교할 때 효소활성도 증가가 polyamine의 함량 증가보다 다소 선행되는 현상을 나타냈다. 한편 절편의 부위에 따라 세포분열능과 세포신장 정도가 상이할 것이라는 전제하에서 polyamine 함량 변화의 경우와 같이 각 절편 부위별로 효소활성도 변화를 조사하였다(Figs. 8 and 9). 먼저 ADC의 경우 극성분화가 유도되는 하단부위에서는 전 배양기간 동안 활성도의 변화가 거의 없었고 중간부위와 선단부위에서는 활성도가 상당히 높았다(Fig. 8). 중간부위와 선단부위에서의 활성도 증가양상은 절편 전체에서 나타난 활성도 증가양상(Fig. 7)과 거의 유사하였다. 이로써 ADC의 활성도 증가는 극성분화가 일어나지 않는 부위에서 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 이는 세포가 stress를 받거나 신장이 일어날때 putrescine의 함량이 급격히 증가하고 ADC의 합성과 활성도가 증가한다는 보고(Flores and Galston, 1982; Young and Galston, 1984)와 일치한다. ODC의 경우는 ADC와 상이한 양상을 나타냈다. 극성분화가 유도되는 하단부위에서 ADC의 활성도 변화가 거의 없었던 반면 ODC는 이 부위에서 배양 1일부터 13일까지 급격한 증가양상을 보였다. 중간부위와 선단부위에서는 배양 1일에서 7일까지는 증가하다가 7일에서 10일 사이에서는 일정한 수준을 유지하였으며 10일 이후에는 약간 감소하였다(Fig. 9). 이로부터 극성분화가 일어나는 하단부위에서의 putrescine의 함량증가는 주로 ornithine decarboxylase의 경로를 통하여 이루어짐을 알 수 있었다. 지금까지 보고된 바로는 분화기구에 관련된 polyamine 생합성 효소는 식물의 종에 따라 상이하다. Monta-

gue 등(1978)과 Feirer 등(1984)은 당근 배양세포로부터 배발생이 유도되는 데에는 ADC의 경로를 통해 합성된 putrescine이 요구된다고 보고하였으며, Cohen 등(1982)은 tomato와 감자의 경우 ODC에 의하여 합성된 putrescine이 성장과 분화에 관계한다고 보고하였다. 목본식물을 재료로 분화과정시 ADC, ODC의 활성도 변화에 관한 연구는 보고된 바 없으나 *Populus*의 경우 극성분화에 관계하는 polyamine은 ODC의 경로를 통하여 합성되는 것으로 사료된다. 한편, 배양초기에 극성분화 부위에서 ornithine decarboxylase의 활성도가 상당히 높게 나타남에도 불구하고 putrescine의 함량은 거의 변화가 없고(Fig. 5) spermidine의 함량이 상당히 증가하는데(Fig. 6) 이로부터 putrescine이 spermidine으로 상당히 빠르게 전환됨을 알 수 있다. 실제로 분화가 일어날 때 putrescine이 spermidine으로 상당히 빠르게 전환된다고 알려져 있다(Dumotier *et al.*, 1983; Shen and Galston, 1985).

적 요

Populus 잎절편으로부터 극성분화를 유도하면서 극성분화 부위의 해부학적 변화와 함께 극성분화 과정에 따른 polyamine의 함량변화와 polyamine의 생합성에 관여하는 효소들의 활성도 변화를 조사하였다. 배양 1일째부터 절편기부단면 유관속의 유조직 세포를 중심으로 세포분열이 개시되었고 배양 4일에서 10일 사이에 세포분열이 급격히 진행되어 배양 2주 정도에서 기부단면으로부터 부정아가 분화되었다. 극성분화 과정 동안 putrescine과 spermidine의 함량이 증가하였고 spermine의 함량은 변화가 없었으나 절편을 극성분화가 유도되는 하단부위와 극성분화가 일어나지 않는 중간부위와 선단부위의 세 부위로 나누어 polyamine의 함량을 조사하였을 때 극성분화 부위에서는 spermidine의 함량이 급격히 증가하였다.

