

석 사 학 위 논 문

Benzyladenine이 대두의 Callus 생육과 Protoplast Viability 및 세포벽재생에 미치는 영향

제주대학교 대학원

농 화 학 과

지도교수 류 기 중

송 태 철



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1986 년 월 일

Benzyladenine이 대두의 Callus 생육과 Protoplast Viability 및 세포벽재생에 미치는 영향

제주대학교 대학원 농화학과

지도교수 류 기 중

송 태 철

이 논문을 농학석사학위 논문으로 제출함

1986년 월 일



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

송태철의 농학석사학위 논문을 인준함

심사위원장 강 경 음
위 원 柳 長 杰
위 원 柳 瑞 中

제주대학교 대학원

1986년 월 일

Effects of Benzyladenine on Callus Growth,
Protoplast Viability and Cell Wall Regeneration
of Soybean(*Glycine max(L.) Merrill*)

Tae - Chul Song

(Supervised by Professor Ki - Jung Yoo)

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Degree of
Master of Agriculture



Department of Agricultural Chemistry
Graduate School
Cheju National University

1986

목 차

Summary	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 대두 callus 의 유기 및 배양	5
2. protoplast 의 분리·정제	8
3. protoplast 의 viability 와 세포벽재생 조사	9
III. 결과 및 고찰	11
1. 대두유묘의 조직부위별 및 배지종류별 callus 의 생성능력	11
2. protoplast 분리에 있어서 pectinase 의 종류와 효소처리 시간의 영향	12
3. callus 성장에 대한 BA 의 영향	13
4. protoplast 의 viability 에 대한 BA 의 영향	16
5. protoplast 의 세포벽재생에 대한 BA 의 영향	18
IV. 적 요	25
V. 참고 문헌	27

Summary

The inducibilities of callus from epicotyl, node and hypocotyl of soybean (*Glycine max* var. Jang-Yeob Kong) were tested on MS, B5 and R2 medium, respectively, and the effects of benzyladenine(BA) were tested on the growth of the callus derived from the hypocotyl.

Protoplasts were isolated from the suspension-cultured cells derived from the hypocotyl callus, and the effects of BA on viability and cell wall regeneration were studied.

1. Various degrees of callus induction and growth were observed depending on the sources of explant and culture media.

Hypocotyl was the best source of explant for callus induction, and R2 medium was the best for growth of the callus.

2. The protoplast isolation from the suspension culture of soybean hypocotyl callus failed when Macerozyme R-10 was used as a source of pectinase, while protoplasts were easily isolated when Pectolyase Y-23 was used.

The 4 hour incubation of cells with enzyme solution containing Onozuka R-10 (2%) and Pectolyase Y-23 (0.25%) gave maximum protoplast yield, 6.5×10^7 protoplasts/g.callus.

3. BA depressed growth of the callus derived from hypocotyl, and the degree of depression increased with the amount of BA in culture medium, in the range of from 0.001 to 10 mg/l, to show lower growth by 22% at 10 mg/l of BA concentration on R2 medium compared with the growth in the cytokinin free medium.
4. Viable protoplasts isolated from soybean hypocotyl callus decreased rapidly within 4 hours during culture, and viable protoplasts were only 30 and 20% at 4 and 12 hours after isolation, respectively.

The effects of BA on protoplast viability were different depending on culture time, viable protoplasts were less by 22-25% at 2 hours culture in

the media containing BA than those in cytokinin free medium, while more by 1-10% at 4 hours, however it was almost the same after 6 hours.

5. Cell wall regeneration of soybean protoplast was observed within 2 hours incubation in the protoplast culture medium, and more than 80% of protoplasts regenerated cell walls within 12 hours.

BA promoted cell wall regeneration of soybean protoplasts, especially between 4 and 8 hours incubation. The cell wall regeneration increased with BA concentration in culture medium over the range of 0-0.1 mg/l. The promotion of cell wall regeneration by BA was also observed in carrot protoplasts isolated from phloem tissue of root.



I . 서 론

Miller 등 (1955) 에 의하여 식물의 세포분열 촉진인자인 Kinetin 이 알려진 이래 1963년 Letham(1963) 에 의하여 천연의 세포분열 촉진인자로서 Zeatin 이 발견되어 Cytokinin 은 Auxin , GA 등과 함께 중요한 식물호르몬으로 대두되었다. 그 후 benzyladenine(BA)을 포함하는 많은 합성화합물들이 Zeatin 과 유사한 생리작용을 나타내는 것으로 밝혀져 Cytokinin 으로 분류되고 있는데, 현재 Cytokinin 은 100 여가지 이상이 알려져 있다. (Moore, 1979).

Cytokinin 은 세포분열 이외에도 기관형성 (Skoog와 Miller,1957), 잎의 생장과 노화 (Leopold와 Kawase,1964), nutrient sink (Herzog, 1982), apical dominance(Woolly와 Wareing,1972) 등 많은 생리작용에 영향을 주는 것으로 보고되어 있는데 Cytokinin 의 이러한 생리작용들이 어떤 생화학적 과정을 거쳐서 이루어 지는지에 대하여는 아직 잘 알려져 있지 않다. 그러나 Cytokinin 이 여러 종류의 단백질 수준 (Yoo 등, 1986; Meyer와 Chartier,1981)과 각종 효소계(Kulaeva,1980)에 영향을 주는 것이 알려졌고, 근래 Cytokinin 의 receptor 에 관한 연구 (Choung 등, 1986) 가 이루어져 Cytokinin 의 작용기작 연구에 다소의 진전을 보이고 있는 듯하다.

한편, 최근에 Cytokinin 의 하나인 Kinetin 이 특정한 단백질의 합성을 저해하며 Kinetin 에 의해 조절되는 이 단백질은 glucan 을 분해하는 β -1,3-glucanase 의 작용 (Eichholz 등, 1983; Felix와 Meins,1985) 이 있는 것으로 알려져 주목되는데, glucan 은 세포벽성분의 하나로 세포벽이 합성될때 빠른 속도로 세포벽에 축적 (Eschrich,1975; Fincher와 Stone,1981) 되는 점을 고려해 볼때 Kinetin 을 포함하는 Cytokinin 류 화합물들은 세포벽합성에 영향을 줄 가능성이 있다. 그러나 아직 β -1,3-glucanase 가 세포벽합성이나 분해에 직접 관여한다는 증거가 없고, Kinetin 이나 BA를 포함하는 Cytokinin 들이 세포벽합성에 영향을 준다는 보고도 없기 때문에 Kinetin 의 β -1,3-glucanase 합성에 대한 조절작용이 Cytokinin 류 화합물의 여러 생리작용과 어떤 관련이 있는지는 알 수 없다.

지금까지 세포벽합성이나 분해에 대한 식물호르몬의 영향에 관한 연구로는

Auxin 과 GA의 세포팽창 혹은 신장에 있어서의 역할과 관련된 것들이 대부분 이고, 세포벽합성에 대한 Cytokinin의 영향에 관해서는 연구되어 있지 않다.

본 연구는 앞에서 언급한 바와 같이 Kinetin 이 $\beta - 1,3 - \text{glucanase}$ 의 합성에 영향을 준다는 점과 glucan이 세포벽성분의 하나라는 점으로 미루어 Cytokinin의 하나인 BA가 세포벽합성에 영향을 줄 것으로 생각되어 protoplast의 세포벽 재생에 대한 BA의 영향을 조사 하였다. 또 세포벽합성에 있어서 BA의 역할과 BA의 세포분열 촉진작용과의 관련성 유무를 보기 위하여 대두 callus의 생육에 대한 BA의 영향도 조사하여 검토 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 대두 callus의 유기 및 배양

사용한 대두의 품종은 농촌진흥청 작물시험장에서 분양받은 유한신육형인 장엽콩 (1985년 10월 수확)이었다.

1) 종자의 발아

종자는 Tween - 20 을 4 ~ 5 방울 첨가한 NaClO 용액 (유한락스, 유효염소 4% ; 30% v/v) 에 20 분간 침지하여 표면을 살균하고 멸균수로 3 회 씻어 사용 하였다. 증류수로 세척한 vermiculite 를 250 ml 비이커에 1/4 되게 채우고 autoclave 에서 살균한 다음 대두종자를 심고 aluminium foil 로 싸서 27 °C, 암조건에서 무균상태로 발아시켰다.

