

## 버드나무(*Salix koreensis*)懸濁培養細胞의代謝産物<sup>1\*</sup>

朴龍求<sup>2</sup>·申東逸<sup>3</sup>·李相求<sup>2</sup>

### Secondary Products in Cell Suspension Culture of *Salix koreensis*<sup>1\*</sup>

Young Goo Park<sup>2</sup>, Dong Ill Shin<sup>3</sup>, and Sang Goo Lee<sup>2</sup>

#### 要 約

버드나무의 잎으로부터誘導된 callus의懸濁培養은 MS 基本培地에 2,4-D 1.0mg/l와 zeatin 0.1mg/l를添加한液體培地에서生長이 가장 좋았다.液體培地에서 24日間細胞를培養한後分離된培養液은상치, 벼 그리고 피種子の發芽를強하게抑制하여培養中에生理活性物質이形成되는것으로推定되었다.

培養細胞에서는 pyrogallol, sinapic acid, cinnamic acid, tannic+gallic acid 그리고 p-chlorobenzoic acid 등과 같은 여러種類의 phenol 化合物이檢出되어 이들이 강한發芽抑制作用을 하는 것으로思料되었다.

#### ABSTRACT

Cell suspension cultures for *Salix koreensis* was well established at the supplements of 2,4-D with cytokinin particularly the combination of 1.0 mg/l 2,4-D with 0.1 mg/l of zeatin. These combined rates of phytohormones are also effective to callus induction from *S. koreensis* leaf and its multiplication. Cultured media exhibited the great inhibitory effect on the germination of rice, barnyard grass and lettuce seeds, indicating the presence of biologically active substances in media. Several phenolic compounds such as pyrogallol, sinapic acid, cinnamic acid, tannic + gallic and p-chlorobenzoic acid were detected in the cell suspension culture. The inhibitory effect exhibited by cultured media may be partly attributed to these phenolic compounds.

*Key words* : *Salix koreensis* ; cell suspension cultures ; secondary products ; phenolic compounds

Abbreviations : BAP(6-benzylaminopurine), BA(6-benzyladenine), 2iP (2-isopentenyladenine), NAA (1-naphthaleneacetic acid), IAA (indole-3-acetic acid), IBA (indole 3-butyric acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), PCV(packed cell volume), MS(Murashige and Skoog medium, 1962)

· 接受 1989年 3月 20日 Received on March 20, 1989.

<sup>2</sup> 慶北大學校 農科大學 College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea.

<sup>3</sup> Department of Forestry, Michigan Technological University, Houghton, Michigan 49931, U.S.A.

\* 本 研究는 1988年度 慶北大學校 遺傳工學 研究費에 依해 遂行된 것임.

緒 論

地球上에 存在하는 3萬餘種의 植物이 生合成할 수 있는 合成物質은 2萬餘種에 이르며, 每年 1, 500餘 物質이 植物體로부터 抽出 分離되고 있으며 이중 300餘種은 生理活性을 가진 物質로 評價되고 있다(Allan과 Fowler, 1985). 그러나 植物體를 통해 生産되는 活性物質은 特定條件下에서 生長되는 組織이나 生殖器에서 生合成되며 그 含量이 높지 않은 것이 大部分이다. 이러한 物質들의 種類는 phenolic compounds, coumarins, alkaloids, terpenoids 등으로 他植物의 發芽 및 生長과 呼吸, 光合成, 植物 生長調節物質 合成 等的 代謝에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Rice, 1984).

一般的으로 發芽 및 生長抑制 效果가 큰 것으로 알려진 物質은 phenol 化合物인데 Buta와 Lusby(1986)는 *Lespedeza* 種子에서 植物 種子發芽 및 生長을 抑制하는 物質인 catechin과 epicatechin을 동정했으며, Mattew와 Jenney(1984)는 *Eucalyptus pulverulenta*의 MeOH 抽出液 가운데 n-hexan 水溶層에서 分離 동정된 grandiol이 10 ppm濃度에서도 잔디 種子의 發芽를 強力하게 抑制한다고 報告하였다. 또한 Shettel과 Balke(1983)도 相互對立 抑制物質인 phenol이 몇몇 雜草와 作物의 成長을 抑制한다고 報告하였다. 우리나라에서도 徐(1985)는 國內 165個 樹種을 對象으로 水溶性 物質을 抽出하여 植物種子 發芽實驗을 한 結果 소나무, 해송, 전나무, 버드나무, 매죽나무 등 7個 樹種이 강한 抑制 效果를 나타냈다고 報告하였으며, Kil과 Yim(1983)도 소나무에서 benzoic acid를 비롯 11種의 phenol物質이 發芽抑制 作用을 나타낸다고 報告하였다.

生理活性物質들은 대부분이 2次代謝產物로서 生産되는데 近來에 들어와 이들 2次代謝產物에 關한 研究가 物質生産의 則面 뿐만아니라 物質의 生合成 經路, 輸送機作, 特定位置에 貯藏過程, 活用 및 轉換 그리고 觸媒反應 等に 對해서도 細胞, 組織 水準에서 많은 研究가 이루어지고 있다(Luckner, 1980; Luckner 等, 1980; Barz와 Köster, 1981; Wiermann, 1981; Conn, 1984).

組織培養을 통한 有用物質生産에 關한 研究는 特用作物에서 이루어지고 있으며 그중 特定物質은 大量生産段階에 들어간 것도 있다. Furuya와 Ishii(1973)는 人蔘에서 ginsenoside를, Brain(1974)은 *Mucuna pruriens*에서 L-Dopa를 그리고 Tabata 等(1976)은 지치(*Lithospermum erythrorhizon*)에서 naphthoquinone을 細胞培養을 통해서 높은 收率로 生産할 수 있는 方法을 研究하였다. 뿐만아니라 Yamaguchi 等(1986 a, b, c)은 *Eucalyptus* spp.의 callus와 細胞 懸濁培養을 통해 phenolic compound를 分析하고 여러가지 要因에 따른 成分含量의 變化와 蓄積量을 研究報告한 바 있다. 이외에도 Alan 等(1986)은 *Cinchona ledgeriana*의 callus 배양에서 alkaloid 生成에 植物 生長調節物質이 미치는 效果에 對한 報告를 했으며 Anderson 等(1987)은 가중나무의 懸濁細胞培養에서 基本培地에 따라 alkaloid 生成效果가 다르게 나타남을 報告한 바 있다.

