

에틸렌 作用抑制劑가 明日葉의 植物體 再分化에 미치는 影響

李重浩·權泰午·南宮承泊·朴炳雨*

Effect of Ethylene Inhibitors on Plant Regeneration of *Angelica keiskei* Koidz

Joong-Ho Lee, Tae-Oh Kwon, Seung-Bak Namkoong and Byung-Woo Park*

ABSTRACT : This study was carried out to increase the rate of plant regeneration from embryogenic callus of *A. keiskei* on MS medium supplemented with ethylene inhibitors. When leaflet, petiolule, and petiole of *A. keiskei* were cultured on MS medium supplemented with 2, 4-D, callus was well induced from leaflet segments at 2.0 ppm 2, 4-D. Shoot elongation of plantlets and shooting from embryogenic callus of *A. keiskei* were best on 2, 4-D-free medium supplemented with 2 ppm AgNO_3 or 10 ppm $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, but it was suppressed on the medium containing 1 ppm 2, 4-D with AgNO_3 or $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Root elongation of plantlets from embryogenic callus was best on 2, 4-D-free medium supplemented with 1 ppm AgNO_3 or 5 ppm $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, but rooting from embryogenic callus was none on the medium containing 1 ppm 2, 4-D with AgNO_3 or $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Fresh weight of plantlets from embryogenic callus was heaviest on 2, 4-D-free medium supplemented with 2 ppm of AgNO_3 or $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, while it was heaviest on the medium containing 1 ppm 2, 4-D with 1 ppm AgNO_3 or 2 ppm $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Key words : *Angelica keiskei* Koidz, Plant regeneration, Ethylene inhibitor, AgNO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

緒 言

明日葉(神仙草)은 漢方藥의 중요한 생약제인 日當歸, 참당귀(土當歸), 羌活, 智異羌活, 日川芎 등과 같이 미나리(繖形科 *Angelica*屬)의 多年草에 속하는데, 草長이 1 m 정도이며, 지상부위와 지하부위를 모두 이용하고 있고, 全草에 chalcone 誘導

體인 黃汁을 함유하는 것이 특징이며¹⁶⁾, 게르마늄(Ge) 함량이 많은 것으로 알려져 있고^{6, 8, 12, 15)}, 암¹⁷⁾ 및 혈액정화 등에 효과가 우수하다고 하여 최근 건강식품으로 각광을 받고 있다. 繖形科에 속하는 藥用植物에는 他殖性이 강한 것이 많아 종자번식을 할 경우 個體變異가 심하여 수량 및 성분의 不均一性이 문제가 된다. Miura 등¹³⁾은 日當歸에서 懸濁培養을 통하여 재분화된 식물체는 의학적으로 중

* 圓光大學校 農學科 (Dept. of Agronomy, Wonkwang Univ., Chonbuk 570-749, Korea)

< '97. 2. 24 접수 >

요한 화학성분에 있어서 종자로 번식한 식물들보다 균일함을 밝혔다. 따라서 組織培養의 기술을 이용하여 동일한 유전자형을 지닌 계통을 대량으로 증식, 재배함으로써 이러한 문제의 해결이 가능하리라 생각된다. 오옥신은 캘러스유도에는 필수적이나, 植物體 再分化에는 역효과를 주는 경우가 많기 때문에 재분화 배지에는 오옥신의 농도를 줄이거나 첨가하지 않는데, 그 이유는 오옥신은 에틸렌의 內的(endogenous) 생산을 강하게 도모하기 때문이다²³. 반면 新梢分化하는 캘러스는 新梢分化를 못하는 캘러스보다 에틸렌 전구물질인 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)가 현저하게 적게 內在하므로 에틸렌을 적게 방출한다⁵. Ag⁺이 강한 에틸렌 作用抑制劑라는 사실은 1976년 에틸렌의 작용으로 생기는 콩 幼植物의 황화, 목화의 낙엽 및 낙화 촉진 및 양란에서 꽃의 노화 등이 AgNO₃ 첨가에 의해 둔화 또는 억제되는 것을 밝힘으로서 알게 되었다¹¹. 에틸렌은 식물의 성장과 발달 단계에 다양한 영향을 미치는 호르몬으로, 에틸렌 작용억제제가 再分化를 촉진한다는 연구로는 밀과 *Nicotiana plumbaginifolia*에서 AgNO₃ 처리¹⁶, 밀과 *triticale*에서 CuSO₄와 AgNO₃ 처리²⁰, 眞珠粟(pearl millet)에서 O-acetyl salicylic acid, NiCl₂, CoCl₂ 및 AgNO₃ 처리¹⁸, 옥수수에서 ACC, AgNO₃ 및 norbornadiene 처리²², *Brassica*속에서 AgNO₃와 AVG 처리²¹, 당근에서 CoCl₂와 NiCl₂ 처리²⁴ 등의 보고가 있는 반면, 에틸렌 作用抑制劑에 의해 再分化가 억제된다는 연구는 *petunia*에서 CoCl₂와 AgNO₃를 처리¹¹, 들깨에서 AgNO₃를 처리²⁷한 보고 등이 있다. 明日葉에 있어 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 관한 研究^{2,9,15}는 있지만, 본 실험에서는 2,4-D를 처리하여 유도된 캘러스로부터 식물체 재분화율을 높이기 위하여 에틸렌 작용억제제인 AgNO₃와 CoCl₂·6H₂O를 처리하였던 바 약간의 결과를 얻었기에 보고한다.

