

백색 완두유묘 중의 IAA 수준에 미치는 저온의 영향

박 노 동 · 안 승 회 · 김 광 식 · 박 창 규*

전남대학교 농화학과, *서울대학교 농화학과

초록 : 저온에서 일어나는 식물생육의 억제와 식물생장조절물질의 하나인 IAA 수준의 조절을 알아보기 위하여 암실재배한 백색 완두유묘를 재료로 저온처리에 따른 생육과 IAA 수준의 변화를 조사하였다. 25°C에서 성장한 백색 완두유묘는 5°C의 저온에 접하면 생장이 거의 정지하였다. 유리 IAA 수준은 생체중 기준 상온묘의 17.6 ng/g에서 3일간 저온처리에 4.9 ng/g으로, 총 IAA 수준은 113.2 ng/g에서 60.8 ng/g으로 현저하게 감소하였다. IAA의 전구체인 트립토판 수준은 생체중 기준 상온묘의 583 nmol/g에서 저온처리에 414 nmol/g으로 약 30% 감소하였으며, 시킵산경로에 의하여 트립토판과 함께 생합성되는 페닐알라닌과 티로신 수준도 감소하였다. 이 결과는 저온에서 IAA의 전구체인 트립토판 생합성의 억제를 통하여 IAA 수준을 일부 하향조절할 수 있을 것임을 시사한다(1990년 1월 4일 접수, 1990년 2월 22일 수리).

IAA(Indole-3-acetic acid)는 고등식물계에 널리 분포하는 중요한 천연 옥신(auxin)으로¹⁾, 그 수준은 생체 내에서 생합성과 분해과정의 율속단계 효소들에 의하여 엄격히 조절된다²⁾.

저온은 식물이 자주 접하게 되는 환경인자의 하나로 식물 생육에 큰 영향을 미친다. 저온에 민감한 식물들은 0~20°C 온도 범위의 특정온도 이하에 처하면 발아, 성장, 수량, 종실의 저장성 등이 급작히 제한을 받는데³⁾ 이 과정에 생장조절물질의 관여와 조절이 필수적인 것으로 생각된다. IAA는 저온에 의하여 영향을 받을 수 있는 생장조절물질 중의 하나이지만⁴⁾, 저온에 의한 IAA 수준의 조절에 관한 직접적인 연구는 거의 없는 실정이다. 최근 장미의 수과를 4°C에 처리하여 휴면을 타파하는 과정에서 유리태 IAA 수준이 급격히 저하하였다가 17°C로 옮겨 발아시킬 때 즉시 증가하였다는 보고가 있을 뿐이다⁵⁾.

따라서 본 연구는, 식물체의 IAA 수준의 조절에 미치는 저온의 영향을 알아보기 위하여, 암실재배한 완두 유묘를 재료로 저온처리에 따른 생육과 IAA 수준의 변화를 조사하였으며, 또한 IAA의 전구체인 트립토판 함량의 변화도 조사하였다. 이 연구의 요약은 이미 발표된 바 있다⁶⁾.

재료 및 방법

1. 완두의 재배와 처리

종묘사에서 구입한 완두(*Pisum sativum* L. var. Spar-

kle) 종자를 25% NaOCl 용액에 10분간 담가 표면소독하고 12시간 침종 후에 최아시켜 vermiculite묘상(30×30 cm)에 심었다. 암조건으로 25°C의 항온기에서 6일간 재배하고 그 일부를 5°C의 항온기에 옮겨 3일간 저온처리 하였다.

2. 시 약

사용된 유기용매는 EP급 또는 GR급의 Wako사(일본) 또는 Kanto사(일본) 제품이었다. Pentafluorobenzylbromide(PFBBR)는 Kanto사에서, 표준 IAA는 Sigma사(미국)에서 각각 구입하였다.

3. 완두유묘 중의 IAA의 정량

1) 추출 및 정제

완두 줄기 20 g에다 80% 냉아세톤 200 ml를 가하여 Waring blender로 고속으로 1분간 간 다음 4°C 암실에 24시간 두었다가 여과하고 찌꺼기를 아세톤 10 ml로 씻었다. 여액을 모아 회전감압농축기에서 농축하여 아세톤을 완전히 제거하였다. 유리태 IAA는 Bandurski와 Schulze의 방법을⁷⁾ 준용하여 정제하였으며, 총 IAA는 아세톤을 제거한 수용액에 고체 NaOH를 가하여 7N NaOH용액이 되도록 조절한 후 100°C에서 3시간 가수분해시킨 다음 유리태 IAA의 경우와 같이 정제하였다.

