

감나무의 배 배양법에 의한 기내 증식

박 시 원

상명여자대학교 화학과

In Vitro Propagation of Persimmon(*Diospyros kaki*) by Embryo Culture

Sie Won Park

Department of Chemistry, College of Natural Science,
Sangmyung Women's University, Seoul 110-743, Korea

ABSTRACT

The embryos(6-8mm) isolated from seeds of *Diospyros kaki* were cultured on Murashige-Skoog (MS), Woody Plant Medium(WPM), Campbell Durzen(CD), Lictvay's Medium(LM), Kao-Michaluk (KM), Nitsch, White, Heller, Wolter-Skoog(WS) media. The results showed that MS and WPM media were most suitable to the development of embryos into plantlets with length of 5.4 ± 1.2 cm and 5-6 leaves. However, when LM and KM media were used, the addition of 1 to 2 μ moles/l GA3 was required for the germination of the embryos. Superoxide dismutase(SOD) activities, one of the changing factors in leaves according to physiological status displayed to be exceptionally significant in the leaves of plantlets germinated from seeds in potting sand soil contrary to those of cultured embryos specially around germination period.

서 론

배배양(embryo culture)은 다세포로 이루어진 고등식물의 배(embryo)를 식물체로부터 분리, 적출해서 영양분이 들어있는 기내에서 배양시켜 캘러스나 단세포 집단 또는 온전한 식물체로 유기하는 일련의 실험적 조작을 일컬으며 조직 배양중의 한 가지 방법이다. 이와 같은 배배양의 기법은 오래 전부터 시도되었지만(1) 실제로 이 기술이 개발되고 이용된 것은 1920년대 중기와 1930년대 후반부에 집중적으로 진전되었다(2-4).

배배양의 기법은 다음과 같은 경우에 육종학적으로 유효하게 적용할 수 있는데, 종자의 성숙시 여러 조건이 미흡하여 배주의 성숙이 이루어지지 않아 배주의 손상이 생겼을 때 또는 종자간 잡종인 F_1 의 대

사의 기능이 떨어져 발육이 불능일 때(5) 캘러스나 완전한 식물체의 유기를 위하여 귀중한 도구로 사용된다. 이외에도 종자나 배의 휴면(6)을 극복하여 수분에서 발아까지의 소요기간을 단축하거나 불화합성을 지닌 종과 속간의 교잡을 용이하게 하거나 반수체, 일배체, 이수체나 삼배체(7)의 생산을 가능하게 하는 인공 증식법으로 이용될 수 있다. 인공 배지내에서 배를 성공적으로 배양시키는 요인으로 중요한 사항은 올바른 배지를 선택하는 것인데 다른 형태의 식물 조직 배양처럼 무기 염류 특히 NH_4^+ (8), 유기 영양소, pH 및 생장 조절제가 필요하고 배지의 삼투압 역시 중요한 원인으로 밝혀져 왔다(8, 9).

그 동안 미숙배나 완숙배에 대해 성공적으로 이루어진 배배양은 콩과 식물, 냉이, 다투라, 황마, 보리, 옥수수(10-12) 등과 같이 주로 초본류에 대한 결과

가 많으며 진화도가 높은 목본류 종자에 대해서는 조속핵과류인 살구, 자두, 사과(13-15) 등이 보고된 바 있으나 성공적으로 이루어진 예가 많지 않다. 본 연구는 목본류인 감나무의 배배양에 대한 연구의 일환으로 시행됐는데 과일은 유용한 식품으로 사용되고 목재는 고급용재로 이용되는 감(*Diospyros kaki*)을 대상으로하여 과육을 섭취한 뒤 폐기되는 종자를 이용하여 배배양을 시켜서 온전한 식물체를 얻는 방법을 모색하였다. 더구나 감나무의 증식이 대부분 접목으로 이루어지고 있는 상황에서 배배양이 원활히 이루어져 유묘의 공급이 가능하면 산업적으로도 좋은 감나무의 또 한 가지 증식방법이 될 수 있을 것이다. 이러한 배배양의 최적조건을 규명하고자 배양에 영향을 미칠 수 있는 요인으로서 인공배지의 종류, 식물생장조절제의 효과를 검색하였으며 아울러 배의 발아와 성장과정에 따른 생리변화의 한가지 지표로서 superoxide dismutase(SOD) 효소의 활성을 측정하였다.

재료 및 실험방법

식물재료

실험에 사용한 감(*Diospyros kaki*)은 재료의 균일성을 기하기 위하여 경상남도 함안군 부일농장에서 재배한 6년생 성목으로부터 가을에 수확한 감 과일을 저온실에서 저장하여 보관하면서 다음해까지 실험에 사용하였다.

