

당근 현탁 배양세포의 성장과 분화에 관한 연구
I. 배형성 과정에서 Peroxidase 활성, Polyamine 함량 및
Ethylene 생성의 변화

金應植·金明苑*·康榮燾·梁德祚**
(연세대학교 이과대학 생물학과, *문리대학 생물학과, **충북대학교 생물학과)

Studies on Growth and Differentiation of
Suspension-Cultured Carrot Cells
I. Alterations in Peroxidase Activity, Polyamine Content and
Ethylene Production during Somatic Embryogenesis

Kim, Eung Sik, Myeong Won Kim*, Young Hee Kang and
Deok Jo Yang**

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul,
*Department of Biology, Yonsei University, Wonju and
**Department of Biology, Chungbuk University, Cheongju)

ABSTRACT

Changes of peroxidase activity, polyamine content and ethylene production during somatic embryogenesis in suspension-cultured carrot (*Daucus carota* L.) cells were investigated. As compared with nonembryogenic cells and their medium, embryogenic cells and their medium were characterized by higher levels of peroxidase at all times of culture period. Peroxidase in embryogenic cells showed higher oxidation activity of IAA than in nonembryogenic cells at the torpedo stage, but the IAA oxidation activity of peroxidase released into embryogenic medium was lower than that of peroxidase released into nonembryogenic medium. Peroxidase patterns of embryogenic and nonembryogenic cells showed three cathodic bands, and one anodic band, while peroxidase patterns released into embryogenic and nonembryogenic media did not show any anodic bands and the isoelectric points of cathodic peroxidase were pH 7.7, 7.5 and 6.6. Compared with nonembryogenic cells, polyamine content in embryogenic cells was increased by 15% at the torpedo stage, but polyamine ratio was constant, and ethylene production was extremely low at all times of culture period. Therefore, it is suggested that the peroxidase in embryogenic cells is correlated with embryogenesis by regulating hormone ratios through IAA oxidation, while the peroxidase isozyme patterns may be used as a biochemical marker of embryogenesis. The increase of polyamine content and the decrease of ethylene production suggest an interaction between polyamine and ethylene during embryogenesis.

서 론

당근(*Daucus carota* L.)의 현탁 배양세포에서 Steward 등(1958)이 처음 배형성 세포를 발견한 이래 현재까지 분화능이 높은 30여개 과에서 인위적으로 배형성을 유도할 수 있었으며 인위적 돌연변이와 원형질체에서도 체세포 배를 유도하여 유용한 식물체를 얻고자 하는 연구가 있다(Kamo *et al.*, 1987; Loschiavo *et al.*, 1988).

당근 배양세포에서 배형성을 유도하였을 때 globular, heart 및 torpedo 형태의 단계를 거쳐 체세포 배가 형성되며 초기에 빠른 세포분열이 일어나고 세포는 큰 전분립과 핵을 가지며 원형질체 밀도와 DNA 및 단백질 합성이 증가한다. 배형성은 고농도의 질소원 공급과 auxin을 결제 시킴으로써 유도할 수 있으며 세포 수준에서 식물의 생장과 분화를 연구하는 유용한 수단으로 사용된다(Fujimura *et al.*, 1980; Fujimura and Komamine, 1980; Caligo *et al.*, 1985). 식물체의 분화시 peroxidase는 그 활성과 특성이 변하며 종류와 기능 또한 다양하고 이들은 배지에 방출된다(Kochba *et al.*, 1977; Wolter and Gordon, 1975; Chibbar *et al.*, 1984). 또한 peroxidase는 phenol 화합물 및 IAA와 NADH의 산화 뿐만 아니라 목질화와 코르크화 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.(Srivastava and Van Huystee, 1973; Chibbar and Van Huystee, 1984; Pedreno *et al.*, 1987; Mäder and Füssl, 1982; Johnson-Flanagan and Owens, 1985). Isozyme으로서 peroxidase의 전기영동적 특성은 auxin과 cytokinin 및 gibberellin의 영향을 받으며 품종, 배양기간, 기관분화 및 조직부위, 계절, 온도 등에 따라 변한다(Lee, 1972; Carins *et al.*, 1980; Berger, *et al.*, 1985; Kay and Basile, 1987; Imberty, *et al.*, 1985; Bricage, 1988).

이러한 peroxidase의 활성과 특성의 변화는 기관분화에 있어서 하나의 특징으로 간주되며 분화시 peroxidase의 중요성에 대하여 많은 논의가 있었으나 그 명확한 기작은 밝혀져 있지 않으며 특히 세포수준의 분화단계에 있어서는 연구가 거의 이루어져 있지 않다(Kochba *et al.*, 1977; Mäder and Füssel, 1982; Wolter and Gordon, 1975).

Polyamine은 또한 분화에 관여하며, 단백질과 핵산의 합성을 촉진시키고 세포분열과 증식에도 관여한다(Walker *et al.*, 1985). *Vigna acuminifolia*의 배와 근형성 callus에서 polyamine 함량이 증가하며 대두 발아시 embryonic axis에서도 cadaverine과 putrescine이 증가하고 감자 정아의 발아시에도 합성이 증가하는 것으로 알려져 있어 polyamine은 식물 생장과 분화에 있어서 생장 조절물질로서 중요한 역할을 하며, 또한 ethylene과 공동의 전구체인 S-adenosylmethionine(SAM)에서 aminocyclopropane carboxylic acid로의 전환을 억제하고 이들의 생합성에 서로 영향을 준다(Kaur-Sawhney *et al.*, 1982, 1985; Lin, 1984).

Ethylene 또한 분화에 관여하나 명백한 기능은 밝혀져

있지 않고 십자화과의 분화와 가문비나무의 배형성은 억제하나 백합의 눈형성과 담배의 묘조 분화는 촉진한다는 상반된 견해가 있을 뿐이다(Lentini *et al.*, 1988; Wann *et al.*, 1987; Van Huystee and Lobarzewski, 1982).

본 실험에서는 당근 배양세포로부터 배형성을 유도하여 세포내 peroxidase와 배지에 방출된 peroxidase의 활성과 전기영동적 특성, peroxidase에 의한 IAA 산화와 체세포 배형성 과정에 따른 polyamine과 ethylene의 변화를 조사함으로써 인위적 배형성 유도를 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

배형성 세포의 유도. 당근(*Daucus carota* L.) 뿌리의 형성층을 세절하여 70% ethanol에 2분, 1.5% sodium hypochlorite 용액에 20분 동안 멸균하고, 멸균수로 3회 세척한 후 0.1-B5(0.1 mg/ml 2,4-D) 고체배지로 옮겨 27±1°C에서 callus를 유도하였다. 유도된 callus는 생장상태가 좋은 것을 골라 현탁 배양하면서 배형성을 유도하는 재료로 사용하였다.

당근 배양세포에서 배형성을 유도하기 위하여 초기 단계에서는 1 mg/l 2,4-D를 처리한 B5 배지에서 2주일 동안 현탁 배양한 다음, 유도단계에서는 배양세포를 (NH₄)₂SO₄와 2,4-D를 결제시키고 0.1 μM zeatin, 10 mM α-alanine, 55 mM NH₄Cl이 첨가된 배형성 유도배지로 3회 세척(500×g)한 후 27±1°C, 100 rpm의 속도에서 14일간 현탁 배양하면서 배형성을 유도하고 배형성 단계인 globular, heart 및 torpedo 형태가 관찰되는 4, 7, 10, 14일째의 배형성 세포를 실험재료로 각각 사용하였다(Mcwilliam *et al.*, 1974; Fujimura and Komamine, 1975, 1980a, b; Kamada and Harada, 1979a, b, 1984; Sakano, 1981; Nomura and Komamine, 1985; Borkird *et al.*, 1986).

