碩士學位論文

大豆 培養細胞의 生長과 蛋白質에 대한 Cytokinin의 影響

濟州大學校 大學院

農 化 學 科

金 昌 五

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1988年 12月

大豆 培養細胞의 生長과 蛋白質에 대한 cytokinin의 影響

指導敎授 柳 基 中

金 昌 五

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

1988年 12月 日

제주대학교 중앙도서관

金昌五의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 柳 長 杰

委 員 金 [illegible]

委 員 柳 基 中

濟州大學校 大學院

1988年 12月 日

EFFECTS OF CYTOKININ ON THE GROWTH AND PROTEINS IN SOYBEAN (*Glycine max*) CALLUS

Chang-Oh, Kim
(Supervised by Professor Key-Zung Riu)

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

1988. 12.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

目　　次

Summary

Ⅰ. 緖　　論 …… 2

Ⅱ. 材料 및 方法 …… 4

1. callus의 誘起 및 培養 …… 4
2. callus生長에 미치는 cytokinin의 影響 …… 6
3. callus의 全窒素와 蛋白質 含量 測定 …… 6
4. 蛋白質의 SDS-DISC polyacrylamide gel 電氣泳動 …… 6
5. β-1,3-glucanase의 抽出 및 活性 測定 …… 7
6. callose의 抽出 및 含量 測定 …… 9

Ⅲ. 結果 및 考察 …… 10

1. 培養細胞의 生長曲線 …… 10
2. callus生長에 미치는 cytokinin의 影響 …… 12
3. callus의 蛋白質 水準에 대한 cytokinin의 影響 …… 18
4. callus의 polypeptide水準에 대한 cytokinin의 影響 …… 20
5. β-1,3-glucanase의 活性에 대한 cytokinin의 影響 …… 22
6. callose 含量에 대한 cytokinin의 影響 …… 24

Ⅳ. 摘　　要 …… 27

Ⅴ. 參考文獻 …… 28

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Summary

Effects of cytokinin on the growth, protein level, polypeptide pattern, glucanase activity and glucan content of soybean(*Glycine max*) callus were studied.

1. The fresh weight of callus cultured for 30 days on agar medium containing 0.5ppm of kinetin was 9 fold of initial weight. The growth of callus was stopped after about 30days. In suspension culture, the cells grew rapidly after 4-day lag phase and the fresh weight of cells cultured for 14 days was 4-fold of initial weight.
2. The fresh and dry weight of callus was linearly increased with logarithmic concentation of cytokinin concentation up to 5ppm.
3. The calli derived from cotyledons and hypocotyls of var. Acme and Jangyeop showed different response to cytokinin in growth pattern.
4. The growth of callus was more stimulated by cytokinin than that of the cells cultured in suspension.
5. The levels of total nitrogen and soluble protein in callus were promoted by cytokinin.
6. Cytokinin decreased the activity of cytoplasmic β-1, 3-glucanase but increased the activity of ionically and covalently wall-bound β-1, 3-glucanase.
7. Cytokinin decreased the cytoplasmic callose but increased the non-extractable callose.
8. Three polypeptides, which seemed to be regulated by cytokinin, were detected by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; one of them was increased by cytokinin and the others decreased.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅰ. 緖　　論

植物細胞의 分裂을 促進하는 因子로서 kinetin(Miller등, 1955)이 알려진 후, Letham(1963)에 의하여 옥수수로부터 天然 cytokinin인 zeatin이 발견되었다. 그 후 zeatin은 다른 여러가지 植物로부터 分離·同定되어 植物界에 널리 分布하는 것이 밝혀져 cytokinin은 auxin, gibberellin과 함께 중요한 植物호르몬으로 등장하게 되었다. cytokinin은 adenine誘導體가 주류를 이루고 있는데 合成 cytokinin을 포함하여 현재 100여 種類가 알려져 있다(Moore, 1979). cytokinin은 細胞分裂 促進作用 외에도 器官의 形成(Skoog와 Miller, 1957), 植物잎의 老化防止(Leopold와 Kawase, 1964), 營養物質의 細胞內 蓄積(Herzog, 1982), 頂芽優勢(Wooley와 Wareing, 1972) 등 生理作用에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 어떤 植物組織이나 培養細胞의 生長은 培地중의 cytokinin含量과 밀접한 관계에 있다는 것이 알려졌고 이를 基礎로한 cytokinin의 生物檢定法도 確立되었다(Miller, 1963).

그러나 많은 硏究者들의 노력에도 불구하고 cytokinin의 生化學的 機作은 아직 잘 알려져 있지 않다. 다만 cytokinin이 蛋白質 水準(Yoo와 Park 등, 1986;Meyer와 Chartier, 1981)과 어떤 酵素系(Kulaeva, 1980)에 影響을 주는 것이 알려졌고, 근래 cytokinin의 receptor에 관한 硏究(Choung과 Yoo 등, 1986)가 이루어져 作用機作의 硏究에 다소 進展이 있었다.

한편 kinetin이 特定한 蛋白質의 合成을 阻害하는데 이 蛋白質은 細胞壁 成分인 glucan을 分解하는 β-1,3-glucanase라는 것이 알려졌다(Eichholz 등, 1983;Felix와 Meins, 1985). 細胞壁 成分의 하나인 glucan은 細胞壁이 合成될때 빠른 속도로 細胞壁에 蓄積(Eschrich, 1975;Fincher와 Stone, 1981)되는 點, 大豆 protoplaot의 細胞壁 合成이 cytokinin에 의해서 促進(Yoo와 Kim 등, 1987)된다는 點을 考慮할때 cytokinin의 生理的 作用은 glucan代謝와 관련이 있을 것으로 보인다.

그러나 β-1,3-glucanase가 kinetin이외의 cytokinin에 의해서도 調節되는지, β-1,3-glucan이 注成分인 細胞內 callose가 β-1,3-glucanase에 의해서 어떻게 調節되는지,

또 callose와 cytokinin이 어떤 生理的 相互作用을 가지는지 알려져 있지 않다. 그래서 本 實驗은 cytokinin의 하나인 benzyladenine에 대한 大豆의 組織培養 細胞로부터 生長反應을 조사하고, 이러한 生長反應과 관련이 있을 것으로 보이는 蛋白質 水準, polypeptide 水準, β-1, 3-glucanase의 活性, callose의 含量에 대한 cytokinin의 影響을 檢討하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅱ. 材料 및 方法

1. Callus 誘起 및 培養

本 實驗에 使用된 大豆 品種은 Acme(Asian Vegetable Development Center, Taiwan)와 "장엽"(農村振興廳 作物試驗場 제공)이었다.

1) 種子의 發芽

種子를 70%(v/v) ethanol에서 30초 동안 沈漬한 후, tween-20을 4~5방울 添加한 NaOCl 溶液(유효염소 1.6%)에 20分間 沈漬하여 殺菌水로 5회 씻어낸 다음 發芽시켰다. 種子發芽에 使用된 培地는 호르몬을 첨가하지 않고 agar의 濃度가 0.8%인 Miller培地(Miller, 1963)였다. 培地 50㎖를 100㎖ erlenmeyer flask에 넣고 120℃, 20分間 殺菌한 다음 3개의 大豆種子를 배꼽(hilum)이 있는 部分이 培地에 묻히도록 하여 約 1週日間 培養하였다.

2) callus 誘起

callus는 6~7㎝로 成長한 大豆幼苗의 cotyledon과 hypocotyl에서 誘起하였는데,

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 1. Composition of Miller medium (㎎/L)

component	concentration	component	concentration
$Ca(NO_3)_2$	347	KI	0.8
KNO_3	1,000	glycine	2
NH_4NO_3	1,000	nicotinic acid	0.5
KH_2PO_4	300	thiamine. HCI	0.1
$MgSO_4$	35	pyridoxine. HCI	0.1
KCI	65	IAA	5
Na-Fe-EDTA	32	kinetin	0.5
$MnSO_4$	4.4	sucrose	30,000
$ZnSO_4$	1.5	agar	1.0% (w/v)
H_3BO_3	1.6	pH	5.8

* BA; ultrafilter sterilization(0.2μfilter)

Table 2. Composition of B5 medium (㎎/L)

component	concentration	component	concentration
$(NH_4)_2SO_4$	134	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
KNO_3	2,500	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150	myo-inositol	100
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250	nicotinic acid	1.0
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150	pyridoxine. HCl	1.0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8	thiamine. HCl	10.0
Na_2EDTA	37.3	sucrose	20,000
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10	kinetin	0.5
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2	2,4-D	1.0
H_3BO_3	3	agar*	0.8% (W/V)
KI	0.75	pH	5.5
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25		

* for solid culture

組織節片(4×4×2㎜) 3조각을 Table 1의 Miller培地(Miller, 1963) 50㎖가 들어있는 100㎖ erlenmeyer flask에 넣고 aluminium foil로 싸서 27℃, 暗條件에서 約 4週間 培養하여 callus를 誘起하였다. 誘起된 callus는 3週마다 繼代培養하여 使用하였다.

懸濁培養은 agar가 없는 B5培地(Gamborg 등, 1968) 100㎖가 들어있는 300㎖ erlenmeyer flask에 callus 1g를 懸濁시켜 27℃, 暗條件에서 振盪(80rpm)하면서 행하였고, 2週마다 새로운 培地와 旣存培地의 比率을 4 : 1이 되게 섞은 培地에서 繼代培養하였다.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3) 大豆 培養細胞의 生長曲線

固體培養은 Miller의 方法(Miller, 1963)에 따라 Table 1의 Miller培地 50㎖가 들어있는 100㎖ erlenmeyer flask에 callus 0.5g을 세조각으로 나누어 심어서 培養했다. 懸濁培養은 Miller培地에서 培養된 callus 0.5g을 B5培地(Gamborg 등, 1968) 50㎖가 들어있는 100㎖ erlenmeyer flask에 懸濁시켜 27℃, 暗條件에서 培養하였고 2日 間隔으로 生體重을 測定하였다.

2. Callus 生長에 미치는 cytokinin의 影響

1) 固體培養

Miller培地의 kinetin 대신 benzyladenine을 0, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50㎎/ℓ로 處理된 培地를 100㎖ erlenmeyer flask에 각각 50㎖ 씩 넣은 다음, callus 0.5g을 세조각으로 나누어 심고 27℃, 暗條件에서 30日間 培養한 후 生體重과 乾物重을 測定하였다. 이때 benzyladenine은 0.2㎛ ultrafilter로 여과하여 使用하였다.

2) 懸濁培養

B5培地에서 kinetin 대신 benzyladenine이 0, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50㎎/ℓ가 되게한 培地 100㎖를 300㎖ erlemmeyer flask에 각각 넣고 1g의 培養細胞를 懸濁시켜 27℃, 暗條件에서 30日間 培養한 후 培養細胞의 生體重을 測定하였다.

