식물조직배양학회지 제21권 제1호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 21, No. 1, 15~22 (1994)

쎌러리(*Apium graveolens* L.)의 체세포배 발생 및 인공종자 발아에 있어서 앱시스산 및 저온처리에 의한 단백질 합성

소웅영* · 여읍동 · 소상섭[1] · 조덕이[2]
전북대학교 생물학과, 전주 560-756, [1]전북대학교 생물교육과, 전주 560-756,
[2]전주우석대학교 생물학과, 전북 565-800

Protein Synthesis during Somatic Embryo Development and Artificial Seed Germinaton of *Apium graveolens* L. after Abscisic Acid or Cold Treatment

Woong Young SOH*, Up Dong YEO, Sang Seop SO[1], and Duck Yee CHO[2]
Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju 560-756;
[1]Department of Biology Education, Chonbuk National University, Chonju 560-756; and
[2]Department of Biology, Chonju WooSuk Univerity, Chonbuk 565-800. *Corresponding author.

To understand the molecular mechanism of hardening process in somatic embryo development and artificial seed germination in celery (*Apium graveolens* L.), the changes of protein synthesis by ABA or cold treatment at early globular stage were examined. Protein content and nitrate reductase activity in ABA- or cold-treated somatic embryo and seedlings were higher than that in untreated ones. The protein content and nitrate reductase activity were more prominent in somatic embryos than in seedlings. From two-dimensional electrophoresis, several protein spots specific to ABA or cold treatment were identified: 30 KD, 32 KD, 171 KD, and 205 KD at heart-shaped stage; and 29 KD, 33 KD, 37 KD, 38 KD, 41 KD, 55 KD, 66 KD, and 110 KD at cotyledonary stage were the most specifically synthesized. However the synthesis of certain polypeptides were repressed at heart-shaped or cotyledonary stage: 42 KD, 44 KD, 59 KD, 64 KD, 101 KD, 104 KD, and 190 KD at heart-shaped stage; and 29 KD and 116 KD at cotyledonary stage. The protein pattern changes by ABA or cold treatment occurred simultaneously and mainly in acid-soluble proteins during somatic embryo development and artificial seed germination. Therfore it is suggested that the metabolic changes for adaptation to environmental change occur during somatic embryo development and the germination and growth of seedling from embryo.

Key words: cold treatment, regenerant

체세포배 및 인공종자 생산과 같은 클론식물의 대량생산계의 연구개발은 동일형질의 식물체를 속성증식시킬 수 있는 식물생명공학의 중요한 과제이며 이와 같은 식물생산을 실용화하기 위해서는 식물발생 및 생산제어에 대한 연구를 필요로 한다. 체세포배는 영양분이 풍부한 배지에서 자라게 되므로 대체적으로 조숙하게 되며 이 과정에서 이

상형 배(異常形 胚)가 형성 되기도 한다. 이와같은 이상형 체세포배는 식물체로 재생되기 어려운것으로 알려졌다 (Lee, 1993: Soh, 1993).

한편, 체세포배를 유도하는 과정에 ABA를 처리하면 건실하고 접합자배의 구조에 더 유사한 체세포배 형성률이 향상된다(Ammirato, 1983, 1987, 1989: Kamada and Harada, 1979: Soh et al., 1990). 그래서 재생률이 향상된 건실한 체세포배의 생산은 ABA 또는 저온처리와 관련이 있는 것으로 알려졌다(Kitto and Janick, 1985: Jeon et al., 1986). 식물체 또는 그 배양세포를 저온에 노출시킴으로써 내한성이 유도될 수 있으며(Weiser, 1970: Chen and Gusta, 1982: Robertson et al., 1987: Perras and Sarhan, 1989), 저온처리 중에 식물체는 내재성 ABA의 함량이 증가된다(Daie and Campbell, 1981). 이와같은 ABA와 저온처리에 의한 식물체의 내한성 획득은 시험관내에서 생산된 재생식물체를 건실한 재생식물체로 육성하는데 중요한 요인이 될 수 있다. 그런데 이와같은 관점에서 체세포배 발생 및 식물체 재생 과정의 분자생물학적 기작에 대하여 별로 밝혀진 바가 없다. 그러므로 본 연구진은 셀러리의 조직배양에서 2 mg/L ABA를 처리하므로서 이상형 체세포배 출현률이 대조구의 10% 미만으로 감소되어 접합자배에 더 유사한 구조를 가진 체세포배를 얻을 수 있었고 4°C의 저온을 72시간동안 전처리한 배양세포로부터 체세포배의 발생에서도 유사한 경향의 이상형 배 출현감소를 관찰하였으며, 이와같이 얻어진 체세포배의 발아율이 발아초기에는 향상되지 않으나 약 3주이상 지나면 대조구조가 향상됨을 확인할 수 있었다 (Soh et al., 1990). 본 연구에서는 이 과정에 있어서 체세포배와 그로부터 재생된 유식물의 단백질 합성의 변화를 관찰하여 분자생물학적인 이해에 기여하고자 시도하였다.

