

光週期植物의 開花誘導에 미치는 2-Chloroethylphosphonic Acid(Etaphon)의 効果에 關한 研究

I. Etaphon에 依한 *Lemna perpusilla* 6746 開花抑制

孟柱善

(西江大學校 理工大學 生物學科)

Studies on the Effect of 2-Chloroethylphosphonic Acid (Etaphon) on the Floral Induction in Photoperiodic Plants

I. Inhibition of Flowering in *Lemna perpusilla* 6746 by Etaphon

Maeng, Jueson

(Department of Biology, Sogang University, Seoul)

ABSTRACT

The inhibitory effect of etaphon on the flowering in *Lemna perpusilla* 6746 was shown to be related to sucrose concentrations and dilution factors of Hutner's medium. When grown in 1/10-strength Hutner's medium under 10(14) cycles, the plants have been completely inhibited in the floral induction by etaphon (>5ppm) in the presence of sucrose (>20 mM) in the medium. However, in a less diluted Hutner's medium (1/2-strength), the inhibition of flowering by etaphon was observed to be partially diminished by sucrose at a high concentration (30 mM), while a low concentration of sucrose enhanced the inhibitory effect of etaphon in flowering. As inductive dark periods were extended, the effects of both compounds were partially nullified.

Since no significant amount of ethylene possibly released in etaphon decomposition in the medium was detected, the inhibitory effect of etaphon in flowering was postulated to be exerted only through ethylene production within the plants. Plants were incubated in 10 ppm etaphon-containing medium during either dark or light periods, singly or periodically. The most effective single treatment with etaphon was observed during the 4th dark period, when formation of floral stimulus was assumed to be completed beyond a critical level. This postulation can be partially supported by a fact that the plants should be exposed to at least more than four consecutive 10(14) cycles for flowering.

緒論

개스狀態의 植物호르몬인 ethylene은 植物의 生長 및 發達에 多樣한 効果와 더불어 特히 光週期植物인 *Xanthium pensylvanicum*(Abeles, 1967) 및 *Pharbitis*

nii(Suge, 1972)등의 開花過程에 作用함이 밝혀진 바 있다.

鹽氣性 水溶液內에서 2-chloroethylphosphonic acid (etaphon 혹은 ethrel)은 分解되어 ethylene을 生成하나(Warner와 Leopold, 1969; Yang, 1969), 또한 이

物質은 植物體에 살포되거나 根系를 通過하여 吸收된 후 植物體內에서 分解하여 ethylene gas를 發生시키므로 (Warner와 Leopold, 1967) ethylene과 同一한 効果를 나타내기 때문에 果實의 落果와 開花誘導促進등에 많이 使用되는 植物生長調節物質로 알려지고 있다. 特히 이 物質은 短日植物인 *Ananassa sativa* (Cooke와 Randall, 1968) 및 *Plumbago indica* (Nitsch와 Nitsch, 1969)의 開花를 長日條件下에서 誘導한다.

本研究에서는 短日植物인 *Lemna perpusilla* 6746의 開花에 미치는 ethephon의 抑制効果를 調査하여 培養液의 稀釋度 및 糖分濃度에 依한 効果가 ethephon의 影響과 어떠한 관계를 가지고 있는 가를 밝히며 開花誘導光週期中 ethephon의 効果時期를 紛明하였고 ethylene의 作用樣式을 論議하였다.

材料 및 方法

Lemna perpusilla 6746을 1/2濃度로 稀釋된 Hutner培養液内에 30mM sucrose를 加한 후 光週期 24(0)[단: x(y)는 24時間中 光期 x時間, 暗期 y時間을 뜻함]下에서 無菌으로 培養한 후 모든 實驗에 使用하였으며, 實驗은 125ml Erlenmeyer flask内 1/2 혹은 1/10의濃度로稀釋된 Hutner培養液 50ml에 3葉型 단계의 2個群體를 移植한 후 無菌狀態에서 進行되었고, sucrose는 滅菌前에 培養液에 加하였으나 ethephon은 첨가 직전에 2차 층류수로 100倍濃度의 原液을 만든 후 濾過滅菌하여 培養液에 加하였다. Ethephon은 2-chloroethylphosphonic acid 21.3%가 含有된 Amchem Products의 Ethrel液을 使用, 活性物質의濃度를 基準으로 培養液内 ethephon의 最終濃度를 算出하였다.