버드나무類(*Salix* spp.)는 藥劑인 salicin을 含有하고 있을 뿐만아니라 여러가지 phenol物質을 많이 가지고 있어서 他植物에 影響을 주는 allelopathic 物質을 生産하는 것으로 알려져 왔다(Steele과 Bolan, 1972).

*Salix koreensis*는 우리나라 전역에 自然 分布되어 있으며 습기가 많은 川邊이나 계곡부에서 生長이 매우 빠른 速成樹이다. 또한 比較的 組織培養이 쉬운 수종으로 再分化和 脫分化가 容易한 것으로 알려져 있기 때문에(Bergman 等, 1985) 2次代謝物質 生産에 對한 基礎研究 材料로 選定하였다.

本 研究에서는 버드나무의 懸濁細胞培養을 통한 2次代謝產物의 生産 可能性을 究明하기 위하여 細胞培養 要因에 따라 生成되는 phenol物質을 分離, 同定을 하였다. 本 實驗의 結果는 林木의 2次代謝產物 生産 可能性에 對한 基礎 資料를 提供할 수 있으리라 期待된다.

材料 및 方法

1. 器內 줄기 增殖

慶北大學校 校內에 있는 約 20年生 버드나무의 冬芽가 붙어 있는 當年生 줄기를 採取하여 室內에

서 水耕 挿木을 하여 새순이 자란 다음 約 5cm정도로 切斷하여 70% Et-OH에 30초간, 1% NaOCl로 10分間, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 10分間 表面殺菌後 各各 滅菌水로 3回씩 水洗하고 最終에는 5回 水洗하였다. 消毒된 줄기는 두가지 種類의 cytokinin(BAP, kinetin 各各 0.00, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00 mg/l)이 添加된 MS 培地(sucrose 30g/l, agar 7.5g/l, pH 5.8)에 置床하여 培養하였다. 培養室 溫度는 25±2°C로 유지되었으며 2,000~2,500 Lux의 螢光下에서 16시간의 日長을 주었다.

## 2. Callus 誘起

器內에서 增殖된 줄기에서 1cm 크기에 달한 잎을 切斷하여 內徑 9cm petri-dish에 놓고 針으로 잎 表面에 여러개의 구멍을 뚫어 2,4-D(0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/l)와 4가지 cytokinin (BAP, zeatin, 2ip, kinetin 各各 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l)를 組合한 MS 基本培地에 置床하여 callus 誘起 程度를 觀察하였다. 培養은 25±2°C 暗狀態下에서 實施하였으며 實驗은 3回 反復 實施하였다.

## 3. Callus 增殖

誘起된 callus는 계속적인 生長狀態를 알아보기 위해 callus무게를 90~110mg으로 하여 callus誘起 程度가 良好했던 生長調節物質을 中心으로 2,4-D(0.1, 0.5, 1.0 mg/l)와 4종류의 cytokinin (各各 0.1, 0.5, 1.0 mg/l)을 組合한 培地에 계대 배양하여 4주후에 生長量을 測定하였다. 生長量의 測定은 최종 callus무게에서 처음 callus 무게를 뺀 후 置床當時 callus 무게에 對한 比率로 나타냈다.

## 4. 懸濁細胞培養

增殖된 callus를 內徑 9cm petri-dish에 꺼내어 메스로 잘게 부순다음 生長 調節物質이 添加되지 않은 MS 액체 배지 50ml가 담긴 300ml 삼각 flask에 넣어 gyratory shaker(60 strok/min.)에 일주일간 배양하였다. 培養된 細胞들은 200 $\mu$ m mesh 체로 거른 다음 培養液과 細胞를 遠心管에 넣어 110×g으로 5分間 遠心한 후 2,4-D(1.0

mg/l)와 4種類의 cytokinin(各各 0.1mg/l)을 添加한 MS 액체배지 40ml를 넣은 200ml 삼각 flask에 8ml의 細胞를 添加하여 24日間 分當 60回轉하는 gyratory shaker에서 培養 한 다음 細胞 增殖 樣相을 調査하였다.

培養條件은 25±2°C, 100~200 Lux 散光下에서 60rpm으로 回轉培養하였으며 培養된 細胞의 增殖率은 各 處理區別로 40ml의 懸濁培養液을 일정하게 혼들어 준다음 바로 10ml를 採取하여 15ml 遠心管에 넣고 110×g으로 遠心한 후 packed cell volume을 測定하였다. 測定値는 4倍로하여 生長量을 計算하였다.

## 5. 懸濁細胞培養液의 植物種子 發芽 및 生長 抑制物質 調査

24日間 懸濁培養한 後에 增殖된 細胞와 懸濁液을 여과지로 거른후 分離된 培養液은 直徑 50mm 1回用 petri-dish에 여과지를 깔 후 種子를 넣고 發芽實驗을 하였다. 벼(*Oryza sativa*), 피(*Echinochloa crusgalli*), 상치(*Lactuca sativa*), 배추(*Brassica campestris*) 種子를 30粒씩 넣은 後 培養液을 5ml씩 첨가하여 1주일 뒤에 發芽된 個體數와 發芽個體의 生長狀態를 觀察하였다. 比較 區로 증류수와 MS 基本培地에 生長調節物質 4個 組合(細胞懸濁培養을 하지않은 液體培地)을 使用 하였으며 發芽實驗은 3回 反復하여 平均한 것을 百分率로 表示하였다.