재료 및 방법

체세포배 유도 및 배양

셀러리(*Apium graveolens* L.) 종자를 발아시킨다음 유식물의 잎을 70% 에탄올에 1분간 침적시키고 sodium hypochlorite로 10분간 표면 살균하여 증류수로 3-4회 헹군 후에 약 3 mm^2의 절편을 만들어 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS(Murashige and Skoog, 1962)의 1% 한천 고형배지에 이식하였다. 캘러스는 25°C, 2,000 lux 및 16 시간 광주기의 조건에서 약 2주후 유도되었으며 유도된 캘러스는 1 mg/L 2,4-D와 0.2 mg/L kinetin을 첨가한 MS배지에 계대배양하였다. 1차 캘러스의 계대배양중 2차로 얻어진 배형성 캘러스를 약 500 mg씩 떼어 위와 동일한 액체배지를 20 ml씩 분주한 50 ml 삼각플라스크에 이식하고 회전진탕배양기에서 90 rpm으로 현탁배양하였다. 이들 배양세포의 동조화는 King 등(1974) 및 Fujimura와 Komamine(1979)의 방법을 준용하였다. 약 10일간 배양후에 체세포배 형성 세포괴를 180 μm 및 90 μm의 스테인레스 체로 걸러서 2,4-D 무첨가배지에서 체세포배를 유도 하였다. 또한 초기 구형배 시기 체세포배의 일부는 ABA(0.5 mg/L) 및 저온(4°C)을 72시간 처리한 후 대조구와 같은 조건에서 배양하여 발생시기별로 시료를 채취하였다.

인공종자 제작 및 발아

자엽기의 체세포배는 2% sodium alginate Ⅶ(Sigma Chemical Co., U.S.A) 용액에 침적시킨 다음 하나씩 50 mM $CaCl_2$용액에 떨어뜨려 10분간 반응시키므로서 알긴산 캡슐을 씌웠고 이들 인공종자는 샤레속에 멸균수를 적신 여과지 위에 놓고 발아시켰다.

단백질 추출 및 정량

발생시기별로 -80°C에 동결보존한 시료 1 g을 유발과 유봉으로 액체질소중에서 균질화시켜 에펜튜브에 추출 buffer (2% ampholine pH 3.5-10, 2% Nonidet P-40, 5% 2-mercaptoethanol, 10 μg/mL leupeptin, 10 μg/mL α-macroglobulin)를 넣고(O'farrell, 1975) 실온에서 30 분간 정치시켰다. 이들을 13,000×g로 10분간 원심분리하여 얻은 상청액을 단백질 정량을 위해 10% TCA(trichloroactic acid)를 가하여 빙수중에서 20분간 정치하였다. 13,000×g로 10분간 4°C에서 원심분리하여 침전물을 0.1 N 수산화나트륨용액에 현탁시켜 Bradford법에 따라 정량하였다(Bradford, 1976). 이때 표준물질로는 소혈청 알부민을 사용하였다.

전기영동

2차원 전기영동을 위하여 상청액에 8.5 M의 요소를 가하여 사용하였다. 2차원 전기영동은 O'Farrell(1975) 방법을 미니스케일용으로 개량하여 사용하였다. 일차원(first dimension)은 내경 1.13 mm×90 mm의 유리모세관을 사용하여 2% ampholine (pH 3.5-10), 8.5 M 요소, 2% NP-40을 포함한 10% polyacrylamide gel을 사용하였다. 사용되는 단백질량은 5 μg이었고 electrode buffer로서는 음극에 0.2 M NaOH, 양극에 0.1 M H_3PO_4를 사용하여 200 V에서 30분간, 700 V에서 3시간 통전을 행하였다. 통전이 끝난 IEF (iso-electric focusing)겔은 80 μM tris-HCl(pH 6.8), 1% SDS, 2% 2-mercaptoethanol로 SDS 처리하였다. 이차원(second dimension)에 있어서 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)는 10-20%의 농도

구배 겔을 사용하여 SDS 처리한 IEF겔로 부착시켜 영동시켰다. 이때의 전기영동조건은 겔 1매당 30 mA의 전류로 120분간 영동하여 BPB(bromophenol blue)선이 겔끝의 5-10 mm정도 내려올때까지 영동시켰다. 이때 running buffer로서는 0.192 M Tris-HCl(pH 6.8), 0.1% SDS를 사용하였다. 전기영동이 끝난 SDS-PAGE를 10% TCA에서 20분간 침적시켜 단백질을 고정시켰다. 메탄올과 에탄올의 혼합액으로 전처리하여 40 rpm으로 10분간 진탕시킨후 25분간 은염색하였다(Cho et al., 1993). 은염색한후 증류수로 세척하여 현상시켜 0.1% 초산으로 정지시켰다(Daiichi Chemical Co., Ltd, Japan).

