

## 좁개구리밥(*Lemna gibba* G3)의 개화에 미치는 Polyamine의 영향

金 康 昶\* · 孟 柱 善

(西江大學校 理工大學 生物學科)

### Effects of Polyamines on Flowering in *Lemna gibba* G3

Kim, Kang Chang\* and Jueson Maeng

(Department of Biology, Sogang University, Seoul)

#### ABSTRACT

The flowering in *Lemna gibba* G3, a long-day plant, was promoted under continuous light by agmatine, putrescine, spermidine and spermine present in the culture medium. Methylglyoxal-bis (guanyldrazone) (MGBG) and cyclohexylamine (CHA), inhibitors of polyamine biosynthesis, were found to suppress the flowering in the plants. The vegetative growth rate was kept constant while the flowering was being promoted by the polyamines, and the inhibitors with depressive effect on flowering showed stimulatory effect on vegetative growth. The pattern of vegetative growth during floral promotion or depression was an indication that the promotive action of the polyamines and the suppressive effect of the inhibitors may be outcome of their possible involvement specifically in the flowering process rather than in broad spectrum of growth of *L. gibba* G3. The degree of promotive action of spermidine and spermine could not be altered (or lessened) by simultaneous application of their inhibitors to the medium. This phenomenon indicates that the flowering process in *L. gibba* G3 may largely be dependent to the status of endogenous spermidine and spermine. Endogenous level of spermidine in florally induced *Lemna*, was found to rapidly increase. In 24 h of floral induction, the content reached at the level 2 times higher than that in non-induced plants. The elevated level of spermidine provides an additional, though premature, evidence supporting the postulation that endogenous polyamine status might play an important role in the very early stage of floral induction in *L. gibba* G3.

#### 서 론

광주기식물의 개화유도의 생화학적 메커니즘이 밝혀지지 않고 있는 상황에서 생물계에 광범위하게 함유되어 있는 polyamine이 고등식물의 세포분열, 배발생, 휴면 및 노화 과정에서 매우 중요한 역할을 수행할 뿐만 아니라(Slocum *et al.*, 1984; Smith, 1985; Galston and Kaur-Sawhney, 1987; Evans and Malmberg, 1989; Galston and Kaur-Sawhney, 1990), 개화유도, 꽃눈 및 꽃형성과정에 관여할 것이라는 증거가 근년에 축적되고 있다.

본 연구는 학술진흥재단(1990년) 연구비의 일부로 수행된 것임.

\*현소속: 국립과학 수사연구소 법과학부 생물학과

Polyamine 중 spermidine이 배양중인 담배(*Nicotiana tabacum*)의 박층조직에서의 꽃눈분화에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려졌으며(Kaur-Sawhney *et al.*, 1988), 이 조직내에서 특유의 단백질과 spermidine이 결합하는 것으로 보아(Apelbaum *et al.*, 1988) 생식기로의 전환을 위한 형태형성에 polyamine의 역할이 논의되기 시작하였다. 광주기식물중 가장 민감한 나팔꽃(*Pharbitis nil*)과 도꼬마리(*Xanthium strumarium*)를 대상으로한 연구에서 개화유도 암기중 *Pharbitis nil* 자엽내에서 급격히 증가 또는 감소되는 3종의 polyamine의 농도변화를 추적한 Dai와 Wang (1989)과 개화유도과정의 *Xanthium strumarium* 조직내에서 높은 농도의 polyamine 수준이 수반된다는 사실을 밝

허낸 Hamasaki와 Galston(1990)은 광주기 처리에 의한 개화유도과정과 조식내 polyamine 수준이 기능적으로 연관되어 있을 가능성을 시사하였다. 개구리밥과(*Lemnaceae*)에 속하는 식물의 개화에 대한 polyamine의 역할을 논의한 것으로 Tsao와 Yin(1985)은 putrescine, spermidine 및 spermine이 단일식물 좁개구리밥(*Lemna paucicostata* 6746)의 개화를 억제하는 반면에, 이들의 제내 합성억제물질인 methylglyoxal-bis(guanyhydrzone)(MGBG)은 개화비유도 조건에서도 개화를 유도한다고 하였고, Bendeck de Cantú와 Kandeler(1989)는 cyclohexylamine(CHA)과 MGBG에 의해 억제되었던 장일식물 개구리밥(*Spirodela punctata* O5)의 개화가 spermidine의 첨가로 회복되었음을 발표하였다. 그러나 계통적으로 가까운 이들 두종에서 polyamine이 각기 상반된 효과를 나타내었을 뿐만 아니라 이와 관련된 연구도 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 장일식물인 *Lemna gibba* G3의 개화유도 과정에 있어서 polyamine의 관련성을 조사하고자 한다.