## 6. 培養培地 및 懸濁 培養細胞로부터 phenol 物質의 抽出 및 分析

Phenolic compound의 抽出은 Krygier 等(1982)의 方法을 變形시켜 사용하였다. 먼저 常溫에서 乾燥된 試料 各各 550mg을 50ml Me-OH (70%) : aceton(70%)를 1:1로 混合한 溶液으로 24時間 동안 抽出하여 여과한 후 water phase와 residue phase로 나누워 減壓 농축시켰다. 이 용액에 hexane을 넣어 lipid 成分을 除去한 다음 수용액을 pH2로 調整한 뒤 DE/EA(diethylether/ethylacetate 1:1)로 3回 抽出하고 濃縮시킨 殘餘物을 TMS(Trimethylsilyl acetamide 25% solution in acetonitrile)화 시켜 C.C.(Pye Unicam Series 304 Gas Chromatograph, PM

8251 single pen recorder, Philips)의 分析用 試料로 使用하였다.

Krygiar 變形法에 依한 phenolic compounds의 分劃方法은 그림 1에 나타 냈으며 free, soluble, insoluble fraction으로 나누어 各 分劃의 phenolic compound를 分析하였다. G.C.分析 條件은 表-1과 같다.

**結 果**

**1. 器內 줄기 增殖 및 callus誘起**

BAP와 kinetin을 各各 0.00, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00 mg/l씩 添加한 MS 固體培地에 1 個月間 培養한 試料에서 가장 많은 줄기가 나온 것은 MS+kinetin 0.5mg/l를 添加한 培地로써 5~8개 었다. BAP가 添加된 培地에서도 줄기가 發生하였으나 kinetin 添加 培地보다 低調하였다. 增殖된 줄기는 MS+kinetin 0.1mg/l培地로 옮겼을때 生育이 좋았으며 發根狀態도 良好하였다.

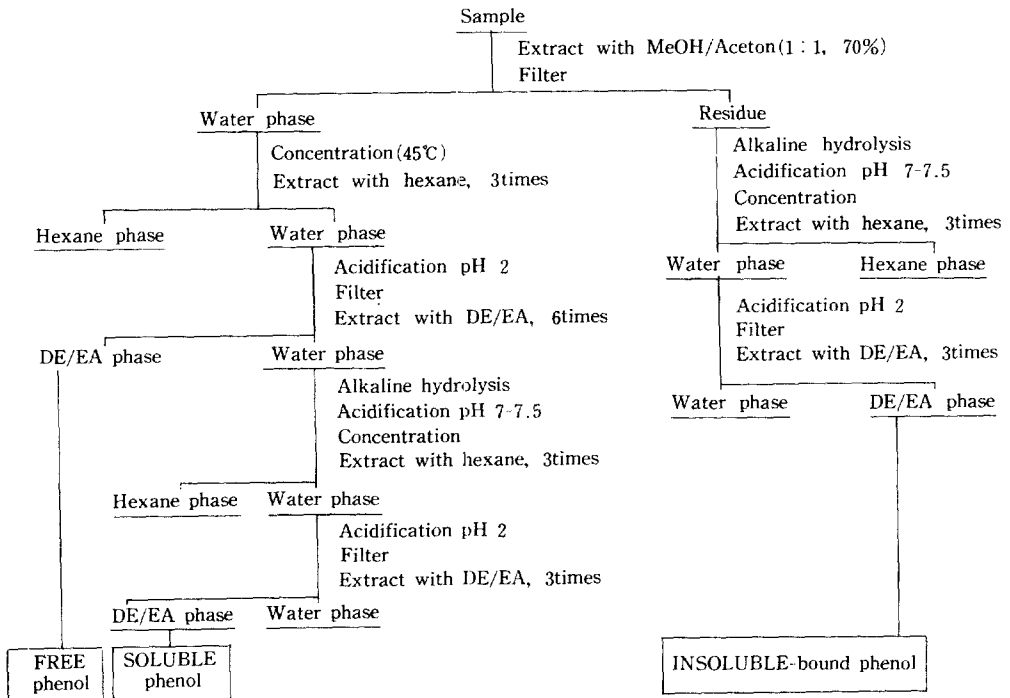
植物生長調節物質을 여러가지 濃度로 組合한 培地에 試料를 置床하여 4週後에 callus 形成 狀態를 調査한 結果는 表 2와 같다.

**Table 1.** The operating conditions of G.C. for phenolic acids analysis in *Salix koreensis*

Items	Conditions
Column	5% SE30 100-120 mesh 4mm I.D. x 1.5, glass
Temp. program	130°C (2min) ... 5°C/min ... 250°C
Detector	F.I.D.
Carrier gas	Nitrogen, 30ml/min
Injection port tempt.	270°C
Detector temp.	280°C

2,4-D와 cytokinin이 添加되지 않은 培地에서 是 callus가 거의 誘起되지 않았거나 誘起된 것도 狀態와 生育이 좋지않았다. 2,4-D와 cytokinin含量이 높을수록 callus誘起 程度와 生長이 裨약하였다. 2,4-D 1.0mg/l와 zeatin 0.1mg/l 組合에서 callus 誘起와 生長이 가장 좋았다. 2,4-D 含量이 높을수록 부서지기 쉬운 callus가 發生되었으며 cytokinin含量이 높을수록 딱딱한 傾向을 나타냈다.

부서지기 쉬운 callus는 透明한 灰色이었으나 딱딱한 callus는 연한 褐色으로 不透明하였다.