질산환원효소 활성 측정

발생시기별 재료의 생중량 1 g을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5), 0.02 M KNO_3, 5% propanol로 된 5 ml 반응액에 침적시킨 후 25°C의 암조건에서 3시간 반응시켰다. 이 반응액에 1% sulfanilamide와 0.02 % N-1-naphthyl-ethylene diamine HCl을 0.3 ml 넣고 발색시켜 약 20분 후에 증류수를 넣고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 $NaNO_2$ 표준곡선으로 그 질산환원효소의 활성을 측정하였다 (Jaworski, 1971).

결 과

배양중인 캘러스는 약 4주후부터 그 표면에 맑고 연한 녹색을 띄며 작은 세포들이 치밀하게 뭉쳐져 있는 체세포배형성 캘러스가 관찰되었다. 이와같은 캘러스를 선발 배양하여 체세포배를 유도하였다. 체세포배의 초기 구형배시기에 ABA 또는 저온처리를 하여 배양한 재료를 발생시기별로 수용성 단백질 함량을 측정한 결과, 심장형배 시기의 단백질 함량은 0.5 mg/L ABA 처리시에는 4.07 mg/g fr wt

Table 1. The soluble protein content in somatic embryos and seedlings from artificial seed after ABA or cold treatment at early globular stage for 72 hrs

Treatment	Protein content (mg/g fr wt)[a]		
	heart-shaped	cotyledonary	seedlings
Control	1.04 ± 0.38	4.24 ± 0.47	5.60 ± 0.51
ABA(0.5mg/L)	4.07 ± 0.54	6.58 ± 0.72	8.74 ± 0.98
Cold(4°C)	7.14 ± 0.72	7.21 ± 0.78	7.32 ± 0.54

[a] ± S.E. of five measurements.

