

## 보리 幼苗에 있어서 Abscisc Acid(ABA) 誘導體가 生長 및 Peroxidase 活性에 미치는 影響

婁慶淑 · 李相甲\* · 姜相載 · 朴昶東 · 朴愚喆

慶北大學校 農科大學 農化學科

\* 大邱直轄市 環境保健 研究院

Effect of Abscisc Acid(ABA) and its Analogues on Growth and  
Peroxidase Activity in Barley (*Hordem vulgaris L.*) Seedling.

Kyung Sook BAE · Sang Kap LEE\* · Sang Jai KANG  
Chang Dong PARK · Woo Churl PARK

Dept. of Agri. Chemistry, Coll. of Agriculture,  
Kyungpook National University.

\* Institute of Health and Enviroment, Taegu

### Abstracts

This experiment was conducted to investigate biological activity of ABA and its analogues on barley shoot growth and peroxidase activity in barley seedlings. The treatments of 3.2 ppm (+)-ABA, 1.2 ppm (S)-(+)-ABA, 0.6 ppm ABA-methyl cinnamate ester compound (AC), and 0.08 ppm ABA-umbelliferone ester compound (AU) inhibited the growth of barley seedlings by more than 80% as compared with untreated control. The increase in barley shoot-inhibit activity of (S)-(+)-ABA became 3-fold than the activity of racemic ABA, and those of AC and AU higher than that of (S)-(+)-ABA by about 2.5 and 16 times, respectively. Peroxidase activities of barley shoots during the early growth stage were kept at a constant levels without ABA treatment, but in the treatment of racemic ABA, (S)-(+)-ABA, AC and AU increased the activities. Furthermore, the peroxidase activities increased as the higher concentration of ABA and its analogues were applied.

Key words : ABA(Abscisc acid), (S)-(+)-ABA, ABA-methyl cinnamate eater, ABA-umbelliferone eanter, Peroxidase activity.

## 緒 論

植物組織으로부터 Auxin을抽出하여生物活性檢定方法에依해定量하는研究를修行하던중 많은研究者들이植物生長阻害物質의存在를發見하여報告하였으며 Paper Chromatography의登場으로 Auxin과 그阻害物質과의分離가可能하였다. Bennet-Clark等(1952)은豌豆의 줄기에서抽出分離한酸性分劃층 2-Propanol : Ammonia : H<sub>2</sub>O의溶媒界에서 Rf 0.6附近의生長阻害物質을確認하여 Inhibitor β로命名하였다.

그後 Phillips(1958)에依해서 *Acer pseudoplatanus*에서冬芽의休眠을誘導하는物質이分離되어 Dormin으로 불리어졌고 Ohkuma等(1963)에依해木花에서離層形成促進物質이分離되어 Abscisin II로 각각研究되어오던중이物質이同一物質로 밝혀져 1968年 Addicot等에依해 Absciscic Acid[(-hydroxy-2, 6, 6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexene-1-yl)]-methyl-2, 4-pentadienoic acid : ABA]는統一된名稱으로使用되어오고있다.

ABA의平面構造는 Ohkuma等(1965)에依해,立體構造는 Conforth等(1965)에依해 밝혀졌으며光學的으로純粹한(S)-(+)-ABA의化學合成에도成功하였다.(Kienzel 등, 1978, Soucup 등, 1989) 一般的으로 ABA의生物活性은植物體에存在하는天然形(S)-(+)-體가非天然形(R)-(-)體보다 훨씬 강한活性을 나타내고 있으나(Conforth 등, 1965, 析谷隆之 등, 1974, 山下恭平 등, 1990) 보리의 α-amylase 生成抑制活性에는 두가지가 거의 비슷한活性을 나타낸다는報告도 있다.(Milborrow, 1974) 이와같이 ABA에對한 많은研究가 있음에도 불구하고 ABA가植物生長調節劑로서實際로農業에 많이利用되지 못하는理由는天然形(S)-(+)-cis-ABA의價格이 너무 비싸기 때문이다.

그러나 1991年 Marumo等에依해 *Botrytis cinera*를利用하여(S)-(+)-ABA의大量生産에成功함에 따라數年內에는 보다싼價格

으로購入이可能할 것으로 보인다. 또 다른理由로는溶液狀態의 cis-ABA가紫外線에 의해 trans形으로異性化하며, 이와 더불어分解되어 그活性이 크게減少하기 때문이다.

