

당근 Hairy root의 성장 및 Anthocyanin 함량에 미치는 Polyamine의 영향

안 준 철 · *표 병 식 · 황 백
전남대학교 생물학과
*동신대학 식품영양학과

Effects of Polyamine on Growth and Anthocyanin Contents of Carrot Hairy Root

Jun Cheul Ahn, Byoung Sik Pyo*, Baik Hwang
Department of Biology, Chonnam National University

*Department of Food Science and Nutrition, Dongshin University

ABSTRACT

The effects of polyamines on growth, anthocyanin contents and β -glucan synthetase(GSII) activity in carrot hairy root were studied.

Growth of hairy root was stimulated somewhat when each polyamine concentration was treated, especially addition of 1mM spermidine resulted in about 20% increase. On the whole, the axial diameter of hairy root was increased in response to increase in concentration of polyamine. On the other hand, GSII activity was stimulated in response to increase in concentration of polyamine, especially addition of 1mM spermine resulted in about 100% increase of activity.

Therefore increased activity of GSII stimulated growth and thickness of hairy root. Anthocyanin contents was not affected by the polyamine.

서 론

Polyamine은 식물, 동물, 미생물에서 널리 분포하며 이들의 다양한 생리적, 생화학적 반응을 조절하는 것으로 알려져 있다. 식물에서는 생장과 발생 및 분화에 있어 생장 조절물질로서 작용하며(1) 이러한 polyamine은 다가 양이온의 특성으로 단백질과 핵산의 합성(2, 3) 및 유사분열을 활성화하여(4), 세포의 항상성 유지(5)와 동정생식(6) 그리고 과일의 성숙(7) 등에도 관여한다. 또한 polyamine은 Mg^{2+} , Ca^{2+} 등과 같은 2가 양이온의 대치효과를 나타내며(8) 단백질 인산화에 관계하는 단백질 kinase의 활성의 증가(9, 10) 및 isocucyl-tRNA synthetase(11), 6-phosphogluconate, glucose-6-phosphate dehydrogenase

(12), RNase 및 β -glucan synthetase II(13)의 활성에 영향을 미친다. 식물 세포벽은 세포성장을 조절하며 인접해 있는 세포들과 서로 결합하므로써 외부 자극이나 세균침입에 대한 보호벽 역할을 할 뿐만 아니라 구조적인 지지를 한다. 이러한 세포벽은 cellulose, hemicellulose, 펙틴질, 세포벽 단백질, 그리고 callose로 구성되어 있다(14, 15). 세포벽 구성성분중 하나인 callose는 원형질막에 존재하는 GSII에 의해 합성되어지는데 UDP-glucose를 기질로하여 cellulose와 callose의 기본구조인 1,3-linked glucan을 합성하여 세포벽 발달과정의 특징이며, 세포나 조직의 회복기작에 관여하기도 한다(16).

한편, *Agrobacterium rhizogenes*가 가지고 있는 Ri-Plasmid의 일부 유전자(T-DNA)가 식물체의 게놈내에

삽입되어 유도된 모상근 배양을 통하여 약용, 방향성물질, 살충제, 색소 등의 다양한 2차대사산물을 얻고자하는 많은 연구가 진행되고 있으며 대부분의 연구에서 이들 모상근은 원 식물의 뿌리에 비교될 수 있는 수준으로 2차대사산물을 합성 및 축적하는 것으로 보고 되어졌다(17, 18, 19). 이러한 hairy root는 식물호르몬이 첨가되지 않은 배지에서 일반적으로 최적의 성장을 보이며(20), 배양조건에 따라서는 hairy root의 직경에 차이를 보이고 두꺼운 뿌리에서 2차대사산물을 많이 함유하는 것으로 보고되어 졌다(21, 22). 물론 자연에 존재하는 중요한 약용 및 2차대사산물을 저장하는 뿌리 역시 그 성분의 축적이 뿌리의 비후, 즉 굵기과도 어느정도 관련이 되어 있다(23).

따라서 본 연구에서는 식물성장조절물질인 polyamine 중 putrescine, spermidine, spermine을 농도별로 처리하여 hairy root의 성장 및 직경의 비후에 미치는 영향과 이에 따른 GSII 활성도와와의 관계를 살펴보고 당근의 2차 대사물질의 하나인 anthocyanin 함량변화를 조사하여 hairy root 배양을 통한 2차대사 화합물 생산에 있어서 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

당근(*Daucus carota* L.) 뿌리에 *A. rhizogenes* A₄ strain을 접종하여 유도된 hairy root를 cefotaxime(300mg / l)이 첨가된 MS배지(24)에서 균을 제거하였으며 MS(sucrose 30 g / l, pH 5.8) 배지를 이용하여 3주 간격으로 계대배양한 후 30ml의 배지에 0.5 g (F.W)을 접종하고 2주간 배양하여 활발히 자라는 hairy root를 본 실험의 재료로 사용하였다.