3. Callus의 全窒素와 蛋白質 含量 測定

Callus의 全窒素 含量은 microkjedahl法(Willits와 Ogg, 1950)으로, 可溶性 蛋白質은 lowry 方法(Lowry 등, 1951)으로 測定하였다. 可溶性 蛋白質은 Thaker의 方法(Thaker 등, 1987)에 따라 callus 2g에 0.2M sodium-borate buffer(pH 7.6) 10㎖를 添加하여 0℃로 冷却된 막자사발로 磨碎하고 4℃에서 1500×g로 10分間 遠心分離한 上澄液에 acetone(0℃)을 넣어 70%가 되게 하여 沈澱시켰다. 沈澱된 分劃을 50mM citrate buffer(pH 5.0) 5㎖에 溶解하여 cytoplasmic 分劃으로 보고, 抽出되지 않은 分劃을 50mM citrate buffer(pH 5.0)10㎖에 溶解하여 cell well 分劃의 蛋白質로 보았다.

4. 蛋白質의 SDS-DISC polyacrylamide gel 電氣泳動

1) 電氣泳動 試料의 調製

70%(v/v) acetone(4℃)에 沈澱된 蛋白質 分劃을 電氣泳動 試料稀釋溶液(1%(w/v)SDS, 1%(v/v) 2-mercapoethanol, 0.05M tris-HCL buffer(pH 6.8), 10%(v/v)

glycerin, 0.001%(w/v) bromophenol blue) 2㎖에 溶解한 후 100℃에서 3分間 處理한 다음 冷却하여 電氣泳動 試料로 使用하였다. 이때 lowry方法(Lowry 등, 1951)에 따라 蛋白質 濃度를 測定하여 試料의 量을 調節하였다.

2) 電氣泳動

電氣泳動은 Leammli의 方法(Leammli 등, 1970)에 따라 實施하였다. resolving gel(pH 8.8)은 acrylamide 含量이 7.5%와 15%로 만들었고, stacking gel(pH 6.8)은 모두 2.5%로 만들었다. 電壓은 bromophenol blue(BPB)가 stacking gel을 통과하는 동안은 120V, resolving gel을 통과하는 동안은 200V로 調節하였고 溫度는 Thermostatic circulator를 使用하여 10℃로 유지하며 Vertical slab gel 장치(LKB 2001, Sweden)로 7~8時間 電氣泳動하였다. 染色은 0.05%(w/v) coomassie blue R-250, 25%(v/v) ethanol, 10%(v/v) acetic acid, 5%(w/v) formaldehyde에서 1時間동안 一次 染色하고, formaldehyde의 濃度를 0.5%(w/v)로 낮추어 調製한 溶液에서 3시간 二次 染色하였으며, 25%(v/v) isopropanol, 10%(v/v) acetic acid의 混合溶液으로 몇 차례 헹구어낸 다음 10%(v/v) isopropanol, 10%(v/v) acetic acid의 混合溶液에서 脫色하였다.

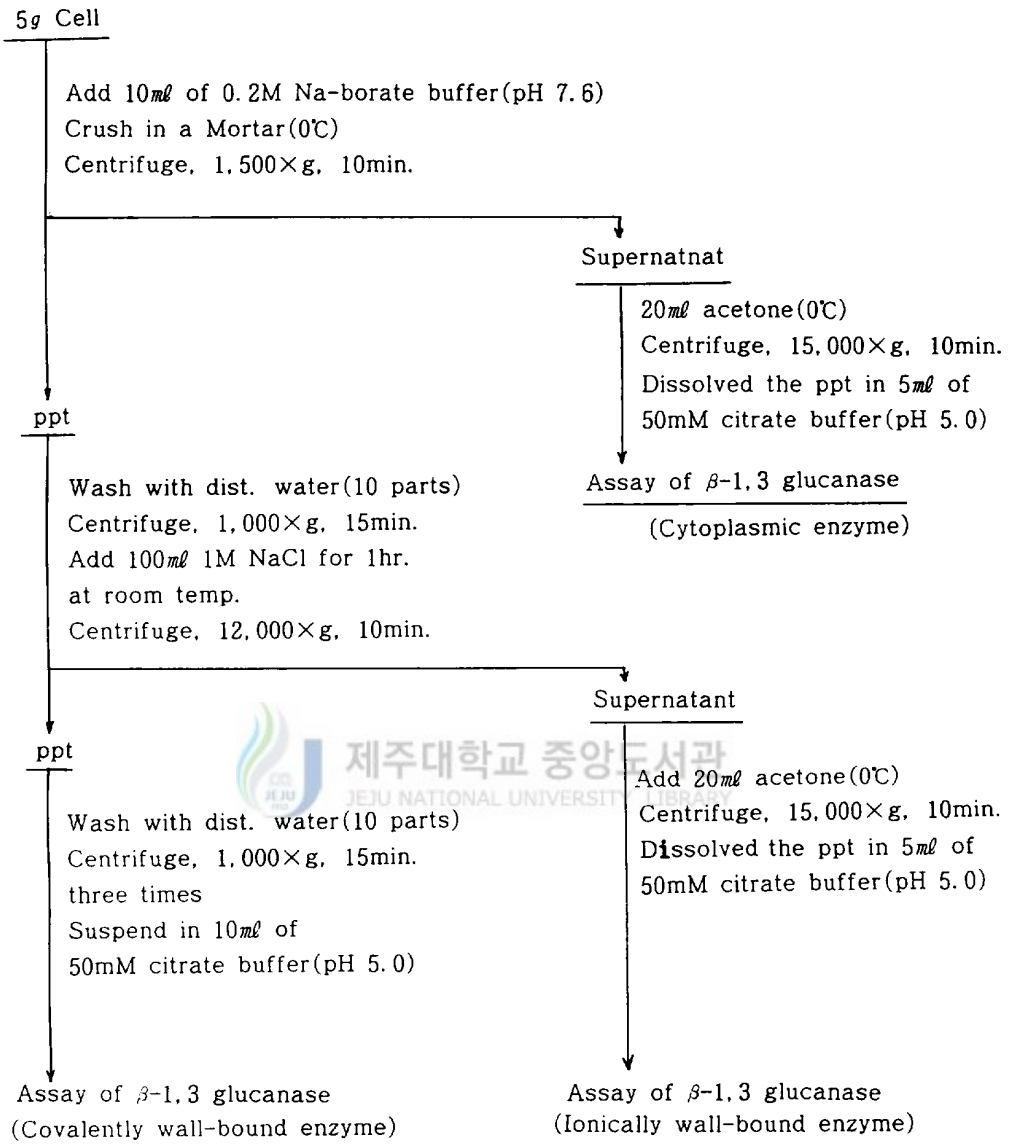
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

5. β-1, 3-Glucanase의 抽出 및 酵素活性 測定

β-1, 3-glucanase의 抽出 및 酵素活性의 測定은 Thaker의 方法(Thaker 등, 1987)에 따라 實施하였다.

1) β-1, 3-glucanase의 抽出

Figure 1에서 보여주는 바와 같이 一次 上澄液에서 抽出된 分劃을 cytoplasmic enzyme, 1M NaCl 溶液을 處理하여 얻은 分劃을 ionically wall-bound enzyme, 抽出이 안되는 分劃을 covalently wall-bound enzyme으로 하였다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure. 1. Procedure of enzyme extraction

2) β-1, 3-Glucanase의 活性 測定

β-1, 3-glucanase分劃 0.5㎖에 1㎖의 laminarin 溶液〔5㎎ laminarin을 1㎖의 50mM citrate buffer(pH 5.0, 50mM sodium aside)에 溶解한 것〕을 混合하여 30℃에서 2시간 방치한 다음 miller試藥(1%(w/v) dinitrosalicylic acid, 0.2%(v/v) phenol, 1%(w/v) sodium hydroxide, 0.05%(w/v) sodium sulfite)을 1.5㎖ 添加하고 100℃에서 10分間 發色시켜서 Visible spectrophotometer(PYE UNICAM, PU 8650)를 이용하여560nm에서 吸光度를 測定하였다.lowry方法에 따라 蛋白質 含量을 測定하여 酵素比活性(specific enzyme activity)을 計算하였다.

6. Callose 抽出 및 含量 測定

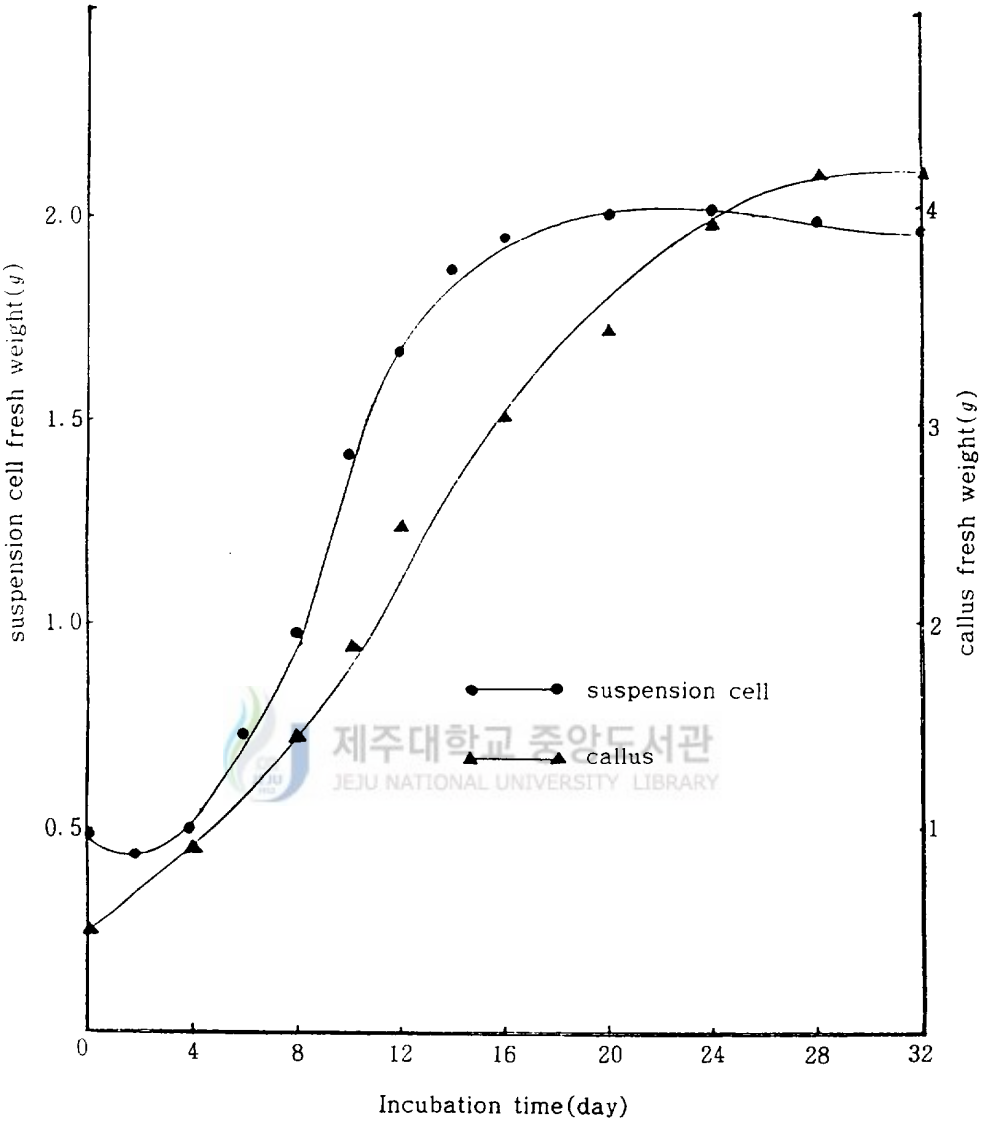
Collose의 抽出과 含量의 測定은 Köhle의 方法(Köhle 등, 1985)에 準하였다. callus 1g을 증류수 30㎖로 3회 遠心分離하여 씻어내고 ethanol(absolute) 15㎖에 15分間 沈漬하여 水溶性 螢光物質을 除去하였다. 10㎖의 1N NaOH를 넣어 磨碎한 후 80℃에서 15分間 處理하여 380×g, 15分間 遠心分離한, 上澄液을 cytoplasmic callose 分劃, 沈澱物은 IN NaOH 10㎖에 溶解하여 cell wall callose 分劃으로 하였다. 각 callose 分劃을 0.6㎖을 取하여 1.2㎖ aniline blue WS(0.2%, w/v), 1N HCl 0.6㎖와 混合하고, 1M glycine/NaOH buffer(pH 9.5) 1.8㎖를 添加하여 pH를 調節하였다. 50℃에서 20分間 處理하고 室溫에서 30分間 방치한 후 螢光分析器(Perkin-Elmer LS-50)을 使用하여 螢光을 測定하였다(excitation:400nm, emission:510nm, slit:10nm, energy:6, gain:50).