한편動植物細胞에廣範圍하게分布되어 있다고 알려진 peroxidase(E. C. 1. 11. 1. 7, oxidoreductase)는植物細胞의成長과分化(Boll 등, 1965, Goren 등, 1971)病原菌에 대한低抗性(Curtis 등, 1971) 및植物生長調節物質과의上昇作用等(Galston 등, 1954, Siegal 등, 1967)과 깊은關係를 맺고 있으며,遺傳樣式的推定(Endo 등, 1971)近親交雜率의推定(Rudin 등, 1976) 및品種의識別等(Borris 등, 1976)에廣範圍하게利用되고 있는酸素중의 하나이다. 또한 Peroxidase活性度는植物生長調節劑에 의해變化된다는報告가 있다.(Hideman, 1970, Hyodo, 1966, Imaseki, 1968) GA와 IAA等은植物의生育을增加시키는 반면, Peroxidase 活性度を減少시키고, Ethylene과 같은生長阻害 호르몬은 Peroxidase活性度を增加시킨다고 알려져 있다.

따라서本研究는天然形光學活性(S)-(+)-cis ABA가 갖는植物生長阻害活性을보다 더向上시키기 위하여合成한 ABA誘導體들의生物活性을調査하고 또한植物의初期生長과密接한關係가 있을 Peroxidase 活性度變化를比較檢討하여 ABA誘導體의生物活性檢定에 Peroxidase活性度の利用을 위한基礎資料를 얻고자遂行하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 供試材料 및 生育方法

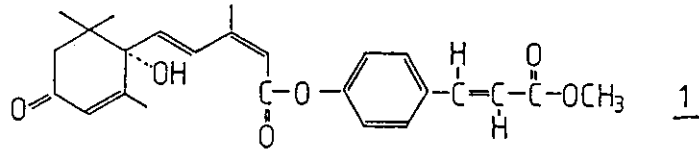
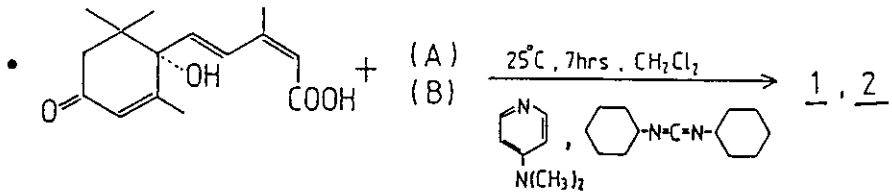
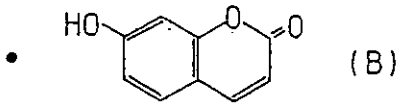
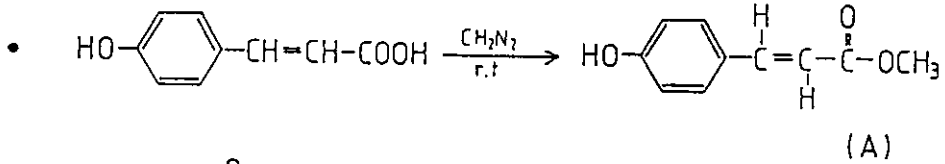
嶺南作物試驗場으로부터分讓받은알보리(*Hordeum vulgare* L.)를 2% NaOCl溶液으로殺菌處理하여殺菌수로充分히 씻고約 2時間동안殺菌수에沈漬시킨後 Gause를 간直徑 9 cm의 사아래에發芽가均一한種子(0.5mm)를選別하여播種하고 여기에適當濃度の ABA 및 ABA誘導體溶液을 10ml씩供給하여 26±1°C, 暗條件에서 7日間生長시켰다.

2. ABA 유도체

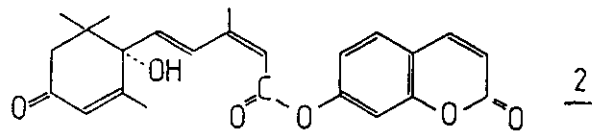
日本 나고야(名古屋)大學 農學部 農藝化學科의 農藥化學 研究室에서 真菌의 一種인 *Botrytis cinerea*의 暗 培養物로 부터 얻은 天然形 (S)-(+)-ABA를 分讓받아 아래와 같이 合成한 誘

導體 (그림 1)를 사용하였다.