## 재료 및 방법

**식물재료의 배양.** Sucrose 30 mM을 첨가한 멸균된 E 배양액(Cleland and Briggs, 1967) 50 ml가 들어있는 용량 125 ml Erlenmeyer flask에 *Lemna gibba* G3의 4-frond 군체 1개를 이식하여 식물배양실에서 배양하였는데, 연속광 또는 명기 8시간, 암기 16시간의 광주기하에서 온도  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  그리고 백열구와 형광등을 광원으로 한 광도  $15 \sim 18 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ 로 배양실내의 환경을 유지하였다. Polyamine과 polyamine 합성억제물질은 pore size  $0.2 \mu\text{m}$ 인 bacterial filter로 여과한 후 배양액에 첨가하였다.

**개화율 및 생장을 측정.** 개화여부와 frond 수는 해부현미경(X 25) 하에서 판별 측정하였다. 총 frond 수(TF)는 군체를 이루는 frond를 떼어낸 후 이들의 배면으로부터 관찰되는 frond 수를 뜻한다. 개화율(FL %)은 꽃의 원기나 성숙한 꽃을 가진 frond 수를 총 frond 수의 백분율로 산출하여 나타내었다.

**Polyamine 추출과 분석.** Polyamine 추출과 high performance liquid chromatography(HPLC)에 의한 분석은 Flores와 Galston(1982), Redmond와 Tseng(1979) 및 Smith와 Davies(1985)의 방법을 변형하여 사용하였다. 냉각된  $0.2 \text{ N HClO}_4$  1 ml를 *L. gibba* G3 100 mg에 가한 후, glass homogenizer로 파쇄하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 60분간 냉장보관하였다가 이 파쇄액을  $4^\circ\text{C}$ 에서  $15,000 \times \text{g}$ 로 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. Polyamine은 초자기구의 벽에 흡착되기 때문에 모든 초자기구의 내벽에는 실리콘막을 입혔다. 이 상층액 1 ml에 1,6-diaminohexane 1 nmole을 internal standard로 첨가하고 2 N NaOH 1 ml와 benzoyl

chloride  $10 \mu\text{l}$ 를 가한 후, 10초동안 vortex로 혼합하여 실온에서 20분간 보관하였다가 포화 NaCl 2 ml를 가하여 benzoylation 시켰고, 이렇게 얻은 benzoylpolyamine을 diethyl ether 2 ml로 추출하였다. 이 용액을  $1,500 \times \text{g}$ 로 10분간 원심분리한 후 ether phase로부터 1 ml를 취하고, 이를  $\text{N}_2$  gas 속에서 건조시켰다가 methanol  $100 \mu\text{l}$ 에 재용해시켜 HPLC 분석시까지  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

Benzoylation된 standard와 추출물은 Lichrosorb RP-8 column(pore size  $10 \mu\text{m}$ ,  $4 \times 250 \text{ mm}$ )을 이용하여 HPLC(LKB 2150 HPLC pump, LKB 2158 UVICORD SD, LKB 2220 recording integrator)로 분석하였다. Solvent system은 60%(v/v) methanol을 사용하였으며, flow rate를  $1 \text{ ml} / \text{min}$ 으로 조정하고 254 nm에서 O.D.값을 측정하였다.

## 결과 및 논의

개화유도조건인 연속광하에서 배양액에 첨가된 4종의 polyamine은 *L. gibba* G3의 개화를 일반적으로 촉진시켰다(Fig. 1A~D). 즉, polyamine의 농도를  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 로부터 증가시킴에 따라 개화율은 agmatine의 경우(Fig. 1A)  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 의 농도에서 대조군에 비하여 19.6% 만큼 촉진되었고,  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  putrescine은 8.3% 만큼 개화율을 증가시켰으며(Fig. 1B), spermidine은 농도  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 에서 21.0% 만큼 개화를 촉진시켰고(Fig. 1C),  $10^{-5} \text{ M}$ 의 spermine에 의하여 13.7% 수준까지 촉진되었던 개화는 이의 농도를  $10^{-4} \text{ M}$ 로 증가시켰을 경우 거의 대조군의 수준으로 유지되었다(Fig. 1D). 한편, 영양생장의 정도를 나타내는 총 frond 수는 각 polyamine의 최대효과 농도까지는 거의 일정하게 유지되었다가 개화촉진효과가 둔화되는 고농도에서는 증가하는 경향을 보여주었다. 이러한 현상은 개화의 영향요인이 개화유도과정에 선택적으로 작용할 때 나타나는 전형적인 현상이라 할 수 있다.