방법

성장을 측정 및 hairy root 직경 관찰

Putrescine, spermidine, spermine을 각각 0.01, 0.1, 1, 10mM 처리한 배지에 hairy root 0.5g를 접종하여 27℃, 암소에서 3주간 배양한 후 여과지로 배지를 완전히 제거하여 생물량을 측정하였으며 각 처리구에 있어 hairy root의 상대적인 비후 정도를 관찰하였다.

GSII의 추출과 활성도 측정

Ray 등(25)과 Cerenius와 Söderhael(26)의 방법을 일부 수정하여 효소 추출과 활성도를 측정하였다. 대조구 및 각 처리구 2g (F.W)을 1M sucrose, 4mM Na₂EDTA, 1mM DTT, 25μM GTP 등이 포함된 0.1mM Tris-HCl

완충액(pH 8.0) 2ml를 사용하여 막자사발로 마쇄하였다. 마쇄된 용액을 나일론천으로 걸러서 여과액을 6,800x g에서 15분간 원심분리하고 상정액을 다시 40,000 x g에 45분간 원심분리하여 얻은 침전물을 Tris 완충액에 현탁하여 조효소로 사용하였다. 효소반응은 200μl의 효소 추출액과 800μl의 Tris 완충액 (0.02 μ / Ci의 uridine diphospho-D-[U-¹⁴C] glucose, specific activity 223mCi / m mol, pH 8.0)을 27℃에서 2시간 반응시켰다. 효소반응 중지를 위해 1ml의 10% trichloroacetic acid를 첨가한 후 잘 혼합하였다. 이것을 Whatman GF/C glass filter로 여과한 후 반응하지 않은 기질의 세척을 위해 10% trichloroacetic acid 용액으로 3ml씩 세번, 96% ethanol로 3ml씩 세번 세척하였다. 이 glass filter를 상온에서 말린 후 10ml의 scintillation cocktail에 넣고 1시간 이상 방치한 후 scintillation counter(PACKARD, Model 1500)로 방사능량을 측정하였다.

단백질 정량

추출된 단백질은 Lowry등(27)의 방법을 이용하여 비색정량하였다.

Anthocyanin 함량측정

각 측정구의 hairy root 1g (F.W)의 조직에 extraction buffer(1% HCl / MeOH) 5ml를 첨가하여 shaker(4℃, 40rpm)에서 24시간 동안 색소를 추출한 후 4000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 spectrophotometer(Gilford-Model-Response)를 사용하여 530nm의 파장에서 흡광도(O.D)를 측정하였다(28).

결과 및 고찰

Polyamine이 hairy root의 성장, 직경 및 branching에 미치는 영향

Putrescine, spermidine, spermine의 각각 0.1mM, 1mM 처리구에서 hairy root의 성장은 대조구에 비하여 다소 향상되었으며 그중, spermidine 1mM 처리구에서는 대조구에 비하여 약 20%의 증가를 보였다(Fig. 1). 이러한 결과는 spermidine 1mM의 처리로 감자괴경의 형질전환조작인 crown gall tumor의 성장(즉 직경)을 최대 촉진시켰다는 Joan등(29)의 결과와 동일하였다. Putrescine, spermidine, spermine 10mM 처리구에서는 모두 hairy root의 성장에 저해 효과를 보였다. 한편 이러한 polyamine의 농도별 처리구에서 당근의 hairy root는 대조구에 비하여 branching 정도, 직경 및 necrosis되는 정도가 변하였는데, 각 polyamine 처리구의 농도가 높아질수록 직경

이 두꺼워 졌으며, branching 정도는 감소되었으며 necrosis 정도는 증가하였다(Table 1).

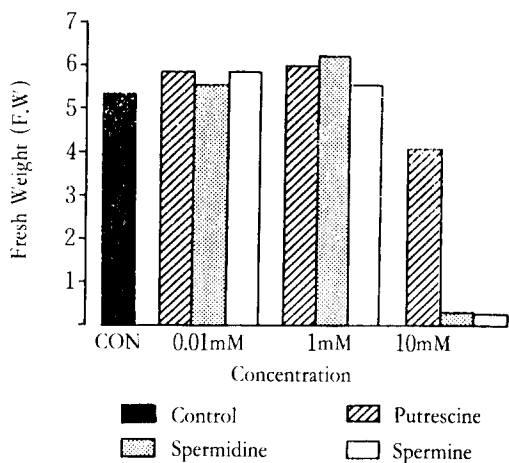


Fig. 1. The effect of polyamine on growth of hairy root. Hairy root were cultured at 27°C in MS medium.