ABA-methyl cinnamate ester 化合物(AC)의 合成은 먼저 市販되는 *p*-hydroxyl-cinnamic acid를 diazomethane(CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>)으로 methyl化 시킨 *p*-hydroxyl-methyl cinnamate를 使用하였다. (S)-(+)-ABA 1mM을 原料로 하여 1.8mM



83 % , m.p. = 166~168°C



78 % , m.p. = 74~76°C

Fig. 1. Synthesis of ABA-methyl cinnamate ester compound(AC) and ABA-umbelliferone ester compound(AU).

의 *p*-hydroxyl methyl cinnamate와 4-(N, N-dimethyl amino)pyridine(DMAP), N, N-dicyclohexyl carbodimide(DCC)를 25°C, 無水 dichloromethane 溶液에서 7時間 ester化 시켰다. 한편 ABA-umbelliferone ester 化合物(AU)의 合成은 1mM의 (S)-(+) -ABA로 市販되는 umbelliferone 1.2mM과 DMAP, DCC를 25°C dichloromethane 溶液에서 40時間 ester化 시켰다.

各各의 反應시킨 溶液을 減壓濃縮시켜 適當量의 ethyl acetate에 溶解시켜 不溶性인 ABA-DCC ester 化合物을 除去하고 그 濾過液을 Preparative TLC에 依해(表 1) 分離, 精製하여 ABA-methyl cinnamate ester化合物과 ABA-umbelliferone ester 化合物을 각각 78%와 83%의 收率로 얻었다.

以上の 모든 實驗은 흐린 綠色光(547±10nm)아래에서 行하였다.

Table 1. TLC operating conditions for identification and isolation of ABA analogues.

Absorbant	Merck, silicagel 60 F <sub>254</sub>
Coated Thickness	1mm
Developing Solvent	Benzene : Ethyl acetate : Acetic acid=50 : 50 : 3(v/v/v) [AC]
System	n-Hexane : Ethyl acetate : Acetic acid=50 : 50 : 3(v/v/v) [AU]
Detector	UV lamp (264nm)

### 3. 生物活性 檢定

26±1°C 暗室에서 7日間 生長시킨 보리 幼苗의 生長에 對한 ABA 및 ABA誘導體의 生物活性은 각 濃度에서 地上部의 伸張 程度를 無處理區에 對한 比로 表示하였다. 즉, 無處理의 伸張에 比해 20%이하의 伸張率을 ++, 30%이하를 ±, 31%이상의 伸張率을 -로 表示하여 生物活性은 30%이하까지를 伸張 沮害 活性이 있다고 判定하였다.

### 4. 粗酵素液 調製

播種 後 暗室에서 生育시킨 보리 幼苗의 地上部를 3日, 5日, 7日째 採取하여 3배(W/V)量의 50mM Phosphate buffer(pH 6.0)를 加하여 磨碎한 後 10,000×g에서 10時間 冷凍 遠心分離하여 얻은 上澄液을 粗酵素液으로 하였다.

### 5. 酵素活性度 測定

Peroxidase는 Worthington enzyme manual의 方法(1951)에 따라 測定하였다. 0.34μM *o*-dianisidine 0.5ml, 0.26mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.05ml 및 50mM phosphate buffer (pH 6.0) 2.9ml에 適當히

稀釋한 粗酵素液 0.1ml를 넣고 30°C, 波長 460nm에서 吸光度 變化를 1分間 測定하여 酵素活性度를 求하였다.

酵素 活性度の 單位는 30°C에서 分當 1μM의 *o*-dianisidine을 分解할 수 있는 酵素의 量을 1unit(U)로 하였으며 酵素 活性度は 蛋白質 mg당 酵素의 unit인 比活性度로 表示하였다.

### 6. 蛋白質 定量

粗酵素液 中の 蛋白質 含量은 Lowry 等(1972)의 方法에 따라 比色定量하였으며 標準物質로는 bovine serum albumin을 使用하였다.

## 結果 및 考察

### 1. ABA와 ABA 誘導體의 보리 生長沮害

보리 幼苗에서 天然形 (S)-(+) -ABA와 racemic ABC, AC 및 AU 處理에 依한 보리 幼苗의 生長沮害 活性은 그림 2, 3, 4, 5와 表 2와 같다.