2) IAA-PFB ester화

위에서 정제한 시료에 아세톤 3ml를 가하여 용해시키고 2ml를 취하여 마개달린 시험관에 옮겨 1% PFBBR acetone용액 200 μ l와 15% K₂CO₃ acetone : water(1 : 1, v/v) 용액 60 μ l를 차례로 가하고 암실에서 하룻밤 방치

하였다. 여기에 5% Na_2SO_4 8 ml와 벤젠 2 ml를 가하고 격렬하게 흔들어 분액시킨 다음 벤젠층 1 ml를 취하여 크로마토그래피하였다⁸⁾.

3) Column chromatography 및 GLC 분석

내경 6.0 mm, 길이 60 cm의 유리관에 증류수층(5%) 가하여 불활성화시킨 실리카겔 0.85 g을 가볍게 두드려 채우고 그 위에 Na_2SO_4 를 1cm 높이로 얹었다. n-Hexane 5 ml로 미리 씻어낸 다음에 시료를 가하고, Na_2SO_4 표면이 드러나기 직전에 benzene : n-hexane(25 : 75, v/v) 15 ml를 가하여 흘러내려 보내고, benzene : n-hexane(75 : 25, v/v) 30 ml로 IAA-PFB ester를 용출시켰다⁹⁾. 이를 농축시킨 후 벤젠 1 ml에 녹이고 GLC(Shimadzu GC-4 BM)로 분석하였다. GLC분석조건은 다음과 같다.

Detector : Ni-63 ECD

Column : 10 ft. \times 1/8 in.(i.d.) glass column packed with 15% OV-17 on Chromosorb W HP(80-100 mesh)

Temperature : Column 215°C

Inlet and detector 250°C

N_2 gas flow rate : 40 ml/min

Sample size : 3-5 μ l

Chart speed : 5 mm/min

한편, IAA의 회수율을 측정하기 위하여 일정량의 IAA를 잔사예다 가하고 유리태 IAA의 추출 및 정량과정에 따라 분석하였다.

4. 완두유묘 중의 트립토판의 정량

완두 줄기 10 g에 80%의 뜨거운 에탄올 100 ml를 가하고 Waring blender로 간 다음 24시간 4°C 냉장고에 보관하였다. 이를 여과한 후 회전진공농축기로 45°C에서 에탄올을 완전히 제거하고 미리 처리한 Dowex 50W \times 4-100을¹⁰⁾ 채운 유리관(내경 1.0 \times 길이 30 cm)에 가하고 증류수 5 ml씩으로 4회 씻어낸 다음 2N NH_4OH 5 ml씩으로 6회 용출시켰다. 처음 5 ml 용출액을 버리고 나머지 25 ml 분획을 받아 45°C에서 감압농축하여 NH_4OH 를 제거하고 분석시료에 사용하였다.

Tryptophan은 Graham등의 방법을 따라 정량하였다¹¹⁾. 그 회수율은 유리아미노산을 추출해낸 잔사예다 일정량의 트립토판을 가하고 하룻밤 냉장고에 두었다가 상기 과정에 따라 추출하고 정량하였다. 또한 몇가지 유리아미노산을 아미노산 자동분석기(LKB Biochrom 4150)로 정량하였다.

결과 및 고찰

1. 완두유묘의 생장에 미치는 저온의 영향

시료로 사용하였던 완두의 100립중은 평균 24.6 g이었고, 25°C의 항온기에서 7일간 재배한 100개체의 무게는 평균 128 g이었고 15일간 기른 것은 242 g이었다.

완두의 지상부를 10개씩 3반복으로 취하여 초장을 측정한 생장곡선은 Fig. 1과 같다. 상온에서는 12일 묘의 초장이 20 cm에 달하였으나 저온처리구에서는 생장이 거의 정지하여 12일 묘의 초장이 약 7 cm로 이것은 6일 묘의 그것과 비슷하였다.