이 때 zeatin과 α-alanine은 Sartorius membrane filter (pore size 0.45 μm)를 사용하여 무균여과하여 사용하였으며 분화능을 유지하기 위하여 유도한 지 24주간의 callus를 실험재료로 하였고 배형성을 억제하기 위하여 1 mg/l 2,4-D 처리한 것을 대조구로 하였으며 계대 배양세포 및 배지는 0.1-B5 배지에서 배양한 것으로 하였다(Smith and Street, 1974; Brown *et al.*, 1976; Wetherell and dougall, 1976; Dixon, 1985). 배형성 세포는 자동카메라 부착된 Nikon 위상차현미경(CF phase objective & contrast turret condenser N.A.)을 사용하여 관찰하였다.

단백질 정량. 세포내 총 단백질은 whatman GF/C filter pad를 사용하여 0.5 g의 배양세포를 모은 후 끓은 70% ethanol에 2회 세척하고 acetone으로 건조시킨 다음 1 N NaOH(1 ml/mg 단백질)를 첨가하여 85°C에서 100분 동안 가수분해한 후 여과시켜서 정량하였다(Street, 1977). 총 단백질 및 효소 단백질은 coomassie brilliant blue G-250 0.01%(w/v)를 이용하여 595 nm에서 측정하였으며 이 때

표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다 (Bradford, 1976).

Peroxidase(EC 1.11.1.7) 추출 및 활성도 측정.

Peroxidase 활성도는 Grison과 Pilot(1985)의 방법을 수정하여 사용하였다. 현탁 배양세포를 차가운 증류수로 여과 세척한 후 1g당 1ml의 0.066 M 인산완충용액(pH 6.0)과 소량의 석영사를 섞어서 막자사발로 균질화한 다음 18,000 ×g에서 20분간 원심분리하여(Hitachi, Model 20PR-S, Automatic High Speed Centrifuge) 얻어진 상정액을 조효소원으로 사용하여 전 과정은 4°C 이하에서 진행하였다.

배지에 방출된 peroxidase 추출은 Kim(1978) 및 Coppers와 Gillis(1987)의 방법을 수정하여 사용하였다. 세포 배양한 배지를 whatman No.2 filter paper로 여과한 다음 25% ammonium sulfate를 넣어 27,000 ×g에서 20분간 원심분리하고 그 상정액을 다시 90% ammonium sulfate 포화용액으로 만들어 같은 조건에서 원심분리한 다음 침전물에 소량의 5 mM 인산완충용액(pH 6.0)을 첨가하여 용해한 후 같은 완충용액으로 4°C에서 24시간 투석하였다. 이 투석한 용액을 냉동 건조한 후 1ml의 5 mM 인산완충용액(pH 6.0)으로 용해하여 배지에 방출된 peroxidase의 조효소원으로 사용하였다.

효소의 활성도는 40 mM 인산완충용액(pH 6.5), 10 mM guaiacol과 100 μl의 조효소원을 첨가하여 전체 부피가 3 ml되게 하였으며 30°C에서 10분 동안 반응을 시킨 다음 10 mM H₂O₂를 첨가하여 470 nm에서 흡광도 증가를 spectrophotometer(Shimadzu, UV-Visible Recording Spectrophotometer)로 측정하였다. 효소 활성도는 1분 동안 단백질 1 mg당 흡광도의 변화로 나타낸다.

Peroxidase에 의한 IAA의 산화. Peroxidase에 의한 IAA의 산화는 Rao 등(1982)의 방법을 수정하여 사용하였다. 전기영동한 gel을 일정 길이로 잘라 균질화한 다음 0.066 M 인산완충용액(pH 6.0)에 용해시켜서 18,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상정액을 같은 완충용액으로 4°C에서 24시간 투석한 후 조효소원을 얻었다. 반응액은 0.2 mM MnCl₂, 0.2 mM 2,4-dichlorophenol, 0.23 mM IAA, 10 mM H₂O₂, 0.02 M 인산완충용액(pH 6.4)에 조효소원을 첨가하여 전체 부피가 2 ml되게 하였다. 이 혼합액을 암소에서 28 ± 1°C를 유지하면서 30분간 반응시킨 다음 salkowski reagent(0.5 M ferric chloride 15 ml, conc. sulfuric acid 300 ml, 증류수 500 ml) 4 ml를 첨가하여 다시 30분간 방치한 다음 530 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 IAA의 산화 정도를 측정하였다(Yoneda and Stonier, 1966).

Peroxidase의 전기영동. Starch gel을 사용한 전기영동은 Graham 등(1965)과 Divall(1984)의 방법을 수정하여 사용하였다. Gel은 5 mM histidine 용액(pH 7.0)에 11% starch를 녹여서 만들었으며 12시간 이상 4°C에서 균질 다음 사용하였고 전기는 단백질을 5-10 μg loading하여 120 volt에서 6시간 동안 저온실에서 진행하였으며 electrode

용액은 0.41 M sodium citrate 용액(pH 7.0)을 사용하였다. 전기영동이 끝난 gel은 두 층으로 분리하여 100 mg 3-amino-9-ethyl cabazole이 포함된 dimethyl-formamide 10 ml와 50 mM acetate 완충용액(pH 5.0) 185 ml, 100 mM CaCl₂ 10 ml, 30% H₂O₂ 0.2 ml에 담가 30°C에서 15분간 발색시킨 다음 흐르는 물에 세척한 후 전기영동적 특성을 조사하였다. 등전점 전기영동은 Stegeman과 Park(1979)의 방법을 수정하여 다음과 같이 시행하였다. 0.1% ampholine을 포함하는 6% disk acrylamide gel(0.8 × 9 cm) 뒷면에 10% sucrose가 첨가된 조효소원에 10-50 μg과 5% sucrose가 첨가된 0.1% ampholine 용액을 층이 분리되도록 loading하여 100 volt에서 1시간, 200 volt에서 5시간 동안 4°C에서 진행하였으며 양극 용액은 0.01 M H₃PO₄, 음극 용액으로는 0.2 M NaOH를 사용하였고, ampholine은 Pharmalyte(pH 3-10)를 사용하였다. 이 때 blank gel을 동시에 전개하여 염색하지 않은 상태에서 1 cm 간격으로 절단하여 pH 7.0이 되게 직정한 증류수로 12시간 동안 용출하여 pH 구배를 조사하였고 1% guaiacol, 50 mM 인산완충용액(pH 6.0), 0.2%(v/v) H₂O₂를 2 : 2 : 1의 비율로 혼합하여 gel당 6 ml씩 넣어 상온에서 15분간 발색시켰다.

Polyamine과 ethylene 측정. Polyamine의 정량은 Gordon 등(1982)의 방법을 수정하여 사용하였다. 시료를 1g당 5% perchloric acid(HClO₄) 3 ml로 균질화한 다음 4°C에서 27,000 ×g로 20분간 원심분리하여 그 상정액을 시료로 사용하였다. 상정액 200 μl, dansylchloride 400 μl, 포화된 Na₂CO₃ 200 μl를 혼합하여 상온의 암실에서 12시간 동안 반응시켰다. 여기에 100 μl proline을 첨가하여 30분간 다시 상온의 암실에서 반응시킨 다음 500 μl benzene으로 dansyl 유도체를 추출하여 이중 200 μl를 silica gel 60 thin layer plate에 점적하여 chloroform: triethylamine(25 : 2, v/v)의 전개용매로 전개시켜 자외선하에서 표준 시료와 비교하여 읽어낸 다음 다시 photofluorimeter에서 형광 강도를 측정하여 정량하였다.

