

에틸렌 억제 물질들이 현삼의 식물체재분화에 미치는 영향

김용경*¹ · 박동식****¹ · 김성무** · 조동하** · 유창연*** · 박상언*[†]

*충남대학교 농업생명과학대학 식물자원학부, **강원대학교 생명공학부,
강원대학교 한방 바이오 연구소, *강원대학교 농업과학연구소

Effect of Ethylene Inhibitors on Plant Regeneration of *Scrophularia buergeriana* M.

Young Kyung Kim*¹, Dong-Sik Park****¹, Cheng Wu Jin**, Dong Ha Cho**,
Chang Yeon Yu***, and Sang Un Park*[†]

*Division of Plant Science & Resources, Chungnam National University, 220, Daejeon 305-764, Korea.

**Kangwon National University, School of Bioscience & Biotechnology, Chuncheon 200-701, Korea.

***Bioherb Research Institute, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

****Kangwon National University, Research Institute of Agricultural Sciences, Chuncheon 200-701, Korea.

ABSTRACT : The study was carried out to establish an improved protocol for shoot organogenesis and plant regeneration from leaf explant cultures of *Scrophularia buergeriana* M. with the treatment of ethylene inhibitors [silver nitrate (AgNO₃), aminoethoxyvinylglycine (AVG), Cobalt chloride (CoCl₂)]. The regenerated shoots obtained from leaf explant cultures on MS medium containing 2 mg/l BAP. The additions of AgNO₃, AVG, and CoCl₂ substantially improved the shoot regeneration frequency, at the optimal concentration of 7 mg/L, 7 mg/L, and 3 mg/L respectively. The regenerated shoots could be easily rooted with 0.1 mg/L IBA treatment. The rooted plants were hardened and transferred to vermiculite with a 85% survival rate where they grew normally.

Key Words : ethylene inhibitors, organogenesis, plant regeneration, *Scrophularia buergeriana* M.

서 언

현삼 (*Scrophularia buergeriana* M.)은 현삼과 (Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 초본으로 주요 약용식물 중 하나이며, 소염, 인후염, 비염, 종기, 번비 등에 약효가 있다 (Qian *et al.*, 1992; Duck and Ayensu, 1985; Jiansu New Medical College, 1977). 또한 현삼과 동속식물에는 iridoid glycosides, phenylpropanoids, terpenoids, 그리고 flavonoids 등과 같은 유효 물질이 생합성된다 (Li *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1993; Kajimoto *et al.*, 1989; Calis *et al.*, 1987; Kim과 Kim, 2000; Lin *et al.*, 2000).

에틸렌은 기체상태의 식물 생장조절제로 식물 기내 배양에서 생장과 발육에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Lieberman, 1979; Yang and Hoffman, 1984). 하지만 기내 배양에서 식물체의 형태 발생과 생육에 미치는 에틸렌의 정확한 기작은 아직 밝혀지지 않았지만, 에틸렌이 식물 재분화

를 억제하는 요소로 작용하는 것으로 보고있다. 그래서 식물체 재분화를 촉진시키기 위해 기내 배양 과정에서 Aminoethoxyvinylglycine (AVG), Cobalt chloride (CoCl₂), Benzyl isothiocyanate (BITC), aminocarboxy propionoc acid, 1-Methylcyclopropene (1-MCP), Polyamines, Silver nitrate (AgNO₃), 3,4,5-Trichlorophenol, Salicylic acid (2-hydroxy benzoic acid) 등의 다양한 에틸렌 억제 물질이 사용되어지고 있다 (Kumar *et al.*, 1998).

현삼의 경우 체세포 배발생 (somatic embryogenesis)을 통한 재분화 (Chae *et al.*, 1993)와 신초 기관분화를 통한 식물체 재분화 (Park *et al.*, 2003)가 보고된바 있으나 에틸렌 억제 물질들이 현삼의 기내 신초 기관발생과 식물체재분화에 어떤 영향을 주는지에 대해선 아직 보고된 바가 없다.