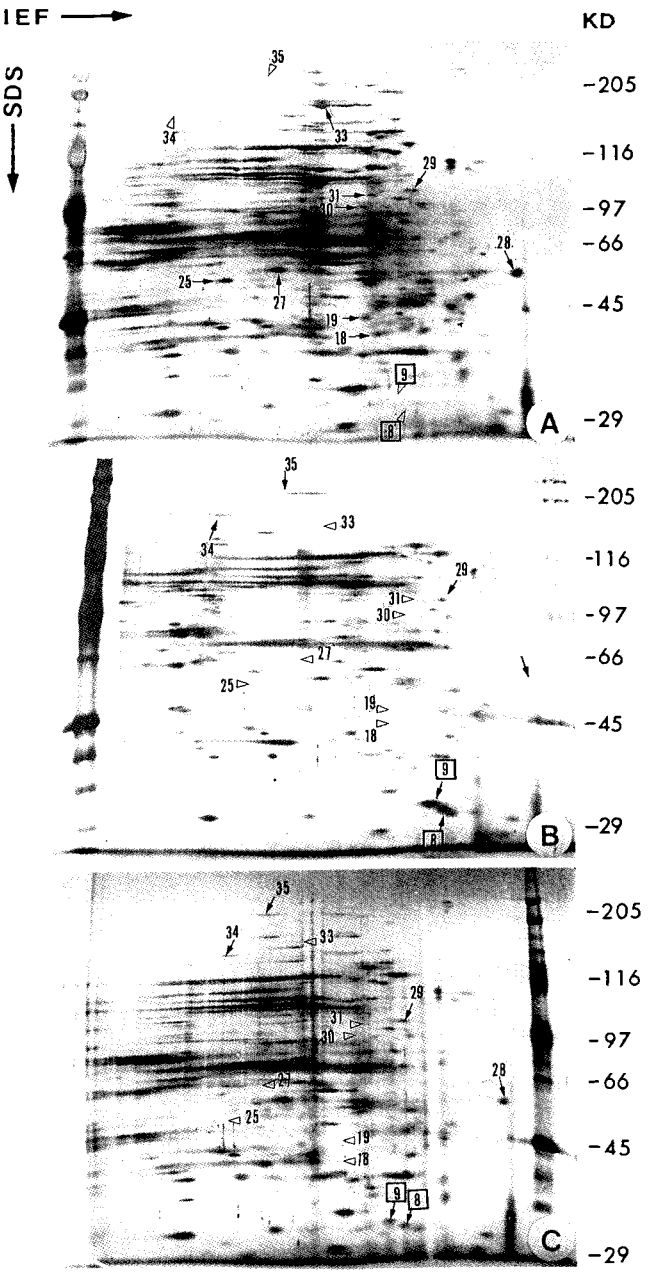

Figure 1. Two-dimensional electrophoretograms of soluble proteins in heart-shaped embryo after ABA or cold treatment at early globular stage for 72 h. Proteins were focused in the pH range of 10.0(left) to 3.5(right). A: control, B: ABA treatment, C: cold treatment, IEF: isoelectric focusing(basic toward acidic), SDS: Sodium dodecyl sulfate, Molecular weight is indicated in kD. Arrows(←) and empty arrow heads(◁) denote proteins induced and repressed by ABA or cold treatment. Numbers in box indicates proteins showing prominent change.

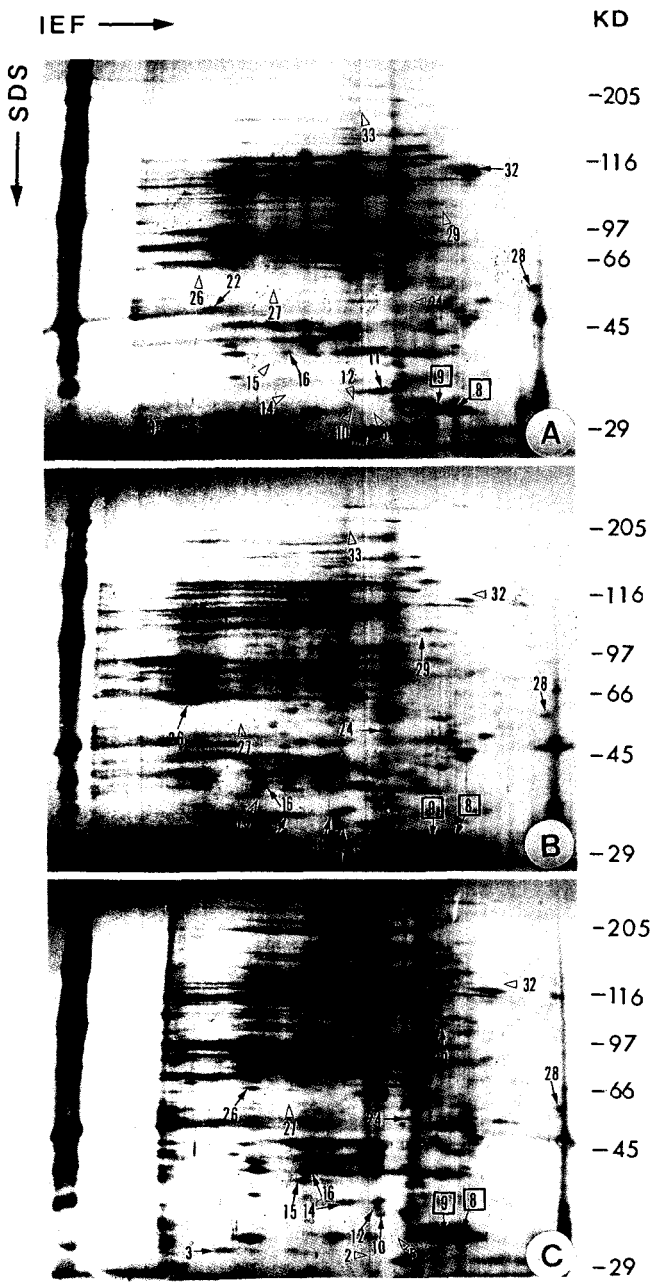

Figure 2. Two-dimensional electrophoretograms of soluble proteins in cotyledonary stage embryo after ABA or cold treatment at early globular stage for 72 h. Proteins were focused in the pH range of 10.0(left) to 3.5(right). A: control, B: ABA treatment, C: cold treatment, IEF: isoelectric focusing(basic toward acidic), SDS: Sodium dodecyl sulfate, Molecular weight is indicated in kD. Arrows(←) and empty arrow heads(◁) denote proteins induced and repressed by ABA or cold treatment. Numbers in box indicates proteins showing prominent change.