Ethylene은 시료를 250 ml의 Erlenmyer flask에 넣고 silicon 마개로 밀봉한 후 27 ± 1°C에서 20시간 동안 현탁 배양한 다음 용기내 기체 1 ml 주사기로 채취하여 gas chromatography(Shimadzu, GC-3BF, flame ionization detector, active alumina column, 100°C, air: 0.4 kg·cm⁻², carrier N₂: 2 kg·cm⁻², H₂: 0.4 kg·cm⁻²)로 분석하여 배양세포가 생성한 ethylene 양을 측정하였다(Yu and Yang, 1979).

결 과

배형성 세포 관찰. Fig. 1은 배형성 유도체지로 옮긴 후 배형성 단계별로 관찰한 것으로 배양 4일부터는 globular 형태의 배들이 나타나기 시작하였다(Fig. 1A). 배양 6-7일에는 heart 형태의 배가 형성되었으며(Fig. 1B), 배양 9-10일에는 heart 형태의 배가 torpedo 형태로 길게 신장되는 단계에 이르렀고(Fig. 1C) 배양 말기에는 torpedo

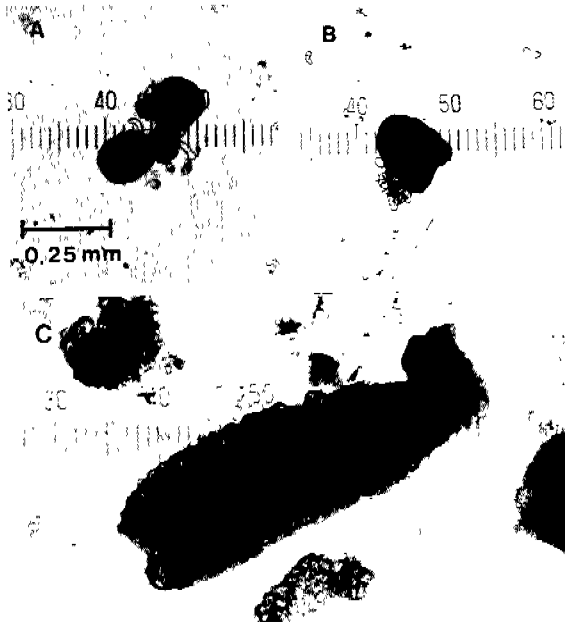


Fig. 1. Photographs of somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. A, globular stage on 4th day after transfer to embryogenic medium; B, heart stage on 7th day after transfer to embryogenic medium; C, torpedo stage on 10th day after transfer to embryogenic medium.

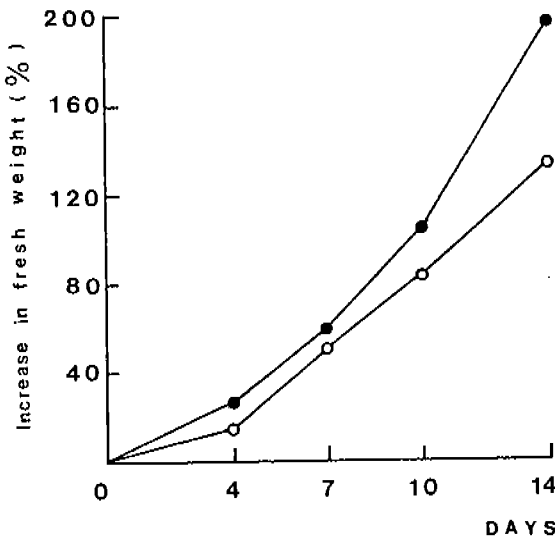


Fig. 2. Growth rate in embryogenic (●-●) and non-embryogenic (○-○) carrot suspension-cultured cells.

단계가 더욱 진행되었다. Fig. 2는 신선중의 변화를 나타낸 것으로 배양 4일부터 배형성 세포가 다소 높은 증가율을 보였으며 배양 14일째에는 약 200% 증가하여 배형성 억

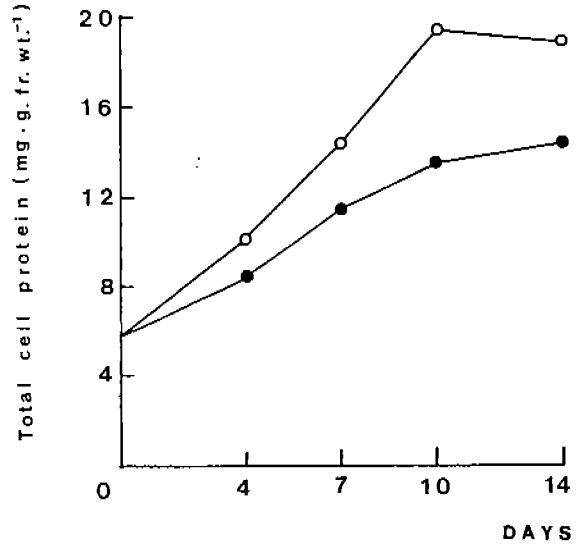


Fig. 3. Total cell protein in embryogenic (●-●) and non-embryogenic (○-○) carrot suspension-cultured cells.

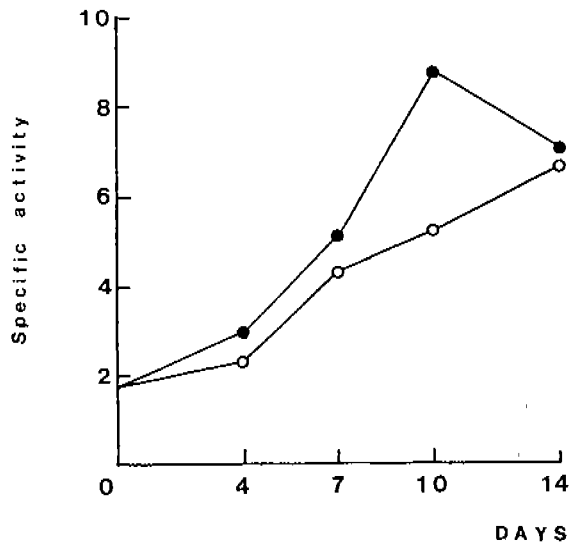


Fig. 4. Peroxidase activity in embryogenic (●-●) and non-embryogenic (○-○) carrot suspension-cultured cells. The enzyme activity was expressed as $\Delta OD_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$.

제세포보다 70% 가량 높은 증가율을 보였다. 총 단백질은 신선 중의 증가율과는 달리 반대 경향이 나타나(Fig. 3), 배형성 세포는 배양 14일까지 계속 증가하여 150% 가량 증가를 보이나 배형성 억제세포는 배양 14일째에서 다소 감소하며 230% 가량 증가하였다.

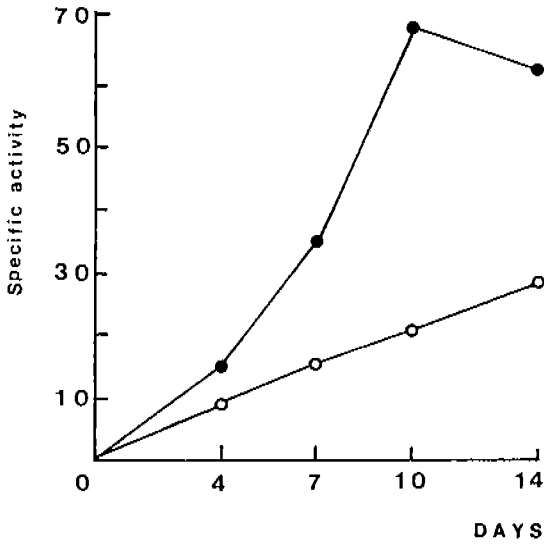


Fig. 5. Peroxidase activity in embryogenic (●-●) and nonembryogenic (○-○) carrot suspension-cultured media. The enzyme activity was expressed as $\Delta OD_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$.