材料 및 方法

본 實驗에 사용한 供試品種은 全北 益山市 圓光大學校 農學科 圃場에 栽植된 2년생 明日葉(*Angelica keiskei* Koidz)을 사용하였다. 供試材料

의 조제 및 배양조건은 잎이 전개되기 전에 小葉을 채취한 후, 75% 에탄올에 10 초간 浸漬한 다음 0.3% sodium hypochlorite 용액으로 10 분간 소독한 후, 滅菌水로 3회 세척하고 2×3 mm의 절편을 만들어 사용했다. 培地는 MS (Murashige and Skoog)¹⁴ 배지에 sucrose 3%, agar 0.8% 및 기타 처리별 試藥을 첨가한 후 pH 5.7이 되게 조절하였고, 고압증기멸균기로 120℃에서 20분간 살균하여 시험관 (2.2 × 15.0 cm)에 15 ml씩 분주했다. 캘러스誘導는 2,4-D 1.0~2.0 ppm이 첨가된 배지에 4월 중순 시험관당 2 切片을 치상하여 5주간 암배양하였고, 캘러스增殖은 2,4-D 2.0 ppm이 첨가된 배지에서 유도된 캘러스를 4주간 암배양하였다¹⁵. 明日葉의 캘러스誘導에 미치는 영향을 검토하기 위해 小葉, 小葉柄 및 葉柄을 2,4-D 농도(0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ppm)를 달리한 MS배지에 4월 중순 치상하여 5주간 암배양한 후 캘러스 유도율을 조사했다. 캘러스로부터 식물체 재분화 능력을 조사하기 위하여 小葉에서 由來된 캘러스를 2,4-D 2.0 ppm이 첨가된 배지에 4주간 계대배양한 후, 증식된 캘러스를 6월 하순 AgNO₃ 또는 CoCl₂·6H₂O (0, 1, 2, 5, 10, 25 ppm)에 2,4-D (0, 1 ppm)를 달리한 MS배지에 10반복 치상하고, 7주간 명배양(1,500 lux 백색형광등 하의 16 시간 明/8 시간 暗)한 후 재분화된 新梢의 발생 빈도를 조사하였고, 小植物體의 신초 및 뿌리의 길이와 무게를 측정하였다.

結果 및 考察

2,4-D의 농도를 달리한 MS배지에서 明日葉의 부위별 캘러스 유도율을 조사한 결과는 표 1과 같다. 부위별로는 小葉 切片에서 제일 잘 유도되었고, 小葉柄과 葉柄 간에는 큰 차이가 없었다. 小葉 切片의 경우 2,4-D 2.0 ppm이 첨가된 배지에서 캘러스 유도율이 75.0%로 가장 양호하였으며, 小葉柄과 葉柄의 절편도 2,4-D 1.0~2.0 ppm에서 유도율이 비교적 높은 편이었다. 명일엽의 캘러스는 엽은 갈색을 띠었다. 明日葉에서 캘러스 유도는 MS배지에 NAA 첨가가 2,4-D보다 좋았지만, 胚發生 캘러스 빈도와 체세포배발생에는 2,4-D가 효

과적이라고 하였으며^{2,15)} 또한 이 등¹⁰⁾은 배추의 자엽 및 엽병의 절편을 2,4-D 0.5 ppm과 kinetin 1.0 ppm이 첨가된 MS배지에 치상했을 때 배발생 캘러스가 잘 발생했다고 한다.

Table 1. Effect of 2,4-D on the rate of callus induction from leaflet, petiolule, and petiole of *Angelica keiskei* at 5 weeks after culture.