2) Callus의 유기 및 배양

배지종류에 따른 조직부위별 callus 유기 능력을 조사하기 위하여, 발아 후 약 1주일 된 대두를 epicotyl, node (epicotyl 과 hypocotyl 그리고 cotyledon 이 붙어 있는 부위) 및 hypocotyl 등 세 부위의 조직을 3 ~ 5 mm 되게 절단하여 25 ml 의 배지가 들어있는 100 ml 삼각 플라스크에 4 ~ 5 조각씩 넣고 aluminium foil 로 싸 다음 27 °C, 암조건에서 callus 를 유기 시켰는데 이 때 사용된 배지는 Table 1의 MS (Murashige 와 Skoog, 1962), B5 (Gamborg 등, 1968) 및 R2 (Ohira 등, 1973)의 세가지였다. 현탁 배양을 위한 callus 는 hypocotyl 을 R2 배지에서 유기 시키고 약 3주 마다 계대배양한 것이였다.

Table 1. Formulations of MS, B5 and R2 medium (mg/l)

Ingredients	MS	B5	R2
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	134	335
(NH ₄) NO ₃	1,650	—	—
KNO ₃	1,900	2,500	4,000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	150
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	250
KH ₂ PO ₄	170	—	—
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	—	150	312
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	—	1.6
MnSO ₄ ·H ₂ O	—	10	—
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	2	2.2
H ₃ BO ₃	6.2	3	2.9
KI	0.83	0.75	—
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	0.12
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	—
myo-inositol	100	100	100
nicotinic acid	0.5	1.0	0.1
pyridoxine·HCl	0.5	1.0	0.1
thiamine·HCl	0.1	10.0	1.0
glycine	2.0	—	—
sucrose	30,000	20,000	30,000
casein hydrolysate	—	—	3,000
kinetin	—	0.1	—
2,4 - D	10	1.0	1.0
BA	2	—	—
agar	1.0 % (W/V)	0.8 % (W/V)	0.8 % (W/V)
pH	5.8	5.5	5.8

3) Callus 성장에 대한 BA의 영향 조사

Miller 배지 (Miller, 1960), B5 배지, 그리고 R2 배지에 Cytokinin 원으로 BA 를 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/l 가 되게 각각 첨가 하였다. 25 ml 의 배지가 든 100 ml 삼각플라스크에 hypocotyl 조직으로부터 R2 배지에서 유기시킨 callus 1 g 을 세 조각으로 나누어 넣고 27 °C 에서 배양하였다. B5와 R2 배지의 경 우는 암조건으로 각각 24, 27 일간, Miller 배지의 경우에는 광조건 (25 ft.-C) 으 로 21 일간 배양하여 callus 성장을 조사하였다. 이 때 사용한 Miller 배지는 Tab- le 2 와 같다.

Table 2. Formulation of Miller medium (mg/l)

component	concentration	component	concentration
Ca(NO ₃) ₂	347	KI	0.8
KNO ₃	1,000	Glycine	2
NH ₄ NO ₃	1,000	Nicotinic acid	0.5
KH ₂ PO ₄	300	Thiamine·HCl	0.1
MgSO ₄	35	Pyridoxine·HCl	0.1
KCl	65	IAA	5
Na-Fe-EDTA	32	Sucrose	30,000
MnSO ₄	4.4	Agar	10,000
ZnSO ₄	1.5	pH	5.8
H ₃ BO ₃	1.6		

4) 현탁배양

R2 배지에서 hypocotyl 로부터 유기·생육시킨 callus 약 0.5 g 을 25 ml 의 배지가 들어있는 100ml 삼각플라스크에 넣고 선회배양기에서 100 rpm 으로 진탕하면서 27 °C 암조건에서 현탁배양 하였고 일주일 마다 계대배양하여 증식 시켰다. 이 때 사용한 배지는 Table 1의 B5 배지와 같으나 2,4-D 2 mg/l 를 사용하였고 agar 를 넣지 않은 점이 달랐다. protoplast 의 분리에 사용된 현탁배 양세포는 계대배양 후 4~6 일 이 된 것이었다.

2. Protoplast 의 분리·정제

1) 대두 protoplast 의 분리·정제 과정

Edwards 등 (1978) 의 방법에 준하여 다음과 같이 분리하였다. hypocotyl callus 의 현탁배양세포들을 $300 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 배양액을 제거한 다음 효소용액 20 ml 가 들어있는 100ml 삼각플라스크에 약 3g 의 세포를 넣고 선회배양기에서 $30^{\circ}C$, 60 rpm 으로 흔들며 주면서 incubation 한 다음 2점의 가아제를 겹쳐서 찌꺼기를 거르고 $45 \mu m$ nylon mesh 로 여과한 다음 $80 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 효소용액을 제거하였다. 침전된 protoplast 분획을 3회에 걸쳐 5 mM $CaCl_2$ 를 함유하는 0.55 M 의 sorbitol 용액에 부유시켜 $80 \times g$ 로 5분간 원심분리하여 세척하여 protoplast 를 분리하였다. 이 protoplast 분획을 더욱 정제하기 위하여 0.6 M sucrose 용액에 부유시키고 그 위에 0.6 M sorbitol 용액을 조심스럽게 얹어 불연속 density gradient 를 유지한 상태로 $80 \times g$ 에서 7분간 원심분리하여 두 액상의 중간에 떠있는 protoplast 를 분리하였다.

2) 효소의 종류와 효소용액의 처리시간

대두 protoplast 의 분리에 적당한 효소의 종류와 효소용액의 처리시간을 결정하기 위해 cellulase 는 Onozuka R - 10 (Yakult Honsha Co. Japan) 을 사용하였고 pectinase 로는 Pectolyase Y - 23 (Seishin Pharmaceutical Co. Japan) 과 Macerozyme R - 10 (Yakult Honsha Co. Japan) 의 두 가지를 검토하였다.

검정에 사용된 효소용액은 $CaCl_2$ 5 mM 을 함유하는 0.55 M 의 sorbitol 용액에, Onozuka R - 10 (2%) Pectolyase Y - 23 (0.25%) 을 녹힌 것과 Onozuka R - 10 (2%) Macerozyme R - 10 (0.5%) 을 녹힌 것 두 가지였다. 이 두 가지 효소용액을 검정한 결과 “결과 및 고찰” 에서 논의한 바와 같이 pectinase 로서 Macerozyme 을 사용했을 때는 protoplast 를 분리할 수 없었고 Pectolyase Y - 23 을 사용했을 때는 4시간 처리에서 최대 protoplast 수율을 얻을 수 있어서 viability 및 세포벽재생 시험을 위한 protoplast 의 분리에는 pectinase 로서 Pectolyase Y - 23 를 사용하였고 효소 처리시간은 4시간으로 하였다.

3) 당근 Protoplast

당근의 protoplast 는 시중에서 구입한 당근뿌리의 phloem 조직으로 부터 분리하였다. 당근뿌리를 유한락스 (30 % v / v) 로 20 분간 표면살균하고 phloem 조직을 얇게 잘라 약 3 g 을 효소용액 20 ml 에 넣고 대두와 같은 방법으로 분리하였다. 사용된 효소용액은 Onozuka R - 10 (2 %) 과 Macerozyme R - 10 (0.5 %) 를 5mM CaCl₂ 를 함유하는 0.55 M sorbitol 용액에 녹힌 것이었다.

3. Protoplast 의 Viability 와 세포벽재생 조사

정제된 protoplast 를 Cytokinin 으로서 BA 를, 각각 0 , 0.001 , 0.01, 0.1, 1, 10 mg / l 가 되게 첨가한 protoplast 배양배지에 약 1×10^5 protoplasts / ml 가 되게 넣어 27 °C , 암조건으로 배양하면서 일정한 시간별로 viability 와 세포벽재생을 조사하였다. 이 때 사용된 protoplast 배양배지는 Table 1 의 B5와 동일하였는데 Kinetin 과 agar 를 뺀것과 GA 0.1 mg / l 와 glucose 50 g / l 를 넣은 것 그리고 pH 를 5.8 로 조정한 것이 다르다.