**Fig. 1.** Separation and fraction scheme for extracting phenolic acids from *Salix koreensis*

**Table 1.** Effect of 2,4-D and various cytokinins on callus induction from the leaf of *Salix koreensis* cultured *in vitro* for 4 weeks

Growth regulators (mg/l)		Callus induction			
2,4-D	Cytokinin	BAP	Zeatin	Kinetin	2iP
	0.0	-	-	-	-
	0.1	+	+	-	-
	0.5	+	+	+	-
	1.0	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
	0.0	++	++		
	0.1	+	+++ (f)*	+++ (f)	+++ (f)
	0.5	+	+++ (f)	+++ (f)	+++ (c)*
	1.0	+	+++ (c)	++	++
	2.0	+	++	++	++
	0.0	+	++	++	++
	0.1	+++ (f)	+++ (f)	+++ (f)	+++ (f)
	0.5	+++ (c)	+++ (f)	+++ (c)	++
	1.0	++	++	++	+++ (c)
	2.0	+	+	++	++
	0.0	++	+++		
	0.1	+++ (f)	++++ (f)	+++ (f)	++
	0.5	+++ (c)	+++ (f)	+++ (c)	+++ (c)
	1.0	+	+++ (c)	++	+++ (c)
	2.0	+	++	++	+++
	0.0	+	++	++	++
	0.1	++	+++ (f)	++	++
	0.5	+++ (f)	+++ (f)	++	++
	1.0	+	+++ (c)	++	++
	2.0	+	++	++	++
	0.0	+	++	++	+
	0.1	++	++	+	+
	0.5	+	++	+	+
	1.0	+	+	+	-
	2.0	+	+	+	-

\* f : friable, c : compact

- : no response, + : little, ++ : moderate, +++ : good, ++++ : excellent

## 2. Callus 增殖 및 細胞懸濁培養

callus 增殖 및 生長을 調査하기 위해 90~110 mg의 callus를 調査培地에 置床하여 4주후에 生重量을 測定한 結果는 그림 2와 같다.

가장 좋은 反應을 나타낸 組合은 2,4-D 1.0 mg/l와 zeatin 0.1mg/l에서 約 2.6배의 增殖率을 나타냈다. 平均 2배 以上の 좋은 增殖을 나타낸 것은 BAP와 zeatin 0.1mg/l를 添加한 組合들에서 이다.

한편 BAP와 zeatin組合 培地에서 callus 生長이 良好하였으나 kinetin의 경우 0.1mg/l를 除外

하고는 callus生長이 不良 하였다. 2ip組合은 全體의 所以로 callus生長이 低調하였다.

以上の 結果에서 細胞 增殖에 알맞는 cytokinin의 濃度는 낮을 수록 效果가 크며 2,4-D의 濃度는 大體의 所以로 0.5~1.0 mg/l 사이가 좋다는 것을 알 수 있었다.

그림 3은 植物生長 調節物質이 여러 가지 濃度로 添加된 液體懸濁培地에 24日間 培養한 懸濁細胞의 增殖 樣相을 나타낸 것이다.

細胞生長 週期는 처음 2日동안 lag phase, 2日부터 6日사이가 linear phase, 6日부터 12日사이가 細胞增殖이 가장 旺盛한 exponential phase,

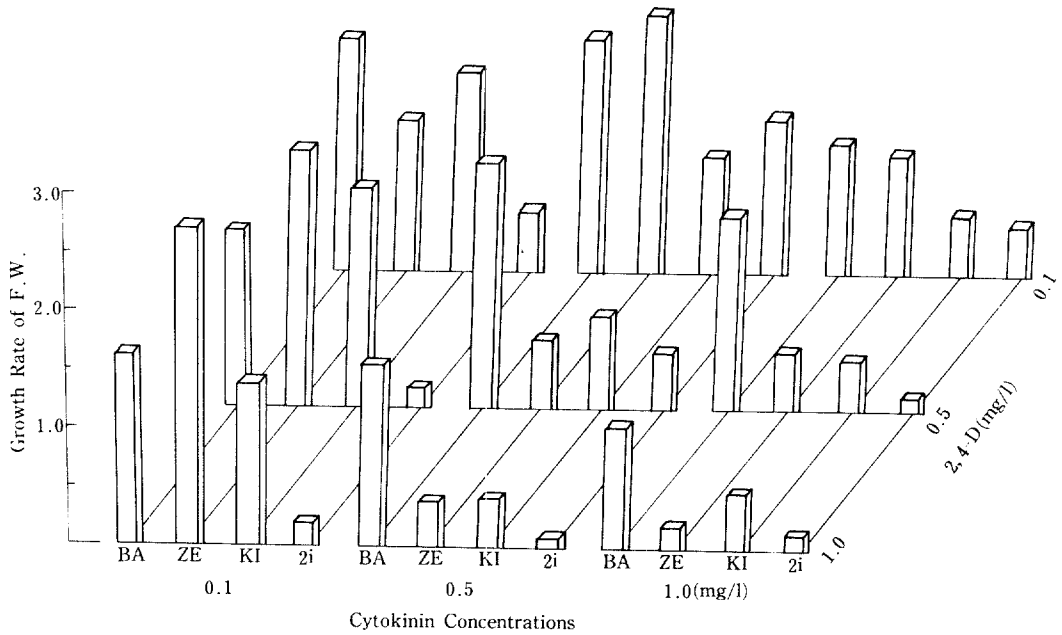


Fig. 2. Effect of cytokinins and 2,4-D on callus growth of *Salix koreensis* cultured *in vitro* for 4 weeks; BA(BAP), ZE(Zeatin), KI(Kinetin), 2i(2iP)

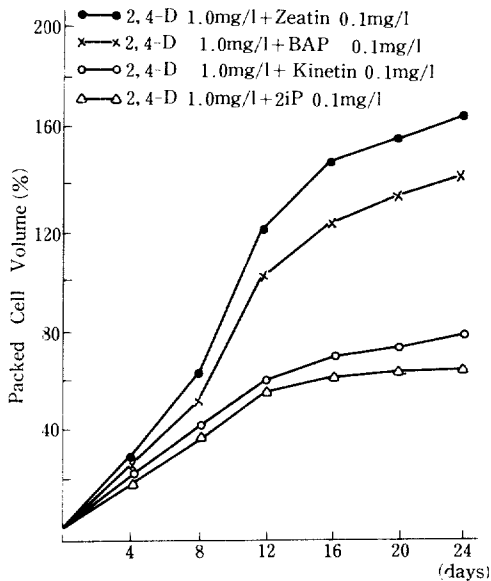


Fig. 3. The increment of cell volumes according to 2,4-D and various cytokinins combination in suspension culture of *Salix koreensis*

12日以後는 細胞 增殖이 거의 둔화된 stationary phase로 나타났다.