其他 本報에 明示되지 않은 培養條件 및 開花率(FL% : flowering percentage), 總個體數(TF : total frond number)의 算出은 前報과 同一하다(Maeng, 1976).

開花誘導에 대한 ethephon의 効果時期를 紛明하는 實驗에서는 光週期 10(14)下, 1/10濃度의 Hutner培養液(10mM sucrose 첨가) 내에서 培養中인 植物을 最終濃度 10ppm의 ethephon으로 處理하였다. 또한 ethephon이 含有된 培養液内에서부터 正常培養液으로 植物群體들을 移植할 때마다 각 個體를 蒸溜水로 세척하였다.

Ethephon이 含有된 培養液内에서 放出 될지도 모르는 ethylene의 量은 ethephon分解후 ethylene과 함께 生成되는 phosphate의 測定으로 間接的으로 얻을 수 있었으며 이의 定量은 修正된 Ammon과 Hinsberg의 ascorbic acid法에 依하였다(Chen, Jr. 등, 1956). 즉 phosphate가 포함되지 않은 Hutner培養液 3ml를

13×150mm 시험관에 넣고 각濃度의 ethephon을 加한 후 26±1°C下에 24時間 혹은 72時間 유지시켰다. 이후 3ml의 reagent C [6N H₂SO₄: 蒸溜水: 2.5% (NH₄)₂MoO₄·H₂O: 10% ascorbic acid=1:2:1:1]를 加한 뒤 37°C에서 3時間 유지시켰고 吸光度를 Bausch & Lomb계 Spectronic 20으로 820nm에서 測定하였다.

各 培養器 當 植物群體의 增殖率(MR : multiplication rate)은 [log(x+1日 채의 TF) - log(x日 채의 TF)] × 1000에 의거 算出하였다(Clark, 1925).

結果 및 論議

Lemna perpusilla 6746의 開花誘導가 sucrose濃度에 영향을 받는다는 사실은 많이 發表되었다. 즉 0.03M의 sucrose가 포함된 1/2濃度 Hutner培養液에 배양된 후 8(16)週期下에서 기른 *L. perpusilla*의 開花는 同一濃度의 sucrose에 의하여 매우 억제되어 特이 開花誘導光週期下에서의 培養液의濃度가 낮을 때(sucrose:mineral의 값이 높을 때) 抑制効果가 심히 나타난다(Posner, 1967). 이러한 sucrose의 抑制効果는 生長中 sucrose에 의한 培養液의 酸性化나 微量污染物質에 의한 것은 아니며 칼슘이나 및 인산염이 부분적으로 억제효과를 방지할 수 있고(Posner, 1969), NH₄이 온이 *L. gibbae*의 開花를 억제함이 發表된 후(Kandeler, 1969), 1/10로 허석된 培養液내에 존재하는 NH₄이 온과 sucrose의 복합적 開花抑制効果는(Hillman과 Posner, 1971) 아마도 開花過程에 필요한 아미노酸의 농도가 낮은 때 기인할 것이라는 논의가 있었으나 (Posner, 1970), 확실한 원인은 규명되지 않고 있다.

Fig. 1에서 30mM sucrose는 1/10×Hutner培養液에서 심한 開花抑制効果를 나타냈으나 1/2×Hutner培養液의 경우 오히려 매우 낮은 농도(5mM)가 開花를 억제한 것은 매우 흥미있는 결과이며 이는 아마도 培養液內 無機鹽類의 높은 농도 하에서 낮은 농도의 sucrose가 나타내는 生長 沢害의 결과일 수도 있으나 樂養生長率의 감소가 반드시 開花率의低下를 가져오는지는 않기 때문에 단정 할 수는 없다.