1) Viability 측정 (Larkin, 1976; Strange 등, 1982)

아세톤에 fluorescein diacetate 를 0.01 mg / l 가 되도록 녹이고 이 용액을 protoplast 가 들어있는 용액 약 0.1 ml 에 한방울 가하여 상온에서 5 분간 방치한 다음 UV lamp 가 부착된 도립현미경 (Diaphot - TMD, Nikon) 에서 viable protoplast 즉 형광을 내는 protoplast 의 수를 조사 하였다. viability 는 전체 protoplast 에 대한 형광을 내는 protoplast 의 백분율로 나타내었다.

2) 세포벽재생의 측정 (Constabel, 1982)

Calcofluor white M₂R (0.1 % , w / v) 를 protoplast 에 소량처리하여 상온에서 5 분간 방치한 다음 UV lamp 가 있는 도립현미경에서 366nm excitation filter 를 부착시켜 형광을 내는 protoplast 의 수를 조사하여 전체 protoplast 에 대한 백분율로 나타내어 세포벽재생율로 간주하였다.

3) 세포벽재생 및 Viability 에 대한 Ca^{++} 의 영향조사

Protoplast 배양배지 (Cytokinin 을 뺀것) 의 Ca^{++} 농도가 1 mM인 것과 6 mM이 되게 조정 한 것에서 protoplast 를 배양하여 세포벽재생과 viability 를 조사 하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 대두유묘의 조직부위별 및 배지종류별 callus 생성 능력

대두의 조직배양은 많은 사람들에 의해서 연구되어 callus 유기 및 배양을 위한 배지조건이 비교적 잘 확립되어 있는 편이다. (Murashige 와 Skoog, 1962; Gamborg 등, 1968; Ohira 등, 1973; Miller, 1963; Schenk 와 Hilderbrandt, 1972). 그러나 이미 알려진 이들 배지는 특정 품종의 특정조직에 대해 확립된 것이므로 품종이나 조직이 다른 경우에는 적정성 여부를 검토하여야 한다. 본 실험에 사용한 장엽콩은 다른 사람들에 의해 callus 유기 및 배양조건이 검토된바 없기 때문에 장엽콩에 대해 callus 유기 및 배양에 적당한 조직부위와 배지를 검토하였다.

Fig.1은 대두유묘의 epicotyl, node 및 hypocotyl 부위를 MS 배지, B5 배지, 그리고 R2 배지에서 각각 callus 를 유기 시키고 27℃, 암조건에서 17일간 배양했을 때의 생육상태이다.

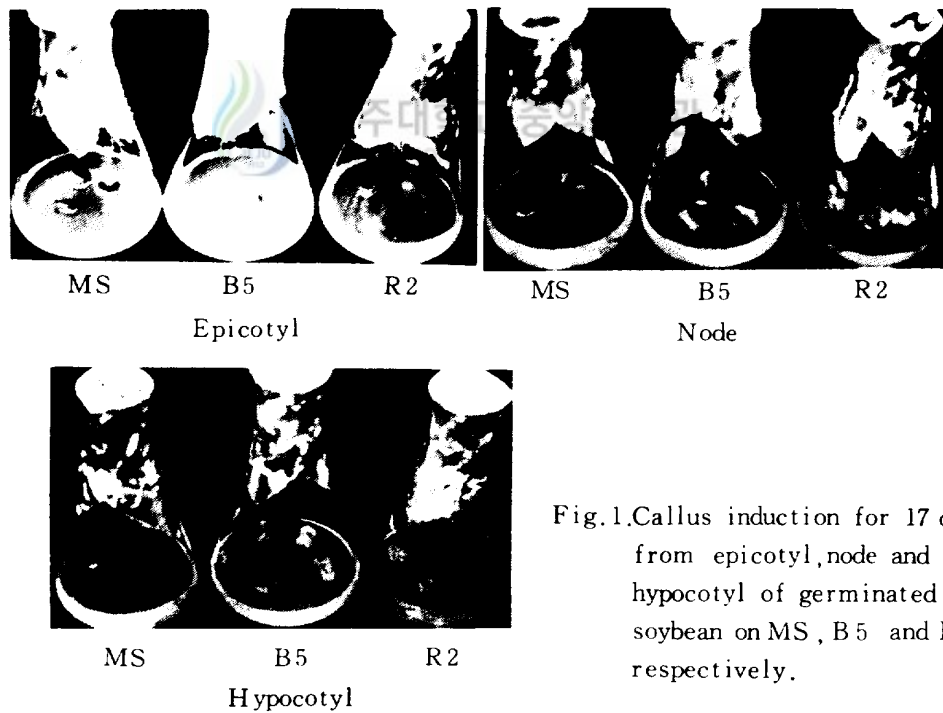


Fig.1.Callus induction for 17 days from epicotyl,node and hypocotyl of germinated soybean on MS, B5 and R2, respectively.

조직부위별로 보면 epicotyl 의 경우에 B5 배지에서 다소 callus 가 생성되는 듯이 보였으나 그 정도는 작았으며, MS 배지와 R2 배지에서는 callus 가 거의 형성되지 않았다. node 부위조직은 MS, B5, R2 의 세가지 배지 모두에서 callus 가 형성되었는데 이 중에서 R2 배지의 callus 생육이 가장 좋았다. 그러나 node 부위조직으로부터 유기된 callus 는 부분적으로 갈색부위가 나타나 균일하지 않았다. hypocotyl 조직은 MS 배지에서 callus 생성이 불량한 반면 B5 와 R2 배지에서는 양호하였고 특히 R2 배지의 callus 는 균일하면서도 생육이 좋았다. 그러므로 hypocotyl 조직을 R2 배지에서 callus 를 유기 시켰을때 가장 양호하였다.

Hypocotyl 부위의 조직을 B5 배지와 R2 배지에서, 배양기간을 더욱 길게하여 25 일간 배양한 경우에도 Fig.2 와 같이 생육이 모두 양호한 편이지만 R2 배지의 경우가 더욱 왕성하였다.

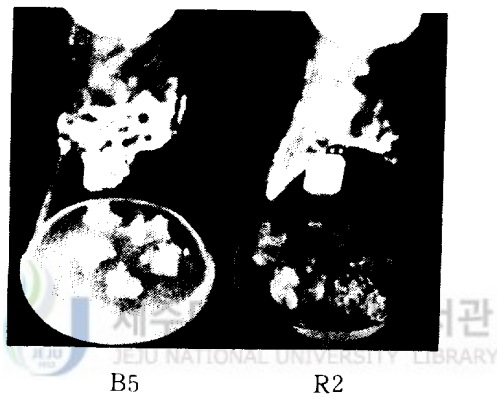


Fig.2. Growth of callus from Jang - Yeob soybean hypocotyl for 25 day-culture on B5 and R2 media.

2. Protoplast 분리에 대한 pectinase 의 종류와 효소처리시간의 영향

효소에 의해서 protoplast 를 분리할때 사용되는 가장 중요한 효소는 cellulase 와 pectinase 인데, 이 중에서 pectinase 는 종류에 따라 특정세포의 세포벽분해 능력에 큰 차이를 보이기 때문에 특정세포의 protoplast 분리에는 적절한 Pectinase 의 선택이 중요하다. 대두 callus 로부터 protoplast 를 분리할때 흔히

사용되는 pectinase 는 Pectolyase Y - 23 인데 , 본 실험에서는 장엽콩 hypo-cotyl 에서 유기된 callus 의 액체배양세포로 부터 protoplast 를 분리할 때에도 Pectolyase Y - 23 가 적당한가를 검토 조사하고, 가격이 비교적 싼 Macerozyme R - 10 의 이용 가능성을 검토하였다.(Table 3).

Table 3. Effects of pectinase and incubation time on isolation yields of protoplast from suspensions of callus derived from soybean hypocotyl. (Yields: protoplasts $\times 10^7$ / g.callus)

Enzymes	Incubation time(hr)				
	2	4	6	8	16
Onozuka R- 10 (2%) + Pectolyase Y-23 (0.25%)	1.45	6.48	6.15	3.2	1.1
Onozuka R - 10 (2%) + Macerozyme R - 10 (0.5%)		-		-	-

Pectolyase Y - 23 를 pectinase 로서 사용했을때 protoplast 는 비교적 쉽게 분리되었는데, 효소처리시간별로 보면 2 시간에서도 비교적 많은 protoplast 가 분리되었으나 4 시간에서 수율이 가장 높아 6.5×10^7 protoplasts / g . callus 였다. 그런데 수율은 6 시간 효소처리 경우에 4 시간 경우와 비슷한 값을 보였으나 8 시간 이후는 크게 감소하여 최대수율(4시간의 경우)의 50% 미만이 되었다.