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 培養細胞의 生長曲線

Miller의 方法(Miller, 1963)에 따라 約 3週間 培養하였을때, 組織이 커지면서 가장자리로부터 callus가 形成되었다. 大豆의 組織培養 條件은 比較的 잘 確立(Murashige와 Skoog, 1962;Gamborg 등, 1968;Ohira 등, 1973;Miller, 1963;Schenk와 Hilderbrant, 1972)되어 있는 편이지만 實驗目的에 따라 適切한 品種, 培地, 繼代培養 등의 條件을 選擇하고 基本的 生育特性을 檢討하는 것이 重要하다. Miller의 方法(Miller, 1963)에 따라 Acme cotyledon으로부터 誘起한 callus를 同一한 成分培地에서 培養하였을때 Figure 2에서 보는 바와 같이 良好한 生長를 보였다. agar培地에 培養한 callus는 生育初期부터 4週까지 거의 直線的으로 生長하였는데 4週 後의 生體重은 初期의 9배에 達하였다. agar를 除外하고 kinetin 0.5㎎/ℓ를 含有한 B5培地(Gamborg 등, 1968)를 使用한 懸濁培養에서는 약 4日間의 潛伏期를 거친 다음 急速히 生長하여 약 2週(生育停止期) 後에는 初期 生體重의 4배가 되었다. 懸濁培養에서의 生長曲線은 潛伏期, 對數增殖期, 安定期가 比較的 뚜렷하였다. 上記와 같은 結果를 토대로 agar培地에서 callus를 培養할때는 3週間隔으로, 懸濁培養에서는 2週間隔으로 繼代培養하면서 callus를 增殖하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 2. Growth curve of soybean callus and suspension cell

2. Cytokinin에 대한 callus의 生長反應

Cytokinin은 담배를 비롯한 여러가지 植物組織으로부터 誘起된 callus의 生長을 促進한다는 것이 알려져 있고(Skoog와 Tsui, 1948;Linsmar 와 Skoog, 1965;Letham, 1967) 大豆의 경우에도 cotyledon에서 誘起된 callus의 生長을 促進하는 것으로 알려져, 이를 基礎로한 生物檢定法(Miller, 1963)도 確立되어 있다.

그러나 cytokinin에 대한 callus의 生長反應은 cytokinin種類에 따라서도 多少 差異가 있기 때문에, 本 實驗에서는 Miller의 實驗에서와는 달리 cytokinin으로 kinetin 대신 benzyladenine을 水準別로 處理하여 暗條件에서 callus의 生長反應을 調査하였다. Figure 3은 benzyladenine 水準에 따라서 約 4週間 培養하였을때 生育狀態를 나타낸 것이며 Figure 4는 callus의 生長反應을 生體重과 乾物重을 測定하여 나타낸 結果이다. Figure 3과 Figure 4에서 보는 바와같이 cytokinin 濃度가 높을수록 callus의 生體重과 乾物重이 모두 增加해서 cytokinin에 의해서 callus의 生長이 促進된 것으로 나타났고 5㎎/ℓ 以上에서는 오히려 生長이 抑制되었다. 이러한 結果는 Miller의 大豆 cotyledon 組織으로부터 誘起된 callus의 生長量이 kinetin 濃度 約 4×10^{-3}㎎/ℓ에서 10㎎/ℓ 범위에서는 kinetin 濃度에 對數를 취한 값에 比例한다는 實驗結果(Miller, 1963)와 대체로 類似하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

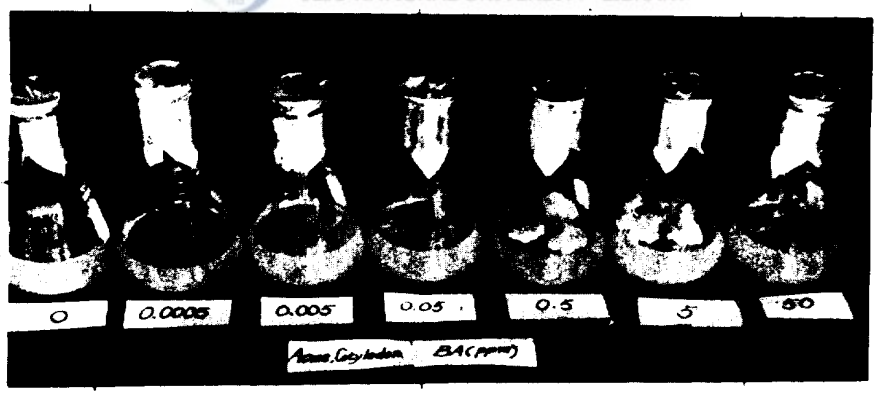
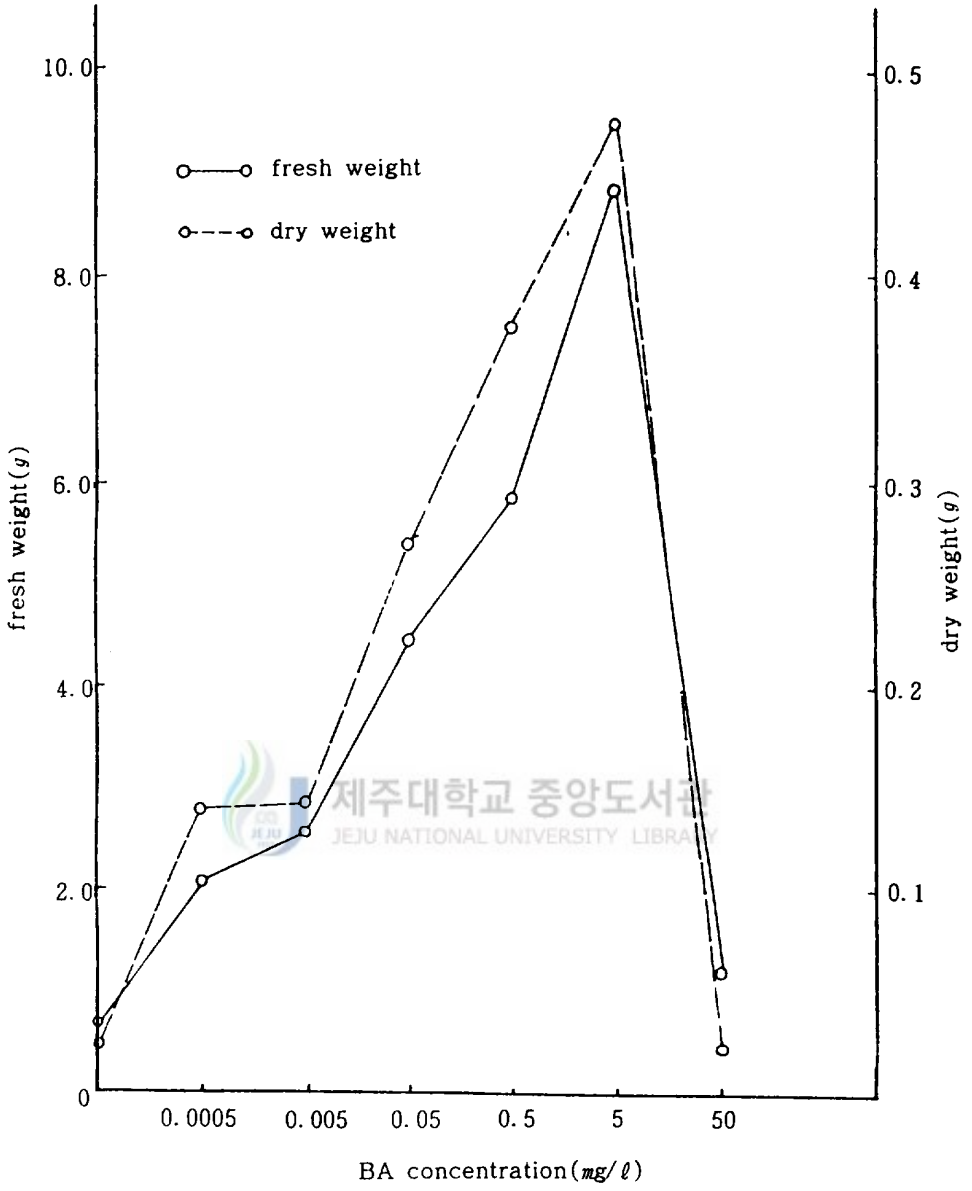


Figure. 3. Effect of cytokinin on callus growth. The calli derived from Acme cotyledon were grown at 27℃ under dark condition for 30 days on Miller media containing various levels of benzyladenine.



