

Gibberellic Acid와 Absciscic Acid가 보리 鞘葉의 核酸 및 核酸分解酵素에 미치는 影響

徐 鎔 澤
全南大學校, 農科大學, 農化學科
(1977년 4월 13일 수리)

The Effect of Gibberellic Acid and Absciscic Acid on Ribonucleic Acid and Ribonuclease in Barley Coleoptiles

Yong-Tack Suh

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chonnam National University,
(Received April 13, 1977)

SUMMARY

In the barley coleoptile sections treated with either $1 \times 10^{-5}M$ absciscic acid (ABA) or $1 \times 10^{-5}M$ gibberellic acid (GA), the time course changes of ribonuclease (RNase) activity and ribonucleic acid (RNA) profiles were studied.

The results may be summarized as follows:

1. While GA suppressed RNase activity, ABA activated it.
2. High level of s-RNA and low level of r-RNA compared with normal plant sections in hormone-untreated coleoptiles seemed to be the results of increased RNase activity in the incubation period.
3. While GA retarded the decomposition of r-RNA, ABA activated it and the results seemed to be related with RNase activity.
4. GA activated the synthesis of RNA-DNA component, and ABA suppressed it.
5. Increase in the amount of s-RNA with the treatment of ABA may be due to the decomposition of r-RNA.

緒 論

Absciscic acid (ABA)는 生長抑制⁽²⁴⁾, 落葉⁽⁴⁾, 落果⁽⁴⁾, 種子發芽抑制 등 植物의 生理調節現象에 關係하는 一種의 hormone으로서 植物生化學的인 면에서도 큰 關心을 자아내고 있다.

1965년 Ohkuma⁽¹⁹⁾는 목화의 아래에서 分離한 天然生長阻害物質을 Abscisin II라 命名하였으며 同時에 그 化學的인 構造를 밝혔다. Eagle⁽¹⁰⁾은

長日條件下의 벗나무 幼苗에서 短日條件下의 同葉 추출액을 처리하여 休眠狀態의 萌芽를 얻어 이에 關係하는 物質을 Dormin이라 하였다. Cornforth⁽⁵⁾는 sycamore葉의 메타놀 抽出液에서 Dormin을 分離하여 이것이 Abscisin II와 同一한 構造의 化合物임을 밝혔고 Tsukamoto⁽²⁷⁾도 양파에서 分離한 生長抑制物質이 ABA임을 밝혔다. Thomas⁽²⁸⁾는 벗나무의 休眠이 ABA와 gibberellic acid(GA) 類 間의 平衡에 依하여 調節된다고 하였고 Blaydes⁽⁸⁾

는 ABA가 귀리의 鞘葉 伸張을 阻害할 뿐만 아니라 RNA의 合成을 阻害한다고 하였다. Rappaport 等^(21,22)은 고구마의 筗(芽)에서 그리고 Nitsan⁽²³⁾은 Lentil豆의 上胚軸에서 GA의 處理가 DNA 및 RNA의 合成을 急激히 增大시킨다고 하였고 Shih⁽⁶⁾도 GA는 RNA와 DNA의 合成을 促進시키나 ABA는 이를 抑制한다고 하였다. Van Overbeek⁽³⁰⁾는 浮藻草(개구리밥, Lemna)에서 ABA가 生長 및 核酸代謝 特히 DNA의 合成을 阻害한다고 하였다

Viller⁽³¹⁾는 물푸레 나무(Fraxinus)胚에서 uridine 및 thymidine의 核酸 incorporation을 ABA가 阻害한다고 하였고 Kahn⁽²⁾은 배(pear)의 胚에서 s-RNA, DNA-RNA 複合體 및 light r-RNA로의 P³²의 incorporation을 ABA가 阻害하나 GA는 이 作用을 역전시키는 效果가 있다고 하였다. Walton⁽³²⁾은 콩 胚芽에 5시간의 ABA 처리는 큰 影響을 주지 않으나 13시간의 처리는 P³²의 核酸 incorporation을 阻止한다고 하여 P³²의 incorporation은 伸張開始이후에 活潑하다고 하였다. Pearson⁽²⁰⁾등도 콩당무우 잎에서 ABA 處理時間을 16시간으로 延長시키면 核酸合成 저해효과도 커진다고 하였고 그 原因은 chromatin 및 RNA polymerase의 活性 阻害 때문이라고 하였다. 그러나 Srivastava等^(18, 20)은 보리 잎에서 ABA에 의한 RNase의 活性增加가 RNA의 減少를 초래한다고 하였고 Bex^(13,14)는 옥수수 잎에 ABA의 處理는 s-RNA 보다 r-RNA의 合成을 阻害시킨다고 하였고 Leshem⁽¹⁶⁾은 담배에서 ABA에 의한 s-RNA의 增大는 r-RNA의 分解 때문이라고 하였다.