배양액에 첨가된 polyamine 합성억제물질인 MGBG와 CHA는 연속광하에서 *L. gibba* G3의 개화를 억제시켰다(Figs. 2 and 3). MGBG에 의한 개화억제효과는  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 의 농도에 이르기까지 서서히 증대되다가  $10^{-4} \text{ M}$ 에서는 대조군의 6.3% 수준으로 개화가 크게 억제되었고, CHA의 경우에는 농도가  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 까지 증가됨에 따라 지수적으로 개화억제효과가 심화되어 대조군의 8.8%까지 개화율이 극히 감소되었다. 한편, 낮은 농도의 억제물질은 frond 수를 거의 일정한 수준으로 유지시켰으나, 개화억제효과의 폭이 큰 고농도의 억제물질은 총 frond 수의 급격한 증가를 유발하였다. 이러한 경향은 이 억제물질들의 효과가 생장 전반에 미치지 보다는 선택적으로 개화과정에 국한되어 작용한 결과일 것이라는 추측을 가능케 한다. CHA의 개화억제의 폭이 MGBG 억제효과에 비하여 크게 나타난

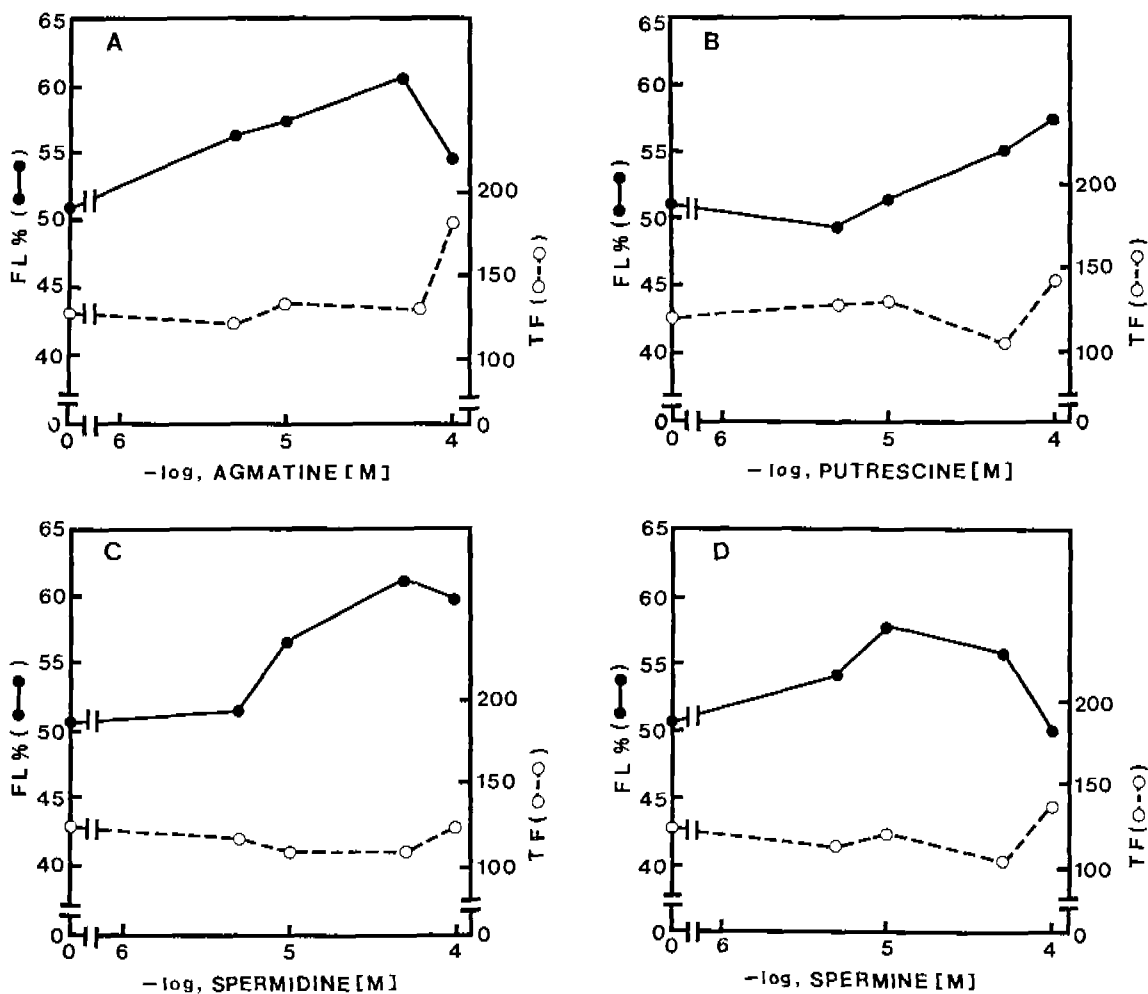


Fig. 1. Effect of exogenous polyamines on flowering and frond proliferation of *Lemna gibba* G3 grown under continuous light. Each polyamine was added to the medium at the beginning of the cultures. FL% (flowering percentage) and TF (total frond number) were analyzed at Day 11. Values plotted are means of six duplicate experiments. A, agmatine; B, putrescine; C, spermidine; D, spermine.