시약 및 기구

배지의 기본성분으로서의 무기염류와 이미노산, 비타민을 위시한 유기물질, 식물생장조절제 및 유기용매 등은 Aldrich, Sigma, Merck사의 분석시약 수준급의 시약을 사용하였으며 SOD 효소분석을 위한 xanthine, xanthine oxidase, cytochrome C 등은 Sigma사의 제품을 구입하였다. SOD분석 기기는 Beckman사의 UV/visible spectrophotometer를 사용하였다.

조직배양실

배양실의 온도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 조절하였고, 조명은 4,200Lux로 식물배양용 형광등을 조사하였으며 그 주기는 18h/day였다. 배양실의 습도는 $50 \pm 5\%$ 로 조절되었으며 배양대는 유리로 제조되어 빛이 시험관 전후, 좌우로 비교적 고르게 조사되게끔 하였다. SOD 효소분석을 위한 감나무 종자의 자연적 파종은

동일한 배양실에서 이루어졌는데 모래에 파종하여 자연 발아시켰으며 그 발아율은 약 12%였다.

배지 및 식물생장조절제

본 실험에서 사용한 배지는 대체적으로 목본류의 조직배양에 긍정적 결과를 나타낸다고 알려진 Murashige와 Skoog(MS)(16), Woody Plant Medium(WPM)(17), Kao와 Michaluk (KM)(18), Wolter와 Skoog(WS)(19), Lictvay's Medium (LM)(20), Campbell과 Durzen(CD)(21), Nitsch, Heller, White 배지를 기본으로 하고 여기에 식물생장조절제로서는 indole-3-acetic acid(IAA), indole-3-butyric acid(IBA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D), benzylamino purine(BAP), furfurylamino purine(kinetin), gibberellic acid(GA₃)를 용법에 따라 희산이나 희염기에 용해시켜 $0.5 \sim 10 \mu\text{moles}/\ell$ 이 되도록 첨가하였다.

고형배지의 제조는 일반적인 방법에 준하였다. 무기, 유기성분을 각각 10~100배 농도로 원액을 제조하여 그중에서 일정량씩을 취하여 모아서 규정농도가 되게끔 희석하고 한천은 최종농도가 0.8~1.0%가 되도록 첨가하였다. 이 혼합액을 일당 가열하여 액이 투명하게 되었을 때 필요한 식물생장조절제를 첨가하여 잘 혼합한 다음 직경 2.5cm, 길이 17cm의 시험관에 10ml~12ml의 배지액을 분주하여 15psi에서 15~20분간 고압멸균시켜 사용하였다. 차후 식물생장조절제에 대한 정밀실험을 할 때는 만일의 경우 열에 대한 불안정성을 고려하여 고압멸균이 끝난 다음 이 배지에 Millipore사의 membrane filter(Millex GV)를 사용하여 체균시킨 생장조절제액을 배지에 첨가하여 혼합한 다음 사용하였다.

배의 절취 및 치상

수확 후 저온보관실에서 잘 보관하여 생과로서도 전혀 손색이 없는 감으로부터 종자를 분리하여 무균상내에서 배를 절취하였다. 배는 딱딱한 종자를 반으로 쪼개면 용이하게 절취되는데 이 배는 흰색으로서 약 6~8mm의 길이였고, 자엽이 매우 유약하므로 절취시 떨어지지 않도록 주의를 요하였다. 배는 일반적으로 살균조작이 특별히 필요하지는 않으나 안전을 기하기 위해 이 배를 1% NaOCl 용액내에 약 1~2분간 담궈 소독을 한 다음 멸균 증류수로 세차 세척하여 배지에 치상한 다음 배양을 시작하였다. 배양결과는 배지상부의 신장(cm)에 준하여 표

시하였는데 다음과 같다. ±; 0.5cm 이하, +; 0.5~1cm, ++; 1~1.5cm, +++; 1.5~2cm, +++±; 2~3cm, ++++; 3~4cm, +++±; 4~5cm, ++++; 5~7cm, ++++±; 7cm 이상

Superoxide Dismutase(SOD) 효소분석실험

감나무의 배배양을 위한 최적조건을 규명하기 위하여 기본배지와 성장조절제를 대상으로 적합한 조건을 선택한 다음 이 조건에서 배양시킨 배와 자연적 발아에 의한 경우와의 생리적 차이점을 물질 준위에서 파악하고자 그 일환으로 잎의 대표적인 효소의 한가지인 superoxide dismutase(SOD)의 활성을 측정하여 보았다. 효소의 활성측정은 기본적으로 McCord와 Fridovich의 방법(22)에 준하여 시행하였다. 배를 인공배지에 치상시킨 후 발아되어 성장된 식물체 및 자연발아에 의해 성장된 잎만 취한 다음 증류수로 세척하고 무게를 측정한다. 다음 Tris-HCl 완충액을 무게의 10배 용량 가하여 Elvehjem pestle로 얼음중에서 1분 처치 1분 간격으로 5회 균질화하였다. 이 균질액을 800×g에서 15분간 원심분리하여 그 상등액(postnuclear fraction)을 효소액으로 사용하여 그 활성을 분석하였는데 효소활성의 측정은 550nm에서 cytochrome C의 환원속도를 50% 억제하는 양을 1unit로 기준삼아 이루어졌다.