著者は ABA가 核酸合成을 阻害하는 原因을 究明하기 위한 研究의 一部로서 보리의 鞘葉에 ABA 및 GA를 處理, 이것을 培養하여 RNase 活性의 消長 및 核酸의 成分比를 조사하여 몇가지 結果를 얻었기에 이에 發表하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

보리(*Hordeum vulgare* cultivar Sedohadaka)種子を 水洗 후 1% NaClO 水溶液에 20분간 沈漬 滅菌한 후에 물에 20분간 沈種하였다. 90×60×8cm의 나무상자에 비닐膜을 깔고 증류수로 洗滌한 모래를 2.5cm 두께로 平平히 깔아 苗床을 만들고 이에 種子를 均一하게 播種한 후에 비닐膜을 씌워 180°C의 暗所에서 7일간 방치하였다.

2cm 程度된 鞘葉을 떼어내고 頂點下 3mm를 切

斷하여 버린 1.5~2.0cm의 鞘葉을 供試하였다.

1×10⁻⁵M ABA, 1×10⁻⁵M GA₃ 수용액 5ml과 同量의 증류수가 들어 있는 50ml容 三角 플라스크에 鞘葉 500mg 및 chloramphenicol 수용액 70μl (0.5mg/ml)를 가하고 16~18°C의 暗處에서 振盪 培養시키면서 5시간 간격으로 30시간동안 RNase 活性의 消長을 관찰하였다.

核酸의 成分比 조사용 鞘葉은 1×10⁻⁵M ABA, 1×10⁻⁵M GA₃ 수용액 10ml 및 同量의 증류수가 각각 들어간 100ml容 三角 플라스크에 鞘葉 2g 및 140μl의 chloramphenicol 수용액을 가하고 16~18°C의 暗所에서 20시간 振盪培養하였다.

2. 實驗方法

(1) RNase 活性의 測定

Dalby와 Davies⁽⁶⁾의 方法에 따라 鞘葉 및 冷 0.5M KCl을 0.05M Tris-HCl 완충액 (pH 7.5) 10ml을 4°C로 冷却된 약연(藥液)에 넣고 마쇄하고, 4°C, 6,000rpm에서 30분간 遠心分離한 후에 沈澱을 同 완충액 10ml로 懸液 同 條件下에서 再遠心分離하여 上澄液을 흡하고 酵素液으로 하였다. 시험관에 효소액 1ml, 0.1M sodium citrate 완충액 1ml 및 0.4% 酵母 RNA 용액 0.5ml을 넣고 37°C의 恒溫水槽에서 25분간 振盪하였다. 0.75% uranyl acetate을 25% perchloric acid 용액 0.5ml을 넣어반응을 中斷시키고 4°C, 6,000rpm에서 20분간 遠心分離한 후 上澄液을 15배로 희석하여 260mm 波長에서 吸光度를 측정하였다.

(2) Methylated Albumin Kieselguhr (MAK)

Column Chromatography用 核酸의 抽出

Bentonite의 精製 및 核酸의 調表는 水野⁽³⁵⁾의 方法에 의하였다. 즉 鞘葉에 1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 및 0.5% bentonite가 함유된 Versene 완충액 (pH 5.0; 0.01M versene, 0.1 M sodium acetate, 0.1M NaCl) 2ml 및 飽水 phenol 4ml을 넣고 4°C의 약연속에서 마쇄하고 4°C, 8,000rpm으로 30분간 원심분리한 후 완충액층을 분리하였다. phenol층에 同 완충액 2ml을 넣고 再抽出 원심분리한 후 완충액층을 분리하여 흡하였다. Ether 10ml로 2회 抽出한 후 ether층을 분리시켜 버리고 冷 95% 알콜 12ml을 加하여 核酸을 침전시켰다. Bentonite 및 SDS가 함유되지 않은 上記 同 완충액 4ml에 침전을 용해하고 다시 10ml의 冷 95% 알콜을 가하여 核酸을 沈澱 원심분리하는 操作을 2회 反復하여 核酸을 精製하였다.