添加된 生長調節物質別로 나누워 볼때 가장 좋

은 生長을 나타낸 組合은 2,4-D 0.1+ zeatin 0.1 mg/l이었다. 이 組合에서는 接種當時의 細胞量보다 培養 24日 동안에 約 160% 以上の 增加率을 보였다. BAP組合은 zeatin組合보다 生長이 낮았으나 큰차이가 없었다. 그러나 kinetin 0.1 mg/l와 2iP 0.1 mg/l 組合에서는 zeatin이나 BAP 組合보다 約 1/2程度의 生長을 나타냈다. 이러한 結果는 callus誘起 및 生長의 경우와 비슷한 傾向을 보이고 있다.

### 3. 懸濁細胞培養液의 植物種子 發芽 및 生長 抑制 物質 分析

24日 동안 懸濁培養한 培養液을 遠心하여 細胞와 培養液을 分離하여 培養液에 對한 배추, 상치, 벼, 피種子 發芽에 미치는 영향을 調査한 結果는 表 3과 같다.

2,4-D 1.0+BAP 0.1 mg/l를 組合한 培地에서는 어느 수종이나 發芽 및 生長抑制 效果가 나타나지 않았으나 2,4-D 1.0에 zeatin이나 kinetin 또는 2iP를 各各 0.1mg/l 씩 添加한 培地에서는 배추를 除外한 상치, 벼, 피種子的 發芽를 심하게 抑制하였다. 特히 2iP 添加區에서는 벼, 피 종자를, kinetin 添加區에서는 벼 種子的 發芽를 심하

**Table 3.** Germination rate of testing plant species affected by cultured suspension medium

Species	Treatments	Germination rate(%)								
		Control medium***					Cultured medium***			
		D.W.**	BAP	Zeatin	Kinetin	2iP	BAP	Zeatin	Kinetin	2iP
			0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1(mg/l)
<i>Brassica campestris</i>		94.1 <sup>a*</sup>	88.0 <sup>a</sup>	85.3 <sup>a</sup>	78.3 <sup>a</sup>	83.5 <sup>a</sup>	98.0 <sup>a</sup>	92.0 <sup>a</sup>	82.9 <sup>a</sup>	90.0 <sup>a</sup>
<i>Lactuca sativa</i>		61.9 <sup>a</sup>	78.6 <sup>a</sup>	65.4 <sup>a</sup>	73.2 <sup>a</sup>	81.3 <sup>a</sup>	58.9 <sup>a</sup>	12.9 <sup>b</sup>	3.7 <sup>b</sup>	4.8 <sup>b</sup>
<i>Oryza sativa</i>		75.0 <sup>a</sup>	82.3 <sup>a</sup>	83.1 <sup>a</sup>	78.1 <sup>a</sup>	76.2 <sup>a</sup>	62.7 <sup>b</sup>	28.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>
<i>Echinochloa crusgalli</i>		95.0 <sup>a</sup>	58.1 <sup>a</sup>	80.4 <sup>a</sup>	79.1 <sup>a</sup>	65.4 <sup>a</sup>	84.1 <sup>a</sup>	14.1 <sup>b</sup>	14.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>

\* Values followed by different letters are significantly different at P=0.05

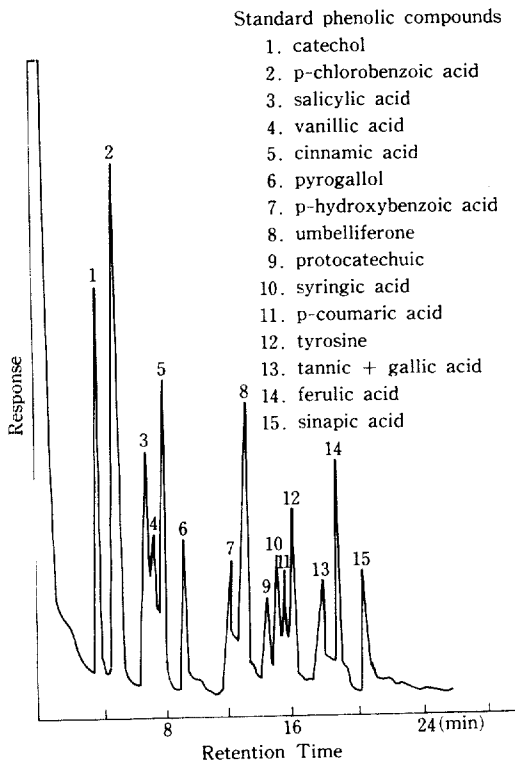
\*\* Distilled Water

\*\*\* Fixed 2,4-D concentration with 1.0mg/l

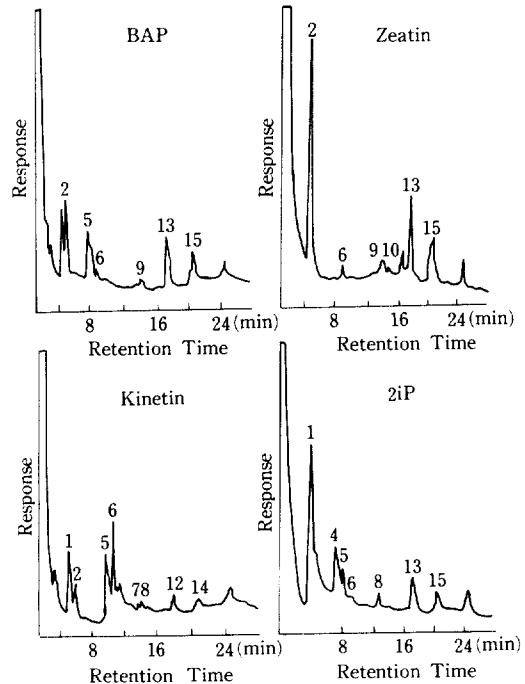
게 抑制하였다.