*Initial inoculum Ca. 0.2 g (F.W)

Table 1. The effect of polyamine on shape of hairy root *

Treatment	Characteristics		
	Dia.	Branching	Necrosis
Control	+	++	-
Putrescine 0.01mM	+	++	-
Putrescine 0.10mM	+	++	-
Putrescine 0.00mM	++	+	+
Spermidine 0.01mM	+	+++	-
Spermidine 0.10mM	++	+	-
Spermidine 1.00mM	++	+	+
Spermine 0.01mM	++	++	-
Spermine 0.10mM	++	++	+
Spermine 1.00mM	++	+	++

-; None, +; Fair, ++; Good, +++; Very good

*Hairy root were cultured for 3 weeks at 27°C in MS medium.

GSII의 활성도

Polyamine의 농도가 증가함에 따라 GSII의 활성이 촉진되었으며, 특히 spermine 1mM 처리구에서의 GSII 활성은 대조구에 비하여 거의 100%의 효소활성의 증가를 보였다(Table 2). 이러한 결과는 당근 뿌리에서 추출한 조효소에 polyamine을 처리하여 GSII의 활성을 조사하였을 때 polyamine의 농도가 증가함에 따라 GSII의 활성이 증가하였으며 특히, spermine 1mM 처리구에서 가장 효과적이었다는 Pyo 등(30)의 보고와도 일치하였다. 따라서 본 실험에서의 GSII의 활성도의 증가가 hairy root의 성장을 증진시켰을 뿐만 아니라 hairy root 직경의 비후를 촉진시키는 것으로 사료된다.

Anthocyanin 함량변화

Polyamine의 첨가에 따르는 성장의 촉진효과와 직경의 비후에 따르는 2차 대사산물의 하나인 anthocyanin 함량의 변화를 조사한 결과, Fig. 2에서 보는 것처럼 spermidine 1mM과 spermine 0.01mM에서 다소 높은 색소농을 보이지만 전체적으로 큰폭의 변화를 보이지 않았다. 이러한 결과, polyamine이 당근 hairy root의 anthocyanin 함량에는 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 2. The effect of polyamine on β-glucan synthetase II activity of hairy root cells* (¹⁴C) -UDP Glucose was used as a substrate and (¹⁴C) glucan formed was measured

Treatment	GSII Activity (cpm / mg protein)
control	1,730
putrescine 0.1mM	1,910
putrescine 1.0mM	2,280
spermidine 0.1mM	2,440
spermidine 1.0mM	1,980
spermine 0.1mM	2,460
spermine 1.0mM	3,420

*Hairy root cells were cultured for 3 weeks at 27°C in MS medium.

(¹⁴C)-UDP Glucose was used as a substrate and (¹⁴C) glucan formed was measured.

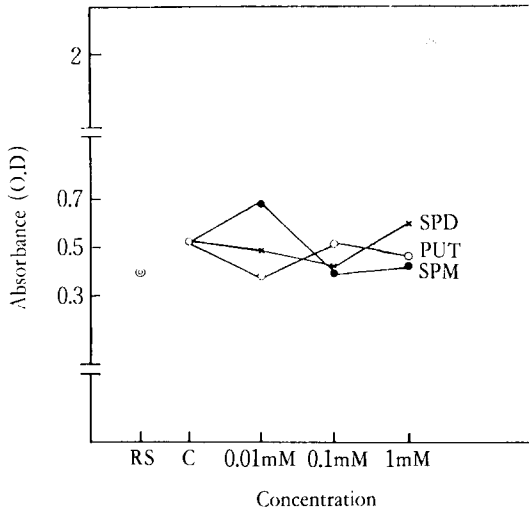


Fig. 2. The effect of polyamine on anthocyanin contents of hairy root. Hairy roots were cultured at 27°C in MS medium. *Initial inoculum Ca. 0.2 g (F.W), RS: Ordinary root C: Control