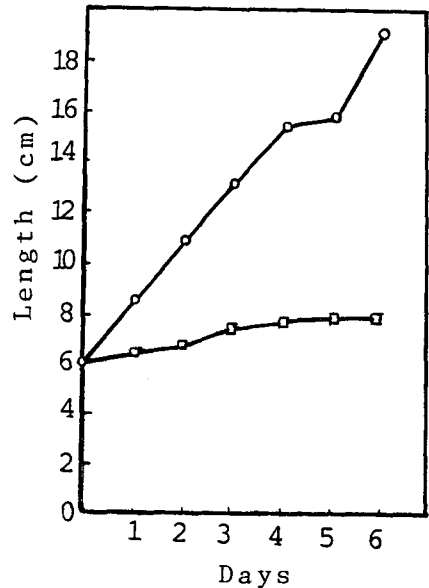


Fig. 1. Effect of low temperature on the growth of pea shoots.

(□—□) : Chilling

(○—○) : Control

2. 완두유묘 중의 IAA 수준에 미치는 저온의 영향

식물조직에 아주 낮은 수준으로 존재하는 IAA를 신속하고 정확하게 정량하는 방법은 IAA의 대사와 생리적 기능을 규명하는데 필수적으로 요구되나 아직도 일상적인 분석법은 확립되어 있지 않다¹²⁾. 현재 GLC, HPLC, 형광분석, 방사능 계측법 등이 유력한 방법으로 등장하였다¹³⁾.

IAA를 GLC로 분석하는 데에는 휘발성 유도체로의 전환이 필요하다. 환경중의 유기산류의 미량분석을 위하여 시도된 PFB ester화 반응은 GLC-ECD에 감도높은

유도체를 좋은 수율로 얻을 수 있어서¹³⁾ 산성계 제조체의 잔류분석과⁹⁾ IAA의 정량에⁸⁾ 응용되어 왔다. 본 연구에 사용된 표준 IAA-PFB ester는 Epstein과 Cohen의 방법⁸⁾에 따라 합성하고 70% 에탄올에서 재결정하여 92.9%의 수율로 얻은 백색의 침상 결정품이었다(mp 130~132°C: 문헌치⁸⁾ 128~130°C). TLC상에서 몇가지 발색 시약에 대한 IAA-PFB ester의 정색반응과 몇가지 전개 용매계에서의 Rf값은 전보에¹⁴⁾ 이미 보고하였다.

Fig. 2는 표준 IAA-PFB ester와 PFB 유도체화한 시료의 GLC chromatogram이다. 표준 IAA-PFB ester의 retention time은 10.6분이었고 이때 aldrin의 그것은 29분이었다. 그 검출한계는 100 pg이었으며 1,000 pg까지 비례관계를 보였다. Fig. 2에서 보건데, 시료 중에는 아

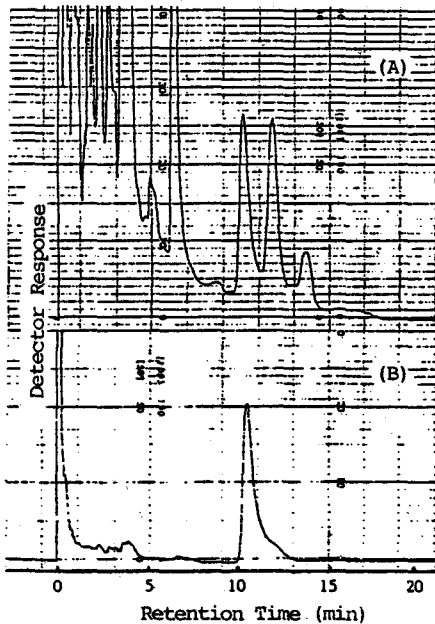


Fig. 2. GLC chromatograms of IAA-PFB ester. (A) PFB derivatives of partially purified pea extract. (B) Authentic IAA-PFB ester at 600 pg.

직도 여러가지 불순물이 포함되어 있었으며 이것은 한번더 실리카 크로마토그래피 하여도 별로 제거되지 않았다. 그러나 이 불순물들은 IAA의 정량에 별로 간섭하지 않았다.