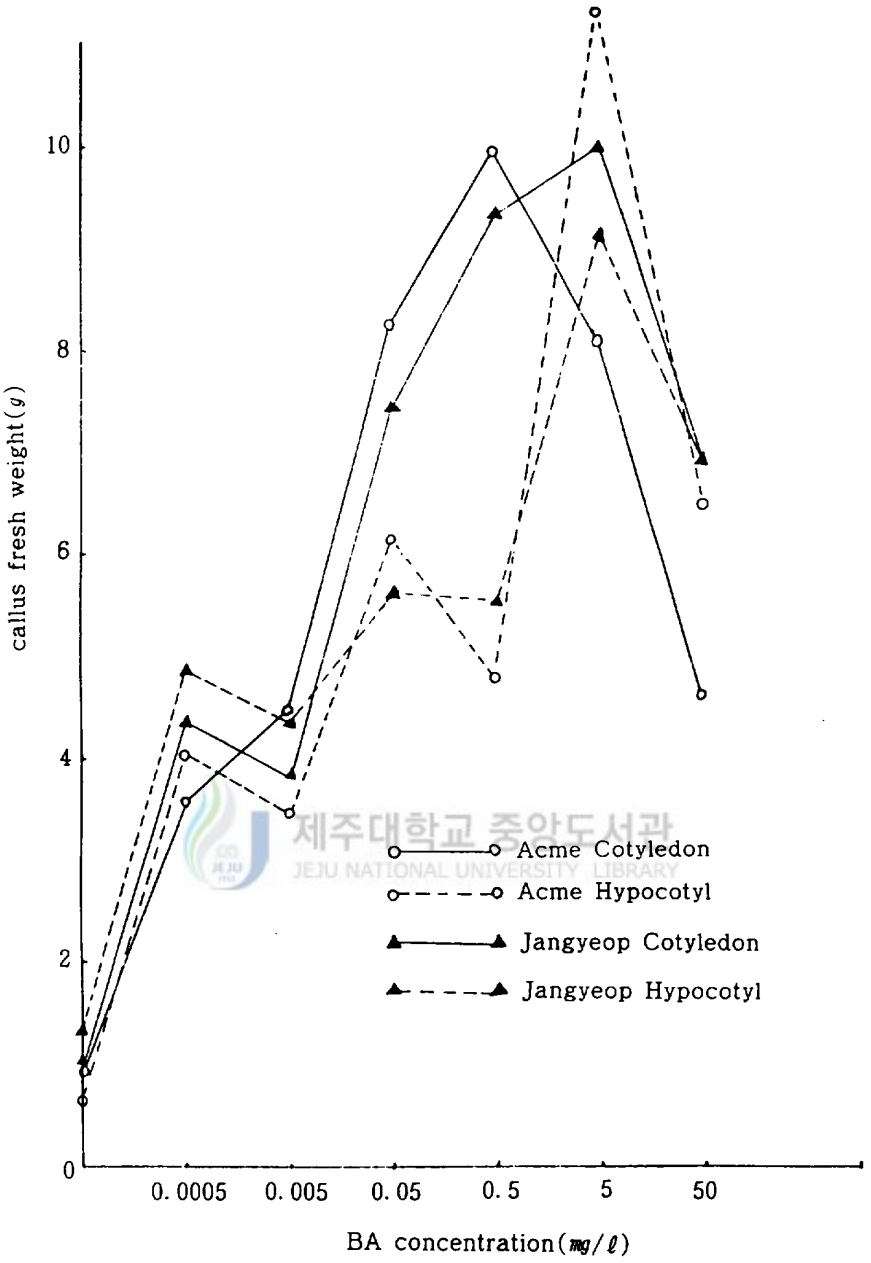
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 4. Response of callus in fresh weight and dry weight to cytokinin.

cytokinin에 대한 calluse의 生長反應은 cytokinin의 種類와 培養條件의 差異에서 뿐만 아니라 品種이나 callus가 由來된 組織部位에 따라서 差異가 있을 수 있기 때문에(Armstrong 등,1981)大豆의 品種과 callus가 由來된 組織部位를 달리하여 cytokinin에 대한 生長反應을 調査하였다.大豆 品種 Acme와 장엽(Jang-yeop) 의 cotyledon과 hypocotyl로부터 誘起된 callus에 대해 30日間 培養하여 각각의 生長反應을 調査한 結果 Figure 5와 같다. cytokinin 水準에 따라 callus의 生長反應은 品種과 組織部位에 따라 대체적으로 類似한 樣相을 보였지만 品種間, 組織部位間에 多少 差異가 있었다. 특히 cotyledon에서 誘起된 callus의 生長은 cytokinin 濃度 5㎎/ℓ까지 계속하여 增加되지만 hypocotyl에서 誘起된 callus의 生長은 Acme나 장엽(Jangyeop)모두 0㎎/ℓ에서 0.5㎎/ℓ까지는 緩慢하게 增加하다가 5㎎/ℓ에서는 급격히 增加하는 樣相을 보여서, cytokinin에 대한 callus의 生長反應은 品種間보다 callus가 誘起된 組織部位에 따라 더 큰 差異가 나타났다. 懸濁培養에 使用된 B5培地(Gamborg, 1968)는 大豆의 뿌리細胞 培養에서 確立된 培地로서, kinetin은 細胞生長에 덜 效果的이라는 報告(Gamborg, 1968)가 있고 cytokinin의 生物檢定法이 固體培地에서 이루어진 點(Miller, 1963) 등을 考慮하여 B5 懸濁培地에 benzyladenine을 水準別로 處理하여 cytokinin에 대한 生長反應을 調査하였는데 Gamborg 등(1968)이 報告한대로 cytokinin으로 benzyladenine을 使用했을때는 별다른 影響을 받지 않았고 benzyladenine이 없는 條件에서도 잘 자라서 初期 生體重의 7배까지 生長하였으며 cytokinin에 의해 生長이 多少 促進된듯 보이나 0.5㎎/ℓ를 지나면서 갑자기 生長이 抑制되었다(Figure 6).

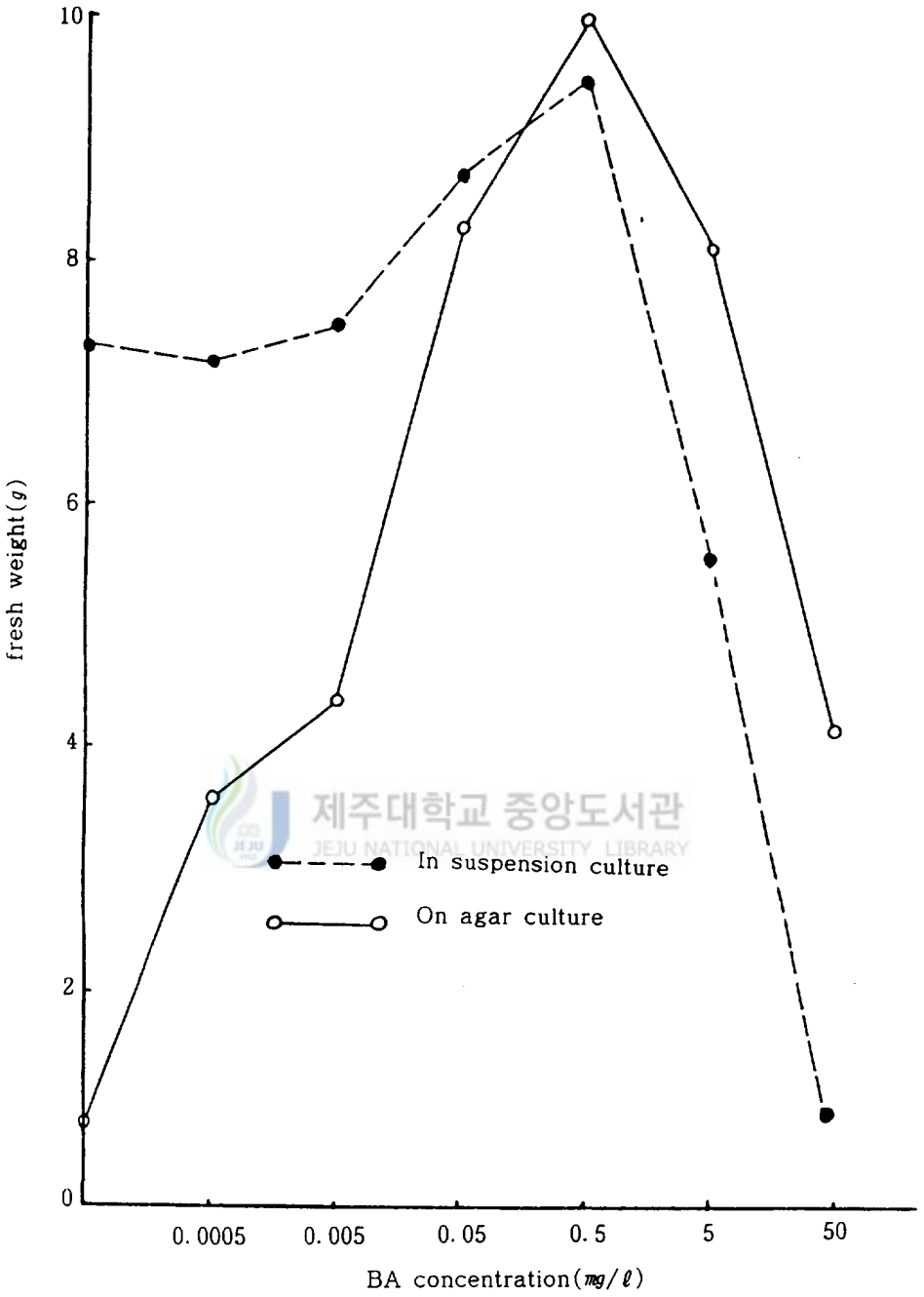
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

또한 大豆 callus 生長量을 生育初期(15日), 生育期(30日), 生育停止期(90日) 등 培養期間別로 測定한 結果는 Figure 7과 같다. Figure 7에서 보는 바와같이 培養 後 30日에서가 cytokinin에 대한 效果가 가장 뚜렷하였고, 90日에서는 cytokinin에 대한 敏感度가 떨어지고 있으며 生體重도 오히려 30日에서 보다도 減少하고 있다. 90日 培養한 callus의 生體重이 30日 培養한 것보다 작은것은 30日 以後의 生育停止期 동안에도 계속된 呼吸作用에 원인이 있는 것으로 생각되었다. 이와같은 cytokinin 水準이 callus 生長에 影響을 준다는 本 實驗의 結果를 確認하기 위해서 cytokinin 無處理 固體培地와 懸濁培地에서 callus와 懸濁培養 細胞를 培養한 結果 Figure 8과 같다.