Pectinase 로서 Macerozyme R - 10 을 사용한 경우에는 효소처리 16 시간 까지도 protoplast 가 거의 분리되지 않아 이것은 장엽콩 hypocotyl callus 의 protoplast 를 분리할 때에는 이용할 수 없었다.

3. Callus 생장에 대한 BA 의 영향

Cytokinin 은 담배를 비롯한 여러가지 식물조직으로 부터 유래된 callus 의 생

장을 촉진한다는 것이 잘 알려져있고 (Skoog와 Tsui, 1948; Linsmar와 Skoog, 1965; Letham, 1967), 대두의 경우에도 Cytokinin은 cotyledon에서 유래된 callus의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 이를 기초로한 생물검법도 확립되어 있다 (Miller, 1963).

그러나 callus의 Cytokinin에 대한 반응은 Cytokinin의 종류 뿐만아니라 대두의 품종이나 유래된 조직부위에 따라 차이가 있기 때문에 (Armstrong 등, 1981), 본 실험에서는 장엽콩 hypocotyl callus가 BA에 대해 어떤 성장반응을 나타내는지를 조사하였다.

Fig.3은 장엽콩 hypocotyl 조직으로부터 R2 배지에서 callus를 유기시키고 이 callus를 Miller의 방법 (Miller, 1963)에 따라 배양하여 BA수준별로 callus 성장을 조사한 결과이다.

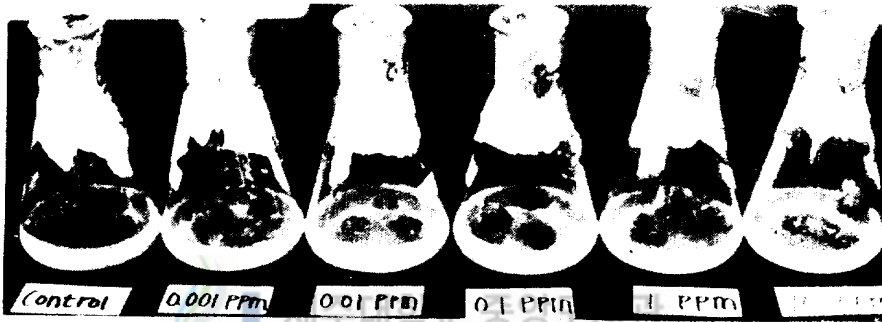


Fig.3. Effects of BA on callus growth

The calli derived from Jang - Yeob hypocotyl on R2 medium were grown at 27 °C under light condition for 21 days on Miller media containing various levels of BA.

조사된 BA농도 0.001 ~ 10 mg/l 범위에서 BA 처리구는 BA를 첨가하지 않은 대조구와 유사한 생육상태를 보여 BA는 장엽콩 hypocotyl callus의 성장을 촉진하지 않았고 오히려 다소 억제한 듯이 보였다.

BA에 대한 callus의 성장반응은 사용배지에 따라 달라질 수도 있는데 이러한 점을 검토하기 위하여 배지를 바꾸어 B5와 R2 배지에서 BA에 대한 callus 성장을 조사한 결과 각각 Fig. 4 및 Fig. 5와 같았다.

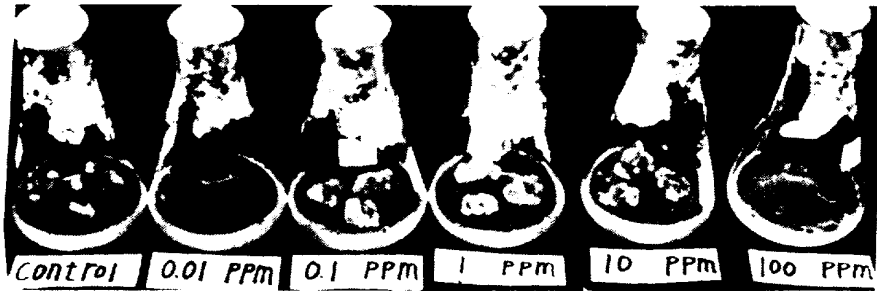


Fig. 4. Effects of BA on callus growth

The calli derived from Jang - Yeob hypocotyl on B5 medium were grown at 27 °C , in darkness, for 24 days on B5 media containing various levels of BA.

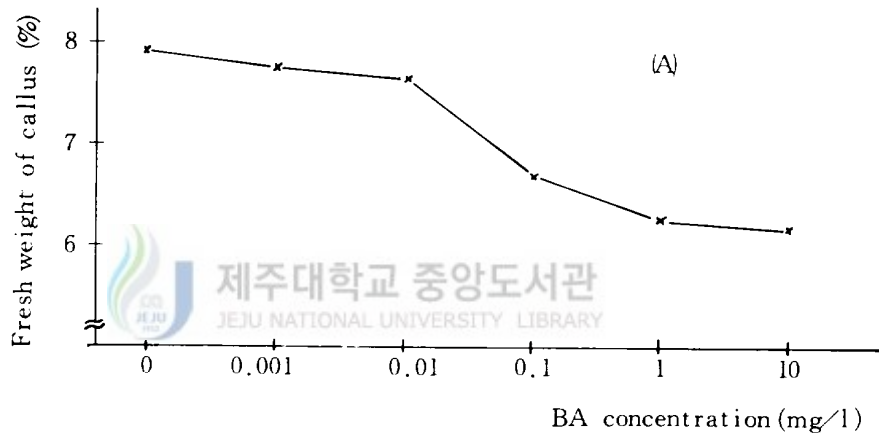


Fig.5. Effects of BA on callus growth

The calli derived from Jang - Yeob hypocotyl on R2 medium were grown at 27 °C in darkness for 27 days

on R2 medium containing various levels of BA.

(A) : Effects of BA on fresh weight of callus.

(B) : A photograph of the callus growth.

Fig. 4 에서 보는 바와 같이 B5 배지를 사용했을때 BA수준에 따라 callus 생장이 다소 달랐으나 뚜렷한 차이는 없었다. 또 Fig. 5 (B) 의 R2 배지에서도 BA의 처리에 의한 callus 생장이 억제되는 듯이 보였는데 실제 callus의 생체무게를 측정 한 결과 Fig.5 (A) 에서 보는 바와 같이 BA농도 $0.001 \sim 10 \text{ mg} / \ell$ 범위에서 농도가 높을 수록 생장이 억제되어 $10 \text{ mg} / \ell$ 의 경우에 BA를 처리하지 않은 것보다 22% 저조한 생육을 보였다.

배지를 달리하여도 BA에 대한 callus 성장반응은 모두 유사한 점으로 보아 BA에 대한 callus의 성장억제는 배양조건과 관련이 없고 본 실험에 사용한 callus 자체의 특성으로 생각되었다. 그러나 이 callus의 특성이 장엽콩의 유전적 특성인지 아니면 조직부위나 callus의 habituation에 의한 후생적(epigenetic) 특성인지는 알 수 없다.

본 실험의 hypocotyl로부터 유래된 callus가 BA에 의하여 생육이 저해된 것은, Miller(1960)가 20 품종의 대두 cotyledon에서 유래된 callus는 모두 Kinetin에 의하여 생육이 촉진 되었다는 보고와는 상이한데 이러한 차이는 callus가 유래된 조직부위가 다르기 때문인 것으로 생각되지만 본 실험에서는 그것을 확인하지 못했다.

4. Protoplast의 Viability에 대한 BA의 영향

Fig.6은 BA가 protoplast의 viability에 주는 영향을 보기 위하여 protoplast 배양배지에 BA를 여러수준으로 처리하여 각각에 대해 12시간까지 viable protoplast의 비율을 조사하여 시간에 따른 변화로 나타낸 것이다. BA가 없는 배지에서 viability는 배양후 2시간까지는 비교적 감소율이 작았으나 4시간 후에는 viable protoplast가 크게 감소하여 30% 이하가 되었고 12시간 후에는 20%에 불과해서 비교적 짧은 시간 이내에 viability가 크게 저하되는 것을 알 수 있다.