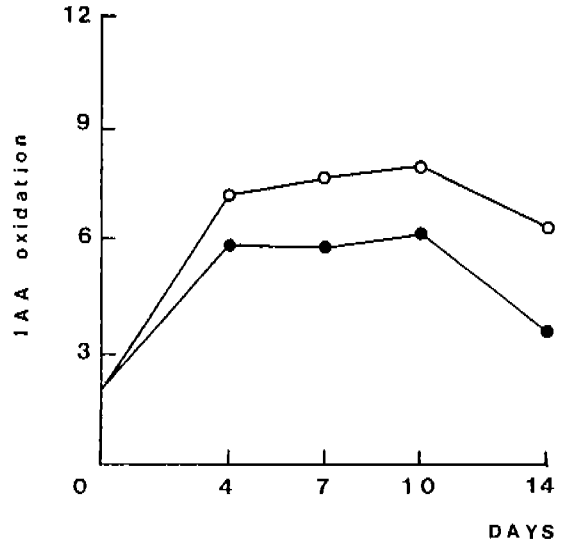


Fig. 7. IAA oxidation of cathodic peroxidase in embryogenic (●-●) and nonembryogenic (○-○) carrot suspension-cultured media. The enzyme activity was expressed as $\text{mg IAA oxidised} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$.

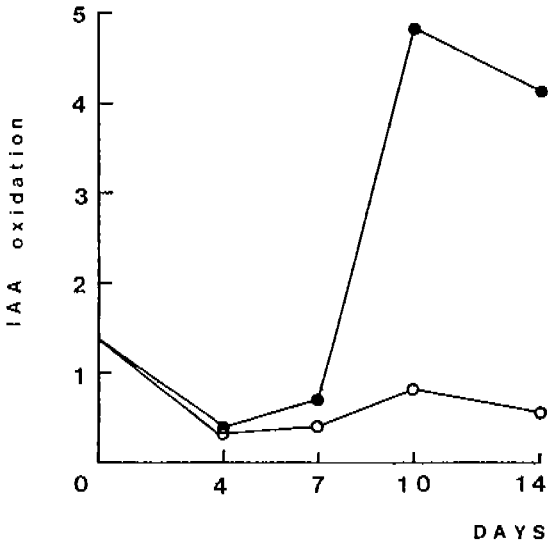


Fig. 6. IAA oxidation of cathodic peroxidase in embryogenic (●-●) and nonembryogenic (○-○) carrot suspension-cultured cells. The enzyme activity was expressed as $\text{mg IAA oxidised} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$.

10일에서 70% 가량 낮은 활성을 보였다. 배형성 유도배지에 방출된 peroxidase 활성의 전반적인 경향은 배형성 세포의 peroxidase 활성변화와 유사하며 배양 10일에서 가장 높은 활성을 보여 배형성 억제배지보다 3.2배 가량의 높은 활성이 나타났다(Fig. 5).

Figs. 6과 7은 peroxidase에 의하여 IAA가 산화되는 양을 나타낸 것이다. 배형성 세포의 peroxidase는 배양 10일에서 5배 높은 IAA 산화능을 나타내다가 배양 말기에서 다소 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6). 배지에 방출된 peroxidase는 globular 형태의 배가 형성되는 배양 초기부터 높은 IAA 산화를 보여 배양 4, 7, 10일에서 일정한 산화능을 보이다가 배양 말기에서 다소 감소하며 배형성 억제배지에 방출된 peroxidase보다 전반적으로 낮은 IAA 산화능을 보여 세포내 peroxidase와는 다른 경향을 보였다(Fig. 7).

Fig. 8과 9는 peroxidase를 starch gel 전기영동한 결과이다. 느리게 이동한 band를 1로 하였고 빠르게 이동할수록 높은 수를 사용하였으며 음극으로 이동한 band는 C, 양극으로 이동한 band는 A로 표시하였다. 세포내 peroxidase 경우 3개의 cathodic peroxidase인 C₁, C₂, C₃와 1개의 anodic peroxidase인 A₁이 나타났으나 주요 band인 C₂와 C₃는 배형성 억제세포와 별다른 차이는 없고 단지 C₁ peroxidase는 배양 7일에서 사라지나 배형성 억제세포에서는 배양 말기에 사라졌다(Fig. 8). 배지로 방출된 peroxidase의 경우 C₂가 주요 band이고 C₃가 subband로 나타났다(Fig. 9). C₁ peroxidase는 배양말기인 14일에서 배형성 억제배지와 배형성 유도배지에서 나타났으며 C₃ peroxidase는 배형성 유도배지에서 배양 초기부터 나타나나 배형성 억

Peroxidase 활성 및 특성. Fig. 4는 세포내 peroxidase 활성을 나타낸 것으로 배형성 세포에서 배양 14일째에 4.5배 증가하여 가장 높은 활성을 보이며 배양 말기에는 다소 감소하여 3.5배의 높은 활성을 보였다. 배형성 억제 세포는 배양기간 동안 계속 증가하나 배형성 세포보다 배양

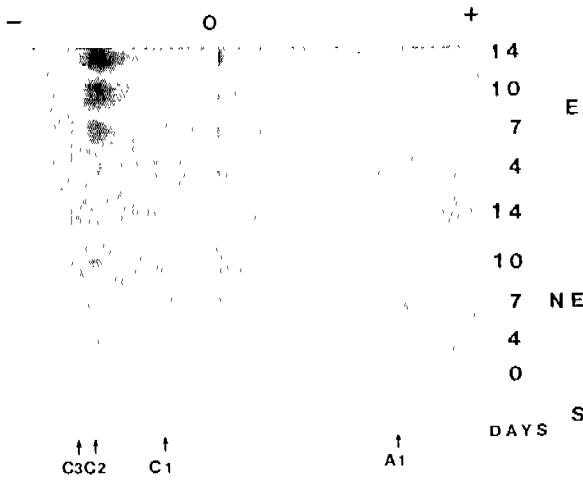


Fig. 8. Starch gel electrophoretic pattern of peroxidase in embryogenic and nonembryogenic carrot suspension-cultured cells. E, embryogenic cells; NE, nonembryogenic cells; S, subcultured cells.

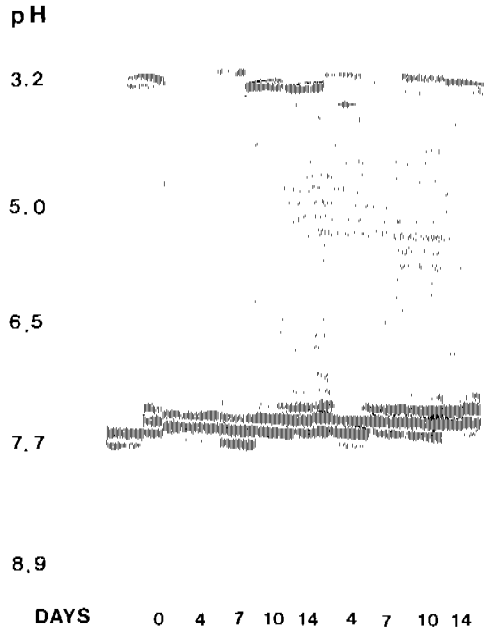


Fig. 10. Isoelectric focusing of peroxidase in embryogenic and nonembryogenic carrot suspension-cultured cells. E, embryogenic cells; NE, nonembryogenic cells; S, subcultured cells.