2,4-D (ppm)	Explant source		
	Leaflet	Petiolule	Petiole
	-----%-----		
0.0	0	0	10.0
0.5	22.2	25.0	44.4
1.0	60.0	40.0	50.0
2.0	75.0	50.0	33.3
4.0	55.0	25.0	30.0

Table 2. Effects of 2,4-D, AgNO₃ and CoCl₂·6H₂O on shooting from embryonic callus of *Angelica keiskei* at 7 weeks after culture.

2,4-D (ppm)	AgNO ₃ (ppm)						CoCl ₂ ·6H ₂ O (ppm)				
	0	1	2	5	10	25	1	2	5	10	25
0	+	++	+++	++	++	++	+	++	++	+++	+
1	+	++	++	+	+	+	+	+	++	++	+

+ : poor, ++ : moderate, +++ : good

眞珠粟 (pearl millet) 의 胚發生 캘러스에 에틸렌 작용억제제인 O-acetyl salicylic acid, NiCl₂, CoCl₂ 및 AgNO₃를 처리하였던 바 AgNO₃ 10 ppm 처리가 식물체 재분화에 있어 다른 처리보다 약 3배의 효과를 보였으며¹⁸⁾, 옥수수에서는 AgNO₃ 17.0 ppm (100 μM)을 배지에 첨가한 경우 캘러스로부터 식물체 재분화는 12배의 효과가 있었고²²⁾, *Brassica campestris*에서도 子葉의 절편에 AgNO₃ 17.0 ppm을 처리한 경우 무처리보다 6배의 재분화율을 나타냈으나 비정상적 신초발생이 많았으며¹⁰⁾, 子葉과 下胚軸의 절편에 AgNO₃ 0.8~5.1 ppm (5~30 μM)을 처리한 경우 현저히 높은 재분화율을 나

에틸렌 작용억제제와 2,4-D를 처리한 배지에서 明日葉의 胚發生 캘러스로부터 7주간 명배양한 후 新梢의 발생 정도를 조사한 결과는 표 2와 같다. 新梢의 발생은 2,4-D를 첨가하지 않을 경우 AgNO₃는 2 ppm, CoCl₂·6H₂O는 10 ppm 처리에서 제일 많았는데, AgNO₃는 25 ppm까지 양호한 반면 CoCl₂·6H₂O는 25 ppm에서 급격히 떨어졌다. 2,4-D 1 ppm을 첨가하면 AgNO₃나 CoCl₂·6H₂O의 모든 처리구에 있어, 2,4-D 무처리보다도 新梢의 발생이 억제되었다. 따라서 에틸렌 작용억제제인 AgNO₃나 CoCl₂·6H₂O에 2,4-D를 첨가하면, 에틸렌 작용억제제의 단독처리보다 신초의 발생이 억제되며, 에틸렌 작용억제제의 신초발생 효과는 AgNO₃가 CoCl₂·6H₂O보다 크다는 것을 알 수 있었다.

타내었다³⁾. 또한 당근에서는 CoCl₂ 1.3~6.5 ppm (10~50 μM)을 첨가한 경우 배발생 캘러스로부터 에틸렌 생산이 억제되어 체세포배 형성이 현저히 증가된 바 있었다²¹⁾. 에틸렌 작용억제제와 2,4-D 처리시 明日葉의 배발생 캘러스를 7주 배양 후 재분화된 小植物體의 新梢와 뿌리의 길이를 조사한 결과는 표 3과 같다. 재분화된 小植物體中 新梢의 길이는 에틸렌 작용억제제 단독처리의 경우 AgNO₃는 2 ppm, CoCl₂·6H₂O는 10 ppm 첨가한 배지에서 제일 길었는데, 2,4-D 1 ppm과 혼용처리한 경우는 AgNO₃는 1 ppm, CoCl₂·6H₂O는 5 ppm 첨가한 배지에서 제일 길었다.

Table 3. Effects of 2, 4-D, AgNO₃ and CoCl₂·6H₂O on length of plantlet regenerated from embryogenic callus of *Angelica keiskei* at 7 weeks after culture.

(mm)

Plantlet	2, 4-D (ppm)	AgNO ₃ (ppm)					CoCl ₂ · 6H ₂ O (ppm)					
		0	1	2	5	10	25	1	2	5	10	25
Shoot	0	8.0	11.0	22.3	17.8	17.3	13.9	8.2	11.2	17.2	25.4	11.1
	1	7.1	13.7	8.9	8.2	7.8	6.2	9.3	10.1	11.3	10.4	8.6
Root	0	7.5	19.6	13.5	14.7	13.6	8.6	7.4	23.1	26.4	18.0	10.5
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4. Effects of 2, 4-D, AgNO₃ and CoCl₂·6H₂O on weight of plantlet regenerated from embryogenic callus of *Angelica keiskei*.