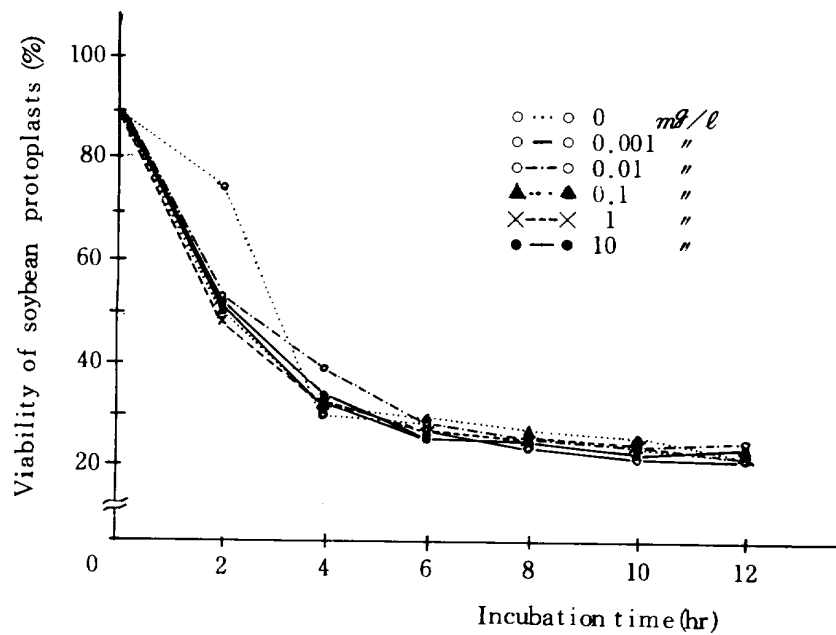


Fig.6. Effects of BA on the viability of protoplasts isolated from callus suspension derived from soybean hypocotyl.

BA를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우를 비교해 볼때 viability에 뚜렷한 차이는 없었으나 배양후 2시간에서 BA가 없는 배지에서 배양한 경우에 viable protoplast가 75%인데 반해 BA를 처리한 경우는 모두 약 50%에 지나지 않아 BA는 배양초기에 viability를 감소시키는 것으로 나타나 주목되었다. 이와는 달리 4시간 이후는 BA가 없는 경우 보다 다소 높거나 유사하여 BA는 배양후 4시간 이후는 viability에는 영향을 주지 않는 것으로 보였다.

protoplast의 배양을 시작한후 시간별 viable protoplast의 비율을 BA농도에 따른 변화로 나타내면 Fig.7과 같이 배양 2시간후 BA농도가 0일때에 비해 BA농도 0.001~10 mg/l 범위에서 모두 viable protoplast의 비율이 현저히 낮고 BA처리간에는 농도에 따라 별로 차이가 없다는 것을 알 수 있다. 또 배양후 4시간 이후에서는 BA농도 0.01 mg/l의 경우를 제외하면 BA농도가 0 mg/l에서 10 mg/l까지의 범위 내에서 BA처리간에 viable protoplast의 비율은 별 차이가 없음을 알 수 있다. (Fig.7)

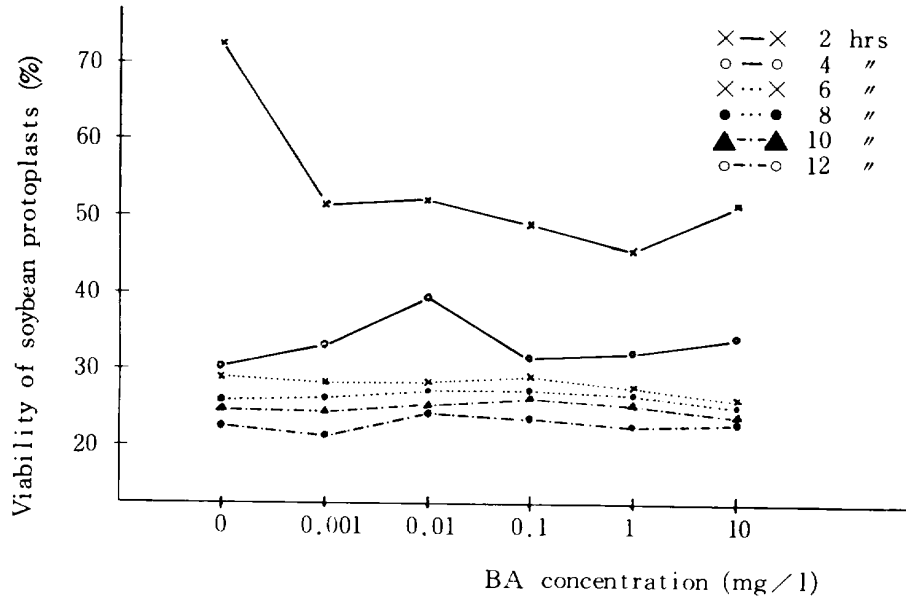


Fig.7. Effects of BA on viabilities of soybean protoplasts isolated from suspension cultures of hypocotyl callus.

5. Protoplast의 세포벽재생에 대한 BA의 영향

Ca^{++} 은 세포막의 안정성을 증가시키는 것으로 알려져 있어서 protoplast 배양배지에서는 callus 배양배지보다 높은 농도의 Ca^{++} 를 사용 (Constabel, 1982) 하기도 하는데, 본 실험에서는 protoplast의 세포벽재생에 대한 BA의 영향을 조사하기에 앞서 1 mM의 Ca^{++} 를 포함하는 protoplast 배양배지에 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 를 첨가하여 6 mM의 Ca^{++} 가 되게 하여, Ca^{++} 의 첨가가 protoplast의 세포벽합성에 주는 영향을 조사하였다. (Fig.8 및 Fig.9).

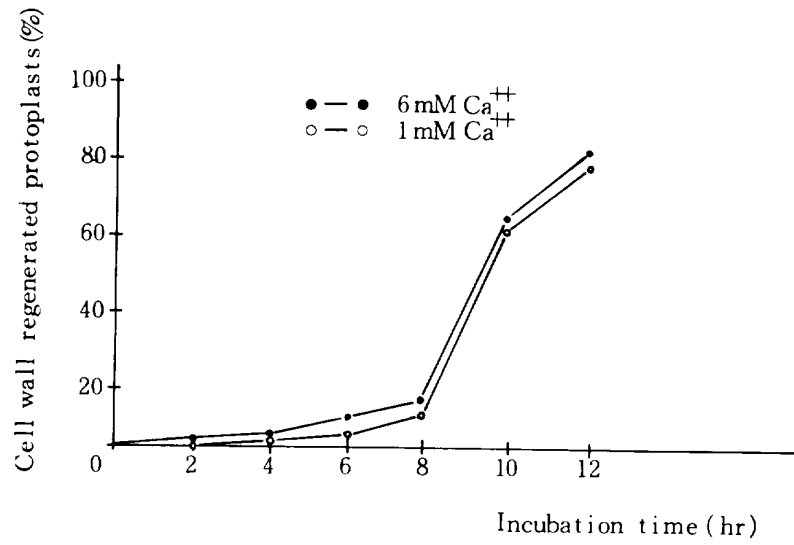


Fig.8. Effect of Ca⁺⁺ concentration on cell wall regeneration of soybean protoplast.

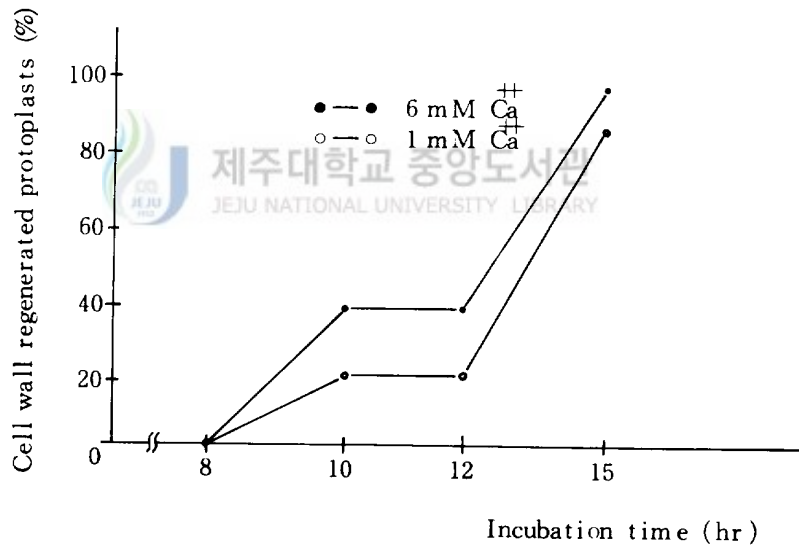


Fig.9. Effect of Ca⁺⁺ concentration on cell wall regeneration of carrot protoplast.