Krygier分劃方法으로 抽出한 후 回轉減壓 濃縮器를 利用하여 조제한 試料를 TMS化하여 標準物質 15가지(그림 4)와 比較 했을때 free 分劃에서는 그림 5, soluble 分劃에서는 그림 6, insoluble 分劃에서는 그림 7과 같은 結果를 얻었다.

free fraction의 경우에는 2,4-D와 kinetin 組合에서 가장 많은 phenolic compounds가 檢出되었



**Fig. 4.** G. C. chromatogram of TMS derivative of standard phenolic compounds



**Fig. 5.** G.C. chromatograms of TMS derivatives of phenolic compounds extracted from dried suspension cells of *S. koreensis* (Free)

으며 BAP 組合과 zeatin 組合에서는 p-chlorobenzoic acid가 kinetin 組合에서는 pyrogall이 그리고 2iP組合에서는 catechol의 含量이 높은 것으로 나타났다.

Soluble fraction에서는 BAP 組合에서 8種類의 phenol物質이 檢출되었으며 zeatin組合에서는 4종류, kinetin 組合에서는 3種類 그리고 2iP組合에서는 6種類의 phenol物質이 同定되었다. BAP

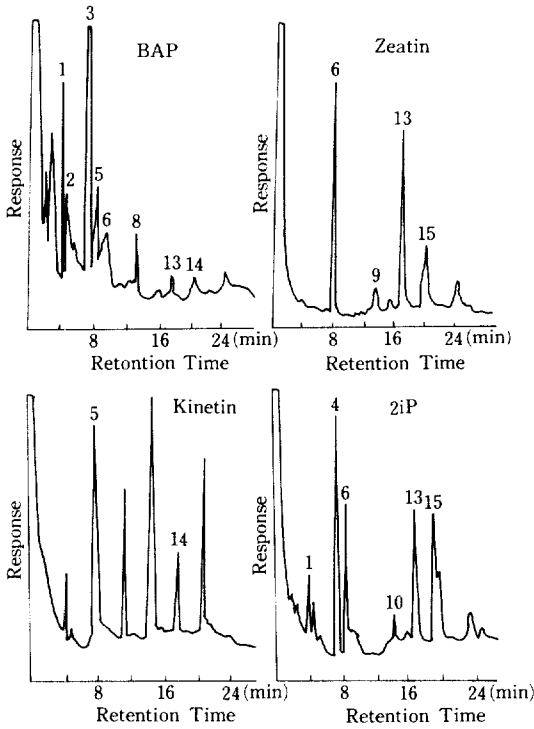


Fig. 6. G.C. chromatograms of TMS derivatives of phenolic compounds extracted from dried suspension cells of *S. koreensis* (Soluble)

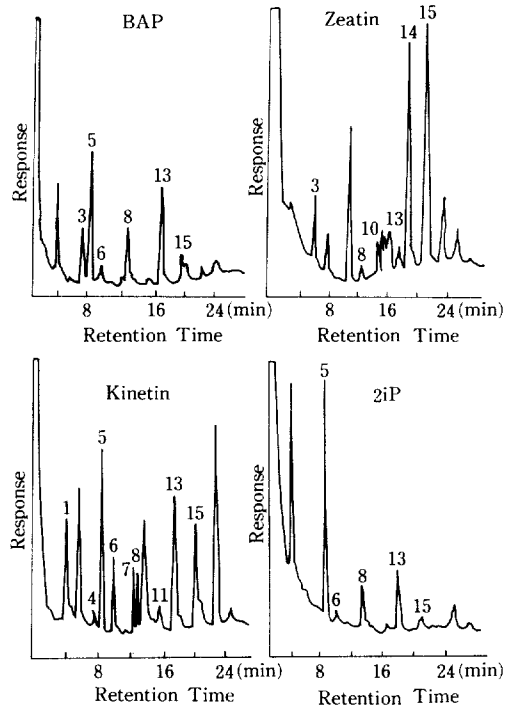


Fig. 7. G.C. chromatograms of TMS derivatives of phenolic compounds extracted from dried suspension cells of *S. koreensis* (Insoluble)

組合에서는 salicylic acid, zeatin 組合에서는 pyrogallol이, kinetin 組合에서는 syringic acid 가 그리고 2iP 組合에서는 vanillic acid 含量이 높은 것으로 나타났다.

Insoluble fraction에서는 free, soluble fraction에서 나타난 phenol 종류보다 더 많은 종류가 검출되었는데 kinetin 組合의 경우 catechol을 비롯하여 8종류, zeatin 組合의 경우에도 salicylic acid 外 8종류의 phenol 物質이 檢出되었다.

以上の 結果에서 cinnamic acid, pyrogallol, tannic과 gallic acid 그리고 sinapic acid는 fraction 別 또는 生長調節物質 添加에 따른 영향을 크게 받지 않는 것으로 나타났으나, salicylic acid, P-chlorobenzoic acid, procatechuic, syringic acid, p-coumaric acid 그리고 tyrosine, ferulic acid 등은 fraction과 生長調節物質 添加에 따라 含量과 出現頻도에 差異를 나타냈다.

### 考 察

植物의 懸濁培養에 의한 有用 2次代謝產物 生産을 爲해서는 對象 植物 組織에서 callus를 誘起시켜 懸濁 細胞 培養技法을 確立해야 한다. 懸濁 細胞培養時 培養方法이나 條件에 따라 物質生産量과 質에 對한 差異가 크게 나타난다 (Yamaguchi 等, 1986c). 그러므로 確立된 技法중 어떤 환경하에서 培養된 細胞에서 有用代謝物質이 가장 많이 生産되는 가를 밝혀내야 한다.