1.2ppm의 (S)-(+) -ABA를 處理한 보리에서 地上部의 伸張度는 對照區에 比하여 約 82%의 伸張 沮害를 나타낸 반면, 1.0ppm에서는

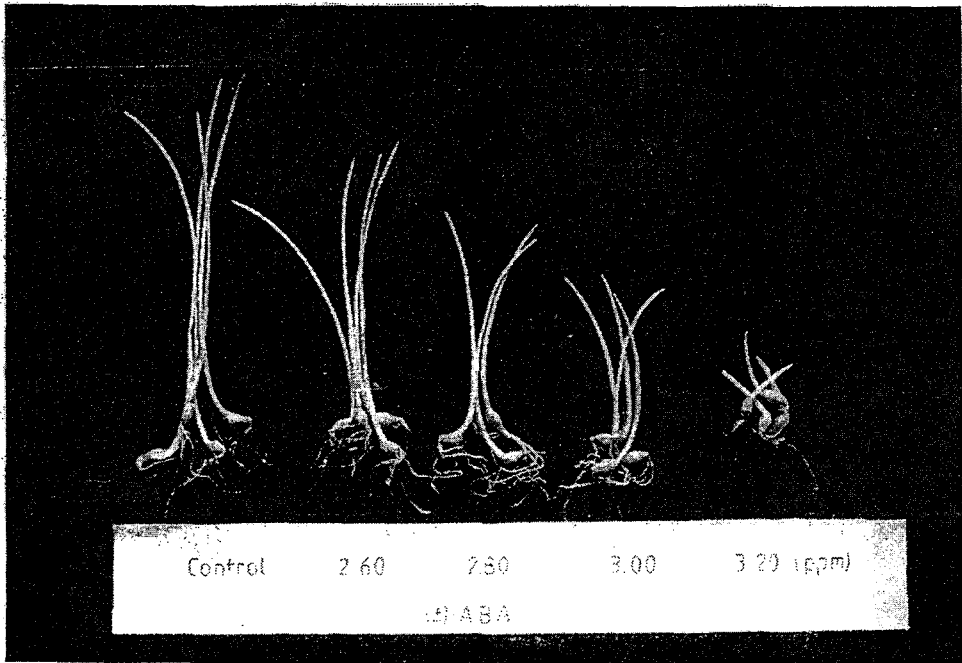


Fig. 2. The growth of barley seedlings during 7 days after the treatment of  $(-)$ -ABA in darkness.

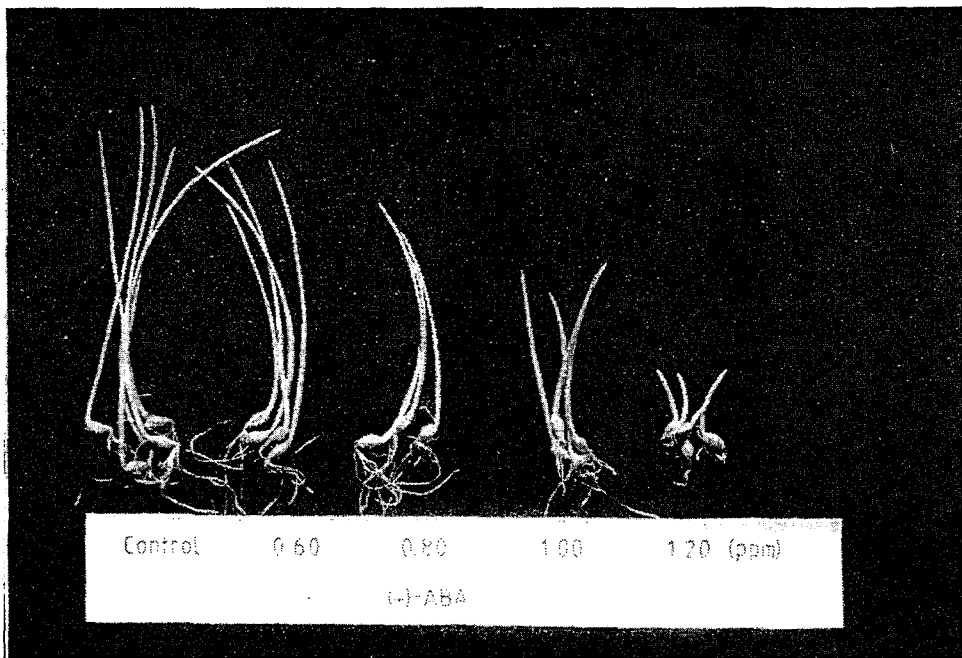


Fig. 3. The growth of barley seedlings during 7 days after the treatment of  $(+)$ -ABA in darkness.



Fig. 4. The growth of barley seedlings during 7 days after the treatment of AC in darkness.