Ethylene은 다른 抑制物質과 달리 微量의 가스狀態에서 몇몇 植物의 生長發達에 영향을 미친다. 特히 水生植物의 生育과 ethylene과의 관계는 밀접하여 많은 논의가 發表되었다(Ku, 등, 1970; Suge, 1971; Musgrave 등, 1972; Musgrave와 Walters, 1974; Suge와 Kusanagi, 1975). Ethylene의 作用中 開花誘導에 대한 効果는 少數種의 植物에서만 다소 밝혀졌다. 8(16)의 單一週期로 처리된 *Xanthium pensylvanicum*

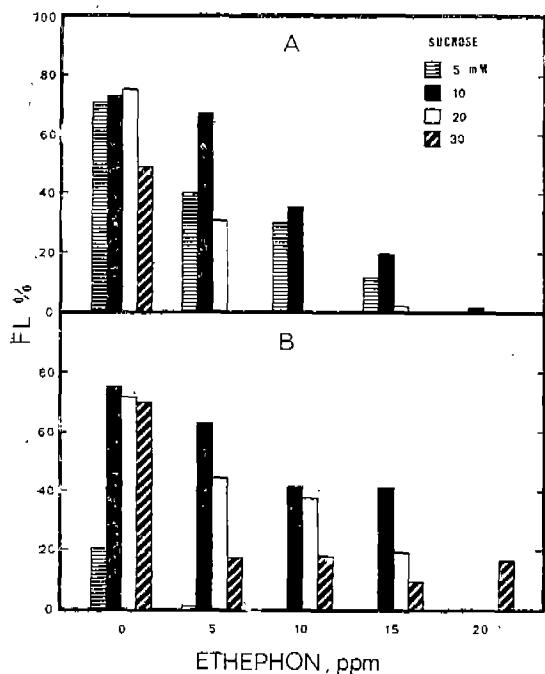


Fig. 1. Effects of ethephon and sucrose as inhibitory factors on flowering of *Lemna perpusilla* grown under 10(14) cycles.

1-A: 1/10-strength Hutner's medium; FL% on Day 7. 1-B: 1/2-strength Hutner's medium; FL% on Day 8.

의開花가 1ppm이상의 ethylene처리에 의하여 완전히抑制되었고(Abeles, 1967), 短日植物인 *Plumbago indica*의 節間部分을 0.1% ethylene에 노출시킨 뒤 줄기頂端分裂組織에서 花芽가 形成됨을 관찰하였고(Nitsch, 1967), *Plumbago indica*를 240mg/l ethephon으로 살포한 후 90%의 植物의 開花가 誘導되었고(Nitsch와 Nitsch, 1969), *Pharbitis nil*의 開花가 100ppm 농도 이상의 ethylene처리로 완전 억제되었고(Suge, 1972), 또한 ethephon은 EDDHA(10 μ g/l)와 함께 培養液內에 첨가되었을 때 長日條件下에서 *L. gibba* G3의 開花를 억제함이 發表되었다(Pieterse, 1976).

本實驗에 사용된 ethephon은 2-chloroethylphosphonic acid로서 植物體에 매우 빠른 속도로 吸收된 후(Epstein, Klein, 및 Larvee, 1977) ethylene gas를 發生시켜 효과를 나타낸다.

Sucrose各濃度下에서 ethephon의 處理는 開花率을 감소시켰다(Fig. 1-A 및 1-B). 1/2濃度의 Hutner

培養液에 존재하는 5 및 10mM의 sucrose는 ethephon의濃度가 증가됨에 따라서 開花率을 서서히 감소시키나, 보다 높은濃度의 sucrose의 경우, 10ppm이상의 ethephon處理는 開花를 完全히 抑制시켰다. 그러나 Hutner培養液의濃度가 1/10로 희석됨에 따라서 ethephon의處理는 高濃度 sucrose存在下에서도 開花를 完全히 抑制시키지는 못했으며 오히려 5mM sucrose處理의 경우, 낮은濃度의 ethephon이 完全한 開花抑制效果를 보였다. 이는 培養液의稀釋度가 sucrose의開花抑制效果를 變形시키는 現象과도 관계가 있음을 보여주며 sucrose의抑制效果가 培養液內無機鹽類의濃度나 아미노酸濃度와 더불어 植物體內에서生成되는 ethylene의 狀態와도 연관이 있음을 시사해 준다. 실제로 sucrose의開花抑制效果는 培養器의 크기, 培養液의體積과 表面積, 培養液의 교반상태에 따라 다양하게 變形되기 때문에 培養器內의 CO₂를 포함한 다른 개스가 관련 될지도 모른다는 可能성이 시사되었고(Hillman과 Posner, 1971), 本實驗에서도 ethylene 관련 가능성을 보여준다.