器內에서 버드나무 multiple shoot를 誘導할 때에는 kinetin 0.5mg/l 만 添加한 MS培地에서 좋은 反應을 나타냈으며, callus誘起나 增殖에서는 2,4-D에 BAP나 zeatin을 組合한 培地에서 좋은 反應을 나타냈다. Bergman 等(1985)은 *Salix* spp.의 기내줄기 生長과 側芽形成에 BA가 미치는 영향을 조사한 결과 shoot multiplication의 最適농도는  $5 \times 10^{-7} \sim 10^{-6}$ 이라고 보고하였다.

포플러류의 multiple shoot誘起는 大部分의 樹



種에서 BAP添加 효과가 크게 나타났다(Park과 Son, 1986, 1988). 이와 같은 差異는 樹種에 따라 植物生長調節物質의 要求量에 큰 差異가 있기 때문으로 생각된다.

버드나무의 callus유기 및 增殖에 있어서 계대배양 期間이 重要な 因子로 作用하였다. 계대배양 期間이 길 때에는 callus生長이 현저히 低下되었는데 이것은 培養細胞에서 分泌되는 生長抑制物質에 起因하는 것으로 생각된다. Yamaguchi 등(1986b)은 植物生長調節物質에 따른 phenol物質 生産량이 유카리 callus生長에 큰 영향을 미친다고 報告하였다.

懸濁培養液의 種子發芽實驗 結果 培養液에 添加된 植物生長調節物質에 따라 差異는 있으나 大部分의 樹種에 對한 種子發芽抑制 效果를 나타내고 있어서 發芽및 生長抑制 物質이 包含되어 있다고 推測할 수가 있었다.

Kim 등(1987)은 *Salix koreensis*의 葉抽出液이 다른 樹種의 種子發芽를 抑制한다고 보고한 바 있다. Brown(1974)은 *Salix pellita*의 葉抽出液이 比較區인 Jack pine 種子發芽率 82% 보다 현저히 낮은 9% 밖에 받아시키지 못했으며, *Prunus pumila*와 *Prunus serotina*의 葉抽出液도 Jack pine 種子發芽를 심히 억제 한다고 報告하였다.

버드나무懸濁培養細胞의 G.C.에 依한 物質分析 結果 많은 種類의 phenol物質이 檢出되었으며 대부분의 phenol은 水溶性이므로 버드나무의懸濁培養液속으로 溶出되어 다른 수종의 種子發芽및 生長을 抑制하는 것으로 유추된다.

Demos 등(1975), Koch와 Wilson(1977)과 Patterson 등(1981)은 ferulic, cinnamic 그리고 gallic acid가 全體 植物의 光合成과 미토콘드리아의 呼吸을 抑制 한다고 報告하였으며, Nicolier와 Thompson(1982)은 coumarin이 대부분의 aromatic acid와 flavonoid 보다 심하게 植物의 生長을 抑制 한다고 하였다. Van Sumere 등(1972)과 Reynolds(1987)는 cinnamic과 gallic acid가 상치 種子的 發芽를 크게 억제한다고 하였으며 Kock와 Wilson(1977)은 ferulic acid가 mung bean의 hypocotyl生長을 抑制한다고 報告하였다.

本實驗에서는 2, 4-D(1.0mg/l) 單用과 4가지 cytokinin(각 0.1mg/l)를 組合한 液體培養液을

使用하여 種子發芽抑制 效果를 얻었으며 phenol物質分析 結果 添加된 植物生長調節物質 種類에 따라 分離된 物質의 種類와 量이 各各 다르게 나타났다. 이러한 物質의 種類와 量이 다르기 때문에 抑制效果도 各各 差異가 나타난 것으로 推定할 수 있었다.

Yamaguchi 등(1986b)은 *Eucalyptus robusta*의 callus培養에서 植物生長調節物質의 種類와 濃도에 따라 callus生長 뿐만아니라 phenol物質의 含量에 變化가 크게 나타난다고 하였으며 Dougall(1979)은 特異한 化合物質의 生成이 培養細胞에서 intact plant보다 낮은 理由는 영양계 변이(clonal variation)와 培養條件에 따른 差異일 것으로 推定하였다. Wescott와 Henshaw(1976)은 단풍나무懸濁培養細胞에서 tannin蓄積은 細胞增殖曲線 마지막 段階에서, 유카리懸濁培養細胞에서도 培養後期에 tannin生成이 많이 되는 것으로 報告하였다(Yamaguchi 등, 1986c).

本研究材料인 버드나무의懸濁細胞에 對한 物質分析 結果 培養條件에 따라 生産物質 種類와 量에 差異가 있음을 밝혀졌으나 이들 物質가운데 어느 것들이 種子發芽 및 生長抑制에 關與하는지는 앞으로 더 많은 研究가 進行되어야 밝혀질 것으로 期待된다.

## 引用文獻

1. Allan, E.J. and M.W.Fowler. 1985. Biologically active plant secondary metabolites perspectives for the further. Chemistry and Industry pp.408-410.
2. Alan, H., S.P.Moris and E.J.Allan. 1986. The effect of plant growth and alkaloid formation in *Cinchona ledgeriana* callus culture. J. Plant Physiol. 124 : 371-377.
3. Anderson, L.A., M.F.Roberts and J.D. Phillipson. 1987. Studies on *Ailanthus altissima* cell suspension cultures. The effect of basal media on growth and alkaloid production. Plant Cell Reports 6 : 239-241.
4. Barz, W. and J.Köster. 1981. Turnover and degradation of secondary(natural) products. In "The Biochemistry of Plants" (E.E.Conn.