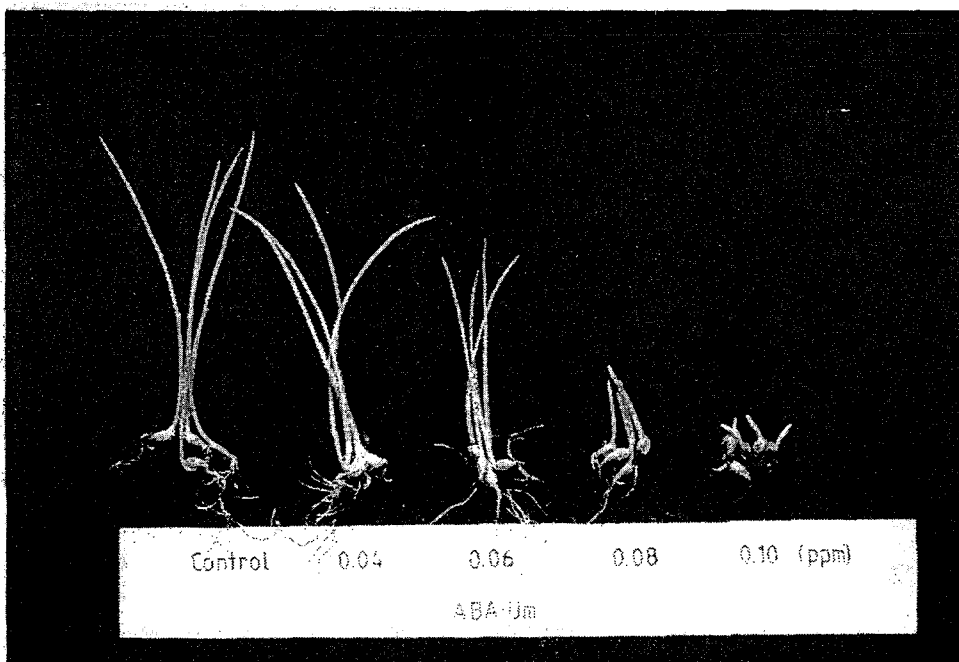


Fig. 5. The growth of barley seedlings during 7 days after the treatment of AU in darkness.

Table 2. A comparison of inhibitory activity between ABA and ABA analogues on barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings in darkness.

Treat. Conc(ppm)	(±)-ABA	(+)-ABA	ABA-cin	ABA-um
3.20	++			
3.00	---			
2.80	---			
2.60	---			
1.20		++		
1.00		---		
0.80		---	++	
0.60		---	++	
0.40			---	
0.20			---	
0.10				++
0.08				++
0.06				---
0.04				---

++ : Inhibition more than 79% as compared with control  
 ± : Inhibition more than 70% as compared with control  
 --- : Inhibition more than 69% as compared with control

약 49%의抑制를 보였다. (±)-ABA에서는 3.2ppm에서 對照區의 約 83%, 3.0ppm에서 約 51%의抑制를 보여 (S)-(+) -ABA는 racemic ABA보다 約 3倍 強한 生長 阻害 活性을 나타내었다. 또한 AC는 0.6ppm에서 約 85%, 0.4ppm에서 約 53%의 阻害를 보였고 AU는 0.08 ppm에서 約 80%, 0.06ppm에서 約 45%의 阻害 活性을 보여 (S)-(+) -ABA에 比하여 AC는 約 2.5倍, AU는 16倍 程度 더 強한 活性을 나타내었다. ABA가 生長阻害 活性을 나타내는 데는 2-cis-4-trans-3-methyl-2, 4-pentadienoic side chain, 2', 3'-double bond, 4'-carbonyl group 및 2'-methyl group 등이 ABA 構造에서 必須的으로 要求되는 것으로 잘 알려져 있다.(Takahashi, 1986)

本 研究에서 ester結合을 한 誘導體들이 ABA보다 더 높은 活性을 갖는 것으로 미루어 有效한 ABA誘導體의 合成에는 活性을 나타낼 수 있는 ABA의 必須 構造와 C-1의 Carboxyl

group에 ester結合이 構造的으로 重要할 것으로 생각된다.