본 실험에는 에틸렌 억제 물질인 질산은 (AgNO₃), AVG (aminoethoxy-vinylglycine), Cobalt chloride (CoCl₂)가 현삼 신초 기관 분화에 미치는 영향을 조사하고, 식물체 재분화를

¹ These two authors contributed equally to this work

[†]Corresponding author: (Phone) +82-42-822-2631 (E-mail) supark@cnu.ac.kr

Received November 3, 2006 / Accepted November 28, 2006

향상시킬 수 있는 방안을 모색하여 현삼의 신초 기관분화를 통한 식물체 형질전환 연구에 기초 자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 무균 발아

현삼 종자를 에탄올 70% (v/v) 용액에 침지한 뒤 2% (v/v) sodium hypochlorite 용액에 tween 20을 0.1 ml 첨가 후 10 분간 표면살균 하였다. 멸균수에 3회 세척한 후 20 ml의 MS (Murashige & Skoog 1962) 고형 배지가 든 페트리디쉬 (100 × 15 mm)에 10립의 종자를 배양하였다. 배양은 내부 온도 25 ± 1°C, 광도 5000 lux로 16 조사되는 배양기내에서 이루어 졌다.

2. 기관분화 유도과 식물체 재분화

발아 후 20일 동안 성장한 유식물체의 잎을 1 cm × 1 cm 길이로 잘라서 7개 절편을 재분화용 배지가 첨가된 페트리디쉬에 치상양하였다. 재분화용 배지는 Park 등이 발표한 논문 (Park *et al.*, 2003)에서와 같이 BAP (6-benzylaminopurine) 2 mg/l 이 처리된 MS 고형배지를 이용하였다. 기관분화의 촉진을 위해 농도별 (0, 1, 3, 5, 10, 20 mg/L)의 질산은 (AgNO₃), AVG (aminoethoxyvinylglycine), Cobalt chloride (CoCl₂)를 4.0 mg/L BAP가 첨가된 MS 배지에 처리하여 조사하였다. 배양은 25 ± 1°C growth chamber의 형광등 아래서 16시간 광조건, 5000 lux 광도로 실시하였다.

신초가 약 1 cm 가량 성장하였을 때 기부를 절단하여 0.1 mg/L IBA (indole-3-butyric acid)가 처리된 MS고형배지가 든 Magenta boxes에서 3주 동안 배양하여 뿌리를 유도하였으며, 발근 후 멸균 소독한 vermiculite에 옮겨 순화를 시켰다.

결과 및 고찰

에틸렌 억제 물질 (AgNO₃, AVG, 그리고 CoCl₂)이 현삼 신초 기관 분화에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 현삼 재분화 배지에 각기 다른 농도의 AgNO₃, AVG, 그리고 CoCl₂를 처리하여 현삼 잎 절편을 배양하였다.

배양한 결과 배양 약 2-3주 후 잎 절편의 절단 면으로부터 부정아가 형성되는 것을 관찰할 수 있었고, 배양 6주 후에는 신초로 완전히 발달되었다.

질산은 (AgNO₃)을 처리한 결과, 20 mg/L를 제외한 각 처리에서 신초 형성을 촉진시키는 것을 관찰할 수 있었다. AgNO₃ 7 mg/L이 첨가된 배지에서 최고치의 신초를 생산할 수 있었고, 대조구에 비하여 약 30% 증가된 길이신장을 보였다.

질산은 (AgNO₃)은 Ag 이온이 에틸렌 결합을 위한 수용 능력을 감소시키는 작용을 함으로 에틸렌 발생을 억제 시키고

Table 1. Effect of the different concentrations of AgNO₃ on shoot regeneration from leaf explant cultures of *Scrophularia buergeriana* M. after 6 weeks on shoot regeneration medium.

AgNO ₃ (mg/L)	No. of shoots/explant	Shoot length (cm)
0	6.3 ± 0.7	0.7 ± 0.1
1	6.5 ± 0.5	0.7 ± 0.1
3	7.1 ± 0.8	0.8 ± 0.2
7	9.7 ± 0.9	1.0 ± 0.2
10	7.9 ± 0.8	0.8 ± 0.1
20	4.2 ± 0.3	0.4 ± 0.1

Each value is the mean ± standard error of three repeated experiments with 30 explants used in each treatment.