Table 1은 암실재배한 완두유묘 줄기 중의 IAA 함량을 GLC로 정량한 결과이다. 상온묘에서 측정된 유리 IAA 함량은 생체중 기준 17.6 ng/g으로, 동일한 시료 즉 백색 완두유묘의 줄기에서 정량된 값 6~35 ng/g에 근사하였다^{15, 16)}.

완두유묘 줄기 중의 IAA 수준은 온도에 따라 현저한 차이를 보여 3일간 5°C의 저온에 처한 유묘에서는 그 수준이 뚜렷이 저하하였다. 즉, 상온묘에서 생체중 기준으로 유리태 IAA는 17.6 ng/g, 결합태 IAA는 95.6 ng/g이었고, 저온묘에서는 각각 4.9 ng/g과 55.9 ng/g이었다. 이를 개체 기준으로 환산하면 유리태 IAA는 70 pmole에서 10 pmole로 더욱 뚜렷이 감소하였다는 것을 보여준다.

이 결과는 장미 수과의 저온처리에 의한 휴면 타파과정에서 IAA 수준이 급격히 저하하였다는 보고와⁵⁾ 잘 일치하는 것이다. 오이에 저온장애를 가하면 에틸렌의 생산이 유도되며¹⁷⁾ 에틸렌은 *Coleus blumei*에서 트립토판으로부터 IAA의 생성속도를 절반으로 저하시키고 그 수송을 50% 저해하였다는 보고는¹⁸⁾ 저온이 IAA 수준을 감소시킬 수 있음을 시사한다. 한편, 저온처리로 겨울밀과¹⁹⁾ 오이유묘에서²⁰⁾ IAA oxidase의 활성이 증가하였는데, 이 증가된 IAA oxidase에 의하여 생체내의 IAA 수준이 저하될 것으로 지적되어 왔다. 또한 IAA 처리는 포화지방산의 수준을 증가시키며²¹⁾ 인지질의 생합성을 억제시킨다는²²⁾ 점을 고려할 때, 식물이 저온에 처하면 IAA 수준이 저하될 것으로 예상되며 본결과를 이를 뒷받침하고 있다.

IAA 정량의 전과정의 회수율은 59%였으며, 이를 보정하였다. IAA분석의 총회수율은 22-70%의 범위로 보고되고 있으며^{7, 15)} 분석방법에 따라 상당한 차이가 있다. 이는 추출방법, 추출용매, 정제단계, 유도체화의 방법, 분

Table 1. Effect of low temperature on the levels of endogenous IAA in etiolated pea shoots¹⁾

Treatment	FW/shoot ²⁾ g	IAA Content			IAA Content		
		Free	Bound ³⁾	Total	Free	Bound	Total
		ng/g FW			pmol/shoot		
Control	0.68	17.6	95.6	113.2	70.0	368.8	438.8
Chilling	0.36	4.9	55.9	60.8	10.2	115.8	126.0

1) Average of triplicates
2) FW : fresh weight
3) Bound IAA : total IAA minus free IAA

석기기 등의 차이에서 기인하는 것으로 보인다²⁾.

3. 완두유묘 중의 트립토판 수준에 미치는 저온의 영향

IAA는 트립토판으로부터 만들어지며⁴⁾, 한편 트립토판은 시킴산경로(shikimic acid pathway)에 따라 합성된 indole-3-glycerol phosphate와 serine으로부터 tryptophan synthetase에 의하여 생합성된다²⁵⁾. 고등식물의 유리 tryptophan pool은 크지 않으며 그 수준은 엄격히 조절된다²⁶⁾. 그러므로 저온은 시킴산경로 효소들의 활성변화를 유도하여 IAA의 전구체인 트립토판 수준을 조절하여 IAA 수준을 저하시켰을 가능성이 있다. 따라서 트립토판과 함께 시킴산경로에 의하여 생합성되는 티로신과 페닐알라닌의 함량을 측정하였다.

상온묘의 트립토판 함량은 Graham 등의 방법으로 분석한 결과 생체중 기준 583 nmol/g(119 µg/g)이었으나 저온처리묘에서는 414 nmol/g으로 약 30% 감소하였다(Table 2). 이때 전과정의 회수율은 90%였으며 이를 보정하였다. Graham 등의 방법에 따른 정량치와 아미노산 자동분석기를 이용한 정량치는 서로 잘 맞았다. 트립토판 함량은 상온묘에서 총유리 아미노산 함량의 0.84%를 차지하였다.