李(1991)의 報告에 의하면 벼의 地上部 生育 阻害 活性은 (S)-(+) -ABA가 racemic ABA보다 2.6倍, AC와 AU는 (S)-(+) -ABA보다 5倍, 25倍로 本 研究結果 보다 더 높은 活性을 갖는다. 이와 같은 生物 活性의 差異는 植物體에서 호르몬의 吸水와 代謝速度의 差異에 깊은 關係가 있을 것이며 對象 植物의 種類, 細胞 및 酵素界에 의해서 ABA에 대한 receptor의 立體的 要求가 서로 다르기 때문일 것으로 思料된다.

## 2. Peroxidase 活性度의 變化

種子の 發芽와 密接한 關係를 갖고 生育 初期 段階에서 急激하게 變化하는 peroxidase 活性度에 미치는 ABA와 ABA誘導體의 影響은 그림 6, 7, 8, 9와 같다.

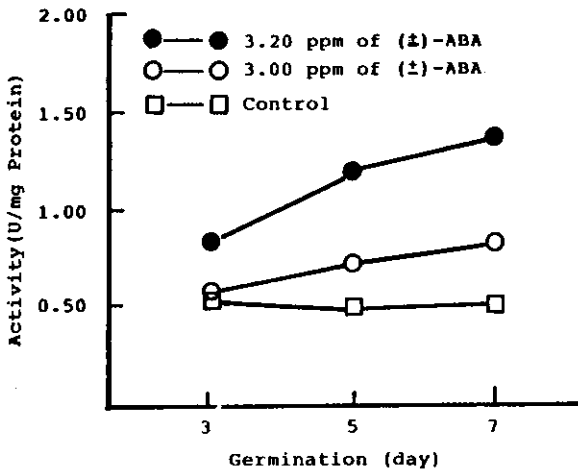


Fig. 6. Time course of peroxidase activity on (±)-ABA concentration in barley shoots.

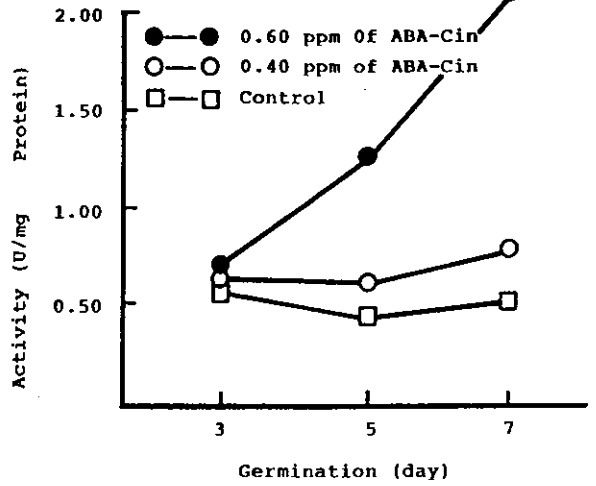


Fig. 8. Time course of peroxidase activity on AC concentration in barley shoots.

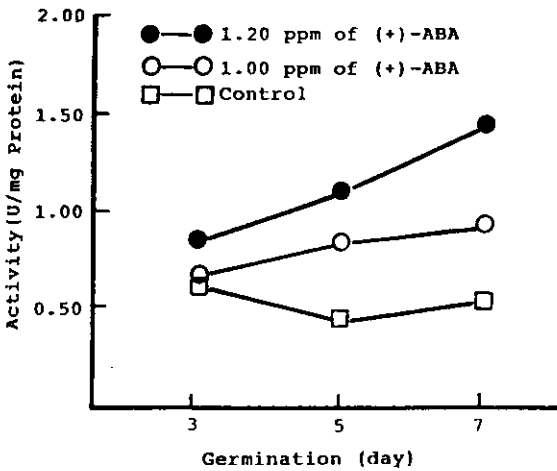


Fig. 7. Time course of peroxidase activity on (+)-ABA concentration in barley shoots.

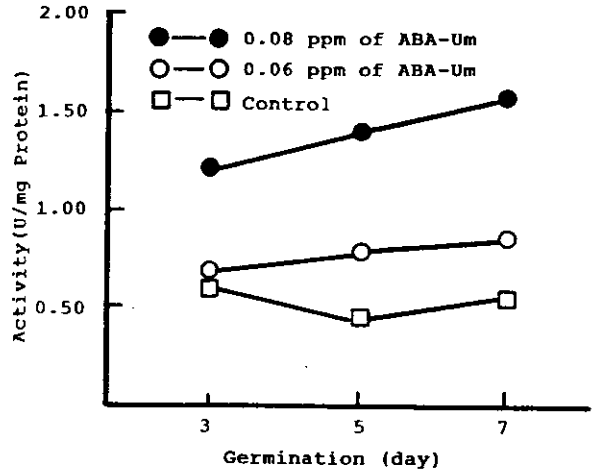


Fig. 9. Time course of peroxidase activity on AU concentration in barley shoots.