(Yang, 1985), 에틸렌 발생 억제 물질 중 조직배양에서 가장 보편적으로 쓰이는 질산은은 여러 식물종에서 기내 기관 분화 향상에 효과가 입증된 바 있다 (Kumar *et al.*, 1998).

현삼의 신초 분화에 미치는 AVG 영향을 알아 보기 위하여 농도 별로 재분화 배지에 처리하여 6주간 배양한 결과 질산은 (AgNO₃) 처리에서 유사한 결과를 보였다. AVG 역시 각 처리구에서 신초 형성이 촉진되었으나, 20 mg/L 이상의 농도에서는 오히려 신초의 분화를 억제하는 것으로 나타났다. AVG 처리 농도 또한 7 mg/L이 신초분화에 가장 적합한 것으로 나타났다. 절편 당 평균 9.2개의 신초를 형성하였으며 대조구에 비하여 23% 정도 향상된 신초 길이신장을 보였다.

AVG는 ACC synthase 효소 활성화에 필요한 pyridoxal phosphate를 억제시킴으로 ACC synthase 효소 활성을 억제하는 것으로 알려졌다. AVG의 ACC synthase 효소 활성 억제 작용으로 에틸렌 생산이 저하 된다 (Adams and Yang, 1979; Yang and Hoffman, 1984). AVG 처리로 pomegranate (*Punica granatum* L.)와 *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson의 기내 배양에서 신초 기관분화를 향상시킨다는 보고가 있었으며 (Chi *et al.*, 1991; Naik & Chand, 2003), 본 실험에서도 AVG (3-10 mg/l) 처리가 현삼 잎 절편 배양에서 신초 기관분화를 향상시킨다는 결과를 얻었다.

CoCl₂은 모든 처리구에서 신초 형성에 별다른 영향을 미치지 못하였다. 저농도 처리(1-3 mg/L)에서 잎 절편 당 6.5-6.9개의 신초가 형성되어 무처리에 비해 약간의 증가를 보였지만, 신초 길이에서는 대조구와 비교하여 0%의 신장율을 보여 무처리와 차이가 없었다. 그리고 7 mg/l 이상처리에서는 오히려 신초분화 능력과 길이신장이 억제되는 것으로 나타내었다.

에틸렌 억제제 중에 하나인 CoCl₂ 처리로 해바라기 (Chraibi *et al.*, 1991), 당근 (Roustan *et al.*, 1989), silktree (*Albizia julibrissin*)와 유채 (*Brassica campestris*) (Palmer, 1992) 식물체 재분화를 향상시킨다는 보고가 있으나, 본 실험에서는 저농도 처리에서만 약간의 효과가 있었을 뿐 전반적으로 큰 영향은 미치지 못하였다.

Table 2. Effect of the different concentrations of AVG on shoot regeneration from leaf explant cultures of *Scrophularia buergeriana* M. after 6 weeks on shoot regeneration medium (MS medium with 1 mg/l BAP).

AVG (mg/L)	No. of shoots/explant	Shoot length (cm)
0	6.3 ± 0.7	0.7 ± 0.1
1	6.2 ± 0.6	0.7 ± 0.1
3	6.9 ± 0.8	0.8 ± 0.2
7	9.2 ± 0.9	0.9 ± 0.1
10	8.7 ± 0.7	0.9 ± 0.2
20	4.6 ± 0.4	0.5 ± 0.1

Each value is the mean ± standard error of three repeated experiments with 20 explants used in each treatment.

Table 3. Effect of the different concentrations of CoCl₂ on shoot regeneration from leaf explant cultures of *Scrophularia buergeriana* M. after 6 weeks on shoot regeneration medium.

CoCl ₂ (mg/L)	No. of shoots/explant	Shoot length (cm)
0	6.3 ± 0.7	0.7 ± 0.1
1	6.5 ± 0.6	0.7 ± 0.1
3	6.9 ± 0.7	0.7 ± 0.2
7	5.8 ± 0.6	0.6 ± 0.1
10	5.3 ± 0.6	0.5 ± 0.1
20	4.4 ± 0.3	0.4 ± 0.1

Each value is the mean ± standard error of three repeated experiments with 20 explants used in each treatment.