것은 polyamine 합성경로에서 spermidine synthase의 활성을 경쟁적으로 억제하는 CHA의 특정성이 s-adenosyl-methionine decarboxylase에 대한 MGBG의 특정성보다 더 크다는 사실(Sindhu and Cohen, 1984; Batchelor *et al.*, 1986; Evans and Malmberg, 1989)과 관련된 것으로 판단된다. 이와 같이 polyamine에 의한 개화촉진효과와 putrescine → spermidine → spermine으로 이어지는 polyamine 합성경로를 저해하는 CHA와 MGBG에 의한 개화억제효과를 연계시켜보면, 적어도 spermidine 또는 spermine이 *L. gibba* G3의 개화과정에 밀접히 관여되어 있을 것이라고 판단된다.

Spermidine 또는 spermine의 관여 가능성을 확인하기 위하여 이 물질들을 이들의 합성억제물질과 동시에 식물체에 공급한 후 개화에 대한 효과를 분석하였다(Fig. 4). Polyamine과 이의 합성억제물질을 배양액에 동시에 가했을 경우, 외부 polyamine의 가용도의 변화 없이 생체내에서 합성되는 polyamine만이 억제물질에 의하여 이의 합성이 저해 또는 중단될 것이다. 따라서 외부 polyamine의 개화촉진 효과의 폭은 이의 억제물질의 존재 여부에 관계없이 거의 일정할 것으로 추정되었다. 실제로 외부에서 공급된 spermidine( $5 \times 10^{-5}$  M)의 개화촉진 폭은 MGBG와 CHA가 배양액에 첨가되지 않았을 때 10.9%이며, MGBG( $5 \times 10^{-5}$  M)

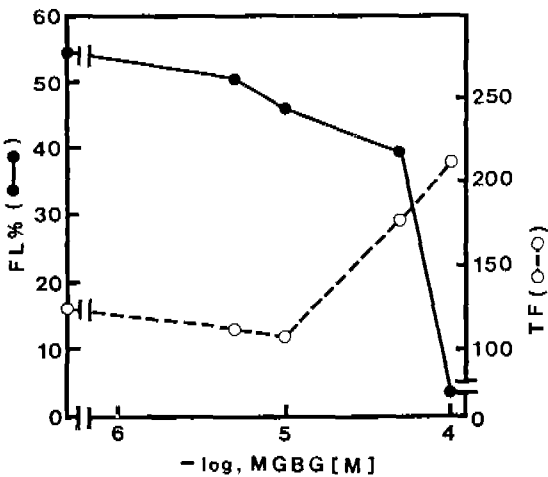


Fig. 2. Effect of MGBG on flowering and frond proliferation of *L. gibba* G3 grown under continuous light. The inhibitor was added to the medium at the beginning of the cultures. FL% and TF were analyzed at Day 11. Values plotted are means of six duplicate experiments.