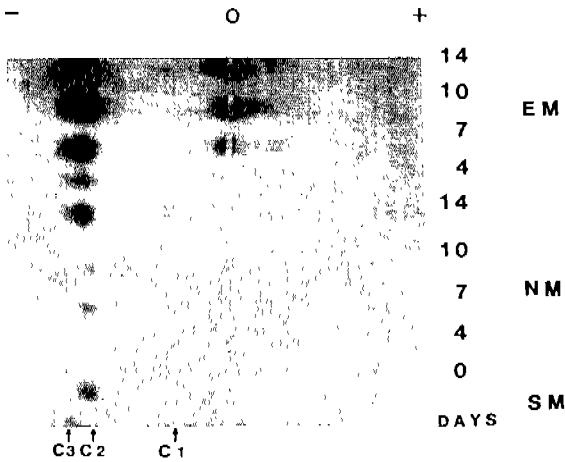


Fig. 9. Starch gel electrophoretic pattern of peroxidase in embryogenic and nonembryogenic carrot suspension-cultured media. EM, embryogenic medium; NM, nonembryogenic medium; SM, subcultured medium.

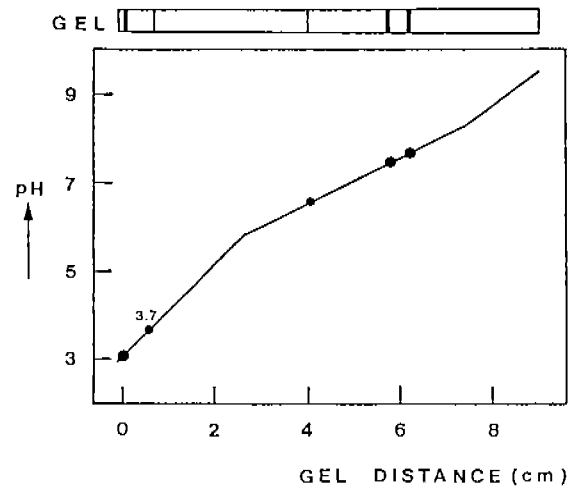


Fig. 11. Isoelectric point of peroxidase in embryogenic and nonembryogenic carrot suspension-cultured cells.

제배지에서는 배양 말기에 나타났고 anodic peroxidase는 두 배지에서 관찰되지 않았다.

Fig. 10은 세포내 peroxidase를 등전점 전기영동한 후 환성 염색하여 등전점을 조사한 것이다. 4개의 band가 나타났으며 배형성 억제세포에서는 배양 10일과 14일에 새로운 band가 나타났다. 증류수를 pH 7.0이 되게 적정하여 pH 구배를 조사한 결과 각 band의 pH는 7.7, 7.5, 6.6, 3.2이며 새로 나타난 band의 pH는 3.7이었다(Fig. 11). Fig. 12

는 배지에 방출된 peroxidase를 등전점 전기영동한 결과인데 3개의 band가 나타났고 계대배양한 배지에서 새로운 band가 1개 나타났다. Starch gel 전기영동의 결과와 마

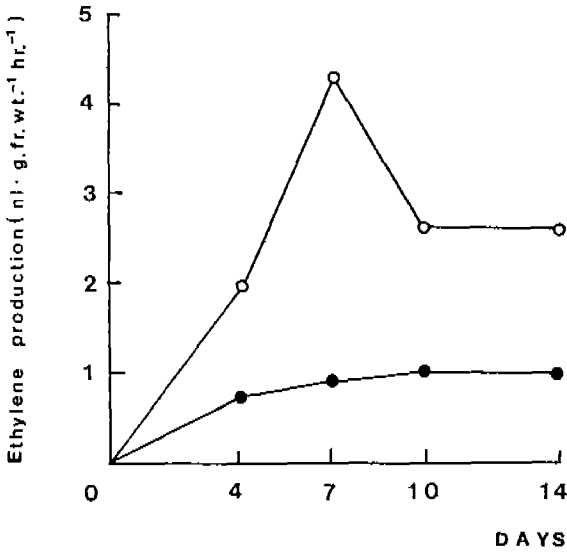


Fig. 15. Ethylene production in embryogenic (●-●) and nonembryogenic (○-○) carrot suspension-cultured cells.

세포의 원형질 밀도 증가와 큰 액포를 갖기 때문이며(Fujimura *et al.*, 1980; Fujimura and Komamine, 1980b) 배형성의 특징인 globular 단계에서 zcatin에 의한 세포분열의 촉진과 torpedo 형태에서 cell size가 증가하기 때문이라 사료된다(Fujimura and Komamine, 1980a; Cyr *et al.*, 1987).

Peroxidase 활성은 torpedo 형태의 배가 출현할 때 가장 높은 활성을 보여 배형성 억제세포보다 70% 가량 높은 활성을 보였다(Fig. 4). 이러한 활성의 변화는 생장곡선과 일치하며 사시나무의 기관분화, 남배 배양세포의 기관분화와 'Shamout' 오렌지 배주 callus의 배형성에서 peroxidase 활성이 증가한다는 보고와 일치하고 있어 분화능을 나타내는 하나의 특성으로 간주하고 있다(Berger *et al.*, 1985; Wolter and Gordon, 1975; Kochba *et al.*, 1977).

또한 땅콩 배양세포에서 peroxidase는 에너지가 필요한 능동수송에 의하여 배지로 방출되며, 방출된 peroxidase의 활성증가는 세포내 peroxidase의 활성증가를 의미하고 세포내 peroxidase보다 높은 활성을 갖는다(Van Huystee and Lobarzewski, 1982; Srivastava and Van Huystee, 1973; Chibbar *et al.*, 1984). 본 실험에서도 배지로 peroxidase가 방출되며 세포내 peroxidase와 배지에 방출된 peroxidase의 활성 경향이 같고, 배지에 방출된 peroxidase 활성이 배양 10일에는 세포내 활성보다 8배 가량 높고 배형성 유도배지의 peroxidase가 배형성 억제배지보다 3.2 배 가량 활성이 높았다(Fig. 5).

사탕무 callus와 양배추 뿌리에서 IAA oxidase는 Km 값이 낮아 생리적 농도의 IAA 조절에 한계가 있어 peroxi-

dase가 IAA oxidase로 작용하며 땅콩 배양세포의 배지에 방출된 anodic peroxidase는 lignin 합성에, cathodic peroxidase는 IAA 산화에 각각 작용하여서 호르몬 균형을 조절하여 분화에 관여한다(Kever *et al.*, 1981; Raa, 1971; Chibbar and Van Huystee, 1984). 당근 배형성 세포에서 cathodic peroxidase는 torpedo 형태의 배가 형성될 때 IAA 산화능이 증가하였으며(Fig. 6), 배형성 유도배지에 방출된 peroxidase는 배양 초기부터 IAA oxidase로 작용하나 배형성 액체배지보다 IAA 산화능이 낮아 peroxidase의 활성변화와는 일치하지 않았다(Fig. 7). 이러한 결과는 세포 분화에 phenol 대사가 관련되어 있고 배지로 방출된 phenol 화합물에 의하여 분화가 억제되기 때문에(Fridberg *et al.*, 1978) 배형성 유도배지에 방출된 peroxidase는 IAA 뿐만 아니라 phenol 화합물의 산화에도 작용할 것이라 사료된다(Habaguchi, 1977).