재분화된 현삼 신훈초는 0.1 mg/L IBA 가 처리된 발근배지에서 배양 3주후 쉽게 뿌리를 유도하였으며 다. 발근된 식물체는 순화과정을 거쳐 vermiculite로 옮겼으며 85% 정도의 생존율을 보였다. 이상의 결과를 살펴보면 현삼 기내 잎 절편 배양에서 에틸렌 억제물질이 신훈초 기관발생을 향상시킬 수 있음을 관찰하였다.

적 요

에틸렌 억제 물질인 질산은 (AgNO₃), aminoethoxyvinylglycine (AVG), Cobalt chloride (CoCl₂)를 현삼 잎 절편을 배양에 처리하여 향상된 신훈초 기관분화와 식물체재분화 방법을 확립하기 위한 연구를 수행하였다. 재분화된 신훈초는 2 mg/l BAP가 처리된 MS 배지에서 배양하는 잎 절편으로부터 얻을 수 있었다. AgNO₃ (7 mg/L), AVG(7 mg/L)와 CoCl (3 mg/L) 처리에서 현삼 신훈초 분화의 빈도가 향상된 것을 관찰하였다. 0.1 mg/L IBA 가 처리된 배지에서 재분화된 신훈초로부터 쉽게 뿌리를 유도하였다. 발근된 식물체는 순화과정을 거쳐 vermiculite로 옮겼으며 85% 정도의 생존율을 보였다.

LITERATURE CITED

- Adams DC, Yang SF (1979)** Ethylene biosynthesis: identification of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:170-174.
- Calis I, Gross G, Sticher O (1987)** Phenylpropanoid glycosides isolated from *Scrophularia scopolii*. *Phytochemistry*, 26:2057-2061.
- Chae YA, Park SU, Kim HH (1993)** Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf tissue in *Scrophularia buergeriana* M. *Korean J. of Plant Tissue Culture*, 20:125-128.
- Chi GL, Pua EC, Goh CJ (1991)** Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson in Vitro. *Plant Physiol.*, 96:178-183.
- Chraïbi BKM, Latche A, Roustan J, Fallot J (1991)** Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Rep.*, 10: 204-207.
- Duck JA, Ayensu ES (1985)** Medical Plants of China. Algonac MI. p. 599.
- Jiansu New Medical College (Ed.) (1977)** Dictionary of Chinese Crude Drugs. p. 769.
- Kajimoto T, Hidaka M, Shoyama K, Nohara T (1989)** Iridoids from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry*, 28:2701-2704.
- Kim SR, Kim YC (2000)** Neuroprotective phenylpropanoid esters of rhamnose isolated from roots of *Scrophularia buergeriana*. *Phytochemistry*, 54:503-509.
- Kumar PP, Lakshmanan P, Thorpe TA (1998)** Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.*, 34:94-103.
- Lieberman (1979)** Biosynthesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30:533-591.
- Lin SJ, Jiang SH, Li YM, Zeng JF, Zhu DY (2000)** Two novel iridoids from *Scrophularia buergeriana*. *Tetrahedron Letters*, 41:1069-1071.
- Li YM, Jiang SH, Gao WY, Zhu DY (1999)** Iridoid glyco-sides from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry*, 50:101-104.
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Naik SK, Chand PK (2003)** Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote in vitro adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum L.*). *J Plant Physiol.*, 160:423-430.
- Park SU, Chae YA, Peter J. Facchini (2003)** Genetic transformation of the figwort, *Scrophularia buergeriana* Miq., an Oriental medicinal plant. *Plant Cell Rep.*, 21:1194-1198.
- Palmer CE (1992)** Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Rep.*, 11:541-545.
- Qian J, Hunkler D, Rimpler H (1992)** Iridoid-related aglycone and its glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry*, 31:905-911.
- Roustan JP, Latche A, Fallot J (1989)** Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. *Plant Cell Rep.*, 8:182-185.

Yamamoto A, Miyase T, Ueno A, Maeda T (1993) Scrophularisaponins II-IB, new saikosaponin homologs from *Scrophularia kakudensis* FRANCH. *Chem. Pharm. Bull.*, 41:1780-1783.
Yang SF (1985) Biosynthesis and action of ethylene. *Hort Sci.*, 20:

41-45.

Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35:155-189.