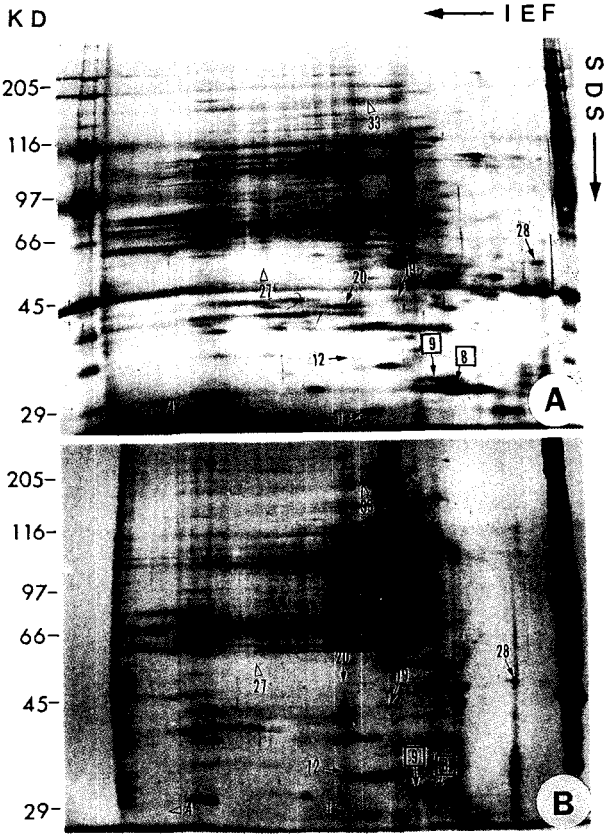

Figure 3. Two-dimensional electrophoretograms of soluble proteins in seedlings germinated from the aritificial seed after ABA or cold treatment at early globular stage for 72 h. Proteins were focused in the pH range of 3.5(left) to 10.0(right). A: control, B: ABA treatment, C: cold treatment, IEF: isoelectric focusing(basic toward acicic), SDS: Sodium dodecyl sulfate, Molecular weight is indicated in kD. Arrows(←) and empty arrow heads(◁) denote proteins induced, increased and decreased by ABA or cold treatment. Numbers in box indicates proteins showing prominent change.

Table 3. Nitrate reductase activity(NRA) in somatic embryos and seedling from artificial seed after ABA or cold treatment at globular stage.

Treatment	NRA (μmole NO_2^-/ g fr wt / hr)		
	heart-shaped	cotyledonary	seedling
Control	1.00 ± 0.23	0.92 ± 0.30	0.35 ± 0.27
ABA(0.5mg/L)	1.29 ± 0.36	1.00 ± 0.27	0.40 ± 0.21
Cold(4°C)	1.23 ± 0.38	1.80 ± 0.52	0.45 ± 0.25

[a] ± S.E. of five measurements.

Table 2. Changes of major protein patterns extracted from heart-shaped and cotyledonary embryo and seedling germinated from artificial seed of *Apium graveolens* after ABA or cold treatment at early globular stage for 72 h.

Stages	Spot No.[a]	KD	pH	Control	ABA	Cold	Regulation
heart-shaped	8	30	4.7	-[b]	+++	++	induced
	9	32	5.2	-	+++	++	induced
	34	171	7.3	-	+	+	induced
	35	205	5.5	-	++	+	induced
	18	42	5.3	+	-	-	repressed
	19	44	5.4	+	-	-	repressed
	25	64	6.7	+++	-	-	repressed
	27	59	6.5	+++	-	-	repressed
	30	101	5.3	+	-	-	repressed
	31	104	5.2	+	-	-	repressed
	33	190	5.8	+++	-	-	repressed
cotyle-donary	3	29	7.0	-	+	++	induced
	5	33	5.3	-	+++	-	induced
	10	33	5.5	-	+	++	induced
	12	37	5.5	-	++	++	induced
	14	38	6.2	-	++	++	induced
	15	41	6.2	-	-	+	induced
	24	55	5.0	-	+++	++	induced
	26	66	6.9	-	++	+++	induced
	29	110	4.6	-	+	++	induced
	2	29	5.3	++	-	-	repressed
	32	116	4.2	+	-	-	repressed
seedling	4	28	7.3	-	+++	-	induced
	1	27	5.0	+	+++	+	increased
	19	44	4.7	++	++	++	increased
	20	45	5.4	+	++	+	increased
	12	37	5.4	+++	+	+	decreased

[a] Spots designation corresponds to that in Figures 1 to 3.

[b] + : Presence, induction or increase, - : absence or repression.

이었고 4°C 저온처리시는 7.14 mg/g fr wt로서 대조구인 1.04 mg/g fr wt에 비해 높게 나타났으며 저온처리가 ABA처리에 비하여 175.4% 더 높게 나타났다. 또한 자엽시기배는 대조구에서 4.24 mg/g fr wt, ABA처리시 6.58 mg/g fr wt 및 저온처리시 7.21 mg/g fr wt로서 대조구가 더 낮게 나타났고 유식물도 같은 경향이었다(Table 1). 그런데 대조구와 ABA처리구에서 다같이 발생시기가 진행됨에 따라서 단백질함량이 증가되었지만 저온처리구에서는 별로 증가를 보이지 않았다.