Peroxidase의 활성도 변화는 가문비나무에서 전기영동적 특성의 변화와 일치하며(Jonson-Flanagan and Owens, 1985) 담배의 기관분화시 전기영동적 특성은 형태변화와 일치하여 분화가 진행될수록 anodic 및 cathodic band 수가 증가하고 이러한 기관분화에는 특정 peroxidase가 관련하고 있으며(Kay and Basile, 1987), 오렌지 배주의 배형성 세포는 1개의 cathodic peroxidase가 나타나나(Kochba *et al.*, 1977) 보리의 분화시 peroxidase의 전기영동적 변화가 없었다(Coppens and Gillis, 1987). 또한 peroxidase는 *Pedilanthus tithymaloides* L.의 경우 sucrose 농도와 온도변화에 따라(Bricage, 1988), 포플러는 계절에 따라(Imberty *et al.*, 1985), 담배와 사과 배양세포는 2,4-D 농도와 배양 기간이 경과함에 따라 그 특성이 변하며(Lee, 1972; Berger *et al.*, 1985) 땅콩 배양세포에서는 세포내 peroxidase와 배지에 방출된 peroxidase와는 전기영동의 면역학적인 특성에 차이가 있었다(Cairns *et al.*, 1980). 본 실험에서 세포내 peroxidase를 전기영동한 결과 3개의 cathodic band와 1개의 anodic band가 나타났으며(Fig. 8) 배지에 방출된 peroxidase에서는 anodic band가 보이지 않아 세포내 peroxidase와 배지로 방출된 peroxidase는 전기영동적 특성의 차이가 나타났다. 등전점 전기영동의 결과 cathodic peroxidase의 등전점은 pH가 7.7, 7.5, 6.6이고 anodic peroxidase의 등전점은 pH 3.2로 나타나 배형성 세포와 배형성 억제세포의 주요 band에서 전기영동적 특성의 차이가 없고 1mg/l 2,4-D를 처리한 배형성 억제세포에서도 배양기간에 따른 전기영동적 특성의 변화가 없어 호르몬의 영향을 받지 않는 것으로 사료되며 단지 C₁ band가 배양기간에 따라 다소 차이가 있어 배형성 과정에서 생화학적 marker로 이용될 가능성을 시사하여 준다 (Figs. 10-13)

*Vigna acouifolia*의 배형성 callus에서는 bound polyamine이, 근형성 callus에서는 free polyamine이 증가하고 대두 발아시에는 cadaverine과 putrescine 합성이 증가하며 감자의 정아 발아시에도 polyamine 함량이 증가한다(Kaur-Sawhney *et al.*, 1982, 1985). 또한 당근 배양세포를 auxin이

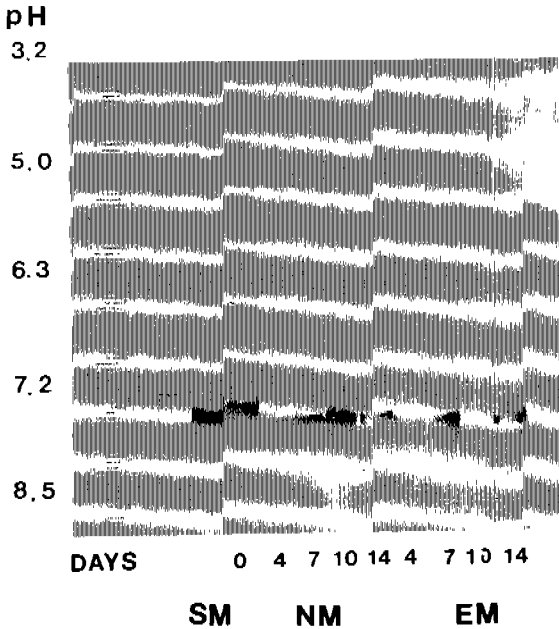


Fig. 12. Isoelectric focusing of peroxidase in embryogenic and nonembryogenic carrot suspension-cultured media; EM, embryogenic media; NM, nonembryogenic media; SM, subcultured media.

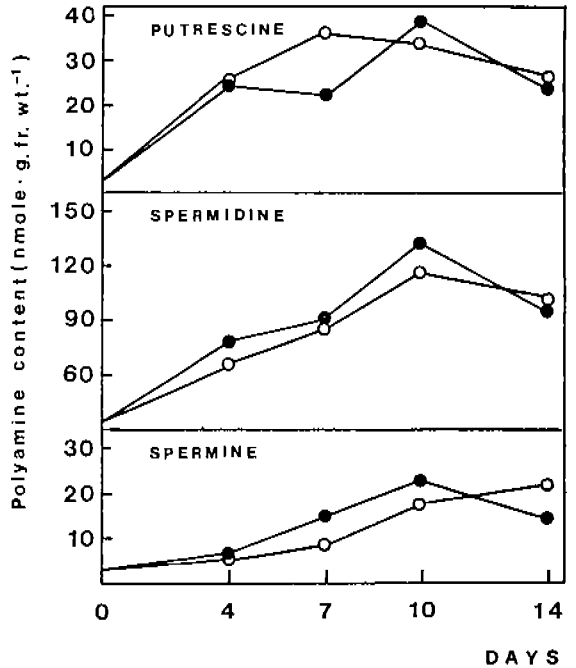


Fig. 14. Changes of polyamine content in embryogenic (●-●) and nonembryogenic (○-○) carrot suspension-cultured cells.

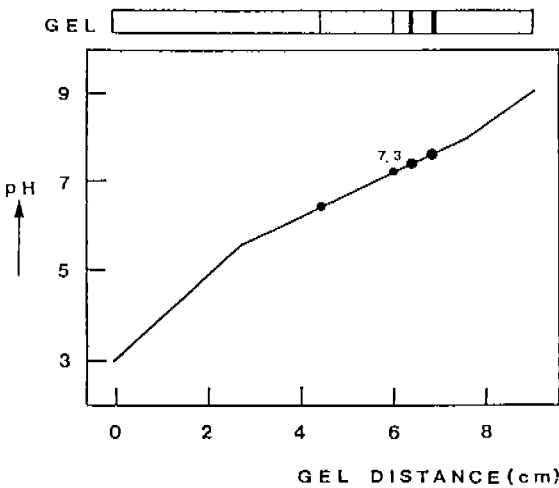


Fig. 13. Isoelectric point of peroxidase in embryogenic and nonembryogenic carrot suspension-cultured media.

찬가지로 anodic peroxidase는 관찰되지 않았고 각 band의 pH는 7.7, 7.5, 6.6이며 새로운 band의 pH는 7.3으로 세포내 주요 cathodic peroxidase와 배지로 방출된 peroxidase는 같은 등전점을 갖는 것으로 나타났다(Fig. 13).

Polyamine과 ethylene 변화. Fig. 14는 polyamine의

변화를 나타낸 것이다. 배형성 세포와 배형성 억제세포에서 polyamine의 분포는 spermidine이 가장 많고 putrescine, spermine의 차례로 분포되어 있어 각 polyamine의 함량 비율은 별 차이가 없었다. 배형성 세포에서 polyamine 함량은 배양기간이 경과함에 따라 점차 증가하여 배양 10일에서 가장 많은 분포를 보여 spermine이 7.7배, spermidine이 4.3배, putrescine이 19.5배 증가하였다. 전체 polyamine 함량은 배형성 세포가 배형성 억제세포에 비하여 배양 10일까지 15% 가량 증가하였으나 배양 말기에는 오히려 배형성 세포의 전체 함량이 13% 감소하였다. Fig. 15는 배양기간 동안 ethylene 생성량을 나타낸 것이다. 배형성 세포의 경우 배양기간 전반에 걸쳐 1 nI 가량 일정한 생성량을 보이나 배형성 억제세포에서는 4일부터 높은 생성을 보여 배양 7일에서 생성량이 가장 많고 배양 10일과 14일에서는 생성량이 일정하여 배형성 세포에 비하여 2.5배 정도 생성량이 많았다.