적 요

당근 hairy root의 배양에 있어 polyamine의 첨가에 따르는 hairy root의 성장과 두께변화 및 GSII 활성도와 의 관계와 이에따른 anthocyanin 함량을 조사하였다. polyamine 의 각 농도별 처리에서 대조구 보다 성장을 다소간 촉진시켰으며 spermidine 1mM 처리에서 약 20% 성장 촉진 효과를 보였다. 또한 polyamine의 농도가 증가함에 따라 hairy root 두께도 증가시키는 경향을 보였다. 한편, GSII 활성도를 보면 농도가 증가할수록 GSII의 활성도는 증가하였으며 spermine 1mM의 처리구에서는 약 100%의 활성도 증가를 보였다. 결국 이러한 활성도의 증가는 hairy root 성장을 약간 촉진시켰으며, 더불어 hairy root의 비후에 영향을 미치는 것으로 사료 된다. 그러나 polyamine의 처리에 따른 색소함량은 유의적인 변화를 보이지 않았다.

참고 문헌

1. F. M. Dumonitier, H. E. Flores, N. S. Shekhawat and A. W. Galston (1983), *Plant Physiol.*, **72**, 915.

2. H. S. Basu and J. J. Marton(1987), *Biochem J.*, **24**, 243.
3. E. Hirasawa and Y. Suzuki(1985), *Plant Growth Regulation*, **3**, 239.
4. N. Palavan and A. W. Galston(1982), *Physiol. Plant*, **55**, 438.
5. N. Bagni and M. Mengoli(1985), *Plant Growth Regulation*, **3**, 371.
6. V. R. Viianueeva, V. Mathivet and R. S. Sangwan(1985), *Plant Growth Regulation*, **3**, 309.
7. D. C. Teitel, E. Cohen, S. Arad, E. Bironbaum and Y. Mizrahi(1984), *Plant Growth Regulation*, **3**, 309.
8. T. F. J. Yan and M. Tao(1982), *J. Bio. Chem.*, **25**, 7037.
9. R. K. delta Fuente(1984), *Plant Physiol.*, **76**, 342.
10. K. Veluthambi and B. W. Poovaiah(1984), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 122(3), 1374.
11. K. I. Igarashi, I. Sakamoto, M. Goto, K. Kashiwagi, R. Homma and S. Hirose(1978), *Eur. J. Biochem.*, **82**, 301.
12. D. Mita and I. Yasumasu(1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 322.
13. Y. D. Cho, S. H. Lee, M. Y. Kim and H. M. Lee (1985), *Kor. J. Bot.*, **28**, 243.
14. J. L. Hall, T. J. Flowers and R. M. Roberts(1982), Long Man Press, PP. 430.
15. R. D. Preston(1979), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 55.
16. M. Kauss and W. Jeblick(1986), *Plant Science*, **43**, 103.
17. J. D. Hamill, A. J. Parr, R. J. Robins and M. J. C. Rhodes(1986), *Plant Cell Reports*, **5**, 111.
18. Y. Kayo, T. Hatano, M. Katayama, S. Marumo(1990), *Phytochemistry* **29**, 3325.
19. M. Yoshihiro, S. Nabeshima, C. Matsui and H. Ohkawa(1986), *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 27150.
20. B. Hwang, J. C. Ahn and J. H. Lee(1989), *Korean J. Biotechnol. Bioeng*(1989), **4**, 246.
21. Y. Hiroshi, K. Shimomura, M. Satake, S. Mochida, M. Tanaka, T. Endo and A. Kaji(1990), *Plant Cell Reports*, **9**, 307.
22. K. S. Ko, Y. Ebizuka, H. Noguchi, U. Sankawa(1988), *Chem Pharm Bull.*, **36**, 4217.
23. M. W. Kim, S. R. Ko, K. J. Choi and S. C. Kim (1987), *Korean J. Ginseng Sci.*, **11**, 10.

24. T. Murashige and M. Tao(1982), *J. Bio. Chem.*, **25**
7, 7037.
 25. P. M. Ray, U. Pohrmann and R. Hertel(1977), *Plant
Physiol.*, **59**, 357.
 26. L. Cerenius and K. Soderhael(1984), *Physiol. Plant*,
60, 247.
 27. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. C. Farr and R. J.
Randal(1951) *J. Bio. Chem.*, **193**, 265.
 28. N. Masayuki and Y. Hitoshi(1985), *Plant Cell Rep-
orts* **4**, 252.
 29. M. K. Joan, A. G. Galsky, P. Lipetz and R. Stephens
(1985), *Plant Cell Reports*, **4**, 81.
 30. B. S. Pyo, S. H. Lee, Y. D. Cho, M. W. Kim and
J. S. Lee(1987). *Korean J. Bot.*, 30(3), 173.
- (Received; July 25, 1991, Accepted; August 6, 1991)**