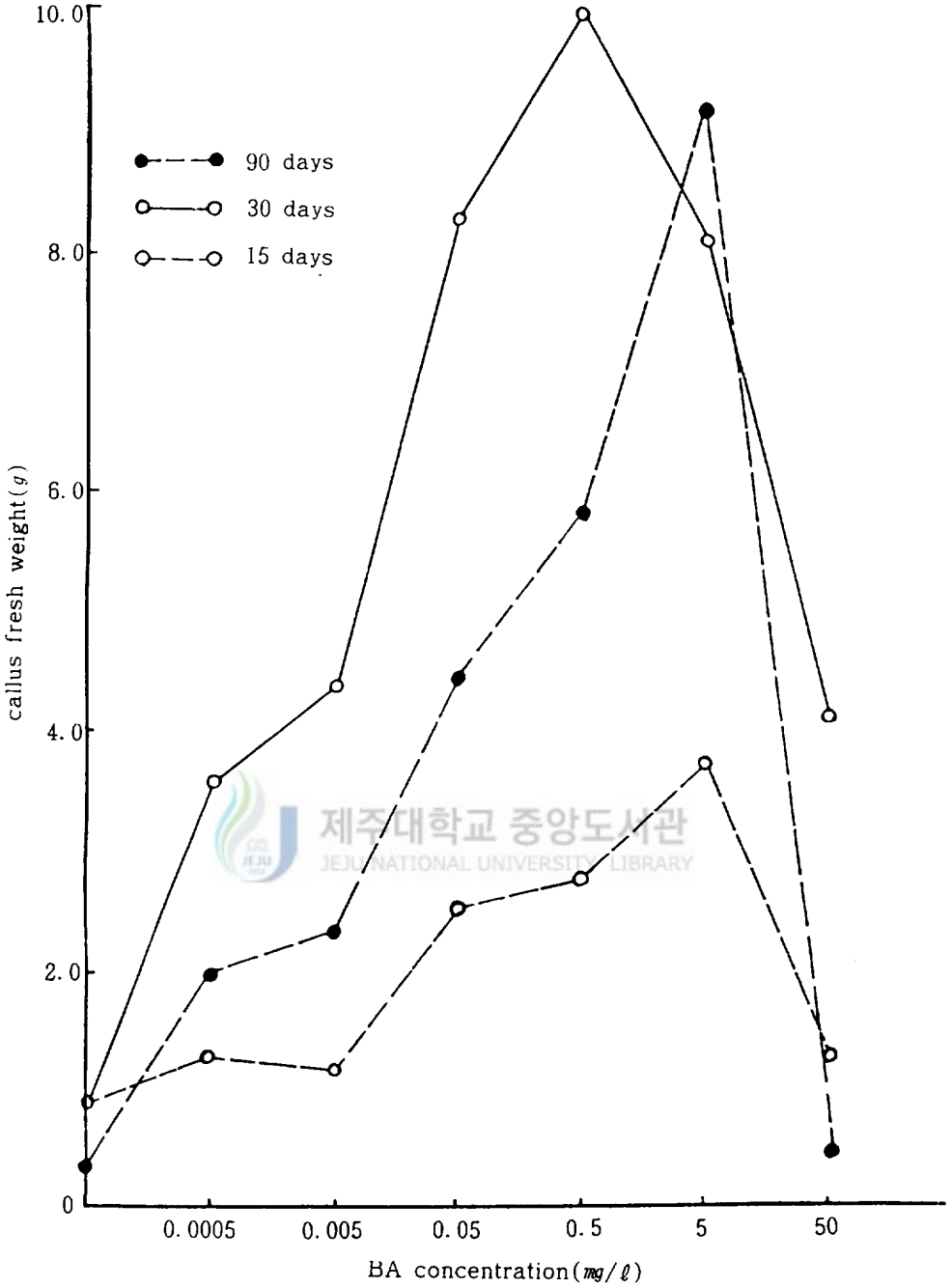
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 5. Growth response of the calli derived from different sources to cytokinin.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 6. Effects of culture types on cell growth



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 7. Effect of incubation time on callus growth

固體培養인 경우에는 4~5日間 原狀態를 維持하다가 callus가 老化되기 시작하면서 生體重이 減少하였고, 懸濁培養에서는 cytokinin이 없는 條件에서도 10日까지 生長하는 것으로 보이나 生長量은 多少 減少하였다.

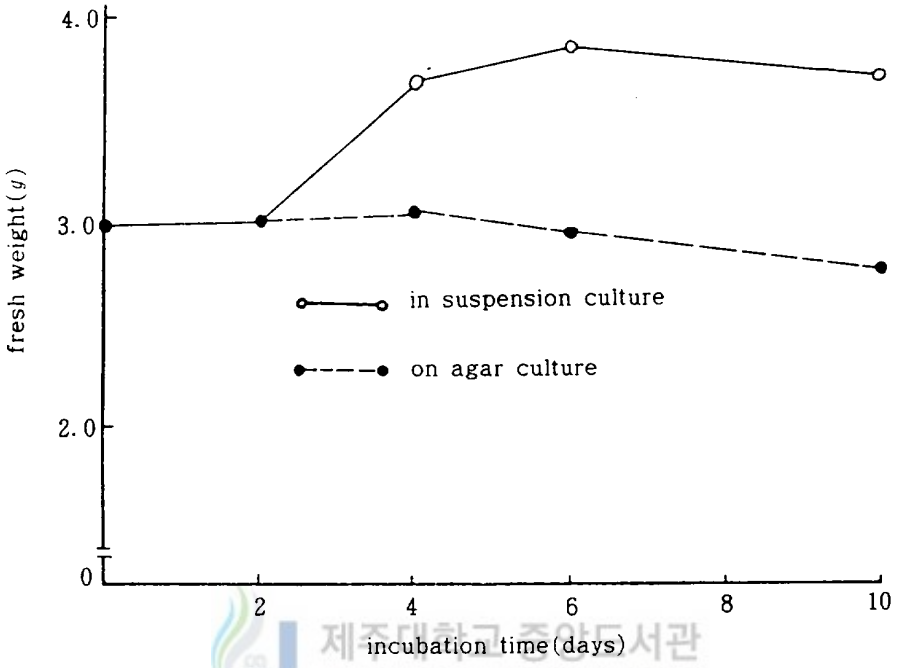
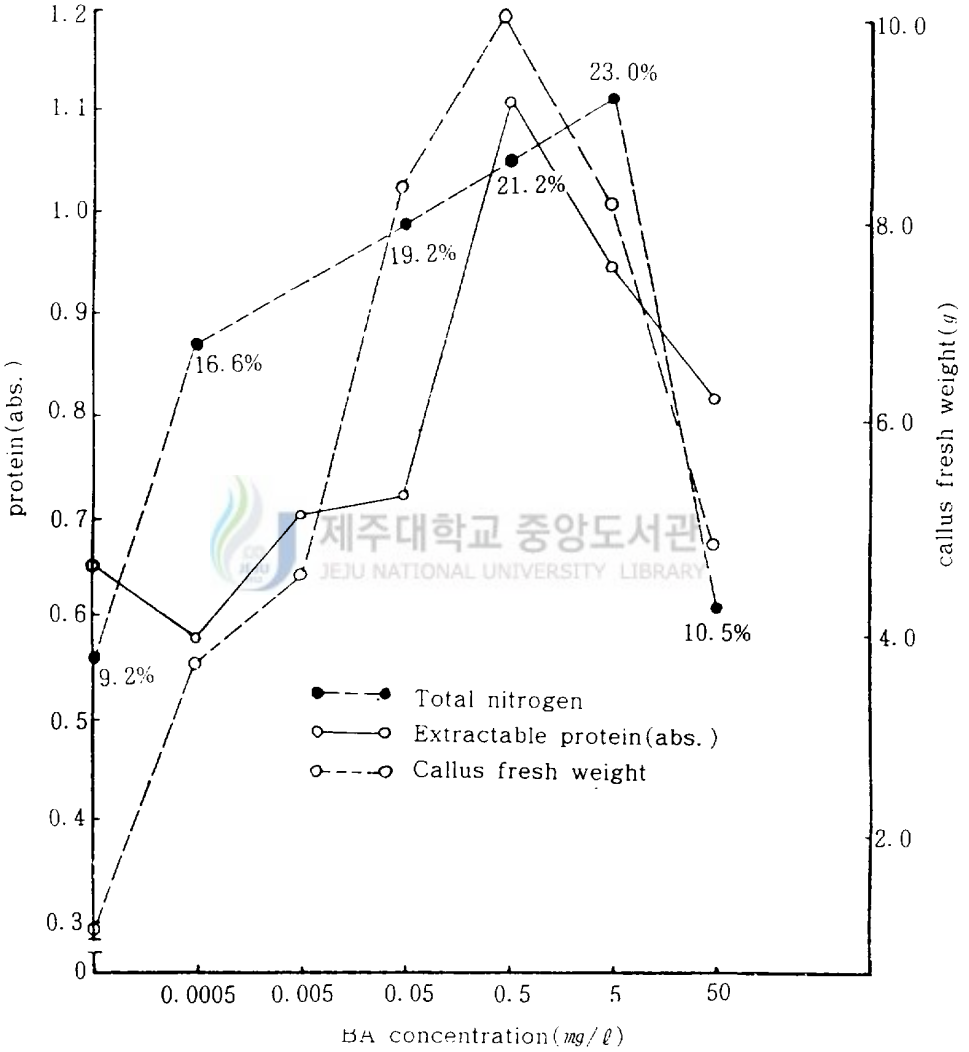


Figure 8. Growth curve of cytokinin-free culture

3. 大豆 callus의 蛋白質 水準에 대한 cytokinin의 影響

cytokinin에 의해서 callus生長이 促進되는 것이 어떤 경로를 거쳐서 이루어지는지에 대하여는 아직 분명하지 않으나, 많은 生理的 현상들의 직접·간접적으로 蛋白質 代謝와 關聯되어 있는 點을 勘案하면 cytokinin에 대한 植物細胞의 生理的 反應도 蛋白質 代謝와 關聯이 있을 것으로 생각된다. 本 實驗에서는 cytokinin이 大豆 callus의 蛋白質 水準에 어떤 影響을 주는지 보기 위하여 benzyladenine 水準이 다른 培地에서 배양한 callus의 蛋白質 水準을 調査하였는데 그 結果는 Figure 9와 같다. cytokinin 濃度 0㎎/ℓ에서 5㎎/ℓ까지, callus의 生體重을 增加시켰던 本 實驗의 결과와 類似한 樣相으

로 蛋白質 含量도 增加되었다. 그런데 cytokinin 無處理 培地에서 培養한 callus의 蛋白質 水準은 全體的으로 低下된 것으로 나타나 cytokinin은 callus의 蛋白質 含量을 增加시킨다는 것이 確認되었다(Figure 10). 그러나 kinetin이 어떤 蛋白質의 合成을 抑制한다는 점을 考慮할때 蛋白質 水準이 높아진 것은 cytoinin에 의해 蛋白質 合成이 促進된 것에도 原因이 있을 수 있지만 部分的으로는 蛋白質의 分解가 cytokinin에 의해 抑制된데에도 原因이 있는 것으로 생각된다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 9. Effects of cytokinin on protein contents of callus