초기 구형배 시기에 ABA 및 저온을 72시간 처리한 다음 정상배양(25°C)을 한 심장형배는 30 KD(pH 4.7, spot No. 8), 32 KD(pH 5.2, spot No. 9), 171 KD(pH 7.3, spot No. 34) 및 205 KD(pH 5.5, spot No. 35)등 4개의 단백질 합성이 유도된(Table 2 및 Figure 1) 반면에 5개의 단백질 합성이 억제되었다(Table 2 및 Figure 1: spot No. 18, 19, 25, 30, 31).

ABA 및 저온을 72시간 처리한 다음 정상배양을 하여 얻어진 자엽시기배에서는 9개의 단백질 합성이 유도되었고(Table 2 및 Figure 2: spot No. 3, 5, 10, 12, 14, 15, 24, 26, 29), 2개의 단백질은 합성이 억제되었다(Table 2 및 Figure 2: spot No. 2, 32). 또한 33 KD(pH 5.3, spot No. 5)의 단백질은 ABA처리구에서만이 활발하게 합성되었으며 41 KD(pH 6.2, spot No. 15)의 단백질은 저온처리시에서만 나타났다(Table 2 및 Figure 2).

초기 구형배 시기에 72시간 ABA 및 저온처리를 하여 자엽기까지 성숙된 체세포배를 알긴산 캡슐을 씌운 인공종자로부터 발아된 유식물에서는 ABA 처리구에서만 28 KD (pH 7.3, spot No. 4)의 단백질이 합성되었고(Table 2 및 Figure 3), 27 KD(pH 5.0, spot No. 1), 44 KD(pH 4.7, spot No. 19) 및 45 KD(pH 5.4, spot No. 20)의 단백질 합성이 ABA 처리시 뚜렷해졌다(Table 2 및 Figure 3). 그러나 단백질합성에 있어서 전체적인 변화는 앞의 두 체세포배 발생시기보다 적었다. ABA 및 저온처리를 하지않은 대조구에서 발생시기별로 보면 30 KD(pH 4.7, spot No. 8)의 단백질은 심장형 시기에는 합성되지 않고 자엽시기배 이후에 유도되었지만(Figures 1-3: □) 59 KD(pH 6.5, spot No. 27)와 190 KD(pH 5.8, spot No. 33)는 억제되었다(Table 2 및 Figure 1). 110 KD(pH 4.6, spot No. 29)의 단백질은 체세포배 발생시기에만 뚜렷하고 인공종자의 발아 유식물에서는 나타나지 않으므로 체세포배의 성숙에 관련된 단백질로 추정된다(Figures 1-3).

한편, 체세포배의 초기 구형배 시기에 ABA 또는 저온처리 후 발생 단계별 질산환원효소의 활성을 측정하였다(Table 3). 질산(NO_3)을 아질산(NO_2)으로 환원시키는 질산환원효소의 활성은 ABA 또는 저온처리구가 대조구에 비해 심장형배 시기에서 약간 높게 나타났다. 그러나 발생이 더 진행된 자엽시기의 시간당 효소활성은 대조구에 있어서는 0.92 μM/g fr wt이었고 저온처리구에서는 1.80 μM NO_2/g fr wt로서 대조구에 비하여 195.7%의 활성을 나타내었다. 그런데 발아유식물에 있어서는 대조구, ABA 및 저온처리에 관계없이 그 활성이 떨어졌다.

고 찰

대조구와 ABA처리구에서는 단백질함량이 체세포배시기보다 유식물에서 더 높지만 단백질 유형의 변화는 반대로 체세포배 시기에 더 현저하게 나타났다(Table 1-4, Fig. 1-3). 이와같은 변화는 체세포배 시기에 새로운 조직, 기관분화와 관련된 생장이 일어나고 있는것과 관련이 되는것으로 추정된다. 전체적인 단백질 함량이 ABA 또는 저온처리로 증가되는 것은 주로 체세포배 시기에는 질산환원효소의 활성이 증가되는 것과 대체로 일치하였다. 이와같은 결과는 질산환원효소의 활성이 높아지므로 아질산으로부터 암모니아로 그리고 단백질합성으로 이어지는 것으로 추정된다. 초기 구형배 시기에 ABA 및 저온처리를 한 후 정상배양을 하면 발생생장이 대조구에 비하여 약 4일간 지연되었다가 건실한 개체로 재생된다(Soh et al., 1990). 그리고 이와같은 과정에 새로운 단백질합성의 유도, 일부의 단백질 합성억제, 감소, 또는 증대 등 다양한 단백질 유형의 변화가 일어나는데 이 변화는 발생시기별로는 일관된 경향을 보이지 않았다(Table 2). 이와같은 현상은 현저한 분화를 수반하는 발생과정중의 재료이기 때문에 발생시기별 반응이 달리 나타나는 것으로 보인다. 밀의 경우에도 저온처리 후에 8개의 단백질 합성이 일어났으나 발생시기와는 일관성을 보이지 않았다(Perras and Sarhn, 1989). 그러므로 이와같은 일부 단백질의 합성, 감소 또는 증대는 생장억제 호르몬(ABA)이나 저온조건의 환경에서 적응하려는 복잡한 대사작용의 변화로 사료된다(Robertson et al., 1987).