조직중의 유리 트립토판 함량에 관한 자료는 많지 않다. 생체중 기준 밀의 잎은²⁵⁾ 20 µg/g, 보리 잎은²⁶⁾ 20-46 µg/g, 토마토 줄기는²⁶⁾ 12 µg/g, 콩 줄기는²⁶⁾ 30 µg/g, *Solanum nigrum* 잎은²⁷⁾ 2-17 µg/g을, 그리고 암실에서 발아시킨 7일차 녹두유묘는²⁸⁾ 130-270 µg/g을 함유하였다 한다. 그러므로 완두유묘의 트립토판 함량은 녹두유묘의 그것에 가깝다.

페닐알라닌과 티로신의 함량도 저온묘에서 각각 감소하여 방향족 아미노산의 함량이, 이중 페닐알라닌이 가장 많은 양을 차지하였는데, 상온묘의 생체중 기준 3,734 nmol/g에서 저온묘의 2,743 nmol/g으로 낮아졌다. 그러므로 저온은 시킴산경로의 주요조절효소들의 생합성을 억제하거나 그 활성을 저하시켜 이 경로의 반응을 억제하였을지도 모른다. 가용 ATP의 수준이 떨어지면 shikimate kinase의 활성이 감소하며²⁹⁾ 저온은 미토콘드리아의 ATP 생산을 제한한다는³⁰⁾ 사실들은 저온이 시킴산경로를 억제하는 요인일 수 있음을 시사한다.

Tsur³¹⁾는 토마토 유묘에서 아연 결핍이 IAA 수준을 저하시킴을 발견하고 이는 그 전구체인 트립토판의 생합성이 억제된 결과라고 하였다. 이것은 트립토판 수준의 변화가 직접 IAA 수준에 반영될 수 있음을 지적하는 것이다. 본 결과는 저온에서 그 전구체인 트립토판 수준의 저하가 곧 IAA 수준의 변화에 반영된 것을 나타낸다. 그러나 트립토판 수준의 변화가 얼마나 IAA 수준에 영향을 미칠 수 있는지에 대하여는 아직 분명한 자료가 없는 실정이다.

완두유묘 줄기의 트립토판 함량은 indole-3-acetaldehyde의 함량 보다 약 10배 높으며(박, 미발표 자료) IAA의 함량 보다는 훨씬 높다. 그러므로 트립토판 함량의 일부 변화가 IAA 수준에 미치는 영향은 미미할 수 있다는 것이다. 그렇지만 트립토판으로부터 IAA로 전환을 촉매하는 효소들의 세포내의 구획화, 이 두 화합물과 중간물질들의 전환속도와 분포, 효소활성조절물질들의 소장과 분포에 따라 트립토판 함량의 변화는 여전히 IAA 수준에 영향을 미칠 수 있을 것으로 보인다.

Table 2. Effect of low temperature on the levels of free tryptophan in etiolated pea shoots¹⁾

Treatment	FW/shoot ²⁾ (g)	Concentration ³⁾		Concentration ⁴⁾	
		nmol/g FW	nmol/shoot	nmol/g FW	nmol/shoot
Control	0.68	583	397	566(0.84) ⁵⁾	384
Chilling	0.34	414	141	415(0.62)	141

1) Average of triplicates

2) FW : fresh weight

3) Measured by the procedure of Graham et al.¹⁴⁾

4) Measured by amino acid autoanalyzer

5) % Ratio to total free amino acids

참 고 문 헌

- Cohen, J. D. and Bandurski, R. S. : Ann. Rev. Plant Physiol., 33 : 403(1982)
- Vanderhoef, L. N. and Kosuge, T. : The Molecular Biology of Plant Hormone Action : Research Directions for the Future, American Society of Plant Physiologists(1984)
- Lyons, J. M. and Breidenbach, R. W. : in "Stress Physiology in Crop Plants", Mussell, H. and Staples, R. C.(ed.), pp.179-196, John Wiley & Sons, New York(1979)