(3) MAK Column Chromatography

Bovine serum albumin fraction을 無水메타놀과 염산을 가하여 에스테르화 시킨 후 粉末化하였고 Mandell과 Hershey⁽¹⁷⁾의 方法에 따라 MAK 크로마토 그리피를 하였다. 核酸을 0.4M 鹽 완충액 (0.4M NaCl, 0.05M phosphate buffer, pH 6.7) 50ml에 용해한 후 MAK 칼럼위에 넣고 水壓下에서 시간당 60ml의 速度로 第三層上 2~3mm까지 流下시켰다. 0.4M 鹽 완충액 10ml을 管壁을 따라 추가하여 같은 方法으로 流下시킨 후 同 용액 5ml을 加하고 칼럼을 濃度勾配 溶出裝置에 연결하였다. NaCl 농도는 0.4M부터 1.0M의 범위였고 15분간에 5ml의 速度로 流下시켜 5ml의 分割으로 하였으며, 260mm 波長에서 吸光度를 測定하였다.

結果 및 考察

1. ABA 및 GA₃가 RNase活性에 미치는 影響

ABA 및 GA₃를 處理하여 5시간 간격으로 30시간 동안 RNase의 消長을 無處理區와 比較하여 그 結果를 그림 1에 表示하였다. ABA處理區, GA₃處理區 및 無處理區에서 다 같이 經時的으로 RNase의 活性이 점점 增加되는 傾向을 보였다. 그러나 ABA處理區는 無處理區에 比하여 더 높은 RNase의 活性을 보여 ABA가 RNase의 活性을 促進시키는 結果를 보였으나 이와 반대로 GA₃는 抑制시켰다. 이는 ABA가 RNase의 活性을 增加시킨 다는 Srivastava等^(15, 24, 26)의 結果와 一致한다. 曹⁽¹⁵⁾는 밀의 韜葉에서, 그리고 徐⁽²⁶⁾는 보리의 韜葉에 植物 hormone 處理에 依한 RNase 活性의 增減이 RNA의 分解機能과 密接한 關係가 있음 을 밝혔다

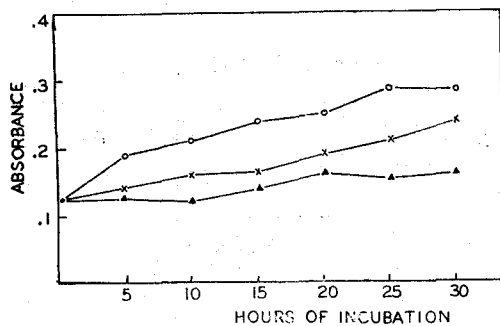


Fig. 1. Changes in ribonuclease activity during incubation of barley coleoptile in water (control, x-x-x), 1×10^{-5} M ABA (o-o-o) and GA (▲-▲) solution.

RNase 活性의 增加는 細胞의 水分含量과도 밀접히 關係되는 것으로서 Dove等^(8, 20)은 植物의 萎凋

는 RNase 活性을 증가시킨다고 하였고 Wright等^(11, 33, 34)은 萎凋期間중 ABA의 含量은 급격히 增加하나 cytokinin의 그것은 減少한다고 하였다. Shoshana⁽²⁸⁾는 정상적水分을 함유한 보리에 ABA의 處理는 RNase 活性을 增大시키나 萎凋된 잎에서는 反對現象을 보이는 것은 萎凋상태하에서는 세포의 水分이 RNase 活性에 대한 hormone的 調整 작용을 변화시키기 때문이라고 하였다.

Varner⁽¹⁸⁾는 보리 糊粉層에 GA處理를 하였을 때 RNase 活性을 增大시키나 ABA는 抑制시킨다고 하여 本實驗의 結果와는 相異하나 이는 組織의 差異에서 온 것이 아닌가 생각한다.

2. ABA 및 GA₃가 核酸의 成分에 미치는 影響

核酸의 形態에 대한 GA₃ 및 ABA의 影響을 無處理區와 比較하였고(그림 2) 核酸分割의 各成分比는 表1에 나타내었다.

無處理區에서는 GA₃ 處理區에서 보다 r-RNA가 더 낮은 成分比를 보였으나 反面 s-RNA는 더 높게 나타났으며 ABA 處理區에서는 이들보다 r-RNA의 成分比가 낮았으나 s-RNA에서는 더 높은 成分比를 보였다. Srivastava^(15, 26)는 ABA 處理가 RNase의 활성을 增加시킨다고 하였고 Leshem⁽¹⁹⁾은 ABA에 依한 r-RNA의 減少는 增加된 RNase의 活性에 依하며 r-RNA의 分解產物이 s-RNA의 증가를 招來한다고 하였 本實驗도 이들의 結果와 一致한 것 같다.