Fig.8.은 대두 protoplast 의 세포벽재생에 대한 Ca^{++} 영향을 조사한 결과이다. 검토된 시간범위 (0 ~ 12 시간) 전부에서 Ca^{++} 1 mM보다 6 mM의 경우가 전체 protoplast 중에서 세포벽이 재생된 protoplast 가 차지하는 비율이 커서 Ca^{++} 은 대두 protoplast 의 세포벽재생을 촉진하는 것으로 나타났다. Ca^{++} 의 세포벽재생 촉진작용을 확인하기 위하여 당근뿌리의 phloem조직으로부터 분리한 protoplast 에 대해 조사한 결과 Fig.9 에서 보는 바와같이 역시 Ca^{++} 농도가 높을때 세포벽 재생이 촉진된 것으로 나타났다. 이러한 결과를 토대로 protoplast 세포벽재생에 대한 BA의 영향을 조사하기 위한 protoplast 배양배지는 Ca^{++} 농도를 6 mM로 하였다.

Fig.10 은 대두 hypocotyl callus 의 현탁배양세포로부터 분리한 protoplast 의 세포벽 합성에 주는 BA의 영향을 조사한 것인데, 전체 protoplast 에 대한 세포벽재생 protoplast 의 비율 (%) 을 시간별로 나타낸 것이다.

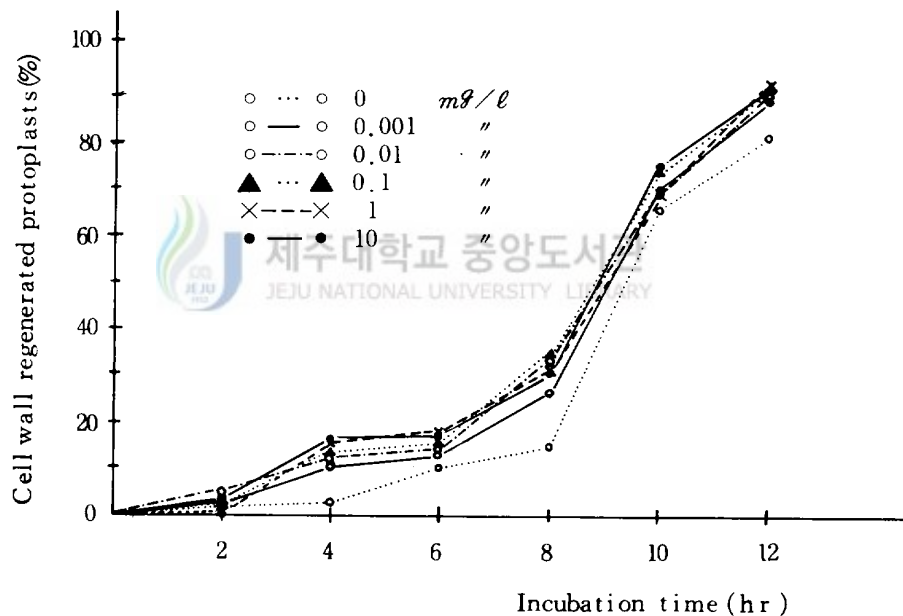


Fig.10. Effects of BA on cell wall regeneration of soybean protoplast. Timecourse change in cell wall regenerated protoplasts.

BA가 없는 배지에서 배양한 protoplast는 배양 개시 2시간후 부터 세포벽을 재생하는 세포가 관찰되어 세포벽은 적어도 배양후 2시간 이내에 재생되기 시작한다는 것을 알 수 있었다. 세포벽이 재생된 protoplast의 비율은 배양 시간이 경과함에 따라 차츰 증가하였는데 배양초기에는 증가속도가 느려 8시간까지는 1.5% 정도였다. 그러나 배양후 10시간에는 세포벽재생 protoplast의 비율이 급격히 증가하여 65%가 되었고 12시간에는 80% 이상이 되었다. 그러므로 장엽콩 hypocotyl callus protoplast의 경우에 세포벽재생은 배양 8시간까지는 잠복기 (Lag phase)이고 8시간에서 10시간 사이는 대수기 (Logarithmic phase)이며, 안정기 (Stationary phase)는 10~12시간 이후인 것으로 보였다.

BA를 첨가한 배지에서 배양한 대두 protoplast에 있어서 세포벽재생 protoplast의 비율은 BA가 없는 배지에서 배양한 것보다 모두 높아 세포벽재생은 BA에 의해 촉진된 것으로 나타났다.

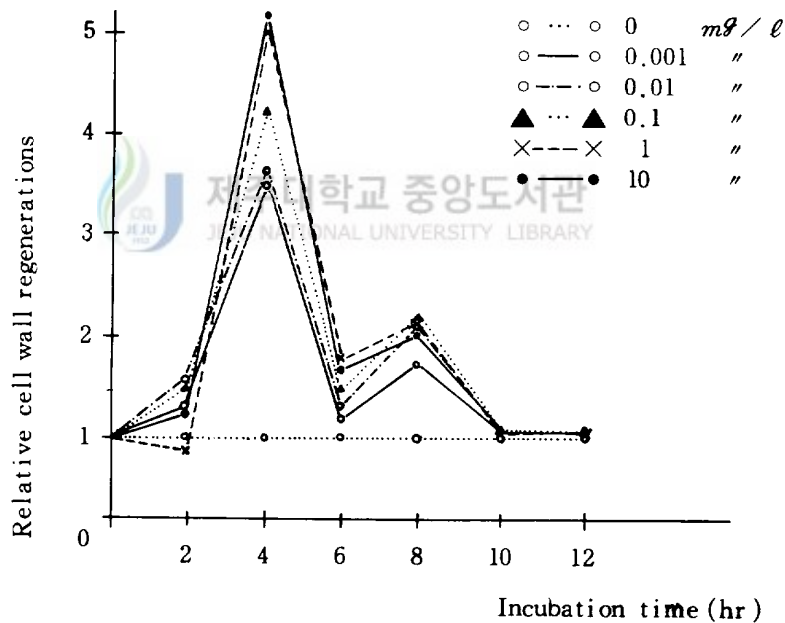


Fig. 11. Relative cell wall regenerations of protoplasts cultured on BA added media compared with those on BA free medium.

또 세포벽재생 protoplast 의 비율이 15%에 도달하는데 걸리는 시간은 BA 10 mg/ℓ 에서는 4시간이었으나 BA가 없는 배지에서는 8시간이어서 BA처리에 의하여 세포벽재생이 2배 정도 빨라진 것을 볼 수 있다. BA를 첨가한 배지에서 배양한 protoplast 의 세포벽재생을 BA가 없는 배지에서 배양한 protoplast의 세포벽재생에 대하여 상대치로 나타낸 Fig.11에서 보면 세포벽재생이 BA에 의하여 촉진된 것이 잘 나타나 있는데 특히 배양 4시간에서는 BA농도가 높을 수록 세포벽재생 protoplast 의 비율이 컸고 4시간부터 8시간 사이에 세포벽재생 protoplast 가 BA가 없는 배지에 비해 BA 첨가배지들의 경우가 높아서 BA는 세포벽재생 초기에 큰 영향을 주는 것으로 나타나 주목된다.