(mg)

2, 4-D (ppm)	AgNO ₃ (ppm)					CoCl ₂ · 6H ₂ O (ppm)					
	0	1	2	5	10	25	1	2	5	10	25
0	44	72	118	97	83	52	68	224	157	112	36
1	32	85	77	63	62	59	62	71	69	63	38

小植物體의 뿌리는 2, 4-D와 에틸렌 작용억제제와 혼용처리한 경우 전혀 발생하지 않았으며, 에틸렌 작용억제제만 첨가한 배지에서는 AgNO₃는 1 ppm, CoCl₂ · 6H₂O는 5 ppm에서 제일 길었다. 이상의 결과로 보아 明日葉의 배발생 캘러스에 에틸렌 작용억제제인 AgNO₃나 CoCl₂ · 6H₂O의 단용처리의 경우 무처리에 비해 재분화된 小植物體의 신초 및 뿌리의 길이에 있어 2~3배의 효과를 보였으나 2, 4-D 1 ppm과 혼용처리하면 에틸렌 작용억제제의 효과는 현저하게 감소되었다.

밀과 *Nicotiana plumbaginifolia*에서는 AgNO₃ 5~50 ppm 처리가 캘러스로부터 新梢分化에 효과가 있었는데, 계대배양시 AgNO₃를 제외하고 2, 4-D만 첨가하면 신초분화 효과는 현저하게 감소되었다¹⁶⁾. 밀과 triticale에서는 CuSO₄ 처리가 新梢와 뿌리의 분화를 모두 촉진하나, AgNO₃ 처리는 新梢分化를 촉진하지만 CuSO₄ 처리에 비하여 뿌리 형성을 억제한다고 했다²⁰⁾. 또한 산형과에 속하는 자생 미나리에서는 2, 4-D와 AgNO₃의 혼용처리시 신초분화를 관찰할 수 없었으나, AgNO₃ 단용처리의 경우

식물체 재분화의 최적 농도는 10~15 ppm이었다¹³⁾.

에틸렌 작용억제제와 2, 4-D 처리시 明日葉의 배발생 캘러스로부터 재분화된 小植物體의 무게를 조사한 결과는 표 4와 같다. 재분화된 小植物體는 2, 4-D 무처리시는 AgNO₃와 CoCl₂ · 6H₂O 모두 2 ppm 처리에서 제일 무거웠는데, CoCl₂ · 6H₂O의 처리 효과가 AgNO₃의 효과보다 2배정도 높았으며, 또한 무처리보다는 AgNO₃는 3배, CoCl₂ · 6H₂O는 5배 정도의 효과를 보였다. 에틸렌 작용억제제와 2, 4-D 1 ppm 혼용처리시 뿌리의 발생은 전혀 없었지만 叢生(rosette)형의 小植物體로 되어, AgNO₃나 CoCl₂ · 6H₂O의 25 ppm 처리에서는 2, 4-D 1 ppm과 혼용처리의 경우가 단용처리의 경우보다 小植物體가 무거웠다.

CoCl₂ · 6H₂O 단용처리의 경우 예를 들면 新梢의 발생 정도와 길이는 10 ppm에서, 뿌리 길이는 5 ppm에서 제일 양호했으나 小植物體의 무게는 2 ppm에서 제일 높았다. 이러한 점은 CoCl₂ · 6H₂O의 높은 농도에서 新梢 발생과 재분화된 小植物體의 伸長에는 좋을지라도 小植物體가 연약하게 보

였기에, 小植物體의 馴化와 健전한 小 식물체 생산을 생각한다면 에틸렌 작용억제제의 적정 농도는 고려되어야 할 것 같다.

摘 要

明日葉의 부위별 캘러스 유도율을 조사하였고, 胚發生 캘러스로부터 식물체 재분화율을 높이고자 에틸렌 作用抑制劑를 처리한 후, 新梢의 발생정도 및 小 식물체의 길이와 무게를 조사하였던 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 2,4-D의 농도를 달리한 MS배지에 明日葉의 小葉, 小葉柄 및 葉柄 切片을 배양하였을 때 캘러스 유도는 小葉에서 잘 되었으며 2,4-D의 농도는 2.0 ppm에서 제일 좋았다.

2. 胚發生 캘러스로부터 신초의 발생정도와 再分化된 小植物體의 新梢 伸長에는 $AgNO_3$ 는 2 ppm, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 는 10 ppm 첨가가 제일 효과적 이었으며, $AgNO_3$ 나 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 2,4-D 1 ppm과 혼용처리하면 신초의 발생정도와 신장은 억제 되었다.