Poulson⁽²³⁾은 보리의 잎에 GA處理 16시간 후 核酸으로 P³²의 incorporation이 促進되며 Walton⁽³²⁾도 切取된 콩의 胚芽에 GA處理가 H³-uridine의 incorporation을 促進시킨다고 하였다. 本實驗의 結果에서 r-RNA는 GA₃處理區나 無處理區에서도 正常的인 植物에 比하여 그 成分比가 낮았고 s-RNA의 成分比는 높았는데 이는 20시간 培養중 增加된 RNase의 作用에 依한 것으로 생각된다. Chandra⁽⁷⁾는 비록 放射性 同位元素의 incorporation이 크다고 하여도 RNase의 作用 때문에 반드시

Table 1. The ratio of each RNA component to total RNA

treatment	ratio of RNA component (%)		
	s-RNA	DNA-RNA	r-RNA
Control	22.7	13.7	63.6
GA	18.9	14.8	66.3
ABA	30.5	12.5	57.0

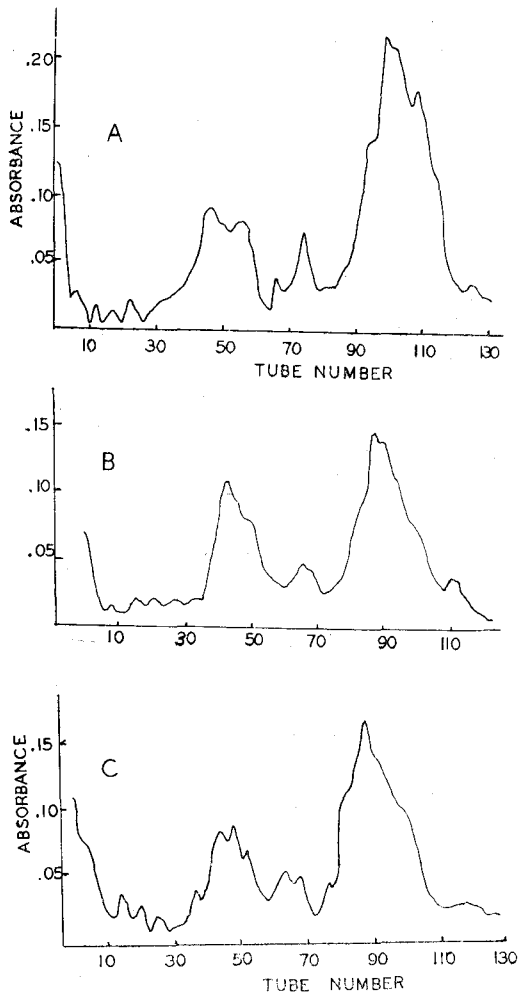


Fig. 2. MAK profiles of nucleic acids of barley coleoptile incubated in the presence of the growth regulators for 20 hours. (A) $1 \times 10^{-5}M$ GA, (B) $1 \times 10^{-5}M$ ABA, (C) water.

RNA의 함량이 증가되는 것이 아니라 흡光度値와 同位元素의 incorporation値는 반드시 一致하는 것은 아니라고 하였다.

Delvin⁽²⁴⁾은 잎에 대한 GA處理는 이의 蛋白質 및 核酸 合成의 促進 때문에 老化現象이 지연된다고 하였고 徐⁽²⁶⁾는 보리 鞘葉에 GA處理가 無處理에 比하여 經時的으로 完滿한 RNA의 減少를 보인다고 하였는데 RNase에 의한 RNA의 分解는 主로 r-RNA에 영향을 주는 것같아서 Leshem⁽¹⁶⁾의 結果와 一致한다.

RNA-DNA 合體에서는 ABA 處理區가 無處理區에 比하여 낮은 成分比를 보인 反面 GA 處理區에서는 높은 값을 보여 GA는 DNA를 增加시키거나 ABA는 이의 合成을 阻害한다는 Shih^(2,22,30,31) 등의 結果와 一致한다.

要 約

보리 (*Hordeum vulgare* cultivar Sedohadaka) 鞘葉에 $1 \times 10^{-5}M$ Gibberlic acid 및 $1 \times 10^{-5}M$ Abscisic acid를 處理하여 RNase 活性의 經時的 消長을 無處理區와 比較하고, 核酸의 形態를 관찰하였으며 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1) GA는 RNase의 活性을 抑制시키는 反面 ABA는 促進시켰다.