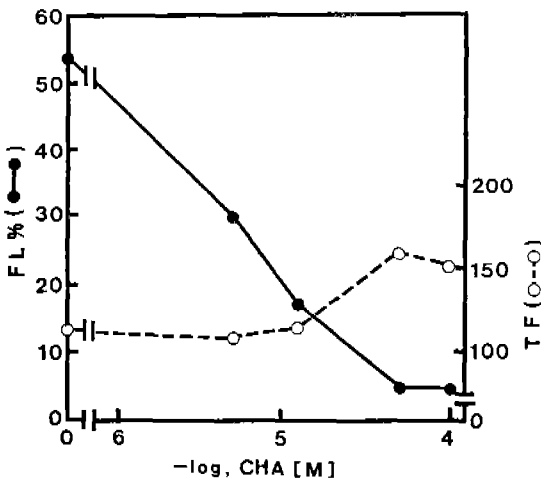
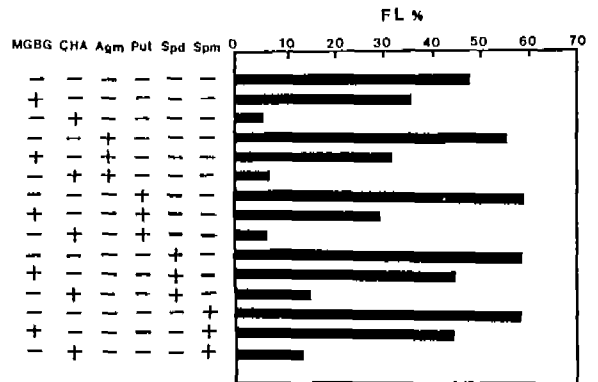


Fig. 3. Effect of CHA on flowering and frond proliferation of *L. gibba* G3 grown under continuous light. The inhibitor was added to the medium at the beginning of the cultures. FL% and TF were analyzed at Day 11. Values plotted are means of six duplicate experiments.

또는 CHA( $5 \times 10^{-5}$  M) 중 어느 하나가 존재할 때 8.5% 또는 10.6%로 각각 나타났다. 또한, 외부에서 공급된 spermine( $10^{-5}$  M)의 개화촉진 폭은 억제물질이 없을 때 10.3%이며, MGBG 또는 CHA 중 어느 하나만이 존재할 때에는 각각 7.9% 또는 7.6%이어서 위의 추정을 지지하고 있다. 따라서 외부에서 공급된 spermidine과 spermine의 개화에



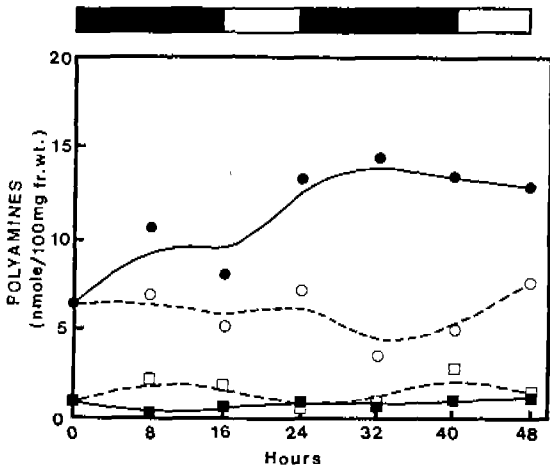


Fig. 5. Agmatine and spermidine titers in induced and non-induced fronds of *L. gibba* G3. Continuous light of 56 hours was given for floral induction and two cycles of 16 h-dark, 8 h-light were given to the plants for non-induced state. Values plotted are means of three duplicate experiments. Symbols: Agmatine in induced (■-■) and non-induced (□-□) fronds; Spermidine in induced (●-●) and non-induced (○-○) fronds. The bar on top of the graph represents dark (■) and light (□) periods.

dine 또는 spermine의 개화촉진 혹은 배양액에 이들의 억제물질의 함유여부와 관계없이 거의 일정한 수준으로 나타났다. 이렇듯, 외부에서 공급된 후 체내에 흡수된 spermidine과 spermine의 개화에 대한 기여도가 한정되어 있는 것으로 보아 *L. gibba* G3의 개화유도과정이 식물체내에서 합성되는 spermidine과 spermine에 크게 의존하고 있을 것으로 판단된다. 한편, 개화유도과정이 시작되어 점차적으로 증가한 체내의 spermidine 함량은 개화가 유도되지 않은 경우에 비하여 24시간만에 약 2배의 수준에 도달하였다. 이렇듯 체내의 spermidine량이 급격히 증가된 사실은 체내의 polyamine의 질적 및 양적 변화가 *L. gibba* G3의 개화유도초기과정에서 매우 중요한 역할을 하고 있을 것이라는 가정을 뒷받침하는 또 하나의 예비적 증거라 할 수 있다.