Ethepron과 sucrose의複合的인 開花抑制效果는 植物이 노출된 光週期와도 밀접히 관련되어 있다(Fig. 2). *L. perpusilla* 6746의 開花誘導에 必要한 臨界光週期는 14(10)이며 (Parves, 1961), 暗期를 14時間에서 16시간으로 연장시킴에 따라 위 物質들의效果가 현저히 달라졌다. 臨界暗期의 연장은 暗期中開花誘導에 必要한 開花誘導物質의蓄積을 가져오거나 혹은 內在의開花抑制物質의合成을 방해하게 되며 結果적으로 開花率의增加를 나타내는데 이러한 條件下에서는 外部에서 加한抑制物質들의 영향력은 자연 감소하게 된다.

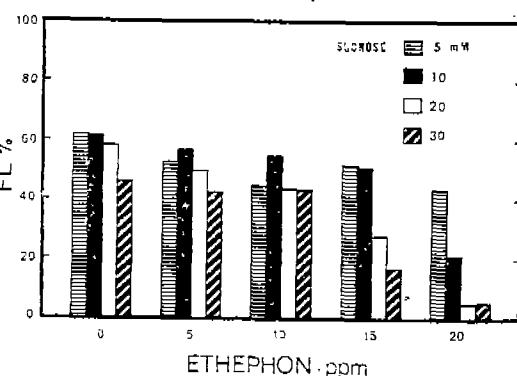


Fig. 2. Effects of ethephon and sucrose on flowering in *Lemna perpusilla* grown in 1/10-strength Hutner's medium under 6 cycles of 8(16).

Table 1. Multiplication rates (Day 5 to 6) of *Lemna perpusilla* 6746 grown in 1/10-strength Hutner's medium with various concentrations of ethephon and sucrose under 7 cycles of 10(14)

Ethepron (ppm)	Sucrose(mM)			
	5	10	20	30
0	89.6 ± 4.0	142.7 ± 7.8	130.2 ± 2.1	124.9 ± 3.3
5	128.7 ± 3.1	113.5 ± 1.0	94.4 ± 2.6	92.9 ± 2.7
10	110.6 ± 3.9	119.6 ± 6.7	81.7 ± 4.5	89.9 ± 3.8
15	149.4 ± 6.1	113.0 ± 6.0	107.4 ± 3.7	196.9 ± 4.0
20	95.5 ± 2.8	117.3 ± 4.6	125.0 ± 4.4	158.6 ± 6.2

培養液內 ethephon處理는 결국 植物體에 흡수되어 ethylene을 發生되는데 이는 植物體內의 원래의 ethylene發生反應을 促進시킨다. 즉 *Ipomoea tricolor*의 경우 ethylene處理는 液胞膜의 透過性을 增大시켜 液胞內의 methionine의 細胞質로 移動되고 이렇게 增加된 methionine의 ethylene生成率을 높혀 주며 (Kende와 Baumgartner, 1974), *Pharbitis nil*에서 ethylene處理는 methionine으로 부터의 ethylene生成過程中 中間生成物인 homocysteine의 有用度를 增加시켜 ethylene生成率이 높아 진다 (Hanson과 Kende, 1976). 따라서 本實驗에서 處理된 ethephon은 흡수된 후 植物體內에서 ethylene으로 分解되고 이는 또 다시 ethylene合成을 유발하게 된다. 그러나 ethylene의 吸收速度나 生合成이 光週期와 어떤 관계가 있는가는 아직 밝혀지지 않고 있다.

Ethepron處理가 *L. perpusilla*의 生長을 저해하는 경우가 있다면 이는 初期단계에 沖害效果가 국한되어 있으며 sucrose濃度의 증가나 ethephon濃度의 減少가 반드시 增加率(MR)을 높혀 주지는 않음을 보여 준다 (Table 1). 또한 Table 1과 Fig. 1-A를 比較하여 볼 때 開花率(FL%)과 增殖率 사이의 相關關係를 發見

할 수가 없다. 따라서 ethephon의 抑制效果는 적어도 生長冲害의 結果는 아니라고 본다.