2) 無處理區에서 정상적인 植物에 比하여 r-RNA의 比가 낮고 s-RNA의 比가 높았는데 이것은 培養중 RNase의 作用에 의한 것 같다.

3) GA는 r-RNA의 分解를 完화시켰으나 ABA는 促進시켰는데 이것은 RNase의 活性과 關係된 것 같다.

4) GA는 DNA-RNA 複合體의 合成을 促進시켰으나 ABA는 이를 억제시켰다.

5) ABA에 의한 s-RNA의 增加는 r-RNA의 分解 産物 때문이라 생각된다.

參 考 文 獻

1. Addicot, F.T. and J.E.Lyon; Ann. Rev. Plant Physiol. **20**, 139(1969)
2. Kahn, A.A. and C.E.Heit; Biochem. J., **113**, 707(1969)
3. Balaydes, D.F.; Plant Physiol., **47**, Suppl. p.23(1971)
4. Carns, H.R., J.L. McMeans and F.T. Adicott; Proc. Ninth. Inst. Bot. Congr. 2:60
5. Cornforth, T.W., B.V. Millbrow and G. Ryback; Nature, **205**, 1269(1965)
6. Shihi, C.Y. and R. Rappaport; Plant Physiol., **45**, 33(1970)
7. Chandra, J.E. and M.M. Johri; Biochem. Physiol. Plant Growth Sub., the Runge Press, Ottawa, p.793(1968)
8. Dove, I.D.; Plant Physiol., **42**, 1176(1967)
9. Dalby, A. and I.I. Davies; Science, **155**, 1573 (1967)
10. Eagles, C.F. and P.F. Wareing; Physiol.

- Plant, 17, 697(1964)
11. Simpson, G.H.; *Planta* (Berl.) **102**, 272(1972)
 12. Nitson, J. and A. Lang; **41**, 965(1966)
 13. Bex, J.H.M.; *Planta* (Berl.) **103**, 1(1972)
 14. Bex, J.H.M.; *Planta* (Berl.) **103**, 11(1972)
 15. Jo, D.H. and C.Y. Lee; *J. Korean Agri. Chem. Soc.*, **15**, 181 (1972)
 16. Leshem, Y. and L. Schwarz; *Physiol. Plant*, **26**, 328 (1972)
 17. Mandell, J.D. and A.D. and A.D. Hershey; *Anal. Biochem.*, **1**, 66 (1960)
 18. Chrispeels, M.J. and J.E. Varner; *Plant Physiol.*, **42**, 1008(1969)
 19. Ohkuma, K., F. T. Addicott, O.E. Smith and W.E. Thiesson; *Tetrahedron Lett.*, **29**, 2529 (1965)
 20. Pearson, A. and P.F. Wareing; *Nature*, **221**, 672(1969)
 21. Rappaport, L.S., Blumenthal-Goldsmith, M.D. Clegg and O.E. Smith; *Plant Cell Physiol.*, **6**, 587(1965)
 22. Rappaport, L. and N. Wolf; *Inst. Symp. Plant Growth Substance, Calcutta, India.* p. 79 (1969)
 23. Poulson, R. and L. Beevers; *Plant Physiol.*, **46**, 782(1970)
 24. Robert, M. Delvin; *Plant Physiol.*, D. Van Nonstrand Co. P. 446 (1975)
 25. Srivastava B.; *Biochem. Biophys. Acta.*, **169**, 53(1968)
 26. Shoshana (Malis) Arad, Y. Mizrahi and A.E. Richmond; *Plant Physiol.*, **52**, 510(1973)
 27. Tsukamoto, Y., Fujita, M., Inaba, T. and Asahira; *Mems. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.*, **24**(1969)
 28. Thomas, T.H., P.F. Wareing and P.M. Robinson; *Nature*, **156**, 1635(1965)
 29. Tvorus, E.K.; *Fiziologia Rastenii*, **17**, 789 (1970)
 30. Van Overbeek, J., J.E. Loffler and M.I. Mason; *Science*, **156**, 1497(1967)
 31. Villers, T.A.; *Planta*, **82**, 342(1968)
 32. Walton, D.C. and E. Sondheimer; *Plant Physiol.*, **45**, 37(1970)
 33. Wright, S.T.C. and R. W.P. Hiron; *Nature*, **221**, 719(1969)
 34. Mizrahi, Y., A. Blumfeld, S. Bittner and A.E. Richmond; *Plant Physiol.*, **48**, 752 (1971)