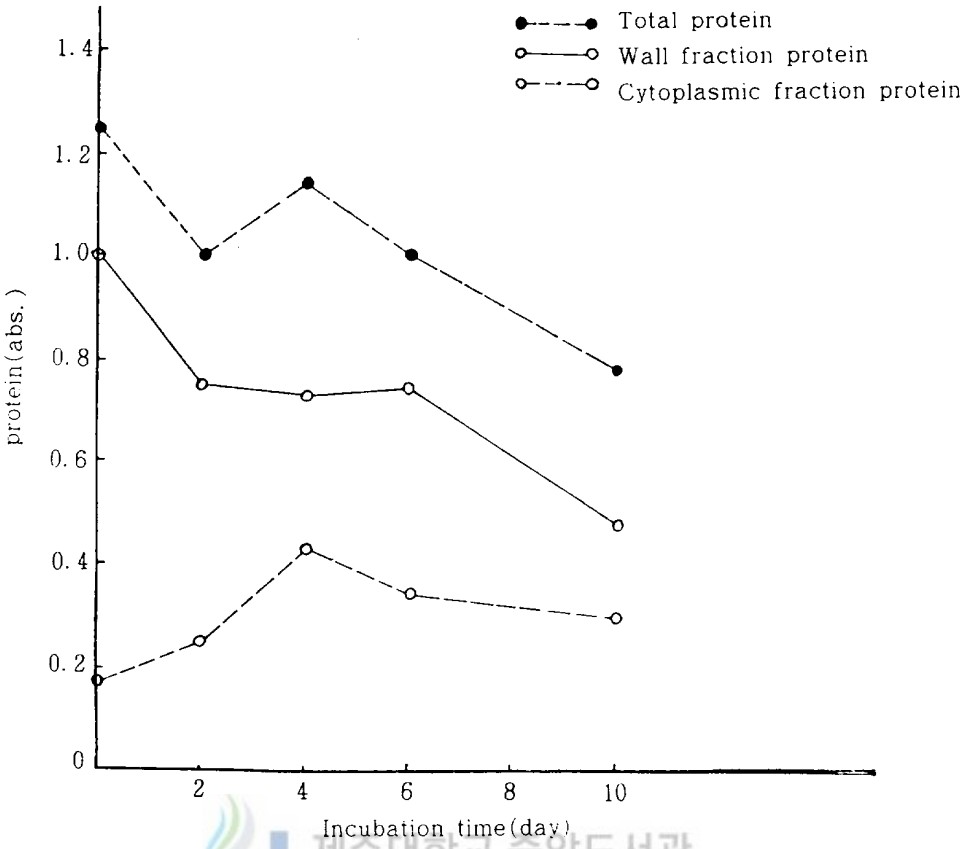


Figure 10. Changes in protein contents of cytokinin-free culture

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4. 大豆 callus의 polypeptide 水準에 대한 cytokinin의 影響

cytokinin이 大豆 callus의 全體 蛋白質 水準을 變化시켰고, 담배 組織培養에 있어서 cytokinin에 의해서 特定 蛋白質의 合成이 調節(Eichholz 등, 1983;Felix와 Meins, 1985)된다는 報告도 있어서 어떤 蛋白質이 cytokinin에 의해서 調節되는지를 檢討하기 위하여 SDS system의 電氣泳動으로 cytokinin 水準別로 處理된 培地에서 生長한 callus의 polypeptide 樣相을 調査하였다. Figure 11과 Figure 12에서처럼 benzyladenine의 濃度가 增加함에 따라서 2개의 polypeptide가 減少하고 1개의 polypeptide가 增加한 것으로 나타났다. 특히 15% gel의 電氣泳動 樣相에서 뚜렷하게 減少한 polypeptide는

담배 組織培養에서 kinetin에 의해서 調節되는 β-1, 3-glucanase(Eichholz 등, 1983; Felix와 Meins, 1985)일 可能性이 있었다.

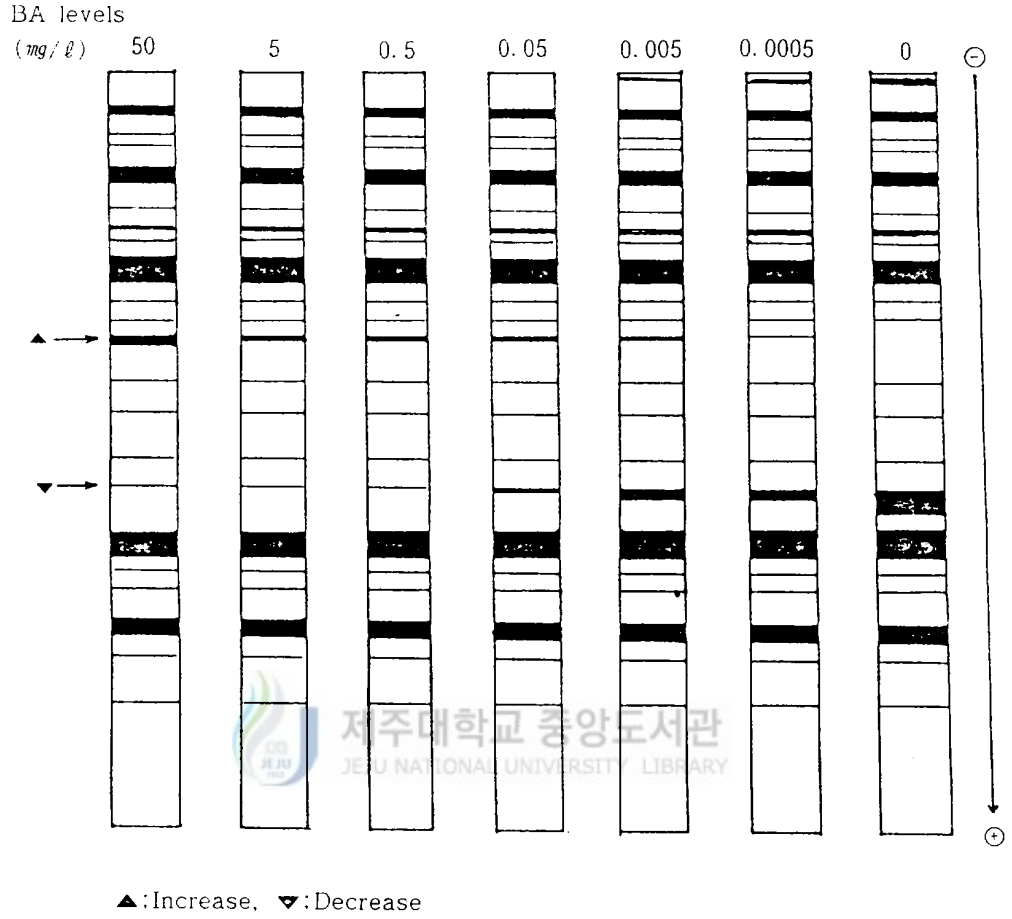
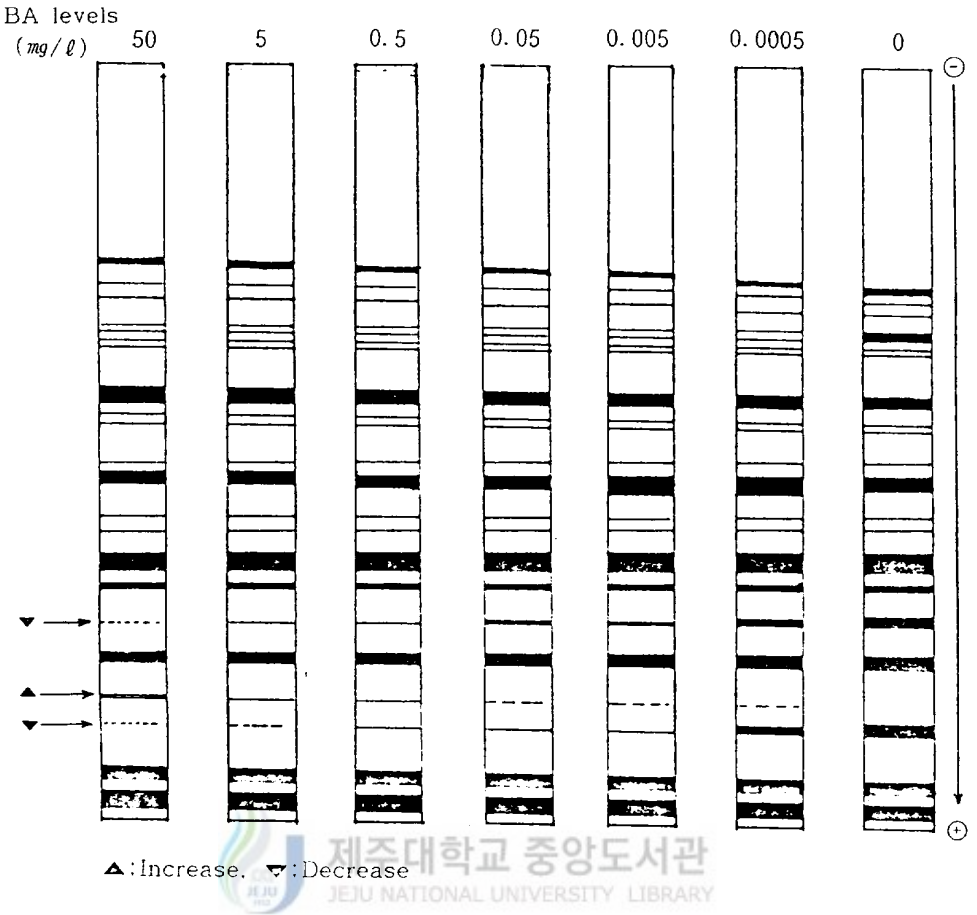


Figure 11. Identification of cytokinin-regulated polypeptides by SDS-DISC polyacrylamide gel electrophoresis (15% gel)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

