Phytochrome이 보리잎 Protoplast의 팽윤에 미치는 영향

유장걸 · 송필순 · 문두길 · 송성준 · 홍경애

Phytochrome effect on swelling of etiolated barley leaf protoplasts

Zang-Kual U., Pill-Soon Song, Doo-Kil Moon, Sung-Jun Song, and Kyung-Ae Hong

Summary

Light effect on the size of protoplasts isolated from etiolated barley leaves was studied. Red light irradiation caused a swelling of protoplasts while little change in size found under the dark condition. Photoreversibility by red light and far-red light was found in protoplast swelling, indicating the involvement of phytochrome. Action mechanism of phytochrome on protoplast swelling should be clarified in aspect of growth regulators and intermediates involved.

Two minute irradiation time and two hour incubation after red light treatment were found sufficient to induce protoplast swelling.

The protoplasts were swollen according to the sorbitol concentration of incubation media but destroyed below 0.4M-sorbitol concentration.

서 론

cyclic-AMP(c-AMP)가 동물이나 원핵생물에서 second messenger로서 여러가지 생리화학적 기능을 갖고 있다고 하는 사실이 잘 알려져 있는(7, 8, 18, 20, 23, 24) 반면에, 고등식물에서, c-AMP 역할에 대해서는 비교적 알려진 바가 적고, 생물체내 함량도 동물의 경우보다는 훨씬 적은 값으로 보고 되었다(1, 2, 6). 그러나 정량방법(13)과 식물종간 또는 부위별로도 많은 차이가 있으며 Bressan 등 (5)은 alga 세포가 신선중 g당 3-3,000 pico mole의 c-AMP를 함유한다고 했다. 비록 미량이지만 식물 세포내에서 합성되고 있음이 증명되었고(2), 이에 따른 식물체내에서의 기능에 대하여 연구된 바로는 c-AMP에 결합되어 있는 단백질의 성질(17), 자엽하축 신장과 세포벽 특성에 관여한다는 보고(14), gibberellins과 IAA는 phytochome과 비슷한 효과가 있다는 연구(3, 12), c-AMP에 의존되는 단백전이효소(9, 20),

* Nebraska 주립대학교 화학과 교수

** 본 논문은 한국과학재단의 차관연구지원에 대한 1986년도 중간보고서임.

ATPase 활성증가(10)등이었으며 최근에는 동물이나 원핵세포에서 잘 알려진 glucose 분해촉진의 효과가 있음이 asparagus의 단세포 배양실험에서 보고 되었다(22).

한편 Blakeley 등 (4)은 암실에서 생육시킨 밀잎의 protoplast가 phytochrome과 gibberellic acid에 의해서 팽배됨을 보고했고, 또 차광재배된 귀리 잎에서 분리시킨 protoplast가 적색광선과 prostacyclin, dibutyryl -c-AMP 처리에 의해서 팽윤됨을 관찰한 바 있다(15).

따라서 protoplast 팽윤 효과를 이용하여 phytochrome의 분자생물학적 기능과 c-AMP의 식물체내 기능에 대해서 검토코자 하며, phytochrome과 c-AMP가 고등식물의 적색광에 대한 형태 변이적인 반응에 독립적으로 또는 상조적으로 관여할 것인가에 대해서 연구코자 한다.

본 실험에서는 암조건에서 생육시킨 식물체(보리)의 protoplast에 적색광과 적외선광을 조사하여 phytochrome 활성변화를 유기시키고 이에 따른 protoplast의 팽윤성을 관찰하며 이에 수반되는 몇가지 실험조건을 확립시켰다.

재료 및 방법

1. 공시재료의 준비

약 50gr의 보리종자를 1%유한락스 100ml에 Tween-20 한방울을 가한 용액에 20분간 침지시켜서 표면소독을 한뒤에 vermiculite가 담긴 그릇에 파종하고 상대습도 90%, 온도 25±1℃인 암상자에 넣고 안전광이 설치된 암실에서 7~8일간 생육시킨 다음에 시험재료로 이용하였다. 이때 사용된 영양액은 50μM kinetin과 0.1M Sucrose를 첨가시킨 Murashige-Skoog(MS) 배지이었고 그 조성은 table 1과 같다.