고찰

당근의 뿌리에서 유도한 callus로부터 배형성을 유도하였을 때 배형성 세포와 배형성 억제세포가 유사한 곡선을 보여 2,4-D에 의한 성장 pattern은 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Figs. 2 and 3) 배형성시 신선중의 증가는 배형성

결제한 배지로 옮겨 배형성을 유도할 때 24시간 후 putrescine이 2배 이상 증가하여 식물의 기관 및 세포분화시에 polyamine의 합성이 증가하며 핵산과 단백질 합성을 촉진한다(Montague *et al.*, 1978; Walker *et al.*, 1985). 본 실험에서 당근의 배형성 세포에서 polyamine 함량이 배형성 억제세포에 비하여 배양 10일까지 높게 나타나(Fig. 14), 종류별 함량의 차이보다 배형성시 전체 함량의 증가가 세포분화에 있어서 ethylene 생합성을 조절하고(Bradley *et al.*, 1984) 핵산과 단백질 합성을 촉진하는 생장조절 물질로서 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

Ethylene은 십자화과의 분화와 가문비나무의 배형성을 억제하나(Lentini *et al.*, 1988; Wann *et al.*, 1987) 백합과의 눈 형성과 담배 자엽의 묘조 분화는 촉진한다고 상반된 견해가 보고된 바 있다(Van Huystee and Lobarzewski, 1982; Sauerbrey *et al.*, 1986). 당근 배양세포에서 배형성을 유도할 때 배양기간 전반에 걸쳐 일정한 수준의 낮은 ethylene 생성을 보여(Fig. 15) 배형성시 공동의 전구체인 SAM으로부터 polyamine 합성이 증가하는 것으로 사료되며 배형성 세포의 polyamine 함량을 높이고 ethylene 생성을 억제함으로써 세포분화능을 높일 수 있는 가능성을 시사하여 준다.

당근 배양세포에서 배형성시 세포내 peroxidase와 배지에 방출된 peroxidase의 활성이 증가하고 IAA에 대한 산화능이 다르며, polyamine 함량이 높고, ethylene 생성량이 적어 세포분화의 특징을 나타내는 것으로 사료된다.

적 요

당근(*Daucus carota* L.) 배양세포의 배형성 과정 중 세포내 peroxidase와 배지에 방출된 peroxidase의 활성과 전기영동적 특성, peroxidase에 의한 IAA 산화 정도, polyamine 함량 및 ethylene 생성변화를 조사하였다. 배형성 세포와 배형성 유도배지의 peroxidase는 배형성 억제세포와 배형성 억제배지로 방출된 peroxidase보다 활성이 높게 나타났으며 배형성 세포의 peroxidase는 torpedo 형성단계에서 IAA의 산화능이 높았고 배형성 배지에 방출된 peroxidase는 배형성 억제배지내의 peroxidase보다 IAA 산화능이 낮았다. 배형성 세포와 배형성 억제세포의 peroxidase는 3개의 cathodic band와 1개의 anodic band를 가지고 있었으며 배형성 배지와 배형성 억제배지에 방출된 peroxidase는 anodic band가 나타나지 않았다. Cathodic peroxidase의 등전점은 pH가 7.7, 7.5와 6.6이었다. 배형성 세포의 내생 polyamine의 함량은 torpedo 형성단계에서 배형성 억제세포보다 신선중당 15% 가량 높았으나 polyamine의 종류별 함량에는 차이가 없었고 ethylene 생성은 매우 낮았으며 배양기간 동안 그 낮은 수준을 유지하였다. 따라서 배형성 세포의 peroxidase는 IAA 산화에 관여하여 세포내 IAA 함량을 변화시켜 호르몬의 비율을 조절함으로써 분화에 관여하며 peroxidase의 isozyme pattern은

분화의 marker로서 이용될 수 있는 가능성을 시사하여 준다. 또한 배형성시 polyamine의 증가와 ethylene 생성 감소는 polyamine과 ethylene이 배형성 과정에서 상호연관되어 있음을 시사하여 준다.

참 고 문 헌

- Berger, R.G., F. Drawert, A. Kinzkofer, C. Kunz and B.J. Radola. 1985. Proteins and Peroxidases in callus and suspension cultures of apple: A study using ultrathin-layer isoelectric focusing, sensitive silver staining of proteins and peroxidase isozyme visualization, *Plant Physiol.* 77: 211-214.
- Borkird, C., J.H. Choi and Z.R. Sung. 1986. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot. *Plant Physiol.* 81: 1143-1146.
- 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.
- Bradley, P.M., F. El-Fiki and K.L. Gillis. 1984. Polyamines and arginine affect somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Plant Sci. Lett.* 34: 397-401.
- Bricage, P. 1988. The isoperoxidase pattern changes and the pigment changes of *Pedilanthus tithymaloides* L. *variegatus* calli as a result of sucrose concentration and phytohormone content of the culture medium and daily temperature differences. *Plant Sci. Lett.* 55: 169-173.
- Brown, S., D.F. Wetherell and D.K. Dougall. 1976. The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. *Physiol. Plant.* 37: 73-79.
- Cairns, E., R.B. Van Huystee and W.L. Cairns. 1980. Peanut and horse radish peroxidase isoenzymes. Intraspecific and interspecific immunological relatedness. *Physiol. Plant.* 49: 78-82.
- Caligo, M.A., V.N. Ronchi and M. Nozzolini. 1985. Proline and serine affect polarity and development of carrot somatic embryos. *Differentiation* 17: 193-198.
- Chibbar, R.N., R. Cella, D. Albani and R.B. Van Huystee. 1984. The growth of and peroxidase synthesis by two carrot cell lines. *J. Exp. Bot.* 35: 1846-1852.
- Chibbar, R.N. and R.B. Van Huystee. 1984. Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiol.* 75: 956-958.
- Coppens, L. and E. Gillis. 1987. Isozyme eletrofocusing as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis in callus tissue of *Hordeum vulgare* L. *J. Plant Physiol.* 127: 153-158.
- Cyr, R.J., M.M. Bustos, M.J. Gultinan and D.E. Fosket. 1987. Developmental modulation of tubulin protein and mRNA levels during somatic embryogenesis in cultured carrot cells. *Planta* 17: 365-376.