결과 및 고찰

배배양을 위한 배지의 선택

배지성분과 성장조절제의 영향을 검색하고자 우선 성장조절제가 포함되지 않은 기본배지에서의 배의 발아와 성장을 관찰하였다. 기본배지의 종류로서는 Murashige와 Skoog(MS), White, Nitsch, Campbell와 Durzen(CD), Heller, Woody Plant Medium(WPM), Wolter와 Skoog(WS), Lictvay's Medium(LM), Kao와 Michaluk(KM)의 9가지를

사용하였다. 이들 배지에서의 배배양의 시행결과는 Table 1에 제시되어 있는데 무엇보다도 특이한 점은 Murashige와 Skoog(MS) 배지와 Woody Plant Medium(WPM)에서 배의 발아와 생장이 매우 뚜렷하게 나타난 것이다. 이 두 가지 배지 이외 나머지 배지에서의 배의 발아와 생장은 그다지 현저하지 않았으며, 이 두 가지 배지에서 약 2주간 배배양을 시행했을 때 WPM의 경우 배지 상부 신장이 5.4±1.2cm, 그리고 MS 배지의 경우 6.1±1.3cm로서 형상은 수간과 주근이 주로 신장되고 푸른 잎이 5~6장까지 나오는 비교적 온전한 식물체(plantlet)의 모양이었다. 이 WPM과 MS배지에서 사용한 감나무 종자의 배는 과육의 성숙시 미숙하거나 기형적으로 형성된 배(전체 종자의 10% 이내)를 제외하고 배양시킨 시료의 거의 모두가 우수한 발아와 성장을 나타내었다. 따라서 식물성장조절제의 첨가없이 WPM과 MS배지에서의 비교적 간단한 배배양도 유묘생성을 가능하게 하여 현재 시행되고 있는 접목법 이외 육종 방안의 한가지가 될 수도 있을 것으로 사료되었다.

이러한 감나무 배배양의 진행과정을 일목요연하게 제시하고자 Fig. 1과 Fig. 2에 걸쳐 한 예로서 가장

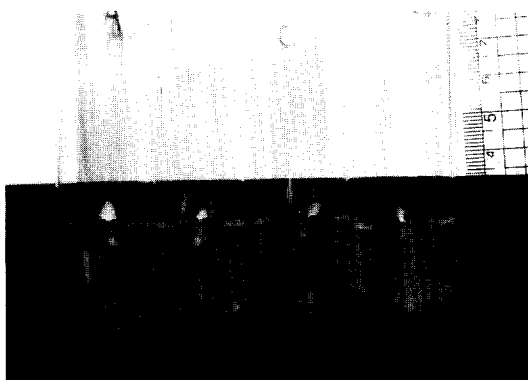


Fig. 1 Embryos placed on the various media.

Table 1. Development of seedlings by embryo culture on media without plant growth regulators.

(n=5~7)

Culture period	Media								
	MS	WPM	CD	LM	KM	WS	Nitsch	White	Heller
1 Week	++	++	+	+	±	+	±	±	±
2 Week	++++	++++	±	++	+++	±	+	±	±

±; insignificant, +; weak, ++; moderate, +++; good, ++++; excellent

효과적이었던 MS 배지에서 배의 발아와 생장을 나타냈다. Fig. 1의 사진은 감나무 종자로부터 배를 분리 절취하여 배지에 치상시킨 즉시의 모습이고 Fig. 2에는 2주간의 배양이 진행됐을 때의 식물체 (plantlet)로 성장된 배의 모습이 제시되어 있다. 다시 Table 1의 결과를 살펴 보면 9가지의 상당히 많은 배지 종류 중에서 대부분 발아와 생장이 매우 저조하여 White배지나 Heller배지에서처럼 발아만 겨우 이루어지거나 Wolter와 Skoog(WS) 배지에서와 같이 $1.1 \pm 0.3\text{cm}$ 정도에 불과한 생장을 보인 결과는 결국 배지의 구성성분의 차이에 의해 나타난 것으로 볼 수 있을 것이다. 이들 배지의 성분은 공통적으로 무기영양소, 유기영양소 및 탄소원 그리고 한천으로 구성되어 있다. 다만 각 성분의 함량비와 종류에 어느 정도씩의 차이가 있는데 본 실험에서 MS 배지와 WPM배지에서 특히 성공적인 배배양이 이루어지는 것은 그들의 성분의 특징에 의할 수 있으리라 볼 수도 있다. MS배지의 성분의 구성상 특이