Polyamine의 합성효소인 ACD와 ODC의 경우 배양기간 동안 두 효소의 활성도가 모두 증가하였고 증가양상은 서로 유사하였으나 ADC가 ODC 활성도보다 높게 나타났다. 그러나 절편을 세 부위로 나누어 활성도를 조사하였을 때 극성분화 부위에서는 ODC의 활성도가 상당히 높았다. 이상의 결과로 극성분화 system에는 ODC와 spermidine이 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Altman, A. 1982. Retardation of radish leaf senescence by polyamines. *Physiol. Plant.* **54**: 189-193.
 Altman, A., R. Friedman, D. Adir and N. Nevin. 1982. Polyamine effects and metabolism in plants under stress conditions. In *Plant Growth Substances*. Academic Press, New York. pp. 483-494.
 Bachrach, U. 1970. Metabolism and function of spermine and related polyamines. *Ann. Rev. Microbiol.* **24**: 109-

134.

- Bagni, N., B. Malucelli and P. Torrigiani. 1980. Polyamine storage substances and abscisic acid-like inhibitors during dormancy and very early activation of *Helianthus tuberosus*. *Physiol. Plant.* **49**: 341-345.
- Bagni, N., D. Serafini-Fracassini and P. Torrigiani. 1982. Polyamines and cellular growth processes in higher plants. In, *Plant Growth Substances*. Academic Press, New York. pp. 473-482.
- Bagni, N., P. Adamo, D. Serafini-Fracassini and V.R. Cillanueva. 1981. RNA, proteins and polyamines during tube growth in germinating apple pollen. *Plant Physiol.* **68**: 727-730.
- Brossard, D. 1977. Organogenesis from foliar discs of *Crepis capillaris* L. cultured *in vitro*. Cytochemical and microspectrophotometric analysis. *New Phytol.* **79**: 423-429.
- Cohen, E., Y. Heimcr and Y. Mizrahi. 1982. Ornithine decarboxylase and arginine decarboxylase activities in meristematic tissues of tomato and potato plants. *Plant Physiol.* **70**: 544-546.
- Cutter, E.G. 1962. Regeneration in *Zamioculcas*. *Ann. Bot.* **26**: 25-70.
- Dore, J. 1965. Physiology of regeneration in cormophytes. *Encycl. Plant Physiol. New Ser.* **15**: 1-91.
- Douglas, G.C. 1985. Formation of adventitious buds in stem internodes of *Populus* hybrid TT32 cultured *in vitro*. Effects of sucrose, zeatin, IAA and ABA. *J. Plant Physiol.* **121**: 225-231.
- Dumotier, F.M., H.E. Flores, N.S. Shekhawat and A.W. Galston. 1983. Gradients of polyamines and their biosynthetic enzymes in coleoptiles and roots of corn. *Plant Physiol.* **72**: 915-918.
- Evans, P.T., B.L. Holaway and R.L. Malmberg. 1988. Biochemical differentiation in the tobacco flower probed with monoclonal antibodies. *Planta* **175**: 259-269.
- Feirer, R., G. Mignon and J. Litvay. 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrots. *Science* **223**: 1433-1435.
- Finberg, A.A., J.H. Choi, W.P. Lubich and Z.R. Sung. 1984. Developmental regulation of polyamine metabolism in growth and differentiation of carrot culture. *Planta* **162**: 532-539.
- Flores, H.E. and A.W. Galston. 1982. Polyamines and plant stress: Activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. *Science* **217**: 1259-1261.
- Galston, A.W. 1983. Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience* **3**: 382-388.
- Galston, A.W., A. Altman and R. Kaur-Sawney. 1978. Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat protoplasts. *Plant Sci. Lett.* **11**: 69-70.
- Galston, A.W. and R. Kaur-Sawney. 1980. Polyamines and plant cells. *WNPP.* **11**: 5-8.
- Goren, R., N. Palavan, H. Flores and A.W. Galston. 1982. Changes in polyamine titer in etiolated pea seedlings following red-light treatment. *Plant Cell Physiol.* **23**: 19-26.
- Heimcr, Y., Y. Mizrahi and U. Bachrach. 1979. Ornithine decarboxylase activity in rapidly proliferation plant cells. *FEBS Lett.* **104**: 146-149.
- Jarvis, B.C., S. Yasmin and M.T. Coleman. 1985. RNA and protein metabolism during adventitious root formation in stem cuttings of *Phaseolus aureus* cultivar berkin. *Physiol. Plant.* **64**: 53-59.
- Kato, Y. and S. Kawahara. 1972. Bud formation in leaves, leaf fragments and midrib pieces of *Helianopsis orientalis*. *Planta* **107**: 111-120.
- Kaur-Sawney, R., N.S. Shekhawat and A.W. Galston. 1985. Polyamine levels as related to growth, differentiation and senescence in protoplast-derived cultures of *Vigna acuminifolia* and *Avena sativa*. *Plant Growth Regul.* **3**: 320-337.
- Komizerko, E.I., N.M. Zhloba, R.K. Turetskaya and V.I. Kefeli. 1978. Polarizing and stimulating effects of auxin on initial processes of organogenesis and growth. *Fiziol. Rast.* **25**: 243-248.
- Lee-Stadelmann, O.Y., S. W. Lee, W.P. Hackett and P.E. Read. 1989. The formation of adventitious buds *in vitro* on micro-cross sections of hybrid *Populus* leaf midveins. *Plant Sci.* **61**: 263-272.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and J.R. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 263-275.
- Montague, M., J. Koppenbrink and E. Jaworski. 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol.* **62**: 430-433.
- Naik, B.I. and S.K. Srivastava. 1978. Effect of polyamines on tissue permeability. *Phytochemistry* **17**: 1885-1887.
- Obhidalova, L., K. Slaby and J. Sebanek. 1979. The polarity of endogenous regulatory substance in *Brophyllum crenatum* leaves and stem. *Bio. Plant.* **21**: 22-26.
- Palavan, N. and A.W. Galston. 1982. Polyamine biosynthesis and titer during various development stages of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* **55**: 438-444.
- Paterson, K. 1983. Polarity of regeneration in excised leaves of *Crassula argentea*. A role of auxin. *Can. J. Bot.* **61**: 1058-1063.
- Pegg, E.A. and P.P. McCown. 1982. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* **12**: 212-221.
- Phillips, R., M.C. Press and A. Eason. 1987. Polyamines in relation to cell division and xylogenesis in cultured explants of *Helianthus tuberosus*. *J. Exp. Bot.* **38**: 164-172.
- Popovic, R.B., D.J. Kyle, A.S. Cohen and S. Zalik. 1979. Stabilization of thylakoid membranes by spermine during st-