3. 재분화된 小植物體의 뿌리 伸長에는 $AgNO_3$ 는 1 ppm, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 는 5 ppm 첨가가 제일 효과적이었는데, $AgNO_3$ 나 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 2,4-D 1 ppm과 혼용처리하면 뿌리의 발생은 없었다.

4. 재분화된 小植物體의 생체중은 $AgNO_3$ 나 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 단용처리한 경우 각각 2 ppm에서, 2,4-D 1 ppm과 혼용처리한 경우 $AgNO_3$ 는 1 ppm과 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 는 2 ppm에서 제일 무거웠다.

引用 文 獻

1. Beyer, E. M. Jr. 1976. A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol.* 58 : 268-271.
2. 채영암, 박상연, 정만영. 1993. 명일엽의 체세포 배발생과 식물체 재생. 제2회 韓國藥用作物學會 發表要旨, 53 p.
3. Chi, G. L., D. G. Barfield, G. E. Sim and E. C. Pua. 1990. Effect of $AgNO_3$ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and

root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Rep.* 9 : 195-198.

4. Dimasi-Theriou, K., A. S. Economou and E. M. Sfakiotakis. 1993. Promotion of petunia (*Petunia hybrida* L.) regeneration *in vitro* by ethylene. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32 : 219-225.
5. Huxter, T. J., T. A. Thorpe and D. M. Reid. 1991. *Plant Physiol.* 53 : 319-326.
6. 金日光, 千賢子, 鄭昇溢, 朴聲雨, 柳在薰. 1993. 네모과 산화전극 벗김 전압전류법을 이용한 게르마늄의 미량분석. *大韓化學會誌* 37(11) : 943-950.
7. 김진아, 최홍집, 박순기, 김달웅. 1993. 葉實 들깨 (*Perilla frutescens*)의 葉切片 및 子葉으로부터 캘러스 誘起 및 植物體 再分化. *한국식물조직배양학회지* 20(1) : 47-50.
8. 김옥경, 궁성실, 박원봉, 이명환, 함승시. 1992. 명일엽 전초 및 생즙의 영양성분 분석. *한국식품과학회지* 24(6) : 592-596.
9. 이병기, 김명준, 이장원. 1994. 신선초 (*Angelica kiusiana* Maxim)의 조직배양을 통한 식물체 재분화. *한국식물조직배양학회 추계학술발표대회 발표요지* 58 p.
10. 이혜승, 조화진, 김병동. 1995. 에틸렌 저해제에 의한 배추 자엽조직의 기내 재분화를 향상. *한국식물조직배양학회지* 22(5) : 267-271.
11. 李萬相, 申憲浩, 南宮承泊. 1994. 자생 미나리의 植物體 再生에 미치는 生長調節劑와 $AgNO_3$ 의 影響. *圓大農大論文集* 17 : 69-95.
12. 李萬相, 金成朝, 白承和, 南宮承泊. 1995. 明日葉과 日當歸의 Germanium 含量 增大를 위한 基礎研究. *韓藥作誌* 3(1) : 45-49.
13. Miura, Y., H. Fukui and M. Tabata. 1988. Reduced inhomogeneity of *Angelica acutiloba* plants propagated clonally through somatic embryoids. *Planta Medica* 54 : 79-81.
14. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15

- : 473-497.
15. 南宮承洎. 1996. *Angelica*屬植物の器内培養と Germanium 含量増大. 圓光大學校 大學院 博士學位論文(農學科).
 16. 野呂征男, 水野瑞夫, 木村孟淳. 1992. 藥用植物學. 南江堂 東京 201-203 p.
 17. Okuyama, T., M. Takata, J. Takayasu, T. Hasegawa, H. Tokuda, A. Nishino, H. Nishino and A. Iwashima. 1991. Anti-tumor-promotion by principles obtained from *Angelica keiskei*. *Planta Med.* 57 : 242-246.
 18. Pius, J., L. George, S. Eapen and P. S. Rao. 1993. Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 22 : 91-96.
 19. Purnhauser, L., P. Medgyesy, M. Czakó, P. J. Dix and L. Márton. 1987. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep.* 6 : 1-4.
 20. Purnhauser, L. and G. Gyulai. 1993. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35:131-139.
 21. Roustan J. P., A. Latche and J. Fallo. 1989. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. *Plant Cell Rep.* 8 : 182-185.
 22. Songstad, D. D., D. R. Duncan and J. M. Widholm. 1988. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate, and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Rep.* 7 : 262-265.
 23. Yang, S. F. and N. E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 35 : 155-189.