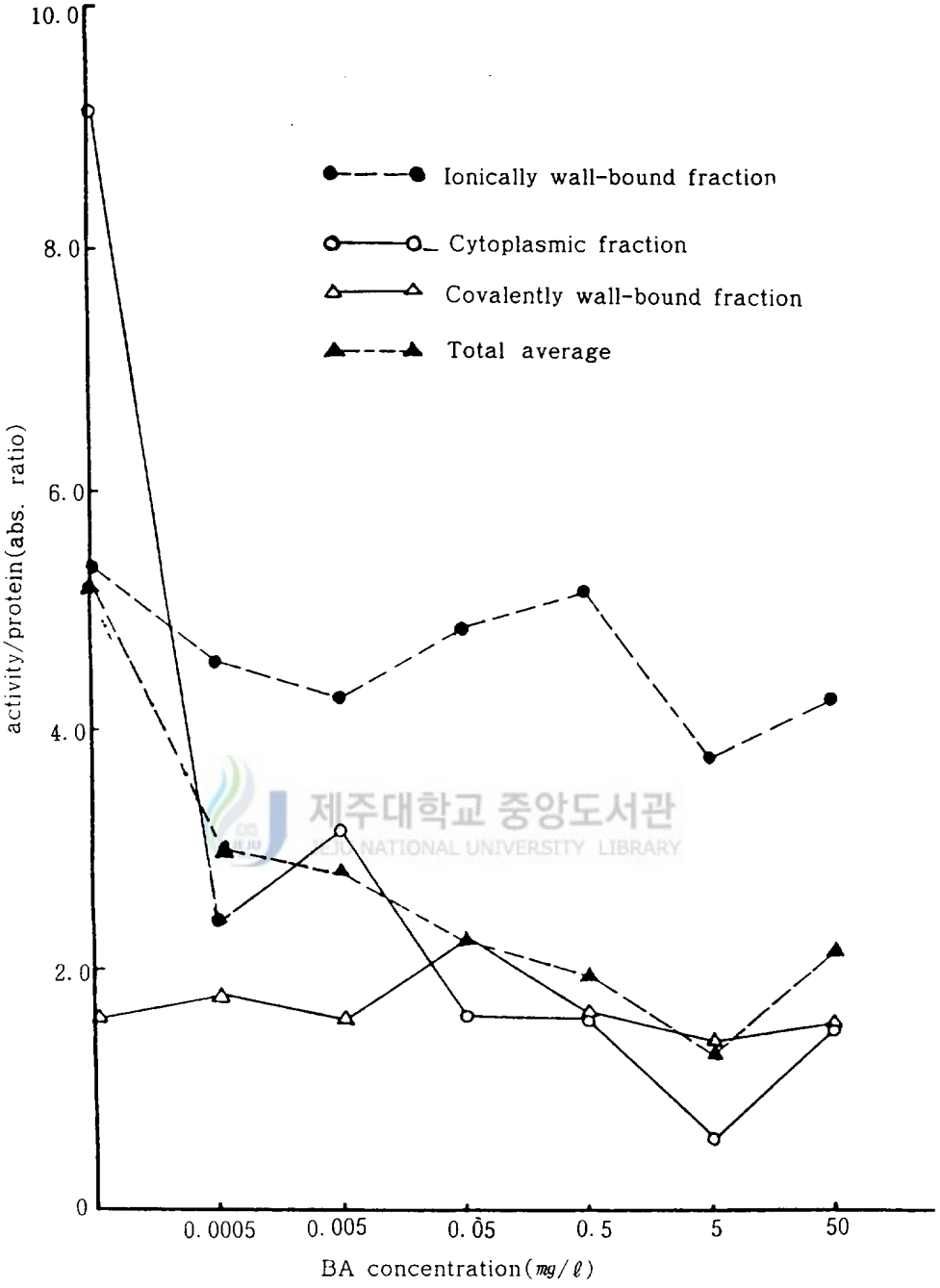


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 12. Identification of cytokinin-regulated polypeptides by SDS-DISC polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% gel)

5. β-1, 3-Glucanase 活性에 대한 cytokinin의 影響

SDS-DISC polyacrylamide gel 電氣泳動에서 cytokinin에 의해 減少된 polypeptide가 담배 組織培養에서 kinetin에 의해 調節되는 것으로 알려진 β-1, 3-glucanase일 可能性이 있어서 大豆 callus의 β-1, 3-glucanase 酵素活性을 測定하여 大豆 callus에서도 cytokinin이 β-1, 3-glucanase의 酵素活性에 影響을 주는지 與否를 調査하였는데 그 結果는 Figure 13과 같다. cytokinin水準에 따라 細胞膜·細胞壁과 結合된 β-1, 3-gl



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 13. Effect of cytokinin on β-1, 3-glucanase activity

ucanase의 酵素活性은 별다른 影響을 받지 않았으나 cytoplasmic 分劃의 β-1, 3-glucanase 酵素活性은 크게 減少한 것으로 나타났다. 이와같은 結果로 보아 Eichholz 등(1983)에 의해 담배 組織培養에서 kinetin에 의해 調節된다고 알려진 β-1, 3-glucanase가 大豆 callus에 있어서도 benzyladenine 處理에 의해서 調節되는 것으로 나타났다.

6. Callose 含量에 대한 cytokinin의 影響

大豆 callus에 있어서도 benzyladenine에 의해서 β-1, 3-glucanase가 調節되는 것으로 나타나 cytokinin은 glucan 代謝와 密接한 關係가 있는 것으로 보인다. cytokinin에 의해서 β-1, 3-glucanase의 合成이 抑制된다면 相對的으로 그 酵素의 反應基質인 β-1, 3-glucan의 合成이 增加될 것으로 생각되어 本 實驗에서는 callose 含量이 benzyladenine 處理에 의해서 어떻게 變化하는지 그 樣相을 調査하였는데 그 結果는 Figure 14와 같다. 기대와는 相反되게 그 結果가 全體的으로 cytokinin處理에 의하여 減少하는 樣相을 보였다. 그런데 cytoplasmic 分劃의 callose는 cytokinin水準에 따라 減少하는 반면, cell wall分劃의 callose는 增加하고 있어서 注目되었다. 이러한 結果를 確認하기 위하여 cytokinin 無處理 培養에서 callose 含量의 變化를 調査하였는데 그 結果는 Figure 15와 같다. cytokinin 無處理 培養에서는 cytokinin이 callose 含量에 별다른 影響을 주지 않은 것으로 나타났다. 이와같은 實驗 結果로 볼때 cytokinin水準에 따라 cytoplasmic分劃의 callose 含量은 減少하고 call wall 分劃의 callose가 상대적으로 增加한 逆相關 關係는, cytokinin이 細胞水準에서 callose 合成보다는 cell wall 部分으로 轉流하는데 影響을 준다는 것을 時事한다. callose가 細胞分裂을 하는 동안 빠르게 細胞壁(cell plate)에 蓄積(Eschrich, 1975; Fincher와 Stone, 1981)된다는 報告, 大豆 protoplast에서 cytokinin에 의해서 細胞壁 合成이 促進(Yoo와 Kim 등, 1987)된다는 點을 考慮한다면 cytokinin은 callose 代謝와 직접 혹은 간접적으로 관여하는 것으로 생각된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

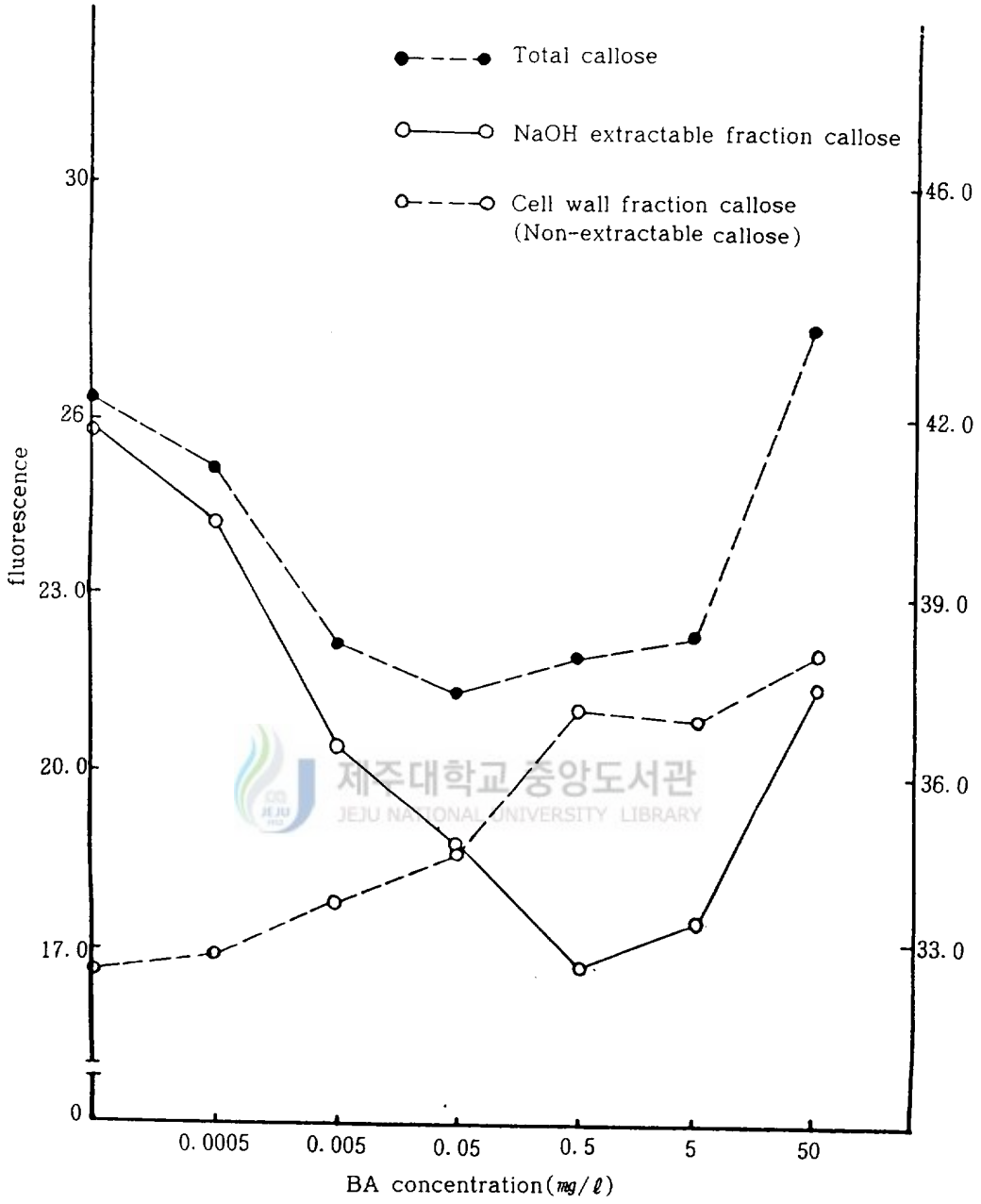
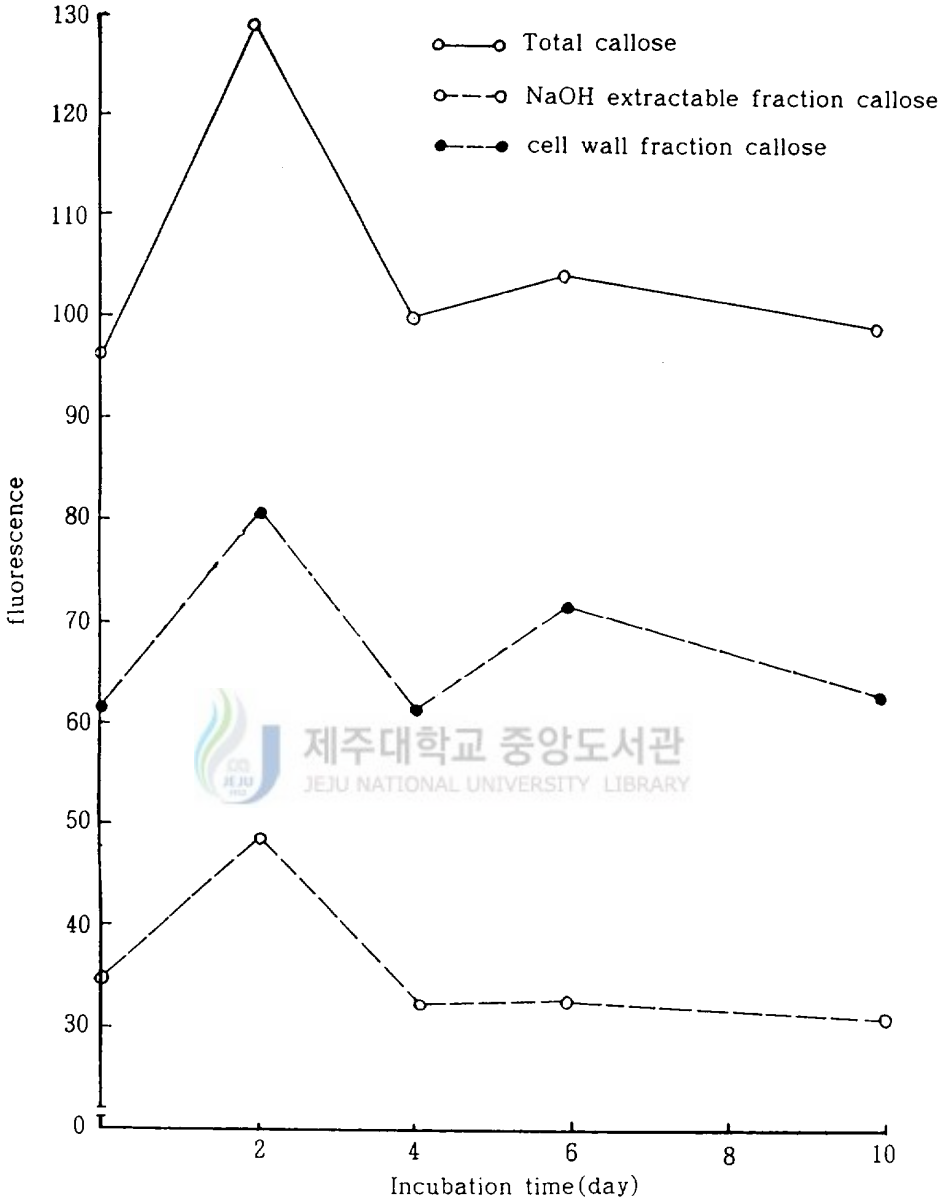