한 점이란 질소원으로서 NH_4^+ 이온이 비교적 다량 함유되어 있다는 것과 충분한 비타민류 및 희금속인 Mo과 Co가 포함되어 있다는 점일 것이다. 마찬가지로 WPM배지의 특징 역시 제반 기본적 성분은 여타 배지와 그 종류에 있어선 큰 차이가 없으나 NH_4^+ 이온의 함량이 비교적 높고 비타민류와 희금속이 포함되어 있다는 점으로서 현재로서는 이들 물질이 만약 배의 발아와 생장에 긴밀히 관계된다면 아마도 배의 발아와 신장을 주관하는 gibberellin류(23-24)의 합성에 직접 또는 간접으로 작용함으로써 우수한 배양 효과를 나타낼 가능성이 있다고 간주된다.

배배양에 대한 식물생장조절제의 영향

Table 1의 결과로부터 성장조절제가 포함되지 않은 경우 최소한 MS배지와 WPM배지에서 상당히 우수하게 배배양이 이루어져 유묘 생산이 가능한 정도의 발아와 생장이 이루어졌다. 그러나 그 밖의 배지에서는 배배양의 결과가 별로 좋지 않아서 본 실험에서는 MS배지와 WPM배지를 포함한 모든 배지에 식물생장조절제인 cytokinin, auxin, gibberellin의 대표적인 화합물로서 IAA, IBA, 2, 4-D, BAP, GA₃를 각각 $1\mu\text{mol}$ 의 농도로 첨가하여 배배양에 대한 효과를 검색하여 보았다. 그 결과가 Table 2에 제시되어 있는데 우선 MS 배지와 WPM배지에서는 6가지 성장조절제 중 어느 것을 첨가하여도 무첨가의 경우와 비슷하거나 생장이 약간 빠를 정도였다.

반면에 기타의 배지에서는 성장조절제의 종류에 따라 배양이 잘 이루어져 MS배지와 WPM배지의 경우와 어느 정도 유사한 결과를 나타내기도 했는데 예컨대 KM배지와 LM배지에서는 gibberellin 처리로 +++ 이상의 결과를 보였고, CD배지, 그리고 Nitsch배지에서도 역시 gibberellin 처리에 의해 ++±의 배양 정도를 나타냈다. 다음으로 White배지와 Heller배지, WS배지에서는 배배양의 결과가 어느 성장조절제를 가하든 썩 우수하지는 않았으나 gibberellin을 첨가한 경우에 +~++ 정도의 미약하나마 약간의 발아와 생장을 나타내었다. 이상의 결과로부터 우선 MS배지와 WPM배지에서는 성장조절제가 첨가되지 않아도 발아와 생장이 우수한 반면 기타 배지에서는 특히 gibberellin을 첨가한 경우에 +±~++++ 정도의 상당히 좋은 배양 결과를 나타내었다. 따라서 본 감나무의 배가 발아하고 성장하는 데에는 아마도 gibberellin류가 필수적이며 MS나 WPM배지에서처럼 배지조성 등 여건만 잘 갖추어지면 배양중에 gibberellin이 de novo 합성될

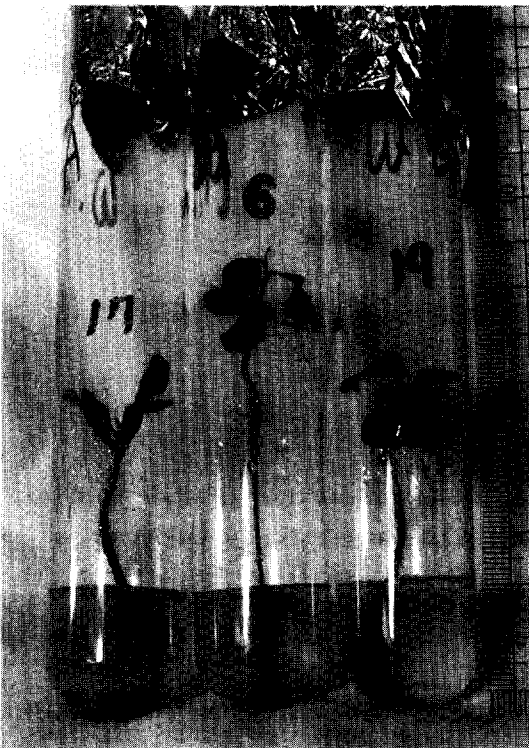


Fig. 2. Plantlets derived from embryos on MS without plant growth regulators after 2 weeks of culture.

수도 있는 가능성도 고려할 수 있을 것이다. 이 gibberellin류는 그 생리작용이 주로 발아와 신장촉진효과 및 개화작용을 나타내는 조절제(25-27)로서 저온과정이 필요한 발아과정을 비교적 고농도의 gibberellin으로 처리하면 저온처리 없이도 발아를 하는가 하면 시금치(27)와 같이 발아시에 빛을 요구하는 종자를 gibberellin처리하면 어두운 곳에서도 발아를 하게 된다. 다음으로 gibberellin(GA₃)을 제외한 기타의 성장조절제를 첨가한 배지들에 있어서의 배배양의 결과를 살펴 보면 MS배지와 WPM배지에 있어서는 거의 모든 경우에 있어서 성장조절제를 첨가하지 않은 경우와 거의 마찬가지로 발아와 생장이 잘 일어났으므로 최소한 MS배지와 WPM배지에서는 성장조절제에 의한 특이성이나 배양의 촉진 및 억제제의 효과가 필요없는 것으로 볼 수 있었다.

한편 기타의 배지에 있어서는 gibberellin 이외의 auxin과 cytokinin의 대표물질로 6가지 식물성장조절제를 첨가한 경우에 대부분의 경우 발아는 이루어지지만 생장은 상당히 저조하여 배양의 정도가 ± ~ ++±에 불과한 것을 Table 2로부터 알 수 있었다. 이와같은 Table 2의 결과를 전체적으로 종합하여 보면 감나무의 배는 배지의 종류에 따라서는 성장조절제가 없이도 배양이 상당히 잘 이루어지며 반면에 성장조절제가 필요한 배지의 경우에는 무엇보다도 gibberellin을 요구하는 것으로 간주할 수 있을 것 같다. 이 결과는 gibberellin의 기본 생리작용 중에서도 휴면타파 발아작용과 무상식물(intact plant)에 대한 성장촉진효과가 상호 충분히 작용하여 나타난 것으로 보이며 한편 callus와 같은 탈분화 조직의 세포분열 촉진작용을 가진 cytokinin류(28-29)나 주로 세포신장효과 및 발근작용을 나타내는

auxin류(30-32)는 본 감나무 배배양에는 크게 작용하지는 않은 것으로 판단하여도 무리는 없을 것 같다. 참고로 Fig. 3에 LM 배지와 KM 배지에 gibberellin(GA₃)이 첨가되었을 때 발현되는 배의 성장상태가 제시되어 있다.

배배양에 미치는 성장조절제의 농도영향

Table 1과 Table 2의 실험결과 MS배지와 WPM배지는 따로 성장조절제가 필요없었고, 반면 KM과 LM배지에서는 gibberellin을 첨가했을 경우가 가장 효과적이었으며 이외의 성장조절제를 첨가했을 때는 그다지 배양효과가 높지 않았다. 따라서 본 실험에서는 GA₃에 의해 효과가 있는 KM배지와 LM배지에 gibberellin을 농도별로 첨가하여서 성장조절제의 농도에 따른 배양효과를 검색하였다.

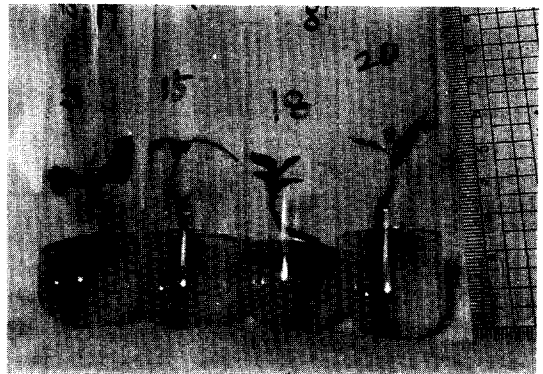


Fig. 3. Plantlets derived from embryos on LM and KM media with gibberellin(1μmol/ℓ) after 2 weeks of culture. From left LM, LM, KM, KM

Table 2. Effect of plant growth regulators(1 μmole/ℓ) on the development of seedlings by embryo culture for 2 weeks.

Regulators	Media									
	MS	WPM	CD	LM	KM	WS	Nitsch	White	Heller	
IAA	++++	+++	++	++±	++	+±	±	±	±	
2,4-D	++++	+++±	+	++	+±	+	+	+	+	
IBA	++++	+++	+±	+±	++	+	±	+±	+	
Gibberellin	++++	++++±	+++±	++++	+++	+±	+++±	++	++	
Kinetin	++++	++++	++	++	+±	+	+	+	±	
BA	+++±	++++	+	+	++	+	+	+	+	

(n=5~7)

±; insignificant, +; weak, ++; moderate, +++; good, ++++; excellent

Table 3에 이 실험 결과가 제시되어 있는데 각각의 성장조절제의 농도를 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 $\mu\text{mol}/\ell$ 씩 순차적으로 증가시켜서 그 효과를 관찰하였다. 무엇보다도 가장 효과적인 최적 농도는 GA_3 를 1.0과 2.0 $\mu\text{mol}/\ell$ 로 첨가했을 경우로서 대략 ++ ±의 배양정도를 나타내었다. 한편 본 실험에서 식물성장조절제가 필요없을 것으로 나타난 MS배지와 WPM배지에서도 GA_3 의 농도에 의해서 다른 효과가 야기될 수 있을 가능성을 고려하여 MS배지와 WPM배지에 GA_3 를 0.5~10 $\mu\text{mol}/\ell$ 의 농도를 첨가하여 실험하였다. 그 결과가 Table 4에 제시되어 있는데 무첨가의 경우나 GA_3 첨가의 경우나 큰 차이가 없었다.

따라서 이상의 모든 결과를 종합하여 보면 감나무의 배는, 다른 목본류의 배보다 비교적 용이하게 인공배지 내에서 배배양을 시켜 유묘를 생산할 수 있을 것으로 판단되었는데, 가장 효과적인 인공배양의

Table 3. Effect of gibberellin concentrations on the development of seedlings on LM and KM media. The culture period was 2 weeks.

(n=5~7)

Gibberellin ($\mu\text{moles}/\ell$)	Media	
	KM	LM
0	+	+
0.5	++	+±
1.0	+++	++++
2.0	+++±	++++±
5.0	++	++
10.0	++	+±

Table 4. Effect of gibberellin concentrations on the development of seedlings on MS and WPM media. The culture period was 2 weeks.

Gibberellin ($\mu\text{moles}/\ell$)	Media	
	MS	WPM
0	++++	+++±
0.5	++++±	++++
1.0	++++±	++++±
2.0	++++	+++±
5.0	++++	+++±
10.0	++++	++++

조건으로서는 우선 MS배지와 WPM배지에서는 성장조절제의 첨가없이도 매우 우수하게 배양이 이루어졌으며, LM배지와 KM배지의 경우에는 1~2 $\mu\text{mol}/\ell$ 범위의 GA_3 를 첨가하면 역시 비교적 우수한 배양을 시킬 수 있을 것으로 결론지을 수 있었다.

배양조건에 따른 Superoxide Dismutase(SOD) 효소의 활성변화

이상의 실험으로부터 감나무 종자의 배를 인공적으로 기내 배양시켜 유묘를 생산할 수도 있을 정도로 배양 성공의 가능성이 제시됐는데 이때 식물체 내의 생리적 변화에 수반되는 생화학적 변화를 측정함으로써 인공적인 기내 배양과 자연적인 증식 사이에 유의성 있는 분자준위에서의 생리변화의 차이가 있는지의 여부를 검색하고자 그 일환으로 본 실험을 시행하였다.

생물체에는 예외없이 독성이 강한 O_2^- , $\cdot\text{OH}$, HOOH 와 같은 활성산소(active oxygen)가 수시로 발생되며(33, 34) 그 중에서도 superoxide(O_2^-)가 대종을 이루는데 식물에서는 광합성(photosynthesis)이 일어나는 엽록체(chloroplast)에서 주로 생성되는 것으로 알려져 왔다(35). 그러므로 뿌리보다는 엽록체의 존재 부위인 푸른 잎에서 O_2^- 발생이 이루어지며 이 O_2^- 의 해독작용을 하는 소거체인 superoxide dismutase(SOD) 효소활성 역시 줄기나 뿌리 부분이 아닌 푸른잎에 집중적으로 높을 것으로 추정되어 왔다(36).

본 실험에서는 배배양에 따른 식물체의 조직과 기관의 분화에 의해 야기되는 SOD활성의 변화를 검색하고 그 활성변화가 배양조건과 어느 정도 연계되는지 부분적으로나마 규명하고자 시도되었다. 아울러 자연증식에 의한 종자의 발아와 성장과정에 비하여 배배양에 의한 이 과정들이 큰 차이가 있는 만큼 이 차이가 SOD 활성 변화에도 반영되는지 검색해 보자 하였다.

이 실험의 결과가 Fig. 4에 제시되어 있는데 배양 기간이 각각 1주일, 2주일, 3주일 경과했을 경우 가장 우수한 배양조건으로 나타난 식물성장조절제가 포함되지 않은 MS배지에서 배를 발아·생장시킨 식물체의 잎, GA_3 를 포함한 LM배지에서 배배양을 시킨 식물체의 잎, 그리고 자연 발아시킨 감나무 새싹의 잎에서 발현되는 SOD활성을 서로 비교하였다.

Fig. 4의 결과에 의하면 종자를 과중시켜 자연 발아시킨 식물체의 잎으로부터 유래한 SOD활성은 발아 3일째에 56.5 units로서 가장 높았고, 성장조절

제없이 MS 배지에서 배양시킨 배의 자엽의 SOD활성은 13.3 units로서 전자의 약 23%에 불과했으며 가장 높은 시기인 발아후 1주일에서도 30% 정도였으며, 다음으로 GA₃를 첨가한 LM배지에서 배양시킨 자엽의 SOD활성도 11.7units, 1주일째에선 23% 정도에 불과하였다. 식물체의 잎에 있어서의 SOD활성은 생장시기 중에서도 특히 발아시기에 즈음하여 가장 높은 활성치를 나타냄은 SOD와 유사하게 유독한 H₂O₂의 소거제인 catalase 활성에서도 (37) 밝혀진 것으로 본 실험의 SOD 경우에서도 유사한 결과를 나타냄으로서 발아와 유해산소를 제거하는 효소들의 활성이 밀접히 관계됨을 시사하고 있다고 볼 수 있다. 추론하건대 발아시 잎의 glyoxisome에서 일어나는 glyoxylate cycle에서 H₂O₂와 O₂⁻ (38)가 상당량 파생되고 이들을 소거하기 위하여 자연히 유해산소의 소거제인 catalase와 superoxide dismutase(SOD)가 상응하여 유발되었을 가능성이 있을 것으로 간주된다.

반면에 자연발아시킨 식물체들의 생장기간 2주째와 3주째의 각 시료에 있어서의 SOD활성은 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이와 같이 발아시기와 가장 근접된 기간인 3일째에 각 시료의 SOD활성 차이가 가장 현저하였으며, 반면에 자연 증식에 의한 잎의 SOD활성에 비해 MS 배지에서건 gibberellic acid가 포함된 LM 배지에서건 간에 배배양을 통하여 얻어진 잎의 SOD활성은 대체적으로 20-23% 수준에 불과하였다. 이처럼 감나무의 자연 발아에 의한 식물체와 배배양에 의한 식물체 사이에는 SOD값에 있어서 4~5배에 달하는 큰 차이가 있었으나 MS배지나 LM배지에서의 배양같이 인공적인 배배양에 의한 시료 사이에는 3주간의 생장기간을 통하여 SOD활성에 별 차이가 없었다는 점이다. 이에 대한 이유로서는 자연 발아시에는 아마도 식물체가 생장하기 위한 기초에너지와 영양소를 마련하기 위하여 배주의 지방을 당류로 분해전환시키는 glyoxylate cycle이 왕성해지고(38) 이에 따라서 O₂⁻의 파생이 증가되며 이 O₂⁻를 소거하기 위한 superoxide dismutase(SOD)효소활성 역시 높아지는 것으로 판단된다. 반면에 종자로부터 배만 유리 절취시켜 인공배지내에서 배양시킨 경우에는 배주가 없는 대신 배지내에 서당과 같은 당류가 충분히 포함되어 있으므로 굳이 지방을 당류로 전환시킬 필요가 없이 간단한 가수분해 정도의 반응으로 에너지원과 영양소로 사용할 수 있으므로 자연히 glyoxylate cycle이 필요없거나 감소되어 O₂⁻생성과 SOD활성

도 별로 증가되지 않을 것으로 생각된다.

이 결과로부터 토양중에서 종자를 파종하여 자연 발아 생장시킨 식물체와 종자로부터 배를 절취하여 인공배지 중에서 배배양으로 생장시킨 식물체 사이에는 특히 발아시기에 SOD 효소 활성에 차이가 있으며 이 효소가 발아작용과 관련이 있을 것으로 시사되었다.

요 약

감나무의 배를 대상으로 인공배지내에서 배배양을 시행하여 발아 및 생장을 시켰다. Murashige-Skoog(MS), Woody Plant Medium(WPM), Campbell and Durzen(CD), Lictvay's Medium(LM), Kao-Michaluk(KM), Wolter-Skoog(WS), Nitsch, White, Heller 배지 중에서 식물생장조절제 없이 배양을 시켰을 때 MS배지와 WPM배지에서 배양이 성공되어 발아와 생장이 잘 되어 5.4 ± 1.2 cm의 신장과 5~6장의 잎을 가진 유묘가 형성되었다. 다음으로 식물생장조절제의 효과는 auxin, cytokinin, gibberellin류 중에서 특히 gibberellin(GA₃)을 LM배지와 KM배지에 첨가했을 때 우수한 배양의 결과를 나타냈으며 최적농도는 $1 \sim 2 \mu\text{mol}/\ell$ 이었다. 아울러 배배양과 자연파종에 의한 발아와 생장의 생리적 차이를 규명하고자 그 일환으로 식물 잎의 특정 효소인 superoxide dismutase(SOD) 활성을 비교했을 때 특히 발아시기에 자연파종된 식물체의 SOD활성이 배양에 의한 식물체의 SOD활성보다 약 4배 이상 더 높았다.

참고 문헌

1. E. Hannig(1904), *Bot. Ztg.*, **62**, 45.
2. F. Laibach(1929), *J. Hered.*, **20**, 201.
3. P. R. White and R. Keller(1939), *Am. J. Bot.*, **26**, 59.
4. R. J. Gautheret(1939), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **208**, 118.
5. D. A. Evans and C. E. Flick(1980), *Hortscience*, **16**, 217.
6. L. E. Randolph and C. G. Cox(1943), *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **43**, 294.
7. S. G. Lakshmi, N. V. Raghava and S. C. Vaidyanthan(1980), *Phytochem.*, **10**, 294.
8. M. Monnier(1978), *Frontiers of Plant Tissue*

- Culture*, p. 277, University of Calgary Press, Canada.
9. T. Murashige(1980), *Plant Growth Substances*, p. 426. Springer-Verlag, Berlin.
 10. W. A. Jensen(1968), *The Zygote Planta*, **79**, 346.
 11. P. R. Murray(1980), *Plant Physiol.*, **66**, 782.
 12. E. Williams and G. Dehatour(1980), *Bot. Gaz.*, **141**, 252.
 13. L. G. Nickell(1951), *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **57**, 401.
 14. H. E. Sommer, C. L. Brown and P. P. Kormanik(1987), *Bot. Gaz.*, **136**, 24.
 15. D. W. Rammig(1990), *Hortscience*, **25**, 393.
 16. T. Murashige and F. Skoog(1962), *Physiol. Plant.*, **15**, 473.
 17. G. Lloyd, B. McCown and C. Stewart(1980), *Comb. Proc. Int. Plant*, **30**, 421.
 18. K. N. Kao and M. R. Michayluk(1975), *Planta*, **126**, 105.
 19. K. E. Wolter and F. Skoog(1966), *Am. J. Bot.* **53**, 263.
 20. J. D. Lictvay, M. A. Johnson, D. C. Verma, D. W. Einsparth and K. Weyrauch(1981), *Inst. Paper Tech. Pap. Ser.*, **115**, 1.
 21. R. A. Campbell and D. J. Durzen(1975), *Can. J. Bot.*, **53**, 1652.
 22. J. M. McCord and I. Fridovich(1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6051.
 23. L. Taiz, R. Murray and E. Zeiger(1991), *Plant Physiol.*, p. 426, Benjamin Cummings, New York.
 24. 増田芳雄(1991) 植物ホルモンの研究法, 生物化学実験誌 26, 学会出版センター, 東京.
 25. R. M. Sachs(1965), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **16**, 73.
 26. J. B. Reid(1987), *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, p. 318, Kluwer, Boston.
 27. J. D. Metgerand J. A. D. Zeevart(1980), *Plant Physiol.*, **66**, 844.
 28. J. VanntHof(1985), *The Cell Division Cycle in Plants*, p. 1, Cambridge University Press, London.
 29. A. C. Leopold, D. W. Einspar and M. C. Kawase(1964), *Am. J. Bot.*, **51**, 294.
 30. A. Dietz, U. Kutschera, M. Shiperes and P. M. Ray(1990), *Plant Physiol.*, **93**, 432.
 31. P. J. Davies(1987), *Plant Hormones, Their Role in Plant Growth and Development*, p. 37, Nihoff, Dordrecht.
 32. M. L. Evans(1985), *Plant Sci.*, **2**, 213.
 33. H. M. Hassan(1984), *Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease*, Raven Press, New York.
 34. 浅田活二(1988), 活性酸素, p. 71, 公立出版, 東京.
 35. 高橋正昭(1988), 活性酸素, p. 87, 公立出版, 東京.
 36. E. Tyszkiewicz and E. Roux(1987), *Progress in Photosynthesis Research*, p. 213, Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands.
 37. S. W. Park and D. S. Kim(1993), *K. J. Chem. Soc.*, **38**(2), 1603.
 38. J. W. Bradbeer and J. B. Norton(1977), *The Biochemistry of Plant*, p. 423, Academic Press, New York.
 39. K. Asada and M. Takahashi(1987), *Topics in Photosynthesis*, p. 227, Elsevier, Amsterdam.