세포벽재생을 BA농도에 따라 나타내면 Fig.12와 같은데, BA농도 0부터 0.1 mg/ℓ 까지는 BA농도가 클수록 전반적으로 세포벽재생율도 높은 것을 알 수 있다. (Fig.12)

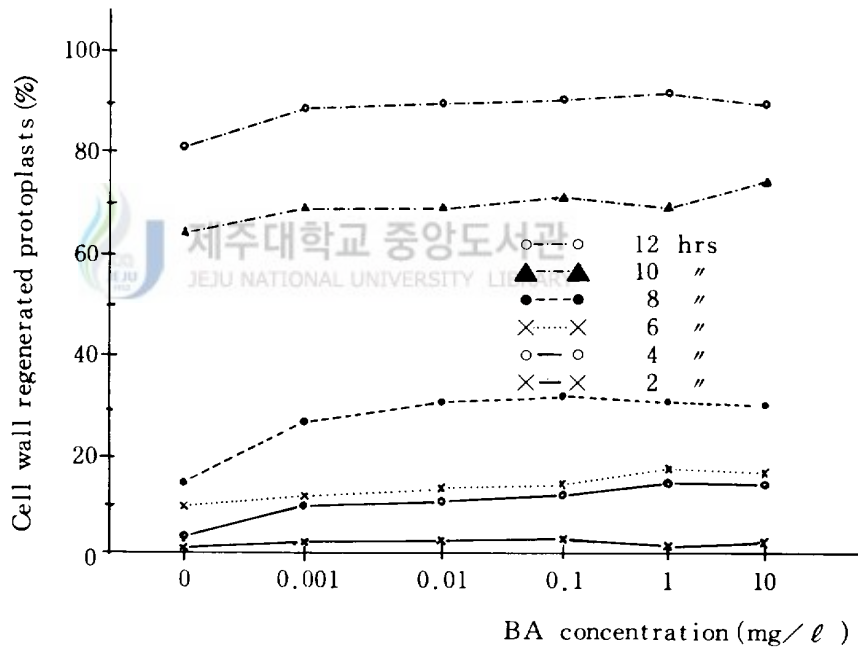


Fig.12. Effects on BA on cell wall regeneration of soybean protoplast. Changes in cell wall regenerated protoplasts with BA concentration.

이상의 결과에서 BA는 protoplast의 세포벽합성을 촉진하는 것으로 나타났고, 특히 세포벽합성의 초기에 영향을 많이 주는 것으로 나타나 세포벽재생의 대수기 (Logarithmic phase)를 앞당기는 것으로 생각되었는데 세포벽재생에 대한 BA의 이러한 촉진작용을 확인하기 위하여 당근뿌리의 phloem 조직으로부터 분리한 protoplast의 세포벽재생에 대한 영향을 조사하였다 (Fig.13).

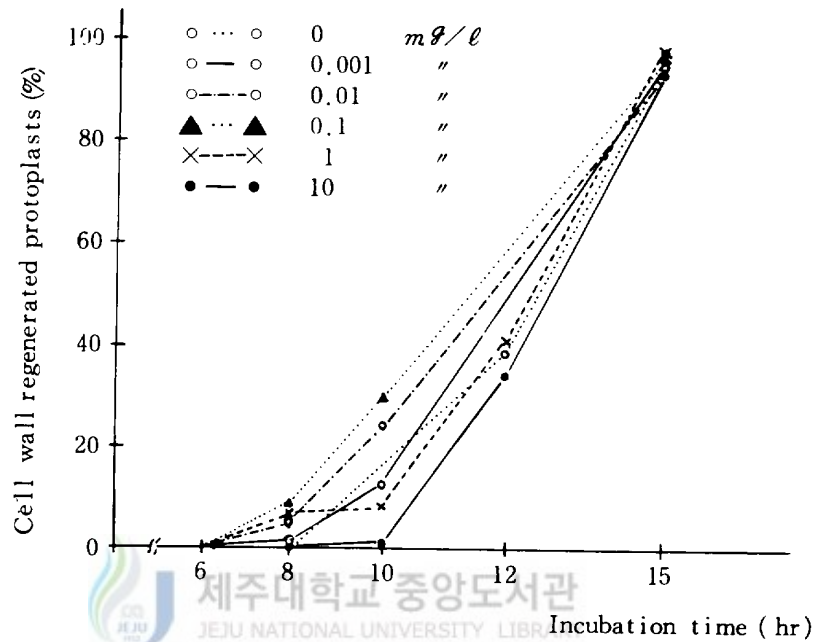


Fig.13. Effects of BA on carrot protoplast cell wall regeneration.

당근 protoplast는 대두의 경우와는 달리 배양개시후 6시간까지는 세포벽재생이 관찰되지 않았고 BA를 처리하지 않은 경우 8시간부터 관찰되어 잠복기가 대두에 비해 약 6시간 정도 길었다. 8시간 이후 부터는 세포벽재생 protoplast의 비율이 급격히 증가하여 15시간 후에는 90% 이상 되었다. BA를 함유한 배지에서는 BA농도에 따라 세포벽재생 protoplast의 비율이 일정한 경향을 보이지는 않았으나 BA 10 mg/l의 경우를 제외하면 배양후 8~12시간 범위에서 BA가 없는 배지의 경우보다, 세포벽재생 protoplast의 비율이 높게 나타나, BA는 대

두에서와 마찬가지로 당근 protoplast 의 세포벽재생을 촉진하며 세포벽재생의 초기에 영향을 많이 주는 것으로 나타났다.

Felix 등 (Felix 와 Meins, 1985; Eicholz 등, 1983) 이 담배 callus 에서 β - 1,3- glucanase 가 Kinetin 에 의하여 그 합성이 억제 되었다고 보고한 점과 β - 1,3 - glucanase 가 세포벽성분의 하나인 glucan 을 분해한다는 점을 고려하면, Kinetin 과 마찬가지로 Cytokinin 의 하나인 BA 에 의하여 protoplast 의 세포벽재생이 촉진된 것은 BA 가 β - 1,3 - glucanase 의 합성을 억제하여 glucan 분해가 방지되어 나타난 결과로 추정 되었다. 더구나 glucan 은 세포벽합성의 초기에 합성된다는 사실 (Eschrich, 1975; Fincher 와 Stone, 1981) 과 BA 의 protoplast 세포벽재생에 대한 촉진작용이 세포벽재생 초기에 뚜렷하다는 본 실험의 결과는 이러한 생각을 뒷받침 해준다. 물론 본 실험의 결과 만으로는 앞에서 제시한 가설을 확실하게 검증할 수는 없고 앞으로의 연구에 의하여 보다 직접적인 증거가 제시되어야 할 것이다.

BA 가 protoplast 의 세포벽합성을 촉진한 것과는 달리 이미 앞에서 논의한 바와 같이 대두 hypocotyl callus 의 생육은 억제한 것으로 나타났는데 겉보기로는 이 두가지 결과가 서로 상반되는 것 처럼 보여 주목된다. 대두 cotyledon 조직에서 유래한 callus 가 Kinetin 에 의해 생육이 촉진되는 것은 Kinetin 의 세포분열 촉진 작용에 의한 것으로 인식 (Miller, 1960) 되고 있는데, hypocotyl 을 사용한 본 실험의 결과에서 protoplast 의 세포벽합성이 BA 에 의하여 촉진 되었음에도 불구하고 callus 생육은 오히려 감소한 것은 BA 의 protoplast 세포벽재생 촉진작용과 BA 의 callus 생육 촉진작용이 서로다른 별개의 과정을 거쳐서 이루어지기 때문에 나타난 결과인지 아니면 BA 에 의하여 세포벽합성이 지나치게 촉진되어 세포분열에 필요한 세포의 extensibility 를 저하시켜 나타난 결과인지는 분명하지 않은데 여기에 관해서도 앞으로의 연구가 기대된다.

IV . 적 요

대두 (장엽콩) 종자를 발아시켜 epicotyl , node 그리고 hypocotyl 조직을 각각 MS , B5 및 R2 배지에서 callus 를 유기시키고 hypocotyl에서 유래된 callus 의 생육에 대한 benzyladenine (BA)의 영향을 조사 하였다 . 또 hypocotyl callus 의 현탁배양세포로부터 protoplast 를 분리하고 , BA가 protoplast 세포벽재생에 미치는 영향을 조사하였다 .

1 . Callus 생성능력은 조직과 배지에 따라 달랐는데 epicotyl , node , hypocotyl 중에서 hypocotyl 조직의 callus 생성이 가장 양호 하였고 배지별로는 R 2 배지가 가장 양호했다 .