ABA와 저온처리에 의한 새로운 단백질의 합성유도 또는 합성억제는 대체로 발생시기에 따른 특징을 보이고 있으며 심장형배 시기에는 합성유도 및 억제가 똑같이 일어나고 (Table 2) 자엽기 시기에는 33 KD(pH 5.3, spot No. 5) 및 41 KD(pH 6.2, spot No. 15) 단백질만이 다르고 나머지는 똑같이 변화하며 유식물 시기에는 28 KD(pH 7.3, spot No. 4) 단백질이 ABA처리에서만 합성되고 저온처리에서는 합성되지 않았다(Table 2). 이와같이 ABA 및 저온처리에 의한 단백질유형 변화에 대체적인 유사성을 보이는 현상은 성숙한 식물체를 재료로 한 실험 결과에서도 나타나고 있으며 저온환경에 적응하기 위한 내재 ABA 생합성과도 관련되는 것으로 보인다(Chen et al., 1983: Keith and Mckersie, 1986: Robertson et al., 1987). 또한 식물의 자연종자 형성중의 배발생 과정에서도 배성숙과 ABA사이에 밀접한 연관성이 보인다(Quatrano, 1987). 본 실험에서 이차원 전기영동에 의한 단백질분석 결과는 체세포배 발생중에 단백질이 동시에 합성되거나 억제되는 현저한 변화를 보였으며 이들 단백질이 주로 수용성 산성이라는 것을 확인할 수 있었다. 이와같은 결과에 유사한 경유로(Table 2: Figure 1, 2) 종자형성에서 접합자배 발생시에도 산성단백질의 합성 및 억제를 보인것이 밝혀졌으며(Quatrano et al., 1983), 이때에 내재 ABA수준이 가장 높아졌다. 그러므로 체세포배의 발생과정중에 생장억제 호르몬(ABA)의 생합성 기작에 대한 연구가 체세포배로부터 건실한 식물체 육성방법을 모색하는데 긍정적인 실마리를 제시해 줄 것으로 기대된다.

대조구에서 발생시기별로 볼 때 심장형배 시기에 뚜렷이 나타난 단백질이 자엽기 이후에 나타나지 않는 경우는 체세포배 발생유도에 관련된 단백질로 보이며(Figures 1-2: spot No. 27, 33), 체세포배 발생중에 뚜렷이 나타난 단백질이 인공종자의 발아유식물 시기에 심하게 감소된 것은 (Figures 1-3: spot No. 28) 이 단백질이 체세포배 발생 및 성숙에 관련되는 것으로 보인다. 이와같은 현상은 밀에서도 밝혀진 바 있고(Walker-Simmons, 1987) 당근에서는 체세포배 발생에 관련된 특이 단백질이 분리된 바 있으므로 (Sung and Okimoto, 1981) 이에 대해서는 발생학적인 관점에서 더욱 연구되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

쎌러리(*Apium graveolens* L.)의 체세포배 발생 및 인공종자 발아에 있어서 분자수준의 기작을 이해하기 위하여 ABA 및 저온처리에 의한 단백질합성변화에 관한 연구를 수행하였다. 단백질함량과 질산환원효소 활성도는 ABA 및 저온처리한 체세포배 및 유식물은 처리하지 아니한 것에 비하여 특히 유식물에서보다 체세포배 발생시에 더욱 높았다. 2차원 전기영동결과 ABA 및 저온처리에 의하여 심장형배 시기에서는 30 KD, 32 KD, 171 KD 및 205 KD의 단백질과 자엽시기배에서는 29 KD, 33 KD, 37 KD, 38 KD, 41 KD, 55 KD, 66 KD 및 110 KD 단백질이 합성되어졌다. 또한 심장형배에서는 42 KD, 44 KD, 59 KD, 64 KD, 101 KD, 104 KD 및 190 KD의 단백질과 자엽시기에서는 29 KD 및 116 KD의 단백질이 억제되었다. 체세포배 발생 및 인공종자 발아에 있어서 ABA 및 저온처리에 의해서 단백질이 합성되어지거나 억제되는 것이 동시에 일어났으며 주로 산성단백질에서 변화가 일어났다. 이와같은 결과는 체세포배 발생과정에서 그리고 체세포배 발아와 유식물의 생장과정에서 환경변화에 적응하기 위한 대사상의 변화가 일어나는 것으로 추정된다.