鹽氣性 溶液內에서 ethephon은 ethylene으로 分解된 후 磷酸이온을 납기는데 (Warner와 Leopold, 1969; Yang, 1969), 이때 發生되는 ethylene과 orthophosphate의 mole數는 同一함이 밝혀졌다. Fig. 2는 Hutner培養液에 첨가된 ethephon이 植物體內로 吸收되는以外에 直接ethylene을 放出 할지도 모르는 可能性을 조사한 결과를 보여 준다. Ethepron 첨가 후 24時間만에 測定한 orthophosphate의 量과 72時間후의 量과는同一하였으며 orthophosphate와 發生된 ethylene의 量이同一하다면 結果의인 ethylene濃度는 위의 인용된 發表에서 나타난 ethylene의 效果濃度와 比較할 때 *L. perpusilla*生長發達에 영향을 미치기에는 不足한 것이다. 따라서 開花에 대한 ethephon의 效果는 오직 吸收를 通한 結果라고 판단된다.

Ethepron의 效果時期를 조사하기 위하여 Fig. 3과 같이 15個의 處理를 行하였다. 이의 結果는 Fig. 4에 나타나 있다.

Ethepron의 지속처리는 가장 높은 開花率을 보여 주었고, 각 單一處理 및 第 1, 2, 3, 및 4暗期 處理의

Table 2. Phosphate formation from ethephon in Hutner's medium. Values represent μ moles of orthophosphate produced in 50 ml of the medium when ethylene is evolved from ethephon

Ethepron (ppm)	1/10×Hutner's medium				1/2×Hutner's medium			
	Sucrose(mM)				Sucrose(mM)			
	5	10	20	30	5	10	20	30
0	0.004	0	0	0	0	0	0.073	0.028
5	0.222	0.105	0.403	0.266	0.545	0.444	0.109	0.278
10	0.133	0.061	0.234	0.117	0.516	0.319	0.141	0.230
15	0.121	0.085	0.145	0.097	0.363	0.303	0.161	0.242
20	0.121	0.073	0.129	0.101	0.323	0.295	0.177	0.262

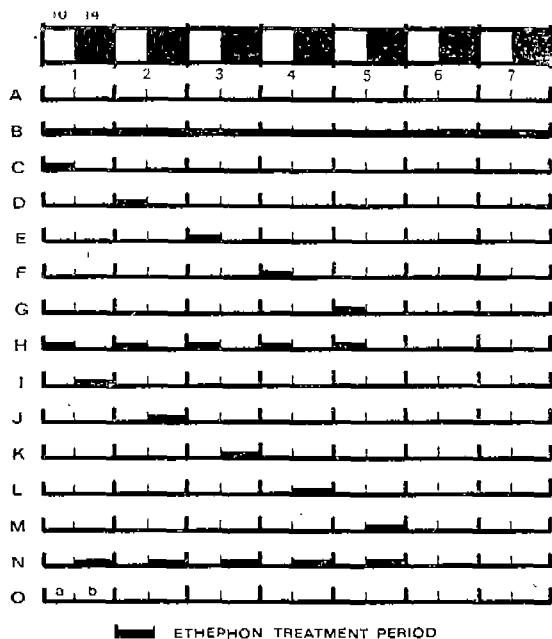


Fig. 3. Schemes of ethephon treatments. *Lemna perpusilla*, grown in 1/10-strength Hutner's medium supplemented with 10 mM sucrose under 7 cycles of 10(14), were treated with ethephon during various periods. Plants were incubated in the medium with 10 ppm ethephon. At the end of ethephon treatment, plants were rinsed in distilled water for less than one minute and then were transferred into normal medium. In treatment O, plants were incubated alternately in normal growth media, a, and b.