2 . 현탁배양세포로부터 protoplast 를 분리할때 pectinase 로서 Macerozyme R - 10 을 사용했을 때는 protoplast 가 거의 분리되지 않았고 , Pectolyase Y - 23 을 사용했을 때는 비교적 잘 분리 되었다 . 효소 (Onozuka R - 10 ; 2 % , Pectolyase ; 0.25 %) 의 처리시간은 4 시간이 적당하였는데 이 때 protoplast 의 수율은 6.5×10^7 protoplasts / g · callus 이었다 .

3 . BA는 hypocotyl 에서 유래된 callus 의 생육을 억제하였고 억제한 정도는 BA농도 (0.001 ~ 10 mg/l) 가 높을수록 커서 R2 배지를 사용한 경우 10 mg/l 에서는 BA를 처리하지 않은 경우에 비해 생장이 22 % 억제되었다 .

4 . Hypocotyl 의 callus 로부터 분리한 protoplast 에 있어서 viable protoplast 는 protoplast 배양개시후 4 시간 이내에 30 % 이하로 급격히 감소하였고 , 12 시간 후에는 20 % 에 불과했다 .

Viability 에 대한 BA 의 영향은 시간에 따라 다르게 나타났는데 2 시간 후의 viable protoplast 는 BA를 처리하지 않은 것에 비해 BA처리에서 22 ~ 25 % 적은데 반해 4 시간 후의 경우는 BA처리에서 오히려 1 ~ 10 % 많았고 6 시간

이후는 별 차이가 없어, BA는 protoplast 분리후 4시간 이내의 viability 에는 영향을 주지 않는 것으로 보였다.

5. 대두 protoplast 의 세포벽재생은 배양후 2시간 이내부터 관찰 되었으며 배양시간이 경과함에 따라 세포벽재생 protoplast 의 비율은 증가하였는데 그 양상은 8시간까지는 증가속도가 느렸으나 8시간에서 10시간 사이에 급격히 증가 하였고 12시간에는 protoplast 의 80%이상이 세포벽을 재생했다.

6. Protoplast 의 세포벽재생은 BA 에 의해 촉진되었는데, 특히 세포벽합성 초기인 4~8시간에 촉진효과가 컸다. BA농도 $0 \sim 0.1 \text{ mg} / \ell$ 범위에서는 BA 농도가 높을수록 세포벽재생율도 높았다. 세포벽재생에 대한 BA의 촉진작용은 당근 protoplast 에서도 확인되었다.



V. 참고 문헌

- Armstrong, D.J., Kim, S. G., Mok, M. C. and Mok, D. W. S. 1981. Genetic regulation of cytokinin metabolism in Phaseolus tissue cultures. Metabolism and molecular activities of cytokinins, ed by J. Guern and C. Peaud-Lenoel, pp 97 - 104, Springer - Verlag, Berlin.
- Brinegar, A.C., A. Stevens and J. E. Fox. 1985. Biosynthesis and degradation of a wheat embryo cytokinin binding protein during embryogenesis and germination. Plant Physiol., 79, 706 - 710.
- Choung, C. C., K. J. Yoo and C. K. Park. 1986. Binding of cytokinin to proteins of soybean (*Glycine max*) leaves. J. Korean Agricultural Chemical Society, 29 (1), 10 - 15.
- Constabel, F. 1982. Isolation and culture of plant protoplasts. Plant tissue culture methods, 2nd ed. L. W. Wetter and F. Constabel, pp. 38 - 48. Saskatoon: Nat'l Res. Counc. Canada.
- Edwards, G. E., S. P. Robinson, N. J. C. Tyler and D. A. Walker. 1978. Photosynthesis by isolated protoplasts, protoplast extracts and chloroplasts of wheat. Plant Physiol. 62: 313 - 319.
- Eichholz, R., J. Harper, G. Felix and F. Meins. 1983. Evidence for an abundant 33,000 - dalton polypeptide regulated by cytokinins in cultured tobacco tissues. Planta, 158, 410 - 415.
- Eschrich, W. 1975. Sealing systems in phloem. Encyclopedia of Plant Physiology. vol. 1. (ed. M. H. Zimmerman and J. A. Milburn), pp. 39 - 56. Springer - Verlag, Berlin.
- Felix, G. and F. Meins. 1985. Purification, immunoassay and characterization of an abundant cytokinin - regulated polypeptide in cultured tobacco tissues. Evidence the protein in α , β -1,3 - glucanase. Planta, 164, 423 - 428.
- Fincher, G. B. and Stone, B. A. 1981. Metabolism of noncellulosic polysaccharides. In Encyclopedia of Plant Physiology., vol. 13 B (ed. W. Tanner and F. A.

- Loewus), pp. 68 - 132. Springer - Verlag, Berlin.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima, 1968. Nutrient requirement of suspension culture of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50, 148 - 151.
- Herzog, H. 1982. Source and sink development during Kernel filling of two Spring wheats as affected by root size and cytokinin applications. *Z. pflanzenaehr. Bodenk.* 145 : 128 - 139.
- Kulaeva, O. N. 1980. Cytokinin action on enzyme activities in plants. *Plant Growth Substrates 1979*, Springer, Berlin. pp. 119 - 128.
- Larkin, P. J. 1976. Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta*, 128:213 - 216.
- Leopold, A. C. and M. Kawase, 1964. Benzyladenine effects on bean leaf growth and senescence. *Am. J. Botany*. 51:294 - 298.
- Letham, D. S. 1963. Zeatin, A factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci.* 2:569 - 573.
- Letham, D. S. 1967. Regulation of cell division in plant tissues. *Planta*, 74, 228 - 242.
- Linsmar, E. M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 18, 100.
- Meyer, Y. and Y. Chartier. 1981. Hormonal control of mitotic development in tobacco protoplasts. *Plant Physiol.*, 68, 1273 - 1278.
- Miller, C. O., F. Skoog, M. H. von Saktza and F. M. Strong. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77:1392.
- Miller, C. O. 1960. An assay for kinetin - like materials. *Plant Physiol.*, 35 (suppl.) xxvi.
- Miller, C. O. 1963. Kinetin and kinetin - like compounds. *Modern methods of Plant Analysis*. vol. 6, H. F. Linskens and M. V. Tracey eds., Springer, Berlin, pp 194 - 202.
- Moore, T. C. 1979. Cytokinins. In *Biochemistry and Physiology of Plant hormones*. Springer - Verlag. Berlin. pp. 147 - 180.

- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473 - 497.
- Ohira, K., K. Ojima and A. Fujiwara. 1973. Studies on the nutrition of rice cell culture. I. A simple defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.*, 14, 1113 - 1121.
- Polya, G. M. and J. R. Davis. 1983. Resolution and properties of a protein kinase catalyzing the phosphorylation of a wheat germ cytokinin - binding protein. *Plant Physiol.*, 71, 482 - 488.
- Schenk, R. U. and A. C. Hilderbrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50, 199 - 204.
- Skoog, F. and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118 - 131.
- Skoog, F. and Tsui, C. 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segment and callus cultured in vitro. *Amer. J. Bot.*, 35, 782.
- Strange, R. N., D. J. Pippard and G. A. Strobel. 1982. A protoplast assay for phytotoxic metabolites produced by *Phytophthora dreschleri* in culture. *Physiol. Plant Pathol.* 20, 359 - 364.
- Woolley, D. J. and P. F. Wareing. 1972. The role of roots, cytokinins and apical dominance in the control of lateral shoot form in *Solanum andigena*. *Planta (Berl)*. 105: 33 - 42.
- Yoo, K. J., C. K. Park and S. I. Kim. 1986. Effects of Auxin, GA and Cytokinin on the Protein Synthesis (Accumulation) of Soybean. *J. Korean Agricultural Chemical Society*. 29(1), 73 - 77.

감 사 의 글

본 연구를 지도해 주신 류기중 교수님께 깊은 감사드립니다.

그리고 본 논문을 심사해 주신 김형욱 교수님, 유장걸 교수님께 진심으로 감사드리며, 항상 격려와 조언을 해 주신 강순선 교수님, 고정삼 교수님, 윤창훈 교수님들께 깊은 감사 드립니다.

끝으로 방사능 이용 연구소 실험실을 이용하도록 배려해 주신 소장님을 비롯한 여러분들과, 그외 저를 도와 주신 여러분들께도 감사드립니다.