2. 안전광(Safety light)설치

공시식물의 재배 및 protoplast 분리등의 작업을 수행하기 위해서 phytochrome의 光吸收영역이 아닌 500nm 부근의 광원을 설치했는데 이것은 80W의 일반 형광등(33cm×129cm)에 몇겹의 filter를 사용해서 만들었다. filter로는 초록색 및 청색 아크릴판(두께 2.95mm)과 청색 및 초록색 셀로판종이(두께 0.05mm)를 모두 두겹씩 덮고, 33cm×129cm×1.8cm의 유리상자에 5%의 $CuSO_4$용액을 1cm 깊이가 되도록 넣은것을 추가시켜서 500nm 부근 이외의 파장(400nm 영역과 600~700nm 영역)을 제거했다.

Spectronic-20 분광분석기의 PM-tube를 외부로 꺼낸 상태에서 500nm 부근 이외의 광이 나오지 않는것을 확인했으며, 한겹의 청색과 초록색의 아크릴판 및 $CuSO_4$용액의 단독 또는 함께 조합시켰을 때의 광흡수 spectrum은 figure 1과 같다.

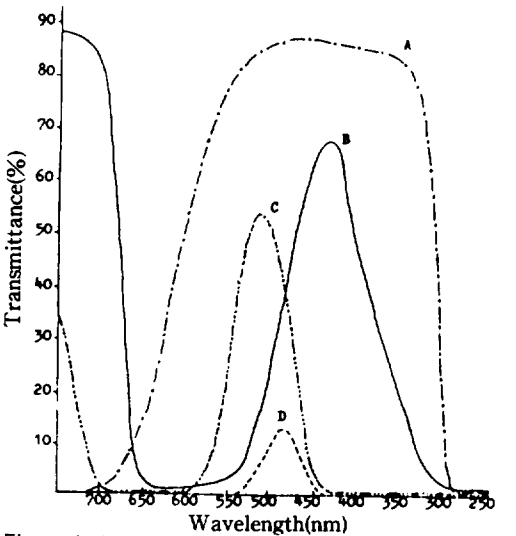

Figure 1. Absorption spectra of filters used for the safe light quality control.

A : 5% W/V $CuSO_4$

B: Green acryl C : Blue acryl

D : Blue acryl+Green acryl+5% W/V $CuSO_4$

Table 1. Composition of culture solution.

Macronutrients	per liter
NH_4NO_3	1650mg
KNO_3	1900mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370mg
KH_2PO_4	170mg
Micronutrients	**per liter**
Na_2EDTA	37.25mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3mg
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	8.6mg
H_3BO_3	6.2mg
KI	0.83mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025mg
Vitamins	**per liter**
Glycine	2 mg
Nicotinic acid	0.5 mg
Pyridoxine-HCl	0.5 mg
Thiamine-HCl	0.1 mg
Growth regulators	**per liter**
Kinetin	10.8mg
IAA	10.0mg
Sugars	**per liter**
Sucrose	34.25g
Myoinositol	100mg

3. Protoplast의 분리

암조건에서 생육시킨 보리잎으로 부터 protoplast를 분리하기 위해 Edwards 등(11)의 방법을 다소 변형시켜서 사용하였다. 즉, 2)의 안전광 조건하에서 보리잎의 상부 1cm 정도를 면도날로 잘게 썰어서 생체중으로 약 4~5g을 취하여 0.6M sorbitol 용액을 포함하는 Protoplast 분리용 효소용액(5% W/V Cellulase -RS, 0.25% W/V Macerozyme R-10; Yacult Pharmaceutical Industry Co. Ltd. Japan, 0.25% W/V Hemicellulase; Sigma Chem. Co. USA, pH 6.8) 50ml에 넣고 25℃에서 5시간동안 incubation 시켰다. 이것을 4겹의 가아제를 사

용해서 찌꺼기를 걸러낸 용액을 x100g에서 7분동안 원심분리하여 효소용액을 제거한뒤 0.6M sorbitol, 50μM kinetin을 함유하는 MS 배지용액 (pH 6.8)을 이용하여 원심분리법으로 3회 세척하였다. 이와같이 하여 얻은 protoplast를 더욱더 순수 분리하기 위해 불연속적인 밀도차(discontinuous density gradient)를 갖는 0.6M sucrose-sorbitol 용액을 가한뒤에 x100g에서 7분동안 원심분리 하였다. 원심분리한 뒤에 두 액 층간에 떠있는 비교적 순수한 protoplast를 얻을 수 있었다.

4. protoplast viability 측정

아세톤에 fluorescein diacetate(FDA 법)(16)을 5ml/l되도록 녹여 만든 용액에 protoplast suspension을 가하여 최종농도가 0.01% 되도록 한뒤에 상온에서 5분동안 incubation한 후, 형광장치가 부착된 도립 현미경(Nikon, DIAPHOT-TMD)하에서 protoplast viability를 조사하였다. 살아있는 protoplast는 초록색의 진한 형광을 내기 때문에 관찰이 매우 용이하였다.

5. red 및 far red 광원

power supply unit로 부터 전원을 공급받는 tungsten lamp(100V, 300V)를 광원으로 하고 lenz에 의해서 광을 집속시킨뒤 interference type의 red filter (Transmission range ; 620~676 nm) 및 far-red filter (transmission range ; 701~744nm)를 각각 사용하므로써 적색광과 적외선 광을 얻었다.

6. protoplast 팽윤효과 실험

0.6M sorbitol이 함유된 MS 배지용액 ml당 1.5×10^5-2.0×10^5개의 protoplast density를 갖는 suspension 200μl를 취하여 작은 유리 용기에 넣고 red 또는 far red light를 조사시켰다. 그 후 2시간 동안 incubation시키고 haematocytometer를 이용 현미경 상에서 400배의 배율로 50개의 protoplast 직경을 micrometer를 이용 측정하였다. 광처리 또는 incubation시킬 때는 항상 ice-cold 상태(4~6℃)를 유지시켰다.

결과 및 고찰

1. 적색광 처리시간 결정

순수분리된 protoplast를 완충용액에 suspension시키고 적색광을 30초, 1분, 2분, 5분씩 조사시킨뒤 4℃에서 두시간 배양한 다음에 protoplast 크기를 측정 했으며 적색광을 조사시키지 않고 동일조건에서 배양한 protoplast(control)크기를 측정해서 얻은 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Effect of red light irradiation time on the size of the etiolated barley protoplasts.

Red light irradiation*	Mean diameter μm±SE**	Increase in diametr μm±SE**
Control(Dark)	22.13±0.27	
30sec	22.93±0.38	0.80±0.47
1min	23.67±0.37	1.56±0.46
2min	26.57±0.55	4.44±0.61
5min	22.75±0.33	0.62±0.43

*: All treatments were given immediately after isolation of protoplasts and their size was measured after 2hr-incubation at 4℃.

**: The SE values refer to size distribution of 50 protoplasts counted.

protoplast 팽윤효과는 적색광을 2분간 조사하였을 때 가장 많이 나타났는데 Blakeley 등(4)도 1mM KCl 존재하에서 2분간의 적색광조사를 함으로써 밀의 protoplast 팽윤효과를 관찰한 바 있다.

2. 광처리후의 배양적정시간 결정

적색광의 조사를 끝낸뒤에 4℃에서 protoplast 효과를 발현시키기 위해서 일정 시간 배양하게 되는바 protoplast의 팽윤효과가 제일 크게 관찰되는 시간은 table 3에서 보는바와 같이 2시간 후 였다. Kim 등 (15)은 phytochrome, dibutyryl, c-AMP, Prostacyclin 등을 귀리의 protoplast에 처리한뒤에 48시간 배양을 시킨바 있었지만, 본 실험조건에서는 48시간 이상 경과하면 protoplast의 생존율도 66%로 감소될 뿐 아니라 protoplast 팽윤효과가 좋지 않았다. 2시간 이내의 배양시간에 대한 검토는 광처리후 50개의 protoplast 크기를 현미경하에서 측정하는데 걸리는 시간 때문에 실질적으로 큰 의의가 없어서 고려해 넣지않고 배양시간을 2시간으로 결정했다.

Table 3. Effect of incubation time on the size and viability of etiolated barley-leaf protoplasts.

	Mean diameter(μm)±SE					
	0hr	2hr	4hr	12hr	24hr	48hr
No red light(Dark)	23.60±0.30	22.54±0.33	23.24±0.34	22.36±0.36	22.36±0.35	22.25±0.35
Red light		25.02±0.42	24.47±0.37	23.81±0.37	23.85±0.32	23.27±0.36
*△diameter (μm)±SE		2.48±0.53	1.23±0.50	1.45±0.50	1.49±0.47	1.02±0.50
Viability(%)	91	86	85	82	74	66

*: Protoplast size differences between dark and red-light treatments at each corresponding incubation time.

3. 차광재배된 보리 protoplast에서의 phytochrome 효과

암실조건에서 발아시켜 생육된 보리잎에서 분리된 protoplast에 적색광, 적외선광 그리고 적색광과 적외선광을 교차조사 시킨뒤에 protoplast의 팽윤정도를 대조구(암처리)와 비교해 본 결과는 table 4에 있는 바와 같다. 적색광 단일처리시와, 적색광+적외선광+적색광 처리시에는 대조구에 비해서 protoplast 크기가 증가됨이 관찰되었다.

한편, 적외선광 처리시와 적색광+적외선광 처리시에는 대조구와 5% 유의수준에서 차이가 없는 것으로 나타났다. 이것은 적색광에 의해서 활성화된 phytochrome이 적외선광의 조사에 의해서 불활성화되고 이는 다시 적색광조사로 활성화 될 수 있다는 photoreversibility를 암시하는 것으로 적색광에 의한 protoplast의 팽윤은 phytochrome 활성과 밀접한 관계가 있다고 볼 수 있다. protoplast가 아닌 intact cell 수준에서의 광처리 효과에 관해서는 Beebers 등(3)이 차광재배된 밀의 잎이 적색광으로 펴진다고 보고했고 Satter 등(21)은 두과식물에서 적외선광 및 청색광 처리로 잎의 움직임을 유기시킨바 있다. Kim 등(15)의 보고에서는 차광재배된 귀리의 protoplast가 적색광 처리에 의한 팽윤이 대조구(암처리)에 비해 15%이상이었지만 본 실험조건에서는 4~6%수준이었다. 이

Table 4. Photoreversibility of protoplast swelling effect induced by red and far red light.

Light treatment	Replications	Mean diameter (μ m)±SE**	△ Diameter (μ m)±SE	Significance group at 5%
Control(Dark)	3	25.16±0.38		b
Red	3	26.14±0.40	0.98±0.55	a
Far red	3	24.52±0.37	-0.64±0.53	b
Red-Far red	3	24.87±0.37	-0.29±0.53	b
Red-Far red-Red	3	26.25±0.42	1.09±0.57	a

*: All red and far red irradiation was of 2 min. duration and protoplast size was measured after 2hr -incubation at 4℃.

**: Mean diameter of the protoplasts before light treatment was 25±0.37μm. The SE values refer to size distribution of 50 protoplasts counted.

는 식물종에 따라 phytochrome 존재량이 다르기 때문에 팽윤효과도 차이가 있게 될 것으로 생각된다.

4. 완충용액중의 Sorbitol 농도에 따른 Protoplast 크기변화

protoplast 배지중에 존재하는 water potential을 좌우하는 것은 sorbitol의 농도이며 이에 따른 물의 protoplast 내로의 침투가 결정되어질 것이다. sorbitol 농도를 달리했을 때의 protoplast 크기가 table 5에서 보는 바와 같이 농도가 낮아질수록 커짐을 볼 수 있는데 이는 물의 chemical potential이 0.40M sorbitol을 함유하는 완충액에서 제일 컸기 때문에 물 흡수가 증가된 결과라고 생각된다.

Table 5. Effect of sorbitol concentration of the buffer solution on the size of protoplast isolated from etiolated barley leaves.

Treatment	Replication	Mean diameter(μ m)±SE	△Diameter(μ m)±SE*
0.60M	3	23.74±0.34	
0.56M	3	24.21±0.41	0.47±0.53
0.53M	3	24.65±0.39	0.91±0.52
0.50M	3	25.02±0.38	1.28±0.51
0.45M	3	25.56±0.42	1.82±0.54
0.40M	3	26.40±0.49	2.66±0.60

*: The protoplast size differences between at control(0.60M) and at the other concentrations.

적 요

암조건에서 생육시킨 보리(Hordeum valgare) 잎의 생장점 부근에서 분리한 Protoplast가 적색광 처리에 의해서 팽윤되었고 적외선광에 의해서는 적색광 효과과 소멸되었다. 이 사실은 Protoplast의 팽윤이 Phytochrome에 의해서 조절됨을 시사하는 것이나 Phytochrome의 작용기작을 알기 위해서는 다각적인 연구가 필요하다. 실험결과로 부터 적색광 처리시간은 2분 적색광 처리후 배양시간은 2시간이 적당함을

알았다.

Protoplast 배양액의 Sorbitol 농도에 따른 크기변화는 농도가 낮을수록 커졌으며 0.4M 이하에서는 Protoplast가 파괴되었다.

참고문헌

1. Amrhein, N. 1977. The current status of cyclic AMP in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 28 : 123~32.
2. Ashton, A. R. and G. M. Polya. 1978. Cyclic adenosine 3′ : 5′-monophosphate in axenic rye grass endosperm cell cultrues. Plant Physiol. 61 : 718~722.
3. Beevers, L., B. Loveys, J. A. Pearson and P. F. Wareing. 1970. Phytochrome and hormonal control of expansion and greening of etiolated wheat leaves. Plant(Berl.) 90 : 286~294.
4. Blakeley, S. D., B. Thomas, J. L. Hall and D. Vince-Prue. 1983. Regulation of swelling of etiolated-wheat-leaf protoplasts by phytochrome and gibberllic acid. Planta 158 : 416~421.
5. Bressan, R. A., A. K. Handa, H. Quader and P. Filner. 1980. Synthesis and release of cyclic adenosine 3′ : 5′-monophosphate by Ochromonas malhamensis. Plant Physiol. 65 : 165~170.
6. Bressan, R. A. and C. W. Ross. 1976. Attempts to detect cyclic adenosine 3′ : 5′-monophosphate in higher plants by three assay methods. Plant Physiol. 57 : 29~37.
7. Brown, E. G. and Newton, R. P. Cyclic AMP and higher plants. 1981. Phytochemstry 20 : 2453~2463.
8. de Crombrugghe, B., S. Busby and H. Buc. 1984. Cyclic AMP receptor protein : Role in transcription activation, Science 224 : 831~838.
9. de Gunzburg, J., D. Part, N. Guiso and M. Veron. 1984. An unusual adenosine 3′, 5′-phospate dependent protein kinase from dictyostelium discoideum. Biochemistry. 23 : 3805~3812.
10. Earle K. M. and A. G. Galsky. 1971. The action of cyclic-AMP on GA controlled responses II. Similarities in the induction of barley endosperm ATPase activity by gibberellic acid and cyclic 3′, 5′-adenosine monophosphate, Plant & Cell Physiol. 12 : 727-732.
11. 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.
12. Handa, A. K., and M. M. Johri. 1976. Cell differentiation by 3′, 5′-cyclic AMP in a lower Plant, Nature 259 : 480~482.
13. Handa, A. V. and M. M. Johri. 1977. Cyclic adenosine 3′ : 5′-monophosphate in moss protonema. Plant Physiol. 59 : 490~496.
14. Kamisaka, S., H. Sano, M. Katsumi and Y. Masuda. 1972. Effects of cyclic AMP and gibberellic acid on lettuce hypocotyl elongation and mechanical properties of its cell wall. Plant Cell Physiol. 13 : 167~173.
15. Kim, Y. S., D. K. Moon, J. R. Goodin and P. S. Song. 1986. Swelling of etiolated oat protoplasts induced by cAMP and red light. Plant Cell & Physiol.
16. Larkin, P. J. 1976. Purification and viability determinations of plant protoplasts. Planta(Berl) 128 : 213~216.

17. Polya, G. M. and J. A. Bowman. 1981. Resolution and properties of to high affinity cyclic adenosine 3′, 5′-monophosphate-binding proteins from Wheat Germ. Plant Physiol. 68 : 577~584.
18. Ross, C. W. 1981. Biosynthesis of nucleotides. In "The Biochemistry of Plants" (Edited by P. K. Stumpf and E. E. Conn), Vol. 6 : Press, New York. pp. 169 ~205.
19. Roux, S. J., R. O. Wayne, and N. Datta. 1986. Role of calcium ions in phytochrome responses : an update. Physiol. Plant. 66 : 344~348.
20. Rutherford, C. L., R. L. Vanghan, M. J. Cloutier, D. K. Ferris and D. A. Brickey. 1984. Chromatographic behavior of cyclic AMP dependent protein kinase and its subunits form Dictyostelium discoideum Biochemisty. 23 : 4611~4617.
21. Satter, R. L., S. E. Guggino, T. A. Longergan and A. W. Galston. 1981. The effects of blue and far red light on rhythmic leaflet movements in samanea and albizzia. Plant Physiol. 67 : 965~968.
22. Tassi, F., F. M. Restivo, P. P. Puglisi and G. Cacco. 1984. Effect of glucose on glutamate dehydrogenase and acid phosphatase and its reversal by cyclic adenosine. 3′ : 5′-monophosphate in single cell cultures of asparagus officinalis. Physiol. Plant. 60 : 61 ~64.
23. Wasternack, C. 1982. Metabolism of pyrimidines and purines. In "Encyclopedia of Plant Physiology" New Ser. Vol. 14B : Nucleic Acids and Proteins in Plants II (Edited by B. Parthier and D. Boulter), Spinger-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 263~301.
24. Wilson, R. H. and R. J. Graesser. 1876. Ion transport in plant mitochondria. In "Encyclopedia of Plant Physiology" : New Ser. Vol. 3(Edited by C. R. Stocking and U. Heber), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp. 377~397.