- ress-induced senescence of barley leaf disc. *Plant Physiol.* **64**: 721-726.
- Prakash, L., P. John, G.M. Nair and G. Pprathapaseenan. 1988. Effect of spermidine and MGBG on *in vitro* pollen germination and tube growth in *Calharanthus roseus*. *Ann. Bot.* **61**: 373-375.
- Raju, M.V.S. and H.E. Mann. 1971. Regenerative studies on the detached leaves of *Echeveria elegans*. *Can. J. Bot.* **49**: 2015-2021.
- Russell, J.A. and B.H. McCown. 1986. Culture and regeneration of *Populus* leaf protoplasts isolated from non-seedling tissue. *Plant Sci.* **46**: 133-142.
- Rutledge, C.B. and G.C. Douglas. 1988. Culture of meristem tips and micropropagation of 12 commercial clones of polar *in vitro*. *Physiol. Plant.* **72**: 367-373.
- Schneider, W.C. 1957. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. *In*, Methods in Enzymology, S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds.), Vol. 3, Academic Press, New York. pp. 680-681.
- Sebanek, J., F. Kopecky and K. Slaby. 1978. Endogenous gibberellins and auxins in the stem of *Bryophyllum* in relationship to its polarity. *Biol. Plant.* **20**: 138-141.
- Serafini-Fracassini, D., P. Torrigiani and C. Branca. 1984. Polyamines bound to nucleic acids during dormancy and activation of tuber cells of *Helianthus tuberosus*. *Physiol. Plant.* **60**: 351-357.
- Shen, H.J. and A.W. Galston. 1985. Correlations between polyamine ratios and growth patterns in seedling roots. *Plant Growth Regul.* **3**: 353-363.
- Smith, T.A. 1985. Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 117-143.
- Tiburcio, A.F., R. Kaur-Sawney and A.W. Galston. 1987. Effect of polyamine biosynthetic inhibitors on alkaloids and organogenesis in tobacco callus cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **9**: 111-120.
- Torrigiani, P., D. Serafini-Fracassini and N. Bagni. 1987. Polyamine biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during the cell cycle of *Helianthus tuber*. *Plant Physiol.* **84**: 148-152.
- Veierskov, B. and K.V. Thimann. 1988. The control of protein breakdown and synthesis in the senescence of oat leaves. *Physiol. Plant.* **72**: 257-264.
- Young, N.D. and A.W. Galston. 1984. Physiological control of arginine decarboxylase activity in potassium deficient oat shoots. *Plant Physiol.* **79**: 331-335.

(1990, 9, 22 接受)