Figure 14. Effect of cytokinin on callose contents



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 15. Changes in callose content of cytokinin-free culture

Ⅳ. 摘　　要

大豆 培養細胞의 蛋白質 水準, polypeptide의 水準, β-1,3-glucanase의 酵素活性 및 callose 含量에 미치는 cytokinin의 影響에 대하여 調査하였다.

1. cytokinin(kinetin, 0.5㎎/ℓ)을 含有한 培養培地에서 培養時間別로 callus의 生長을 調査한 결과 固體培地의 callus는 4週까지 生長을 계속하여 初期 生體重의 9배에 達하였고 그 이후에는 더 이상 生長하지 않았다. 懸濁培養 細胞는 4日間의 潛伏期(lag phase)를 거친 다음 初期 生體重의 4배에 達하였으나 그 이후에는 生長이 停止되었다.

2. cytokinin 濃度 0㎎/ℓ에서 5㎎/ℓ 範圍에서 callus 生長은 cytokinin 含量의 濃度에 거의 比例하였으나, 5㎎/ℓ以上에서는 오히려 生長이 抑制되었다. callus의 生長을 乾物量으로 測定하였을 때도 같은 樣相을 보였다.

3. cytokinin에 대한 callus 生長反應은 大豆 品種과 callus가 由來된 組織部位에 따라 多少 差異가 있었다.

4. cytokinin에 대한 培養細胞의 生長反應은 懸濁培養에서 보다는 固體培養에서 뚜렷하였다.

5. cytokinin은 callus의 全窒素와 蛋白質 蓄積을 促進시켰다.

6. cytokinin은 cytoplasmic 分劃의 β-1,3-glucanase 酵素活性을 底下시켰다. 그러나 細胞膜·細胞壁과 結合된 β-1,3-glucanase의 酵素活性은 cytokinin에 의해서 별다른 影響을 받지 않았다.

7. NaOH 可溶性 callose는 cytokinin處理에 의하여 減少한 반면, NaOH 非可溶性 callose는 增加하였다.

8. SDS-DISC polyacrylamide gel 電氣泳動에서 分離된 polypeptide중에서 cytokinin에 의해서 調節되는 3개의 polypeptide를 確認할 수 있었는데, cytokinin 處理에 의하여 하나는 增加하였고 두개는 減少하였다.

제주대학교 중앙도서관

V. 參 考 文 獻

1. Armstrong, D. J., S. G. Kim, M. C. Mok and D. W. S. Mok. 1981. Genetic regulation of Cytokinin metebolism in Phaseolus tissue culture. Metabolism and molecular activities of Cytokinin. ed by J. Guern and C. Peaud-lenoel, pp. 97~104, Springer-Verlag, Berlag, Berlin.
2. Brinegar, A. C., A. Stevenes and J. E. Fox. 1985. Biosynthesis and degration of a wheat embryo Cytokinin binding protein during embryogenesis and germination. Plant Physiol., 79, 706~710.
3. 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.
4. Dodds, J. H. and L. W. Reborts., 1984. Experiments in plant tissue culture Cambrige, university press, Cambrige, pp. 1~50.
5. Eichholz, R., J. Harper. G. Felix and F. Meins. 1983. Evidence for an abundant 33,000 dalton polypeptide regulated by Gytokinin in cultured tobacco tissues. Planta, 158, 410~415.
6. Eschrich, W. 1975. Sealing systems in Phloem. Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 1. (ed M. H. Zimmerman and J. A. Milburn), pp. 39~56.)
7. Felix, G. and F. Meins. 1985. Purification, immunoassay and charaterization of an abundant, Cytokinin-regluated polypeptide in cultured tobacco tissues. Evidence the protein in β-1,3-glucanase. Planta, 164, 423~428.
8. Fincher, G. B. and B. A. Stone, 1981. Metabolism of noncellulosic polysaccharides. In encyclopedia of plant physiol., Vol. 13B(ed. W. Tanner and F. A. Loewus), pp. 68~132. Springer-Verlag, Berlin.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

9. Flcher, R. G., M. E. Mccurlly., G. Setterfield and J. Sutherland. 1975. β-1, 3-Glucan may be associated with cell plate formation during Cytokinesis. Can J. Bot., 45, 539~542.
10. Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirment of suspension culture of soybean root cells. Exp. Cells Res., 50, 148~151.
11. Herzog, H. 1982. Source and sink development during Kernel filling of two Spring wheats as affected by root size and cytokinin applications. Z. Pflanzenernaehr. Bodenk. 145~128~139.
12. Hames, B. D., 1983. Gel electrophoresis of proteins. pp. 1~91. IRL Press. Oxford, Washington D. C.
13. Köhle, H., W. Jeblick, F. Poten., W. Blaschek and H. Kayss, 1985. Chitosan-Elicited Callose Synthesis in soybean cell as a Ca^{++} development process. Plant Physiol., 77, 544~551.
14. Kulaeva, O. N. 1980. Cytokinin on enzyme activities in plants. Plant Growth Substrates, 1979. Springer, Berlin. pp. 119~128.
15. Leammli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteing the assembly of the head of Becteriophage T4. nature, 227, 680~685.
16. Leopold, A. C. and M. Kawase. 1964. Benzyladenine effects on bean leaf growth and senescence. Am, J. Botany. 51 : 294~298.
17. Letham, D. S. 1963. Zeatin, A factor inducing cell division isolated from Zea mays. Life Sci. 2 : 569~573.
18. Letham, D. S. 1967. Regulation of cell division in plant tissues. Planta, 74, 228~242.
19. Linsmar, E. M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirment of tobacco tissue cultures. Physiol. plant, 18, 100.
20. Lowry, O. H., A. L. Roseborough., A. L. Farr and R. J. Randall, 1951.

제주대학교 중앙도서관

Protein Measurement with the Folin-Phenol reagent. J. Biol. Chem., 193~265.

21. Miller, C. O., F. Skoog., M. H. Von Saktza. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J. Am. Chem. Sci. 77 : 1392.
22. Miller, C. O. 1960. An assay for Kinetin-like materials. Plant Physiol., 35(suppl) Xxvi.
23. 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.
24. Moore, T. C. 1979. Cytokinin. In Biochemistry and Physiology of Plant hormones. Springer-Verlag. Berlin. pp. 147~180.
25. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant, 15, 473~497.
26. Ohira, K., K. Ojima and A. Fujiwara. 1963. Studies on the nutrition of rice cell culture. I. A. simple defind medium for rapid growth in suspension culture. Plant cell Physiol., 14, 1113~1121.
27. Polya, G. M. and J. R. Davis. 1983. Resolution and properties of a protein kinase catalyzing the phosphoryation of a wheat germ cytokinin-binding protein. Plant Physiol., 71, 482~488.
28. Schenk, R. U. and A. C. Hilderbrandt. 1972. medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. Can, J. Bot., 50, 199~204.
29. Skoog, F. and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in Vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11 : 118~131.
30. Skoog, F. and Tsui, C. 1948. chemical control of growth and bud formation

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

in tobacco stem segment and callus cultured in Vitro. Amer. J. Bot., 35, 782.

31. Stenesh, J., 1984. Experimental Biochemistry. Allyn and Bacon, Inc., massachusetts, pp. 69~76.
32. Thaker, V. S., S. Saroops and Y. D. Singh. 1987. Physiolical and Biological changes associated with Cotton Fible development. Ⅳ. Glycosidases and β-1, 3-Glucanase activities. Annals of Botany, 60, 579~585.
33. Willits, C. O. and C. L. Ogg. 1950. Report on standardization of microchemical methods. Microkjeldahl Nitrogen Determination. J. Assoc. Agr. Chemist., 33, 179.
34. Woolley, D. J. and P. F. Wareing. 1972. The role of roots, Cytokinin and apical dorminance in the control of lateral shoot from in Solanum andigena. Plant(Berl). 105 : 33~42.
35. Yoo, K. J. H. O. Kim, C. K. Park and C. O. Kim. 1987. Effects of cytokinin on cell wall regeneration and cell division of soybean protoplasts. J. Korean Agricultural Chemical Society, 30(4), 300~304.
36. Yoo, K. J., C. K. Park and S. I. Kim. 1986. Effects of Auxin, GA and Cytokinin on the protein synthsis(Accumulation) of Soybean. J. Koran Agricultural Chemical Society. 29(1), 73~77.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

감사의 글

본 논문이 나오기까지 시종일관 지도하여 주신 류기중교수님께 먼저 감사드리고 그동안 가르침을 주시고 원고까지 바로잡아 주신 농화학과 김형옥교수님, 강순선교수님, 유장걸교수님, 고정삼교수님께도 감사드립니다. 그리고 실험여건의 조성은 물론 여러 가지로 도움을 준 농화학과 조교선생님, 제주대 방사능이용연구소 송선준선배님, 농과대학 정밀분석기기실 고정은선배님을 비롯한 직원 여러분께 고마움을 드리며 실험수행에 도움을준 대학원 동료학우와 농화학과 현창주 · 오미순학생, 막바지 실험수행과 원고정리를 도와준 김양록학생 모두에게 더 없는 고마움을 드립니다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY