

植物호르몬 및 生長調節物質의 生物檢定技術

I. 옥신, 지베렐린 및 싸이토키닌

李政明*

Bioassays of Plant Hormones and Plant Growth Regulating Substances

I. Auxins, Gibberellins, and Cytokinins

Jung Myung Lee*

ABSTRACT

The objective of this paper is to compare and summarize the procedure and effectiveness of some bioassay systems and to point out ways to obtain reliable results from each bioassay. Detailed descriptions were given for those widely-adapted bioassay methods, such as mungbean rooting (auxin), *Avena* first internode straight growth (auxin), dwarf rice growth (gibberellin), dwarf pea epicotyl elongation (gibberellin), radish cotyledon expansion test (cytokinin), and tobacco stem pith callus growth (cytokinin), and the effects of various plant growth regulators including some recently introduced growth retardants (Paclobutrazol, Uniconazol, etc.) were also summarized.

Key words : bioassays, auxins, gibberellins, cytokinins, plant growth regulators.

緒 論

植物生長의 化學的 制御는 一般植物學者 뿐만 아니라 實用性을 重要視하는 農學者들이 많은 關心을 기울이고 있는 分野의 하나로 學界에서의 研究關心度가 特히 最近에 急激히 增加하고 있다. 植物生長의 化學的 制御는 넓은 意味로는 除草劑를 包含한 農藥까지도 對象이 될 수는 있으나 狹意 또는 一般的으로 植物호르몬 또는 植物호르몬과 類似한 生理的인 活性을 지니는 化學物質에 局限되는 경우가 더욱 많다. 植物호르몬은 内生호르몬(endogenous hormones)으로써 그 特性에 따라 다음과 같은 6群으로 區分되는데 즉 (1) auxin類, (2) gibberellin類, (3) cytokinin類, (4) 抑制物質類(inhibitors), (5) ethylene, 그리고 (6) brassinolide類로 大分된다.^{4,26)} 이에 對하여 自然發生은 되나 植物호르몬으로는 區分되지 않은 物

質이나 또는 最近에 많이 開發되고 있는 여러가지의 合成有機物質中에서 植物호르몬과 類似한 效果를 지닌 것을 일컬어서 植物生長調節物質(Plant Growth Regulators; PGR)이라고 한다. 그러나 경우에 따라서는 内生植物호르몬과 아직 判明되지 않은 植物體內의 모든 生長調節物質을 모두 PGR의 범위內에 包含시켜 함께 論하기도 하는데 그 理由는 實用面에서는 植物호르몬보다는 오히려 合成物質이 大部分 사용되고 있으며 種類도 極히 많고 또한 이들 物質들의 生理的인 作用을 植物호르몬과 同一하게 區分하여 記述하는 경우가 많기 때문이다.

PGR을 定量하는데에는 여러가지 方法이 쓰일 수가 있으며 많은 경우 定量分析에는 GC-MS를 위시한 많은 最新의 器機를 利用하는데^{4,16,26)} 器機分析에도 한계와 맹점은 있어서 植物體內에서 抽出된 各種 複合된 호르몬類似物質에 關하여는 生檢이 必然的으로 併行되어야 하지 않으면 안된다.²⁷⁾ 즉 器機

* 慶熙大學校 園藝學科 Dept. of Horticulture, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea.

分析에서는 特定한 植物호르몬을 比較對象으로 設定하고 이에 對比해서 未知物質이나 抽出物內에 含有된 量을 推定하는 것에 지나지 않으므로 gibberellin과 같이 化學構造나 特性이 各各 다른 類似한 많은 種類가 植物體內에 存在하는 경우 각각에 대한 standard가 없으면 分析이 不可能한데 比해서³⁾ 生物檢定(biological assay 또는 bioassay)에서는 이들은 勿論 現在까지 그 機作이 알려지지 않은 物質이라 할지라도 호르몬과 類似한 效果를 낸다면 그 反應을 評價할 수 있다는 點이다. 이렇듯 植物體 抽出物뿐에서만 아니고 호르몬類似效果를 지닌 많은 合成化學物質의 效果有無 및 程度를 評價하는데는 必須의 으로 利用되는데 特히 生檢時는 기존식물호르몬의 效果와는 다른 여러가지 效果를 追加관찰하는 것이 可能한데 이러한 長點은 器機分析에서는 전혀 고려의 대상도 되지 않는다.^{4,13,14,27)}

生物檢定은 그러나 그 方法論에서는 이미 區分되어 있는 5群 또는 6群의 植物호르몬 중 어느 하나에 대하여 민감하고 特殊하게(specific) 반응하고 기타 다른 호르몬에 대하여는 반응을 거의 보이지 않

는 方法이 가장 理想的이어서 이를 근거로 많은 生檢法이 소개되어 있다.^{1,3,11,25,26,27)} 그러므로 研究者들의 立場이나 施設, 그리고 경험 등을 토대로 하여 一貫性있는 方法을 일단 採擇하게 되면 대개 1~2 種類의 生檢方法으로 結果를 얻는 것이 常例이다. 따라서 이 論文의 目的은 첫째 各各의 식물호르몬中 auxin, gibberellin, cytokinin에 많이 利用되는 生檢法을 소개하고 둘째로는 本人이 많이 使用하고 있는 生檢方法에 關하여 구체적인 方法, 活用 및 各種要因이나 問題點에 關하여 상세한 소개를 함과 아울러 몇가지 검토를 행하고자 함이다.

옥신類 生檢法(Bioassays for auxin and auxin-like substances)

옥신類 生檢에 많이 活用되고 있는 方法과 대략적인 內容은 表 1에서와 같다. 이는 Yopp(1986)이 열거한 바 있는 32 種類의 方法中에서 學術論文 등에 많이 使用되거나 各種 實驗用으로 많이 쓰이고 있는 몇가지만을 간추려서 발췌한 것이다. 이중에서도 特

Table 1. Comparison of some bioassays for auxin and auxin-like substances.

Bioassays	Plant parts tested	Effective concentrations (ppm)	Time required for Preparation	Assay	Remarks
<i>Avena</i> coleoptile curvature	Coleoptile segment of dark-grown seedlings	0.005-0.1	72hr	1.5hr	Highly specific, cultivar differences, use of agar
<i>Lepidium</i> root growth inhibition	Intact or excised root of dark-grown seedlings	0.001-0.1	72hr	17hr	Can be practised with rape and cucumber
<i>Avena</i> seedling geotropic curvature	Coleoptile segment of dark-grown seedlings	0.03-0.1	45hr	4hr	Highly specific, can be practised with lettuce and mustard
<i>Pisum</i> split stem curvature	3rd internode segment of dark-grown seedlings	0.03-0.3	8 day	24hr	Lighting is important, Co and Mn ions may have some effects
<i>Pisum</i> stem segment straight growth	Epicotyl segment of dark-grown seedlings	0.03-0.1	8 d	24hr	Light control is important, cucumbers can be used
Mungbean adventitious root induction	Light grown seedlings with root removed	0.001-1.0	7 d	5-7day	Easy to operate, bean and radish seedlings can be used
<i>Avena</i> first internode straight growth	First-internode segment of dark-grown seedlings	0.001-1.0	3 d	20hr	Can be practised with dwarf corn
<i>Phaseolus</i> internode curvature	First internode segment of dark-grown or etiolated seedlings	0.175-175	6 d	1-3hr	Highly specific in response

히 커리초엽굴곡실험 (*Avena coleoptile curvature test*), 완두종단줄기절편의 굴곡실험 (*Pisum split stem curvature test*), 綠豆不定根發根實驗 (Mung bean adventitious root induction), 커리 제1節間長伸長 (*Avena first internode straight growth*) 등이 가장 많이 利用되고 있으나 편이상 개개에 관한 설명은 생략하고 이중 mungbean adventitious root induction과 *Avena first internode straight growth*에 關하여 상세히 검토하고자 한다.

1. 녹두 發根 生檢法 (Mungbean adventitious root induction method)

옥신의 主要作用中의 하나가 發根促進이며 또한 實用面에서도 이 分野에 가장 많이 利用되고 있다. 녹두發根生檢法은 Hess (1964)에 依해 開發되고 그 후 여러 學者들에 依해 修正, 補完 및 變更을 받은 바 있다. 먼저 그 主要과정을 순서대로 나열하면 대체로 다음과 같다. 2,7,8,13

소립종 綠豆品種의 種子를 0.3% sodium hypochlorite 용액에 3分間 침지소독후 흐르는 수도물에 24~26時間 浸種한다. 次後 질석에 播種하여 26℃에서 發芽시키는데 이때 光度는 5,000 lux 이상이 유지되어야 좋으므로 溫室보다는 growth chamber 나 조직배양실 등의 환경이 적합하다. 파종 후 7~10일이 경과되면 第1本葉이 전개되고 첫 三小葉의 葉芽가 깨알크기 정도로 다소 부풀어 있는 상태에서 녹두묘를 캐 낸다.

균일한 크기로 선별된 녹두묘로부터 子葉을 제거하고 子葉 밑으로 下胚軸을 3cm 남기고 예리한 칼

로 절단하여서 시험용액(옥신類라면 0.01~1.0 ppm)이 채워진 용량 5~10ml의 vial에 묘묘를 2~5개 잘라 넣고 24시간마다 용액의 水準을 증류수로 一定水準까지 보충하여 위와 同一한 환경조건하에서 連續照明으로 6日間 發根시킨다. 6日후에 길이 1mm 이상의 發根數를 계수한다(그림 1). 녹두묘에서의 不定根 發生數는 溶液內 옥신농도(대수치)와 比例하므로 一定濃度에 대한 反應을 평가할 수 있으며 植物體로부터 抽出된 未知物質의 濃度를 推定하는 것이 可能하다.

실험에서의 몇가지 주의점을 열거한다면 먼저 品種에서는 大粒種보다는 小粒種이 더 좋으나 品種에 따른 反應의 차이는 크지 않으므로 食用으로 市販되는 선화녹두 등이면 充分하다.¹⁵⁾ 또한 種子保存 狀態만 좋다면 몇년을 묵어도 무방하다. 發芽 및 生檢時의 溫度와 光環境은 一貫性있는 實驗結果를 얻는데 絕對的으로 重要하다.^{14,20} 이 두가지 환경은 供試直前의 苗의 발육속도, 크기 및 狀態를 좌우하는데 決定的 役割을 할 뿐만아니라 次後의 發根 速度 및 發根數에도 큰 影響을 미치기 때문이다.²¹⁾ 즉, 溫度는 24~28℃, 光度는 5,000 lux 이상으로 연속조명해 주도록 한다. Vial은 여러가지를 쓸 수 있으나 일반 시험관(test tubes)은 길이가 길어서 불편하므로 짧은 vial이나 항생물질병(용량 7~8ml)을 이용하면 병당 3~4個體를 잘라 넣어도 實用上 支障이 없다. 표 2에서 보이는 바와 같이 환경조건에 따라서²⁴⁾ 그리고 植物혼을 包含한 各種 化學物質이 影響을 미치고^{13,14,23,24)} 摘葉이나 生長點 除去 등이 크게 影響을 미치며¹⁴⁾ 近來 開

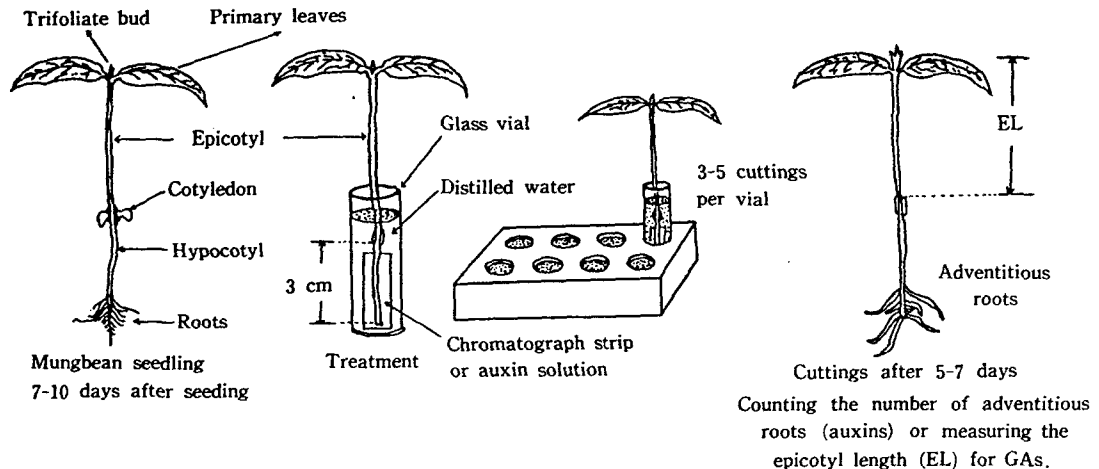


Fig 1. Steps in the mungbean rooting bioassay (redrawn from the original drawing by Weaver, R. J.)

Table 2. Factors affecting adventitious root formation in mungbean cuttings (references : 2, 13, 14, 15, 23, 24).

Factors	Effective condition or concentrations	Rooting response*	Remarks
High temperature	Up to 35°C	++	
High light intensity	Up to 10,000 lux	++	
Variety	15 varieties tested	±	
Seed size within a variety	Larger seed	+	
Partial leaf removal	Removed	-	
Removal of growing point	Removed	+	
Epicotyl rooting	Hypocotyl removed	--	
Auxin (IAA)	0.01-1.0 ppm	+++	
Gibberellin(GA ₃)	0.01-1.0 ppm	--	Epicotyl elongation
Cytokinin(zeatin)	0.01-10.0 ppm	--	Growth reduction
Absciscic acid	0.1-10.0 ppm	+	
Ethylene(ethephon)	1-50 ppm	-	Leaf abscission
Brassinolide	0.001-1.0 ppm	--	Epicotyl elongation
IBA(Indole butyric acid)	0.01-1.0 ppm	+++	
NAA(Naphthalene acetic acid)	0.01-1.0 ppm	++	
2, 4-D	0.01-1.0 ppm	+	
2, 4, 5-TP	0.01-0.1 ppm	++	Toxicity
TIBA	0.1-10.0 ppm band	-	
BA(N6-benzyladenine)	0.01-1.0 ppm	--	Growth reduction
Daminozide(SADH)	0.1-10.0 ppm	+	
Paclobutrazol(PP-333)*	0.001-1.0 ppm	+++	Growth reduction
Uniconazol(S-07)*	0.1-10.0 ppm	+++	Growth reduction
Inabenfide*	0.1-10.0 ppm	+	Growth reduction
NTN-821*	0.1-1.0 ppm	++	Growth reduction
KIM-112*	0.01-1.0 ppm	+++	Growth reduction
BAS-106*	0.01-1.0 ppm	+++	Growth reduction
Glucose	0.1-1.0%	+	
Fructose	0.1-1.0%	+	
Sucrose	0.1-1.0%	++	
Maltose	0.1-1.0%	+	
Lactose	0.1-1.0%	±	
Sorbitol	0.1-1.0%	+	
Ginseng extract	30-3,000 ppm	++	
Saponin	0.015-15 ppm	++	
PEG(Polyethylene glycol)	0.001-1.0 ppm	--	Wilting at high conc.
Hyponex	x5000-x1000	-	Healthy roots
Atotone**	0.1-10.0 ppm	+	
AVB, Chrysal, etc.***	Half to double strength	--	Growth reduction

Table contents include many unpublished data obtained in this laboratory.

* Symbol "+" indicates promotion of rooting, "±" no effect, and "-" inhibition.

* Plant growth retardants recently introduced, but not commercially available.

** Atotone : Growth promoting substance registered for use in horticultural plants.

*** Chemical formulation for extending longevity of cut flowers (contains sucrose, silver thiosulfate, aluminum sulfate, and hormones).

發되는 paclobutrazol 이나 uniconazol 그리고 이 고 확실하게 나타나서 實用面에서 그리고 많은 수의
들의 類似物質 等도 發根을 顯著히 促進한다는 報告 화학물질의 효과검정을 실시하는데 많이 이용되고
가 있다. 15, 23, 24) 실험조작이 간편하고 結果가 고르 있으나 실험에 所要되는 期間이 다소 길고(15~18

日) 옥신以外에도 gibberellin은 上胚軸伸長을 促進하나 發根을 억제하는 反應을 보이며 brassinolide도 gibberellin과 유사한 反應을 보이고 cytokinins는 發根을 현저하게 抑制하는 效果를 보여서 植物體로부터 抽出된 hormone 混合物을(crude extract) TLC나 PC 등의 기초적 정제과정을 거치지 않고 곧바로 評價하는데는 그 特殊性面에서 多少의 問題點이 있다.

2. 귀리 제1절간장 생검법 (*Avena first internode straight growth test*)

이 생검은 1956년에 Nitsch와 Nitsch에 의해 開發된 것으로서 實驗期間이 짧고 感應度가 뛰어나 利用價値가 높으나 特殊性(specificity)이 결여되어 gibberellin에도 類似하게 反應하며 조작이 까다롭고 시설을 요하는 등의 問題點이 있다. 주요과정은 다음과 같다. 11,21,27

귀리種子를 1% sodium hypochlorite 용액에 10分間 소독후 暗黑狀態에서 2時間 浸種한 후 다음의 作業을 모두 光線照射效果가 나타나지 않는 安全光인 綠色光線下에서 실시한다(형광등에 녹색 cellophane을 2겹 씌워서 사용). 品種은 'Brighton'이나 'Victory' 등을 使用하나 必須的 要因은 아니며 질석에 播種하여 25℃ 암흑에서 發芽시킨다. 3日 후에는 제1節間長이 25mm 정도에 달하게 되는데 이때가 處理適期이다. 이때 초엽(coleoptile)의 길이

는 5mm 정도가 되는데 이 초엽을 절단해 버리고 제1절간의 上部 2mm 정도도 역시 절단해 버린후 그 밑의 4mm 절편을 生檢에 利用한다. 11,25) 切斷된 切片은 1時間동안 통기가 잘 되는 멸균수로 세척하고 0.5ml의 완충용액이나 옥신을 함유한 시험관(13×100mm pyrex)에 5個씩을 넣고 흔히는 3反復으로 實施한다. 이들 시험관은 25℃ 暗黑下에서 20시간 동안 1rpm의 속도로 회전시키면서 배양하고 20시간 후에는 현미경(×10)하에서 길이를 0.1mm 단위까지 측정한다.

주의점을 보면 精밀한 溫度調節이 必要하므로 環境調節室(growth chamber)이 必要하고 解剖顯微鏡, rotary shaker, citric-acid-phosphate buffer, air pump 등이 필요되며 精밀한 조작 측정 등이 重要하다. 식물체로부터의 抽出物(crude extract)에 abscisic acid와 같은 生育抑制物質이 함유되어 있다면 이것도 함께 反應하여 평가되어지는데 이것은 長點보다는 短點에 해당된다. 국내산 귀리 5호 등을 박피하여 한전에서 발아시키면 均一하고 좋은 재료를 얻을 수 있다. 회전기가 없으면 1시간에 1회정도 흔들어 주어 굴곡을 방지하고 측정은 overhead project로 확대시켜 측정하면 더 용이하다.

Gibberellin 類 生檢法

多様な 生檢法이 開發되어 있으나 auxin 類에 比

Table 3. Comparison of some bioassays for gibberellins and GA-like substances.

Bioassays	Plant part and state	Effective concentrations (ppm)	Time required for		Remarks
			Preparation	Assay	
Dwarf rice seedling growth	Light-grown rice seedling(2-3 days after soaking)	0.001-1.0	2day	7day	High in specificity and sensitivity
Dwarf corn seedling growth	Light-grown seedling 7 days after sowing	0.01-100ug per seedling	7d	7-10d	Careful seedling selection is needed, slightly lower in sensitivity
Dwarf pea epicotyl elongation	Dark-grown seedlings 5 days after sowing	0.2-20.0	4d	5d	Highly specific
<i>Lactuca</i> hypocotyl elongation	Hypocotyl of germinating seedlings under light	0.01-10.0	36h	2-3d	Highly specific
Barley endosperm alpha amylase induction	Half-seed containing no embryo	0.0005-0.05	2d	1-2d	Highly specific
<i>Avena</i> first internode segment elongation	Lower coleoptile segment of dark-grown seedlings	0.001-0.10	3d	24hr	Sensitive to auxins, too

하면 많이 利用되고 있는 方法은 그다지 많지 않아서 表 3에 要略된 程度로 大部分의 生檢이 行하여진다. 이중에서도 特別히 短稈坊柱를 利用한 矮性벼生檢이 가장 많이 行하여 지고 다음으로 왜성완두의 莖長, 상치幼苗의 下胚軸生長, α -amylase의 比較等이다. Crozier 等(1970)은 9種類의 生檢方法을 26 gibberellins로 比較해본 결과 表 4에서 요약된 바와 같이 生檢方法에서 뿐만아니라 gibberellin의 종류에 따라서도 반응이 매우 달라질 수 있음을 밝힌바도 있다.

1. 矮性벼를 利用한 gibberellin生檢(Dwarf rice bioassay)

日本에서 開發된 것으로써 體內에서 gibberellin을 量産치 못해 矮化되는 벼의 幼苗에 外部로부터 gibberellin을 공급해 주면 그 量에 比例하여 伸長이 이루어 지는 特性을 利用한 것이다.⁶⁾ 그 方法을 보면 먼저 단은방주(또는 短稈銀坊柱)의 법씨를 無水 ethanol에 2分間 積신후 1.0% sodium hypochlorite 용액에 1시간 소독한뒤 흐르는 물로 깨끗이 씻는다. 이후 이들 種子는 30℃의 멸균수에서 2~3日 催芽시켜 초엽의 길이가 0.5mm정도가 되었을 때 이를 사용한다. 먼저 petri dish에 멸균된 솜을 2~3mm 두께로 깔고 溶液 또는 抽出液을

3ml 添加하여 솜진체에 고르게 적신 후 다시 이 솜을 건조시킨다. 다음에 증류수를 5ml 加하여 고르게 적신후 均一한 크기의 發芽中인 법씨를 10粒씩 配置시킨 후 뚜껑을 덮고 30℃, 1,500 lux에서 48時間 生育시킨다. 초기 48時間 生育後 뚜껑을 열고 다시 3ml의 증류수를 添加한 후 뚜껑이 없는 이들 petri dish가 여러개 들어갈 수 있는 플라스틱容器(30×45×15cm 정도)에 넣는다. 이때 용기 内部에는 증류수를 吸水시킨 2겹의 paper towel을 부착시켜 용기內가 水分飽和狀態가 되도록 한다.⁶⁾ plastic 용기에 petri dish를 넣은 후 다시 이 위를 PE wrap으로 덮은 후 앞서와 같은 환경조건(30℃, 1,500 lux)에서 5日間 生育시킨 다음 제 2엽의 葉신길이를 측정한다(그림 2).

이 方法은 먼저 特殊性이 높고 매우 예민하게 반응하여서 精밀한 生檢方法으로 가장 普遍的으로 活用되는 方法中의 하나이다. 所要되는 期間도 比較的 짧고 誤差도 적어서 매우 效率的이다. 그러나 여기에도 몇가지 要因들이 重要하게 作用하는데 먼저 供試 왜성벼의 品種에서 일반적으로 많이 쓰이는 短稈坊柱에 비해 品種에 따라 반응이 相異하게 나타남이 指摘되고 있으며²²⁾, 솜을 利用하는 代身에 agar 배지를 이용하는 것이 精密度를 더 높일 수 있으며¹²⁾ 또한 솜이나 agar에 生長 조절물질을 溶解시켜 種

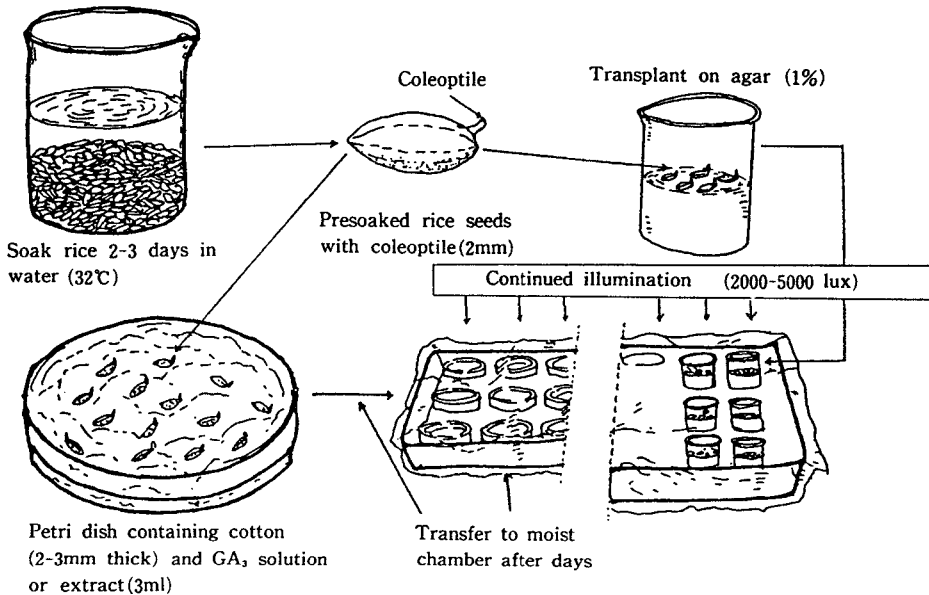


Fig. 2. Steps in determining the activity of gibberellin-like substances or endogenous gibberellins using dwarf rice seedlings (after Weaver, R. J.)

자가 吸收하여 반응을 誘導하는 것보다는 미세주사기(microsyringe)를 利用하여 少量의 溶液을 식물체에 直接 處理하여 주는 microdrop方法도 있다.¹²⁾ 실험時 光度가 각각 다소 다르게 표현되어 있으나 1,500 lux 이상이면 무방하며 agar 배지와 micro-drop時에는 1 μ l를 처리해 준다. 이 方法은 IAA나 auxin 류, 또는 ABA 등에 거의 반응하지 않으므로 매우 편리하다.^{3, 25, 27)}

2. 矮性완두를 利用한 生檢法

이 方法은 앞에서의 왜성벼보다는 감응도나 정확성이 다소 뒤지는 감은 있으나 작업이나 관리가 간편하여서 역시 많이 利用되고 있다. 시설이나 장비가 다소 소요되는 短點도 있는 反面 正確도가 높고 誤差가 적어 정밀실험에서는 勿論 多數의 物質에 따른 效果의 比較評價에도 많이 쓰인다. 主要方法을 順序대로 살펴보면⁹⁾ 먼저 왜성완두種子를 흐르는 물에 6~8 시간 침지시킨 후 축축한 질석에 1cm 정도 복토되도록 파종한다. 이때 品種은 가장 흔히는 'Progress No.9'을 이용하나 'Little Marvel'이나 그밖의 極矮性品種들도 다소간의 반응차이는 있으나 큰 支障은 없이 反應하나 많이 市販되는

'Sparkle'은 거의 반응치 않는다.¹⁶⁾ 初期에 種子가 吸收를 시작할 때 많은 量의 酸素도 반드시 함께 供給이 되어야 發芽가 좋고 均一해지므로 흐르는 물에 적절히 浸種하는 것이 均一한 發芽苗를 얻는데 必須的이다. 암흑상태에서 27°C 전후의 溫度下에서 약 4日이 경과되면 완두의 上胚軸이 질석위로 1cm 程度 자라오르게 되어서 완두의 草長이 2cm 정도가 되는데 이때가 供試適期이다. 발아한 완두를 질석에서 모두 캐내어 이중 均一한 크기의 苗를 골라서 사용하는데 苗의 길이가 지나치게 길거나 짧던지, 苗의 上胚軸이 지나치게 굵어있거나 異狀伸長을 보이는 것은 이때 엄밀하게 選定해 주는 것이 實驗結果의 正確度를 높이는 데 重要하다. 대략 充實한 種子라면, 그리고 播種狀態가 좋으면, 파종한 전체종자수의 50% 정도를 이용할 수 있으나 소요량의 3배 정도를 파종하는 것이 무방하다. 용기는 두께 0.5cm의 stylofoam 판을 6×21cm 정도로 잘라서 직경 1cm의 구멍을 1cm 간격으로 10개×2줄로 뚫고 아래판은 직경 0.5cm의 구멍을 위와 같은 간격으로 뚫어서 이들 두개의 판을 덧붙여서 使用하는데 이 판은 種子를 골려놓더라도 水面위로 떠 있게 되므로 대단히 편리하다.

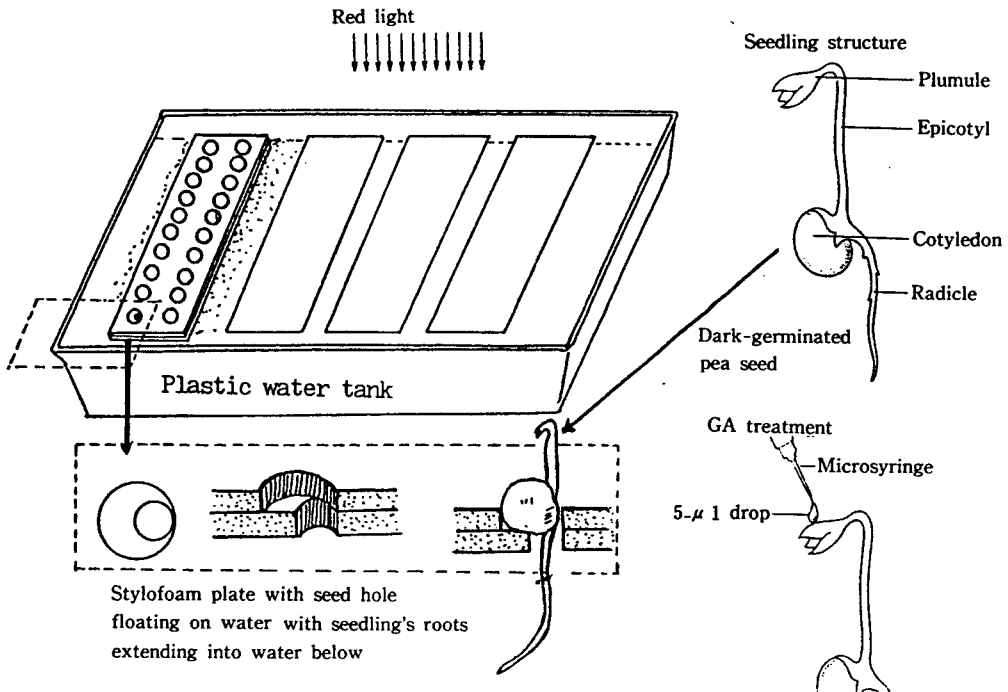


Fig. 3. Steps in the red-light inhibition test to determine presence of gibberellin or the activity of GA-like substances using dwarf pea(after Weaver, R. J.)

Table 4. Relative activities of gibberellins A1-A15 in 7 bioassay systems.²

Gibberellin	Barley aleurone	Dwarf pea	Lettuce hypocotyl	Dwarf rice	Cucumber	Dwarf d-1	maize d-2
A1	++++	+++	+++	+++	++	+++	○
A2	++++	++	++	+++	++	+	+
A3	++++	++++	+++	++++	++	++++	++++
A4	+++	+++	++	++	+++	+++	++
A5	++	+++	++	+++	+	++	+++
A6	++	++	++	+++	+	++	++
A7	+++	+++	++++	+++	++++	++++	++++
A8	+	+	+	+	○	○	○
A9	+	++	+++	++	+++	○	+++
A10	+	○	○	+++	++	○	++
A11	+	○	○	+	+	○	○
A12	○	○	○	+	+	+	○
A13	+	○	+	+	○	+	○
A14	○	○	○	+	○	+	○
A15	○	+	++	++	++	○	++

² After Crozier, A. et al. (1970).

Relative activities: +++++ very high, +++ high, ++ intermediate, + low, and ○ very low - inactive.

물통의 크기는 이러한 stylofoam 판을 5~10개 정도 띄울 수 있는 크기가 좋다(그림 3).

선별된 완두는 암흑에서 발아되어 매우 연약하므로 줄기 등을 쥐지 말고 반드시 종자를 조심스럽게 쥐어서 취급한다. 완두를 집어서 뿌리는 물위에 띄워진 stylofoam 판의 구멍으로 빼어내어水中으로 들어가게 하고 上胚軸은 위로 가급적 곧바로 위치하도록 한다. 이러한 묘의 선별, 취급과정에 光線을 받으면 안되므로 安全光이라고 일컫는 弱한 綠色光線下에서 작업을 실시한 뒤에 적색광선下에서 묘를 자라게 한다. 녹색광선은 일반 형광등에 녹색 cellophane sheet를 2겹 씌워서 얻고 적색광선은 市販되는 적색형광등(40W 2~4개)에 적색 셀로판지를 1겹 씌워서 얻는다. 이때 赤色光線의 效果는 伸長을 抑制하는 것이지만 phytochrome의 機作을 통해 上胚軸의 伸長을 抑制하므로 光度가 높을 必要는 없다. 이렇게 24時間 경과되면 취급시에 상처 받은 것 등은 말라 죽으므로 再選別을 하고 미세주사기(microsyringe)를 이용하여 5 μ l의 처리용액(또는 抽出液)을 苗先端에 處理한다. 이때 0.05%의 Tween 20을 加하면 展着效果가 增大되어 處理部位에 高르게 附着되는데 取扱이 다소 거칠면 處理部位에서 모두 흘러내려서 效果가 나타나지 않을 수도 있어 展着如否의 確認이 必須의이다.

處理後 6日間 連續照明下의 赤色光線에서 生育시

킨 후 種子에서 제 2 전개엽까지의 節間을 측정한다.

細密한 作業이 必要없고 處理效果가 顯著하게 나타나므로 大學院生이나 一般初歩者들이 많이 利用하고 展示用으로도 매우 훌륭하다. 供試品種의 選定이 중요한데 많이 쓰이는 'Progress No.9' 品種은 固定된 矮性品種이므로 少量만 확보하면 自體增殖하여 利用한다. 溫度에는 比較的 둔감하나 光線에는 매우 예민하여 赤色光이 實驗材料의 全般에 걸쳐 弱하게 그리고 高르게 照明되는 것이 重要하다. Auxin이나 ABA 等에는 거의 反應하지 않아서 特殊性이 뛰어나나^{16,27} dwarf rice에 比해 감응도가 다소 낮은 것이 결점이다.³⁾

싸이토키닌類 生檢法

싸이토키닌은 植物體로부터의 抽出이나 精製가 비교적 어려워 器機分析보다는 生檢에 依存하여야 하는 경우가 많은데 많은 生檢方法이 소개되어 있으나 實際로 많이 利用되는 方法은 그다지 많지 않다(表 5). 過去에는 담배의 callus 生育 等を 利用한 生檢이 많이 使用된 時期가 있었으나 期間이 지나치게 오래 所要되는 것이 決定的인 短點이 되어 근래에는 무우子葉生長, 그리고 오이지엽의 葉綠素形成 등이 많이 利用되고 있어서 이 세 方法에 關하여 구체적인 說明을 하고자 한다.

Table 5. Comparison of bioassay methods for cytokinins and cytokinin-like substances.

Bioassays	Plant parts and state for testing	Effective concentrations (ppm)	Time required for Preparation	Assay	Remarks
<i>Lemna</i> dark growth promotion	Meristematic fronds of etiolate vegetative adult	0.065-0.65	5d	2d	
<i>Lactuca</i> seed photodormancy release	Nondormant seeds	0.022-2.19	0	42hr	GA may show some effect,
<i>Raphanus</i> cotyledon expansion	Cotyledon of dark-grown seedlings, 2-3 days after sowing	0.022-21.9	48-72 hr		Very rapid & highly specific
Tobacco stem pith callus growth	Stem pith from young seedlings, regenerating	1.0-20.0	4-5 wks after sampling	5wks	Very slow
Cucumber cotyledon chlorophyll formation	Intact or excised cotyledons of 6-day-old seedlings	0.01-10.0	6d	17hr	Rapid, specific & sensitive

1. 무우자엽생장(Radish cotyledon expansion test)

사이토키닌의 세포분열促進效果에 기초를 두었으나 세포伸長效果도 勿論 包含되어 있다. 많은 双子葉植物에서 幼苗時 子葉을 分離시켜 培養하면 사이토키닌의 植物體內 生成部位인 뿌리組織이 除去되므로 以後의 子葉의 生育은 外部로부터 供給되는 사이토키닌量에 比例하여 進行된다. 따라서 광범위한 双子葉植物의 子葉이 實際 使用될 수 있으나 種子의 均一性, 材料確保의 容易性, 빠른 發芽特性, 감응정도 等 때문에 무우자엽이 가장 흔히 使用되고 있고 담배 수조직의 callus 生檢과도 類似한 效果를 보여 最近에는 가장 많이 利用되고 있다. 그 主要方法은 아래와 같다.

國內産 신진주무우(中央種苗)나 사철열무우의 種子를 無水 ethanol에 30秒 적신 후 1% sodium hypochlorite 용액에서 20分間 消毒한 뒤 멸균수로 꺼끗이 여러번에 걸쳐 씻어낸다. 이들 種子는 밑바닥에 蒸溜水를 充分히 적신 2겹의 여과지를 間 플라스틱容器內에 넣고 뚜껑을 닫아서 暗黑狀態 25 ± 2℃에서 48 ~ 72時間 發芽시킨다. 發芽가 되고 子葉이 出現되면 子葉中 작은 子葉을 끝이 뾰족한 forceps으로 分離하는데 葉柄을 包含해서는 안되며 葉身만을 分離해 낸다. 切斷된 子葉은 吸水한 filter paper 위에 임시로 간수한다. 充分한 子葉이 分離確保되면 同時에 供試하는데 먼저 petri dish(직

경 9cm)에 filter paper를 一枚 깔고 3 ml의 완충용액이나 cytokinin을 含有한 溶液 또는 抽出液을 添加한 후 切斷된 子葉中 均一한 것을 다시 고르면서 子葉의 뒷면이 filter paper에 附着되도록 하여 10~12個를 置床한다. 이들 petri dish는 다시 증류수로 完全飽和시킨 filter paper나 paper towel 등을 깔은 플라스틱용기(8~10개 정도의 petri dish가 들어갈 수 있는 크기)에 넣고 이 용기의 上面을 PE 필름으로 덮어 容器內 相對溫度를 飽和狀態로 維持하여 준다. 이후 이 용기를 光度 500~2,000 lux 정도의 약한 형광등으로 連續照明하면서 25 ± 2℃에서 3日間 培養한다. 3日後에는 이들을 꺼내어 葉表面에 附着된 水面을 휴지 등에 접촉시켜 제거한 후 그 重量을 測定하여 蒸溜水區(無處理區)의 重量增加分에 대하여 相對的인 增加程度로써 效果를 比較 - 評價한다. 정결히 취급하여 汚染을 最小化하도록 유의한다.

短時日內에 終了할 수 있고 多數의 sample을 同時에 比較할 수 있으며 自然的으로 生成되는 cytokinin類에 대한 反應이 높아서 많이 이용된다.^{10, 18, 19, 20, 23, 25, 27)} 그러나 表 6에서 보이는 것과 같이 gibberellin이나 brassinolide 等에도 다소간 反應하는 것이 問題가 될 수 있다.¹⁰⁾ 무우品種으로는 純度가 均一한 F₁ 品種이 더 適合한 것으로 판단되며^{10, 18)} 같은 品種內에서라도 種子選別을 하여 크고 均一한 種子를 利用하는 것이 有利하고 갖 채종된 種子是 休眠때문에 發芽가 늦고 不均一하므로 이는 피한다.

Table 6. Factors affecting radish cotyledon expansion bioassays (10, 18, 19, 20, 23).

Factors	Effective condition or concentrations	Cotyledon expansion ²	Remarks
Temperature (high)		+	15-25°C range
Light intensity (high)	Up to 2000 lux	++	
Light quality	Red light	+	Fluorescence light
Cultivars	Differences	+ or -	Larger-seeded cv.
Seed size within cultivar	Larger seeds	+	
Cotyledon age	Up to 3 days	+	
Light during germination	Light (nonetiolated cotyledons)	--	Less responsive
Auxin (IAA)	0.01-1.0 ppm	--	
Gibberellin (GA ₃)	0.01-1.0 ppm	--	
Cytokinin (Zeatin)	0.01-1.0 ppm	+++	
Abscisic acid	0.01-1.0 ppm	--	
IBA	0.01-1.0 ppm	--	
NAA	0.01-1.0 ppm	-	
2, 4-D	0.01-1.0 ppm	--	
Kinetin	0.01-1.0 ppm	++	Dark green coloring
BA (N ⁶ -benzyladenine)	0.01-1.0 ppm	+++	Dark green coloring
Adenine sulfate	0.01-1.0 ppm	+	
2-ip	0.01-1.0 ppm	++	
Fructose	0.1-1.0%	+	
Saponin	1.5-150 ppm	++	Rooting & callus
Ginseng extract	3,000 ppm	+	Rooting & callus
Ginseng tea	1.0%	+	Rooting & callus

² Direct rooting or callus could be observed within 7 days after incubation depending upon cultivars. 'Comet', an extra maturing cultivar with larger seeds showed such organ differentiation readily.

種子播種粒數는 實際 利用코자 하는 子葉數보다 5 ~ 10 倍로 하여야 均一한 子葉의 確保가 용이하다. 우수品種에 따른 反應差外에도 光度, 酸度, 發芽條件 등의 영향을 받는다.¹⁰⁾

2. 오이자엽의 葉綠素形成 (Cucumber cotyledon chlorophyll formation test)

暗發芽된 오이의 子葉은 葉綠素를 含有치 않으나 cytokinin을 添加한 溶液이나 培地에 培養하면 切斷된 子葉內에 엽록소形成을 促進하므로 이 原理를 利用하여 生檢할 수 있다.⁵⁾

感應度가 뛰어나고 生檢에 所要되는 時間이 극히 짧아서 대단히 좋은 方法으로 分析되고는 있지만 그 效果나 容易性에 比하면 많이 利用되지 않고 있는 實情이다. 그 方法을 간단히 要約한다. 먼저 消毒된 種子를 27°C 暗狀態에서 發芽시키는데 질석 또는 filter paper 어느 것을 使用해도 좋다. 播種後 6日이 경과되면 實驗에 使用할 수 있을 程度의 크기 에 도달하므로 무우에서와 유사하게 綠色光線下에서 子葉을 떼어내어 petri dish에 cytokinin 溶液

또는 植物體 抽出液을 filter paper에 침투시켜 넣고 이 위에 다시 分離된 子葉을 놓고 17時間동안 暗狀態에서 培養한다. 17時間後에는 이들 子葉으로부터 엽록소를 抽出하여 spectrophotometer로 定量하여 그 效果를 比較한다 (Fletcher and McCullough 논문 참조 요망).

3. 담배줄기髓 (Pith) 켈러스生育

Skoog 등 (1948)에 依해 開發된 方法으로써 한 동안 대단히 널리 쓰이기도 했지만 根本적인 短點이 있어서 最近에는 많이 利用되지 않는다.²⁷⁾ 먼저 이 生檢의 原理는 複雜한 植物體보다는 켈러스조직 등은 外部에서 供給되는 植物홀몬의 영향을 더 銳敏하게 받으며 특히 細胞分裂 등과 關係된다면 더더욱 確實히 나타나서 未知의 또는 抽出物內의 cytokinin 유사물질의 定量이 매우 낮은 濃度일지라도 充分히 可能하다는 것이다. 主要方法은 아래와 같다. 담배 種子를 播種箱子에 播種하여 盆에 定植後 約 4個月 生育시킨다 (草長 1m 内外). 이후 줄기先端에서 10cm 밑에서부터 줄기를 15cm 길이로 잘라서

순홍수에 20分間 멸균한다. 다음엔 clean bench에서 멸균된 cork borer로 담배 髓組織을 도려내어 약 2mm 두께(重量은 약 50mg 정도)의 切片을 만들어서 준비된 三角 flask 등의 agar培地위에 置床하므로써 處理가 시작된다. Agar培地를 멸균하자면 autoclaving을 하여야 하나 이때 cytokinin이나 이와 類似한 物質 등은 熱에 의해 파괴되거나 特性이 변하므로 멸균후 各各의 flask內的 培地가 파스한 狀態로 아직 굳어지기 前에 millipore filter로 無菌화된 cytokinin 용액 또는 抽出液을 添加하여야 한다. 약 5주간을 組織培養室에서 培養된 callus를 꺼내어 重量을 比較하므로써 效果有無 및 그 程度를 推定할 수 있다. 이 生檢은 뛰어난 感應度나 cytokinin에만 特殊하게 반응한다는 훌륭한 長點을 지녔음에도 불구하고 近來에는 많이 利用되지 않는데 그 理由는 시설(조직배양시설+溫室)이 必要하고 지나치게 長期間이 所要된다는 點이다. 대개의 生檢은 10여일 程度면 완료되나 이 生檢은 6~7個月이 所要되고 설혹 적합한 材料(개화하지 않고 있는 담배의 줄기선단)를 얻었다고 해도 5주나 必要하여 小量의 精密檢定에는 어쩔지 몰라도 大規模의 效果比較나 藥劑選定 등에 適用할 수가 없다. 品種은 特別히 問題視되지는 않으므로 예비실험을 거친 同一品種을 調節된 環境條件下에서 栽培하여 利用하면 實驗에 따른 誤差를 效果의으로 줄일 수 있다.

摘 要

植物호르몬을 包含한 各種 植物生長調節物質의 生檢法(bioassays or biological assays)을 紹介 및 比較檢討함과 同時에 一貫性있는 結果를 얻기 爲한 몇 가지 留意點을 指摘코자 옥신類 生檢에서는 綠豆發根과 쿼리제 1절간장伸長, gibberellin에서는 왜성벼의 제 2영신장과 矮性완두의 上胚軸伸長, 그리고 cytokinin類에서는 무우子葉生長, 담배줄기髓껍질스生長, 그리고 오이子葉內엽록소形成 등의 方法을 요약하였다. 아울러 一連의 實驗을 통해 얻어졌던 各種生長調節物質(特別히 最近에 開發되는 各種 矮化劑)에 對한 反應을 株本별로 요약 및 比較하였다.

引 用 文 獻

1. Aytoun, R. S. C., A. J. Dunn and D. A. L. Seiler. 1959. A biological assay for gibberellic acid with rice seedlings. *Analyst* 84: 216.
2. Blazick, F. A. and C. W. Heuser. 1979. The mungbean rooting bioassay: A reexamination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104: 117-120.
3. Crozier, A., C. C. Kuo, R. C. Durley, and R.P. Pharis. 1970. The biological activity of 26 gibberellins in nine plant bioassays. *Can. J. Bot.* 48: 867-877.
4. Davies, P. J. (ed.) 1987. *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Nijhoff. pp.222-239.
5. Fletcher, R. A. and D. McCullogh. 1971. Cytokinin-induced chlorophyll formation in cucumber cotyledons. *Planta* 101: 88-90.
6. Hayashi, T. and Y. Murakami. 1954. Response of bakanai fungus: Part 32. The physiological action of gibberellin. VII. Response of different parts of the cereal grass leaf to gibberellin. *J. Agric. Chem. (Japan)* 28: 543-545.
7. Hess, C. E. 1961. The mungbean bioassay for the detection of root promoting substances. *Plant Physiol. (Suppl.)* 36: xxi.
8. Hess, C. E. 1964. Naturally occurring substances which stimulate root initiation. *Cent. Natl. de la Rech. Sci., Paris* 123: 527.
9. Kohler, D. and A. Lang. 1963. Evidence for substances in higher plants interfering with response of dwarf peas to gibberellin. *Plant Physiol.* 38: 555-560.
10. 許允燦·薛鍾姬·閔炳訓·李政明. 1989. 무우 자엽생장을 利用한 生檢에 미치는 몇가지 要因에 관한 연구. *한국원예학회 논문발표요지* 7(1): 50-51.
11. Mitchell, J. W. and G. A. Livingston. 1968. *Methods of studying plant hormones and growth-regulating substances*. USDA Agric. Handbook 336.

12. Murakami, Y. 1968. The microdrop method, a new rice seedling test for gibberellins and its use for testing extracts of rice and morning glory. *Bot. Mag. (Tokyo)* 81 : 33-43.
13. 李政明·趙惠敬. 1977. 各種 生長調節物質의 生檢法에 關한 研究. II. 녹두와 무우의 發根에 미치는 效果. *경희대학교 산업과학기술연구소 논문집* 5 : 32-41.
14. 李政明·沈相七·金武成. 1981. 各種 生長調節物質의 生檢法에 關한 研究. II. 녹두발근에 미치는 環境條件, 摘葉 및 核酸 複合 調味料 아이미의 效果. *조영식박사 회갑기념 논문집* 775-783(경희대학교).
15. 李政明. 1989. 미발표 data.
16. Lee, J. M. and N. E. Looney. 1978. Changes in abscisic acid and gibberellin levels in apple seeds during stratification and their relationship to genetic compaction. *Can. J. Plant Sci.* 58 : 761-767.
17. Lee, J. M. and N. E. Looney. 1977. Branching habit and apical dominance of compact and normal apple seedlings as influenced by TIBA and GA₃. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102(5) : 619-622.
18. Letham, D. S. 1968. A new cytokinin bioassay and the naturally-occurring cytokinin complex. *In Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances* (Wightman, F. and Setterfield, G. ed.) Runge Press (Ottawa) pp. 19-31.
19. Letham, D. S. 1971. Regulators of cell division in plant tissues. XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons. *Physiol. Plant.* 25 : 391-396.
20. Letham, D. S., P. B. Goodwin and T. J. V. Higgins. 1978. *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise*. Elsevier. pp. 29-31, 129-134, 224-226.
21. Nitsch, J. P. and C. Nitsch. 1956. Studies on the growth of coleoptile and first internodal sections; A new sensitive straight growth test for auxins. *Plant Physiol.* 31 : 94-111.
22. Ogawa, Y. 1963. Studies on the conditions for gibberellin assay using rice seedlings. *Plant & Cell Physiol.* 4 : 227-237.
23. 裴道咸. 1983. 人參성분이 원예작물의 생육 및 其他 特性에 미치는 영향. *경희대학교 석사학위 논문* pp.1-44.
24. 朴映科·閔炳訓·朴惠遠·李政明. 1987. pp-333, Brassinolide 및 기타 生長조절물질의 單用 및 混用이 녹두 幼苗의 發根 및 胚軸伸長에 미치는 영향. *경희대학교 식량자원개발연구소 연구논문집* 8 : 1-15.
25. Weaver, R. J. 1972. *Plant Growth Substances in Agriculture*. W. H. Freeman. pp. 23-66.
26. Yokoda, T. and N. Takahashi. 1985. Chemistry, physiology and agricultural application of brassinolide and related steroids. *In Plant Growth Substances*(ed. M. Bopp). pp. 129-138.
27. Yopp, J. H., L. H. Aung and G. L. Steffens. 1986. *Bioassays and Other special Techniques for Plant hormones and Plant Growth Regulators*. Published by Plant Growth Reg. Soc. Amer. pp. 11-123.