보고와 논의에 의하면, polyamine 특히 spermidine과 spermine은 개화유도에 관련된 과정에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 판단된다. Polyamine 대사와 개화과정과의 관련성을 더욱 상세히 밝히기 위해서는 개화유도과정에서 일어나는 arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase 및 s-adenosylmethionine decarboxylase 등과 같은 polyamine 합성과정을 촉매하는 효소들의 활성변화를 추적할 필요가 있다.

적 요

장일식물인 *Lemma gibba* G3의 개화유도과정에 있어서 polyamine의 관련성을 조사하였다. 이 식물의 개화는 연속광하에서 agmatine, putrescine, spermidine 및 spermine에 의해 촉진되었으며 이들의 체내 합성억제물질인 methylglyoxal-bis(guanyhydrzone)(MGBG)과 cyclohexylamine(CHA)에 의해서 억제되었다. Polyamine은 영양생장률을 거의 일정한 수준으로 유지하면서 개화를 촉진시켰으며, 억제물질에 의한 개화억제는 오히려 영양생장률의 증가를 수반하였다. 이러한 현상은 이 물질들의 개화촉진 또는 억제효과가 생장률의 일반적인 촉진 또는 억제효과에 의한 것이 아니라 선택적으로 개화과정에 작용한 결과일 것이라는 추측을 뒷받침해 준다. 배양액에 첨가된 spermi-

참 고 문 헌

Apelbaum, A., Z.N. Canellakis, P.B. Applewhite, R. Kaur-Sawhney and A.W. Galston. 1988. Binding of spermidine to a unique protein in thin-layer tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* **88**: 996-998.

Bendeck de cantú, L. and R. Kandler. 1989. Significance of polyamines for flowering in *Spirodela punctata*. *Plant Cell Physiol.* **30**: 455-458.

Batchelor, K.W., R.A. Smith and N.S. Watson. 1986. Dicyclohexylamine is not an inhibitor of spermidine synthase. *Biochem. J.* **223**: 307-308.

Cleland, C.F. and W.R. Briggs. 1967. Flowering responses of the long-day plant *Lemma gibba* G3. *Plant Physiol.* **42**:1553-1561.

Dai, Y.R. and J. Wang. 1987. Relation of polyamine titer to photoperiodic induction of flowering in *Pharbitis nil*. *Plant Sci.* **51**: 135-139.

Evans, P.T. and R.L. Malmberg. 1989. Do polyamines have roles in plant development?. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 235-269.

Flores, H.E. and A.W. Galston. 1982. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* **69**: 701-706.

Galston, A.W. and R. Kaur-Sawhney. 1987. Polyamines as endogenous regulators. In, *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*, P.J. Davies (ed.). Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht. pp. 280-285.

Galston, A.W. and R. Kaur-Sawhney. 1990. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* **94**: 406-410.

Hamasaki, N. and A.W. Galston. 1990. The polyamines of *Xanthium strumarium* and their possible relation to floral initiation. *Photochem. Photobiol.* **52**: 181-186.

Kaur-Sawhney, R., A.F. Tiburcio and A.W. Galston. 1988. Spermidine and flower- bud differentiation in thin-layer

- explants of tobacco. *Planta*. **173**: 282-284.
- Redmond, J.W. and A. Tseng. 1979. High pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J. Chromatography*. **170**: 479-481.
- Sindhu, R.K. and S.S. Cohen. 1984. Propylamine transferases in Chinese cabbage leaves. *Plant Physiol.* **74**: 645-649.
- Slocum, R.D., R. Kaur-Sawhney and A.W. Galston. 1984. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Bioch. Biophys.* **235**: 283-303.
- Smith, M.A. and P.J. Davies. 1985. Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiol.* **78**: 88-91.
- Smith, T.A. 1985. Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 117-143.
- Tsao, T.H. and L.M. Yin. 1985. Effects of polyamines (PA) and their biosynthesizing inhibitor MGBG on flowering of *Lemna paucicostata* 6746. Abstracts 12th Intern. Conf. Plant Growth Substances, Heidelberg, F. R. G., 130 p. (1992. 10. 19 接受)