- Divall, G.B. 1984. Starch gel electrophoresis of proteins. In, *Methods in Molecular Biology, Vol. I, Proteins*. J. M. Walker, (ed.) Humana Press. Clifton. pp. 97-104.
- Dixon, R.A. 1985. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In, *Plant Cell Culture*, IRL Press, Oxford. pp. 1-20.
- Fridberg, G., M. Pedersen, L.E. Landstrom and T. Eriksson. 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures: Adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol. Plant.* **43**: 104-106.
- Fujimura, T. and A. Komamine. 1975. Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Sci. Lett.* **5**: 359-364.
- Fujimura, T. and A. Komamine. 1980a. Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z. pflanzenphysiol.* **99**: 1-8.
- Fujimura, T. and A. Komamine. 1980b. The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *New Physiol.* **86**: 213-218.
- Fujimura, T., A. Komamine and H. Matsumoto. 1980. Aspects of DNA, RNA and protein synthesis during somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Physiol. Plant.* **49**: 255-260.
- Gorden, R., N. Palavan, H.E. Flores and A.W. Galston. 1982. Changes in polyamines titer in etiolated pea seedlings following red light treatment. *Plant Cell Physiol.* **23**: 19-26.
- Graham, R.C., U. Lundholm and M.J. Karnovsky. 1965. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-ethylcarbazole. *J. Histochem. Cytochem.* **13**: 150-155.
- Grison, R. and P.E. Pilot. 1985. Cytoplasmic and isoperoxidase in growing maize roots. *J. Plant Physiol.* **118**: 189-199.
- Habaguchi, K. 1977. Alterations in polyphenol oxidase activity during organ redifferentiation in carrot calluses cultures *in vitro*. *Plant Cell Physiol.* **18**: 181-198.
- Imberty, A., R. Goldberg and A.M. Catesson. 1985. Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. *Planta* **164**: 221-226.
- Johnson-Flanagan, A.M. and J.N. Owens. 1985. Peroxidase activity in relation to suberization and respiration in white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) seedling roots. *Plant Physiol.* **79**: 103-107.
- Kamada, H. and H. Harada. 1979a. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. I. Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. *Z. Pflanzenphysiol.* **91**: 256-266.
- Kamada, H. and H. Harada. 1979b. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. II. Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol.* **91**: 453-463.
- Kamada, H. and H. Harada. 1984. Studies on nitrogen metabolism during somatic embryogenesis in carrot. I. Utilization of α -alanine as a nitrogen source. *Plant Sci. Lett.* **33**: 7-13.
- Kamo, K.K., K.L. Chang, M.E. Lynn and T.K. Hodges. 1987. Embryogenic callus formation from maize protoplasts. *Planta* **172**: 245-251.
- Kaur-Sawhney, R., N. Shekhawat and A.W. Galston. 1985. Polyamine levels are related to growth, differentiation and senescence in protoplast-derived cultures of *Vigna aconitifolia* and *Avena sativa*. *Plant Growth Regul.* **3**: 129-137.
- Kaur-Sawhney, R., L. Shin and A.W. Galston. 1982. Relation of polyamine biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tubers. *Plant Physiol.* **69**: 411-415.
- Kay, L.E. and D.V. Basile. 1987. Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol.* **84**: 99-105.
- Kevers, C., M. Coumans, W.D. Gret, M. Jacobs and T. Gasper. 1981. Organogenesis in habituated sugarbeet callus: Auxin content and protectors, peroxidase pattern and inhibitors. *Z. Pflanzenphysiol.* **101**: 79-87.
- Kim, S.S. 1978. Physiol and kinetic study of two peroxidase form tobacco suspension culture WR-132 grown under darkness. Ph. D. Dissertation, Univ. of Oklahoma, Norman. 116 pp.
- Kochba, J., S. Laavee and P. Spiegel-Roy. 1977. Differences in peroxidase activity and isozymes in embryogenic and nonembryogenic 'Shamout' orange ovular callus lines. *Plant Cell Physiol.* **18**: 463-467.
- Lee, T.T. 1972. Interaction of cytokinin, auxin and gibberellin on peroxidase isozymes in tobacco tissue cultured *in vitro*. *Can. J. Bot.* **50**: 2471-2477.
- Leetini, Z., H. Mussel, M. A. Mutschler and E.D. Earle. 1988. Ethylene generation and reversal of ethylene effects during development *in vitro* of rapid-cycling *Brassica campestris* L. *Plant Sci.* **54**: 75-81.
- Lin, P.P.C. 1984. Polyamine anabolism in germination *Glycine max* L. seeds: Dynamics of cadaverine and putrescine formation in the embryonic axis. *Plant Physiol.* **76**: 372-380.
- Loschiavo, F., G. Galston and Z.R. Sung. 1988. Characterization of a temperature-sensitive carrot cell, mutant impaired in somatic embryogenesis. *Plant Sci.* **54**: 157-164.
- Mäder, M. and R. Füssl. 1982. Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. II. Regulation by phenolic compounds. *Plant Physiol.* **70**: 1132-1134.
- McWilliam, A.A., S.M. Smith and H.E. Street. 1974. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) *Ann. Bot.* **38**: 243-250.
- Montague, M.J., J.W. Koppenbrink and E.G. Jaworski. 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus*

- carota* L. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol.* **62**: 430-433.
- Nomura, K. and A. Komamine. 1985. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* **79**: 988-991.
- Pedreno, M.A., F. Sabater, R. Munoz and F. Garoia-Carmona. 1987. Effect of different phenols on the NADH-oxidation catalyzed by a peroxidase from lupin. *Phytochemistry.* **26**: 3133-3136.
- Raa, J. 1971. Degradation of indole-3-acetic acid in homogenates and segments of cabbage roots. *Physiol. Plant.* **24**: 498-505.
- Rao, N.R., S.C. Naithan, R.T. Jasanwala and Y.D. Singh. 1982. Changes in indoleacetic acids oxidase and peroxidase activities during cotton fibre development. *Z. Pflanzenphysiol.* **106**: 157-165.
- Sakano, K. 1981. Regulation of aspartatekinase isoenzyme levels in cultured cells of *Vinca rosea*. *Plant Cell Physiol.* **22**: 1343-1353.
- Saucerbrey, E., K. Grossmann and J. Jung. 1986. Is ethylene involved in the regulation of growth of sunflower cell suspension cultures? *J. Plant Physiol.* **127**: 471-479.
- Smith, S.M. and H. E. Street. 1974. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Ann. Bot.* **38**: 223-241.
- Srivastaba, O.P. and R.B. Van Huystec. 1973. Evidence for close association of peroxidase, polyphenoloxidase, and IAA oxidase isoenzymes of peanut suspension culture medium. *Can. J. Bot.* **51**: 2207-2215.
- Steward, F.C., M.O. Mapes and K. Mears. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* **45**: 705-708.
- Stegeman, H. and W.M. Park. 1979. Rice protein patterns, comparison by various PAGE-technique in slabs. *A. Acker. Pflanzen.* **148**: 446-454.
- Street, H.E. 1977. Cell (suspension) cultures-techniques. In, *Plant Tissue and Cell Culture*, Univ. of California Press, Berkeley and Los Angeles. pp. 61-102.
- Van Huystee, R.B. and J. Lobarzewski. 1982. An immunological study of peroxidase release by cultured peanut cells. *Plant Sci. Lett.* **27**: 59-67.
- Walker, M.A., D.R. Roberts, C.Y. Shin and E.B. Dumbroff. 1985. A requirement for polyamines during the cell division phase of radicle emergence in seeds of *Acer saccharum*. *Plant Cell Physiol.* **26**: 967-971.
- 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 Report* **6**: 39-42.
- Wetherell, D.F. and D.K. Dougall. 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* **37**: 97-103.
- Wolter, K.E. and J.C. Gordon. 1975. Peroxidase as indicators of growth and differentiation in aspen callus cultures. *Physiol. Plant.* **33**: 210-223.
- Yoneda, Y. and T. Stonier. 1966. Elongation of stem internodes in the Japanese morning glory (*Pharbitis nil*) in relation to auxin destruction. *Physiol. Plant.* **19**: 977-981.
- Yu, Y.B. and S.F. Yang. 1979. Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. *Plant Physiol.* **64**: 1074-1077.