抑制效果는 관찰 되지 않았으나 第4暗期處理에서 37%의 開花抑制를 나타낸 것은 매우 주목할 만하다. 短日植物의 開花誘導의 形成은 暗期中에 이루어지며 特히 單一暗處理로서 開花가 誘導되는 植物에서는 暗期各部分에 따라 抑制物質에 대한 민감도가 다르다. 處理群 I,J 및 K에서 暗期中 單一處理는 開花誘導의 形成을 抑制시킬 만큼 充分한 抑制效果가 紊積되지 않았거나 혹은 ethephon處理 以後에 뒤따라오는 光週期가 最少限 4回 반복되었기 때문에 抑制效果가 나타나지 않았으며 處理群 L의 結果는 10(14)週期下에서 第4暗期中에 開花誘導의 비로소 領界量以上 紊積될 것이라는 판단을 내리게 한다. 處理群 M의 경우는 ethephon處理 前 4回 반복된 誘導週期동안 形成된 開花誘導의 移動된 후 ethephon의 영향권에 서서 開花誘導를 進行시킨 結果일 것이다. 이러한 판단은 *L. per-*

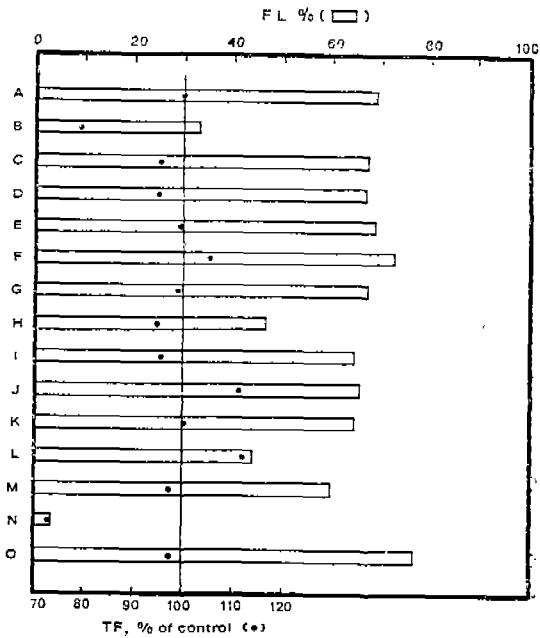


Fig. 4. Effects of various ethephon treatments on flowering and propagation of *Lemna perpusilla*. Treatments shown in Fig. 3. FL% and TF evaluated at the end of 7th dark period.

perpusilla 6746의 開花는 最少限 4回 以上의 10(14) 연속주기를 가져야 된다는 예비실험 결과로서 뒷받침될 수 있다. Ethepron의 반복적 光期處理(處理群 H)結果는 光期中 吸收된 ethephon이 暗期中 나타내는 紊積效果이며 반복적 暗期處理(處理群 N)가 開花를 完全抑制한 사실은 處理群 B의 結果와 比較하여 볼때 植物體內 ethylene의 作用에 대한 光效果의 개입여부가 밝혀지지 않는 이상 現在로선 說明할 길은 없다.

*Lemna*培養中 植物體를 週期的으로 물 혹은 새培養液에 移轉시킬 때 나타나는 開花抑制效果가 論議된 바 있으므로(Halabian과 Hillman, 1970, 1971; Doss, 1975), 處理群 O에서 이의 效果를 조사하였으나 處理期間 및 培養液의 稀釋度의 差異로 抑制效果는 나타나지 않았다.

Ethepron의 效果가 sucrose와 밀접히 관계를 갖는다는 사실은 ethephon에 의한 生體內 ethylene生成誘導의 結果이며 sucrose의 開花抑制效果도 ethylene와 연관되어 있을 것으로 판斷된다. 따라서 開花誘導過程에서 나타나는 植物體內의 ethylene合成, ethylene의 先驅物質인 methionine 및 methionine代謝의 抑制物質을 利用한 ethylene合成阻害에 따른 效果, 開

花에 대한 ethylene抑制效果의 機作 등의 研究는 主要한 課題로 계시될 수 있다.