- ed.) 7 : 35-84. Academic Press, New York.
5. Bergman, L., S.V. Arnol and T. Eriksson. 1985. Effects of N-benzyladenin on shoots of five willow colnes(*Salix* spp.) cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4 : 135-144.
  6. Brain, K.R. 1974. Accumulation of L-Dopa in culture from *Mucuna pruriens*. Abst. 3rd Inter. Congr. Plant Tissue Culture, Liecester, No.73.
  7. Brown, R.T. 1967. Influence of naturally occurring compounds on germination and growth of jack pine. *Ecology* 48 : 542-546.
  8. Buta, J.G. and W.R. Lusby. 1986. Catechins as germination and growth inhibitors in *Lespedeza* seeds. *Phytochem.* 25 : 93-95.
  9. Conn, E.E. 1984. Compartmentation of secondary compounds. Pages 1-28 *in* A.M. Bondet, G. Alibert., G. Marigo and P.J. Lea eds. *Membranes and Compartmentation in the Regulation of Plant Functions*. Oxford Univ. Press(Clarandon), London and New York.
  10. Demos, E.K., M. Woodwine, K.H. Wilson and C. McMillan. 1975. The effects of ter. phenolic compounds on hypocotyl growth and mitochondrial of mung bean. *Am. J. Bot.* 62 : 97-102.
  11. Dougall, D.K. 1979. Factors affecting the yields of secondary products in plant tissue cultures. Pages 727-745 *in* W.R. Sharp, P.O. Larsen, E.F. Paddock & V. Raghavan eds. *Plant Cell and Tissue Cultures - Principles and Applications*. Ohio State Univ. Press, Columbus.
  12. Furuya, T. and T. Ishii. 1973. The manufacturing of panax plant tissue culture containing crude saponins and crude sapogenins which are identical with those of natural panax roots. Japan. Patent Appl. No. 48. 31917.
  13. Kil, B.S. and Y.J. Yim. 1983. Allelopathic effect in *Pinus densiflora* on under growth of red pine forest. *J. Chem. Ecology* 9(8) : 1135-1151.
  14. Kim, K.U., Y.G. Park and S.H. Kwak. 1987. Development of useful secondary product through plant cell culture. *Bulletin of Institute of Genetic Engineering* 2 : 17-25.
  15. Koch, S.J. and R.H. Wilson. 1977. Effects of phenolic acids on hypocotyl growth and mitochondrial respiration in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Ann. Bot.* 14 : 1091-1092.
  16. Krygier, K.F., F. Sosulski and L. Hogge. 1982. Free, esterified and insoluble bound phenolic acids. I. Extration and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.* 30 : 330-334.
  17. Luckner, M. 1980. Expression and control of secondary metabolism. In "Encyclopedia of Plant Physiology, New Series" (E.A. Bell and B.V. Charlwood, eds.) 8 : 23-63. Springer-Verlag, Berlin and New York.
  18. Luckner, M., B. Piettrich and W. Lerbs. 1980. Cellular compartmentation and channeling of secondary metabolism in microorganisms and higher plants. *Prog. Phytochem.* 6 : 103-142.
  19. Mattew, L.B. and B. Jenny. 1984. Germination inhibitor from *Eucalyptus pulverulenta*. *Agric. Biol. Chem.* 48 : 373-376.
  20. Nicolier, G.F. and A.C. Thompson. 1982. Phytotoxic compounds from *Melilotus alba* (white sweet colver) and isolation and identification of two new flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 30 : 760-764.
  21. Park, Y.G. and S.H. Son. 1988. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* x *P. maximowiczii*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 15 : 95-105.
  22. 朴龍求·孫聖鎬. 1986. 이테리포푸라 I-214 葉內組織에서 原形質體分離에 미치는 몇가지 要因. *韓國林學會誌* 74 : 29-36.
  23. Patterson, D.T. 1981. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of soybean (*Glycine max*). *Weed Sci.* 29 : 53-59.
  24. Reynolds, T. 1987. Comparative effects of

- aromatic compounds on inhibition of lettuce fruit germination. *Ann. Bot.* 42 : 419-422.
25. Rice, E.L. 1984. Allelopathy. Academic Press, Inc. New York pp.267-291.
  26. 徐丙秀. 1985. 매죽나무 葉內含有物質이 砂防草類의 發芽抑制에 미치는 影響. 全北大學校 大學院 博士論文 pp1-31.
  27. Shettel, N.L. and N.E.Balke. 1983. Plant growth response to several allelopathic chemicals. *Weed Sci.* 31 : 293-298.
  28. Steele, J.W. and M.Bolan. 1972. *J. Chromatog.* 71 : 427. page 53. 천연물 화학연구법에서 인용. 두원식 민음사(1984)발행.
  29. Tabata, M., H.Mizukami, N.Hiraoka, and M.Konoshima. 1976. The production and regulation of shikonin derivatives in cultured cells. *Abst. 12th Phytochem. Symp. Kyoto, Japan* pp.1-8.
  30. Tabata, M., H.Mizukami, N.Hiraoka, and M.Konoshima. 1974. Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* 13 : 927-932.
  31. Van Sumere, C.F. J.Cotrenin, J.Degreet and, J.Kint. 1972. Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occurring coumarin and phenolics. *Recent Adv. Phytochem.* 4 : 165-221.
  32. Wescott, R.J. and G.G.Henshaw. 1976. Phenolic synthesis and phenylalanine activity in suspension culture of *Acer pseudoplatanus* L. *Planta* 131 : 67-73.
  33. Wiermann, R. 1981. Secondary plant products and cell and tissue differentiation. In "the Biochemistry of Plants". (E.E.Conn.ed.) 7 : 85-116 Academic Press, New York.
  34. Yamaguchi, T., T.Fukuzumi, and T.Yoshimoto. 1986a. Phenolics of tissue cultures from *Eucalyptus* spp. I. Analysis of phenolics in callus of *Eucalyptus robusta*. *Mokuzai Gakkaishi* 3 : 203-208.
  35. Yamaguchi, T., T.Fukusumi, and T.Yoshimoto. 1986b. Phenolics of tissue cultures from *Eucalyptus* spp. II. Effects of phytohormones on phenolic accumulations in callus of *Eucalyptus robusta*. *Mokuzai Gakkaishi* 3 : 209-212.
  36. Yamaguchi, T., T. Fukuzumi and T.Yoshimoto. 1986c. Phenolics of tissue cultures from *Eucalyptus* spp. III. The influence of inorganic elements and sucrose on the growth, phenolic accumulation and composition of *E. polybracteas* suspension cultures. *Mokuzai Gakkaishi* 3 : 336-372.