發芽後生育이 進行됨에 따른 Peroxidase 活性度는 對照區에서는 큰 變化가 없었으나, 生育 阻害活性 弱하게 나타난 3.0ppm의 (±)-ABA, 1.0ppm의 (S)-(+)-ABA, 0.4ppm의 AC 및 0.06ppm의 AU에서는 對照區에서 보다 더 높은 活性度를 나타내면서 계속 增加하는 傾向을 보였다.

生育阻害活性 強하게 나타난 高濃度 [3.2ppm의 (±)-ABA, 1.2ppm의 (S)-(+)-ABA, 0.6ppm의 AC 및 0.08ppm의 AU]에서는 低濃度에서 보다 더 높은 酵素活性度를 나타내어, ABA가 Gibberelline, Kinetin 等の 植物生長 促進 호르몬과 拮抗作用을 갖고 또한 綠豆에서 Peroxidase 活性度를 增加시킨다는 李等(1988)의 報告와도 一致하며 이러한 酵素活性度 變化의 主要因은 酵素自體의 生合성에 依해서라기 보다는 蛋白質 含量의 減量에 따른 影響으로 思料된다.

#### 摘 要

天然形 ABA가 갖는 生物 活性을 向上시키기 위하여 合成된 ABA 誘導體들의 生物活性과 아울러 初期生長과 密接한 關係가 있는 peroxidase 活性度 變化를 調査한 結果는 다음과 같다.

26±1°C, 暗室에서 7日間 生長시킨 보리 幼苗의 地上部 伸張은 3.2ppm의 (±)-ABA, 1.2ppm의 (S)-(+)-ABA, 0.6ppm의 ABA-methyl cinnamate ester 化合物(AC) 및 0.08ppm의 ABA-umbelliferone ester 化合物(AU)에서 對照區에 비해 80% 이상의 阻害를 보여 (S)-(+)-ABA가 racemic ABA보다 約 3배, AC와 AU는 (S)-(+)-ABA보다 各各 約 2.5배, 16배 더 強한 活性을 나타내었다.

發芽後 生長이 進行됨에 따른 보리 幼苗의 地上部の peroxidase 活性度는 對照區에서는 큰 變化는 없었으나, ABA와 그 誘導體를 處理한 보리 幼苗의 地上部에서는 계속 增加하였다. 生長 阻害 活性이 強하게 나타난 高濃度 [3.2ppm의 (±)-ABA, 1.2ppm의 (S)-(+)-ABA, 0.6ppm의 AC 및 0.08ppm의 AU]의 處理가 低濃度 [3.0ppm의 (±)-ABA, 1.0ppm의 (S)-(+)-ABA, 0.4ppm의 AC 및 0.06ppm의

AU]의 處理보다 더 높은 peroxidase 活性度를 나타내었으며, ABA 유도체들은 ABA보다 低濃度에서 더 높은 peroxidase 活性度를 나타내었다.

#### 參 考 文 獻

1. Bennet-Clark, T. A., M. S. Tambliah and N. P. Kefford 1952. Estimation of plant growth substances chromatography. *Nature* 169 : 452.
2. phillips, I. D. J. and P. F. Wareing 1958. Studies in dormancy of sycamore I. Seasonal changes in the growth-inhibitors in *Acer Pseudoplatanus*. *J. Exp. Bot.* 9 : 350-364.
3. Ohkuma, K., J. L. Lyon, F. T. Addicott and O. E. Smith 1963. Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. *Science* 142 : 1592-1593.
4. Addicott, F. T., J. L. Lyon, K. Ohkuma, W. E. Thiessen, H. R. Carns, O. E. Smith, J. W. Conforth, B. V. Milborrow, G. Ryback, and P. F. Wareing 1968. Abscisic acid: A new name for abscisin II. *Science* 159 : 1493 p.
5. Ohkuma, K., F. T. Addicott, O. E. Smith and W. E. Thiessen 1965. The structure of abscisin II. *Tetrahedron Lett.* 29 : 2529-2535.
6. Conforth, J. W., B. V. Milborrow, G. Ryback 1965. Synthesis of (±) abscisin II. *Nature* 206 : 715.
7. Kienzle, F., N. Mayer, R. E. Minder and H. Thommen 1978. Synthese von optisch aktiven, natürlichen Carotinoiden und strukturell verwandten verblidungen. III. Synthese von (+)-Abscisinsäure, (-)-Xanth oxin, (-)-Actinidiolid und (-)-Dihydroactinidoid. *Heiv. Chim., Acta.* 61 (7) : 2616-2627.
8. Soukup, M., T. Lukac, B. Lohri, und E. Widemer 1989. Synthese von (+)-Abscisinsäure. *Helv. Chim. Acta.* 72 : 361-364.