参考文獻

- Ateles, F.B. 1967. Inhibition of flowering in *Xanthium pensylvanicum* Walln. by ethylene. *Plant Physiol.* 42: 608—609.
- Chen, Jr., T.Y. Toribara, and H. Warner. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chem.* 28: 1756 —1758.
- Clark, N.A. 1925. The role of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. *J. Physiol. Chem.* 29: 935—951.
- Cooke, A.R. and D.I. Randall. 1968. 2-Haloethanephosphonic acids as ethylene releasing agents for the induction of flowering in pineapples. *Nature* 218: 974—975.
- Doss, R.P. 1975. Influence of short term inhibitor treatment on the flowering of *Lemna perpusilla* 6746. *Plant Physiol.* 56: 360—363.
- Epstein, E., I. Klein, and S. Lavee. 1977. The fate of 1,2-¹⁴C-(chlorethyl)phosphonic acid (ethephon) in olive (*Olea europaea*). *Physiol. Plant.* 39: 33—37.
- Halaban, R. and W. Hillman. 1970. Response of *Lemna perpusilla* to periodic transfer to distilled water. *Plant Physiol.* 46: 641—644.
- _____. 1971. Factors affecting the water-sensitive phase of flowering in the short day plant *Lemna perpusilla*. *Ibid.* 48: 760—764.
- Hanson, A.D. and H. Kende. 1976. Methionine metabolism and ethylene biosynthesis in senescent flower tissue of morning-glory. *Ibid.* 57: 528—537.
- Hillman, W. and H.B. Posner. 1971. Ammonium ion and the flowering of *Lemna perpusilla*. *Ibid.* 47: 586 —587.
- Kandeler, R. 1969. Hemmung der Blütenbildung von *Lemna gibba* durch Ammonium. *Planta* 84: 279—291.
- Kende, H. and B. Baumgartner. 1974. Regulation of aging flowers of *Ipomoea tricolor* by ethylene. *Ibid.* 116: 279—289.
- Ku, H.S., H. Suge, L. Rappaport, and H.K. Pratt. 1970. Stimulation of rice coleoptile growth by ethylene. *Ibid.* 90: 333—339.
- Maeng, J. 1976. Studies on inhibition factors and the role of phytochrome in the floral induction in short-day plants. *Korean J. Bot.* 19: 14—18.
- Musgrave, A., N.B. Jackson, and E. Ling. 1972. *Callitricha* stem elongation is controlled by ethylene and gibberellin. *Nature New Biol.* 238: 93—96
- _____, and J. Walters. 1974. Ethylene and buoyancy control rachis elongation of the semiaquatic fern *Regnillidium diphyllum*. *Planta* 121: 51—56.
- Nitsch, C. 1967. Effects of growth substances on the induction of flowering of a short-day plant in vitro. In: *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*. F. Wightman and G. Setterfield, eds. Runge Press, Ottawa, Canada. p.1385—1398.
- _____, and J.P. Nitsch. 1969. Floral induction in a short-day plant, *Plumbago indica* L., by 2-chloroethanephosphonic acid. *Plant Physiol.* 44: 1747—1748.
- Pieterse, A.H. 1976. Specific interactions in the physiology of flowering and gibbosity of *Lemna gibba* G3. *Plant and Cell Physiol.* 17: 713—720.
- Posner, H.B. 1967. Inhibitory effects of sucrose on flowering in *Lemna perpusilla* 6746 and mutant strain 1073. *Ibid.* 8: 535—539.
- _____. 1969. Inhibitory effect of carbohydrate on flowering in *Lemna perpusilla*. I. Interaction of sucrose with calcium and phosphate ions. *Plant Physiol.* 44: 562—566.
- _____. 1970. Inhibitory effect of carbohydrate on flowering in *Lemna perpusilla*. II. Reversal by glycine and L-aspartate. Correlation with reduced levels of β-carotene and chlorophyll. *Ibid.* 45: 687—690.
- Purves, W.K. 1961. Dark reactions in the flowering of *Lemna perpusilla* 6746. *Planta* 56: 684—690.
- Suge, H. 1971. Stimulation of oat and rice mesocotyl growth by ethylene. *Plant and Cell Physiol.* 12: 831 —837.
- _____. 1972. Inhibition of photoperiodic floral induction in *Pharbitis nil* by ethylene. *Ibid.* 13: 1031—1038.
- _____, and T. Kusanagi. 1975. Ethylene and carbon dioxide: Regulation of growth in two perennial aquatic plants, arrowhead and pondweed. *Ibid.* 16: 65—72.
- Warner, H.L. and A.C. Leopold. 1967. Plant growth regulation by stimulation of ethylene production. *Bioscience* 17: 722.
- _____, and _____. 1969. Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Plant Physiol.* 44: 156—158.
- Yang, S.F. 1969. Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Ibid.* 44: 1203—1204.

(1977년 4월 18일 접수)