4. Sembdner, G., Gros, D., Liebisch, H. W., and Schneider, G. : in "Encyclopedia of Plant Physiology", MacMillan, J.(ed.), New Ser., Vol. 9, pp.251-444, Springer, Berlin(1980)
5. Tillberg, E. : Plant Physiol., 76 : 84(1984)
6. Park, R. D., Kim, K. S., Suh, Y. T. and Park, C. K. : Plant Physiol., 86(S) : 150(1988)
7. Bandurski, R. S. and Schulze, A. : Plant Physiol., 54 : 257(1974)
8. Epstein, E. and Cohen, J. D. : J. Chromatography, 209 : 413(1981)
9. Agemian, H. and Chau, A. S. Y. : J. Assoc. Off. Anal. Chem., 59 : 633(1977)
10. Cooper, T. G. : The Tools of Biochemistry, pp. 136-168, John Wiley & Sons, New York(1977)
11. Graham, C. F., Smith, E. F., Hier, S. W. and Klein, D. : J. Biol. Chem., 168 : 711(1947)
12. Brenner, L. : Ann. Rev. Plant Physiol., 32 : 511(1981)
13. Kawahara, F.K. : Anal. Chem., 40 : 2073(1968)
14. 김정봉, 박노동, 서용택, 박창규 : 한국농화학회지, 32 : 162(1989)
15. Allen, J. R. F., River, L. and Pilet, P. E. : Phytochemistry, 21 : 525(1982)
16. Bandurski, R. S. and Schulze, A. : Plant Physiol., 60 : 211(1977)
17. Wang, C. Y. and Adams, D. O. : Plant Physiol., 69 : 424(1982)
18. Ernest, L. C. and Valdovinos, J. G. : Plant Physiol., 48 : 402(1971)
19. Bolduc, R. J., Cherry, J. H. and Blair, B. O. : Plant Physiol., 45 : 461(1970)
20. Omran, R. G. : Plant Physiol., 65 : 407(1980)
21. Sterns, E. M. and Morton, W. T. : Phytochemistry, 14 : 619(1975)
22. Moore, T. C., Price-Jones, M. J. and Harwood, J. L. : Phytochemistry, 22 : 2421(1983)
23. Nair, P. M. and Vaidyanathan, D. S. : Arch. Biochem. Biophys., 104 : 405(1964)
24. Moore, T. C. : Biochemistry and Physiology of Plant Hormones, Chapter II, Springer, New York(1979)
25. Kim, W. K. and Rohringer, R. : Can. J. Bot., 47 : 1425(1969)
26. Schneider, E. : PhD thesis, Carleton Univ., Ottawa(1965)
27. Wakhloo, J. L. : Planta, 65 : 301(1965)
28. Lee, C. Y., Cho, I. H. and Kim, I. S. : J. Kor. Agric. Chem. Soc., 15 : 1(1972)
29. Beaudoin-Eagan, L. D. and Phorpe, T. A. : Plant Physiol., 73 : 228(1983)
30. Lyons, J. M. : Ann. Rev. Plant Physiol., 24 : 445(1973)
31. Tsui, C. : Amer. J. Bot., 35 : 171(1948)

Effects of Low Temperature on the IAA Level in Etiolated Pea (*Pisum sativum* L. var. Sparkle) Seedlings

Ro-Dong Park, Seoung-Hee Ahn, Kwang-Sik Kim and Chang-Kyu Park(Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea, *Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon, 440-744, Korea)

Abstract : Little is known about the regulation of IAA level in plants under low temperature. On exposing 6-day-old etiolated pea (*Pisum sativum* L. var. Sparkle) seedlings grown at 25°C to 5°C for 3 days, free IAA level decreased from 17.6 to 4.9 ng/g fresh weight(that is, from 68 to 10 pmol/shoot) and total IAA level from 113.2 to 60.8 ng/g FW. The level of free tryptophan, precursor of IAA, also decreased from 583 to 414 nmol/g FW and that of free phenylalanine and tyrosine, products of shikimic acid pathway along with tryptophan, decreased from 3,168 to 2,327 nmol/g FW. Thus low temperature was found to down-regulate the level of endogenous IAA, in part, by reducing tryptophan biosynthesis in etiolated pea shoots.