9. Conforth, J. W., B. V. Milborrow, G. Ryback, P. F. Wareing 1965. Chemistry and physiology of dormins in sycamore. *Nature* 205 : 1269-1270.
10. 析谷隆之, 山下恭平. 1975. アブサイシン酸の化学. *化学と生物*, 13(6) : 351-359.
11. 山下恭平. 1990. 光学異性体と生物活性. *日本農藝化学会誌* 64(2) : 187-190.
12. Miborrow, B. V. 1974. The chemistry and physiology abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25 : 259-397.
13. 丸茂茂吾, 李相甲, 泰雄. 1990. 天然形光学活性 アブサイシン酸の生産と活性. *植物細胞工学* 2(4) : 503-513.
14. Boll, W. C. 1965. On the claimed adaptive nature of indoleacetic acid oxidase and on the effect of green light on indoleacetic acid oxidase activity. *Can. J. Bot.* 43 : 885-892.
15. Goren, R. and E. Tome 1971. Effect of seselin and comarin on growth, indoleacetic acid oxidase, and peroxidase with special reference to cucumber radicles. *Plant Physiol.* 47 : 312-316.
16. Curtis, C. R. 1971. Disc electrophoretic comparisons of proteins and peroxidase from *Phaseolus vulgaris* leaves infected *Agrobacterium tumefaciens*. *Can. J. Bot.* 49 : 333-337.
17. Galston, A. W. and L. Y. Dalberg 1954. The adaptive formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. *Am. J. Bot.* 40 : 373-380.
18. Siegal, B. Z. and A. W. Galston 1967. The isoperoxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 42 : 221-226.
19. Endo, T., B. B. Shabi, and C. Pal 1971. Genetic convergence of the specific acid phosphatase zymograms in *Oryza sativa*. *Jap. J. Genet.* 46 : 147-152.
20. Rudine, D. and I. Ekberg 1976. Linkage studies in *Pinus sylvestris* L. using macro gametophyte allozymes, *Silvae Genetica. Genetica.* 27 : 1-12.
21. Bassiri, A. 1976. Barley cultivar identification by use of isozyme electrophoretic patterns. *Can. J. Plant Sci.* 56 : 1-6.
22. Betz, A. 1963. Ascorbinsaure, NADH, Cystin and Glutathion hemmen den durch Peroxidase Catalysierter oxydativen Abbau von  $\beta$ -Indolyessigsaeure. *Z. Botani.* 51 : 424-433.
23. Buttery, B. R. and R. I. Buzzel 1968. Peroxidase activity in seeds of soybean varieties. *Crop Sci.* 8 : 722-727.
24. Hidemasa Imaseki. 1970. Induction of peroxidase activity by ethylene in sweet potato. *Plant Physiol.* 46 : 172-174.
25. Hyodo, H. and I. Uritani 1966. A study on increase in a diphenol oxidase activity during incubation of sliced sweet potato tissue. *Plant Cell Physiol.* 7 : 137-144.
26. Imaseki, H., M. Uchiyama and I. Uritani 1968. Effect of ethylene on the inductive increase in metabolic activities in sliced sweet potato roots. *Agr. Biol. Chem.* 32 : 387-389.
27. Worthington enzym manual. 1972. Worthington Biochemical Corp., Freedhold, New Jersey. pp. 41-45(1972).
28. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
29. Takahashi, N. 1986. Chemistry of plant hormones, CRC Press Inc., pp. 239-241, 1986.
30. 李相甲. 1991. *Botrytis cinerea*에 의한 천연형 Abscisic Acid의 생산과 그誘導體의 활성. 韓國農化學會嶺南支部總會特別講演要旨 : pp.
31. Lee, S. K. and W. C. Park 1988. Effect of GA<sub>3</sub> and ABA on peroxidase, catalase activities and isoperoxidase patterns in mungbean seeding. *J. Kor. Chem. Soc.* 31 : 205-210.