사 사

본연구는 1989년도 문교부 대학부설 유전공학연구소 연구지원비에 의해 이루어졌으며, 전북대학교 생물학과 최용의, 최필선, 김성길, 김학수 대학원생 여러분의 실험보조에 대하여 사의를 표하고자 한다.

인 용 문 헌

Ammirato PV (1983) The regulation of somatic embryo development in plant cell: Suspension culture technique and hormone requirements. Bio/Technol 1 : **68-74**

Ammirato PV (1987) Organization events during somatic embryogenesis. *In* Plant Tissue and Cell Culture. C. E. Green, D. A. Sommers, W. P. Hackett and D. D. Biesboer, eds. pp. 57-81. Alan R. Liss, Inc., New York.

Ammirato PV (1989) Recent progress in somatic embryogenesis. *IAPTC News Letter* **57**: 2-1

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72** : 248-254

Chen PM, Gusta LV (1982) Cold acclimation of wheat and smooth bromegrass cell suspensions. Can J Bot **60** : 1207-1211

Chen TH, Gusta LV, Fowler DB (1983) Freezing injury and root development in winter cereals. Plant Physiol **73** : 773-777

Cho DY, Cho PS, Soh WY (1993) A comparison of protein pattern in adventitious and tap root development of *Phasealus vulgaris* L. Ⅰ. Adventitious root from hypocotyl cuttings and tap root of germinating seed. Korean J Plant Tissue Cult **20** : 129-134

Daie J, Campbell WF (1981) Response of tomato plants to stressful temperatures : increase in abscisic acid concentrations. Plant Physiol **67** : 26-29

Fairbanks G, Steck TL, Wallach DRH (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry **10** : 2606-2617

Fujimura T, Komamine A (1979) Synchronizaton of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Plant Pysiol **64** : 162-164

Jaworski EG (1971) Nitrate reductase assays in intact plant tissues. Biochem .Biophys Res Commun **43** : 1274-1279

Jeon JH, Liu JR, Yang SG, Lee HS, Joung H, Han MH (1986) Development of a model system for artificial seed production. 1. Encapsulation of somatic embryos by alginic acid. Korean J Plant Tissue Cult **13** : 119-128

Keith CN, McKersie BD (1986) The effect of abscisic acid on the freezing tolerance of callus cultures of *Lotus corniculatus* L. . Plant Physiol **80** : 766-770

Kitto SL, Janick J (1985) Hardening treatments Increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. J Amer Soc Hort Sci **11** : 283-286

Kamada H, Harada H (1976) Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. Ⅱ. Effect of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. Z Pflanzenphysiol **91** : 453-463

King P J, Cox BJ, Fowler MW, Street HE (1974) Metabolic events in synchronized cell culture of *Acer pseudoplatanas* L.. Planta **117** : 109-122

Lee JY (1993) Structural characteristics of carrot embryos and their regenerants from callus and suspension culture. MS Thesis, Graduate School, Chonbuk National University, Korea

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15** : 473-497

O'Farrell P (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Bio Chem **250** : 4007-4021

Perras M and Sarhan F (1989) Synthesis of freezing tolerance proteins in leaves, crown and roots during cold acclimation of wheat. Plant Physiol **89** : 577-585

Quatrano R (1987) The role of hormones during seed development. In: Davies, P. J.(ed) Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and

Development. Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht. pp. **494-514**

Quatrano RS, Ballo BL, Williamson JD, Hamblin MT, Mansfield M (1983) ABA controlled expression of embryo-specific genes during wheat grain development *In* "Plant Molecular Biology". R. Goldburg, ed., pp. 95-120. Alan R. Liss, Inc., New York

Robertson A, Gusta LV, Reaney MJT, Ishikawa M (1987) Protein synthesis in Bromegrass(*Bromus inermis* Leyes) cultrued cells during the induction of freeze tolerance by abscisic acid or low temperature. Plant Physiol **84** : 1331-1336

Soh WY (1993) Cevelopmental and structural diversity of regenerated plants in cell and tissue cultures. Proc. 7th Symp. Plant Biotech., Bot. Soc. Korea, Seoul

Soh WY, Yeo UD, So SS (1990) Artificial seed production and somatic embryogenesis from the cultured cells of *Cedrela sinensis* Juss.. Kor J Plant Tissue Culture **17** : 231-238

Sung ZR, Okimoto R (1981) Embryogenic proteins in somatic embryos of carrot. Proc Natl Acad Sci USA. **80** : 2661-2665

Walker-Simmons M(1987) Embryonic ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars, Plant Physiol **84** : 61

Weiser CJ (1970) Cold resistance and injury in woody plants. Science **169** : 1269-1278

(1993년 12월 10일 접수)