

마塊莖의 肥大生長에 관한 生理·生態學的 研究

第3報. 塊莖의 肥大生長에 關與하는 植物生理 活性物質의 檢出

張光鎮¹⁾, 金賢準²⁾, 林滿³⁾

¹⁾韓國農業專門學校, ²⁾高嶺地農業試驗場, ³⁾日本鹿兒島大學農學部

Ecophysiological Studies on Growth and Enlargement of Tubers in Yam

Ⅲ. Detection of activity of the endogenous substances related to the growth and enlargement of tubers.

Kwang Jin Chang¹⁾, Hyun Jun Kim²⁾, Mitsuru Hayashi³⁾

¹⁾Korea National Agriculture College, Hwasung 445-890, Korea

²⁾Alpine Experiment Station, RDA, Pyongchang 232-950, Korea

³⁾College of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan

ABSTRACT

Using a bioassay for tuber enlargement activity, which was carried out with culture of microtuber of nodal stem segments *in vitro*, the endogenous substances was detected from leaves of yam (*Dioscorea alata* L., cv. Solo Yam) treated under the short and the long day length condition. Tuber enlargement activity was found in both the aqueous and ethyl acetate phase of extract obtained from leaves of yams. Those activities increased under the short day length, whereas not increased under the long day length. Guided by bioassay, the active substances in the ethyl acetate phase were purified by charcoal adsorption chromatography. The result obtained indicated that the 40% ethanol fraction contained the most prominent tuber enlargement activity. In seasonal changes of the leaves, tuber enlargement activity remained almost constant during summer (June-August), but after, the middle of September, the activity increased gradually and then reached a maximum in early October. Jasmonic acid (JA) was isolated with the guidance of microtuber test and identified by gas chromatography. The level of endogenous JA in the leaves of plants was more than 290 μ g/kg at the 10 hr day length. These results seem evidences for the occurrence of the tuber enlargement activity which is formed in leaves under the short days and transmitted to under ground part to induce growth and enlargement of tuber.

Key words : Bioassay, Jasmonic acid, microtubertest, Tuber enlargement

緒言

마(*Dioscorea alata* L.)의 塊莖形成은 괴경이 형성 될 때 光周反應이 關與하는 감자와는 달리 日長에

관계없이 생육초기의 幼植物에 形成된다(Coursey, 1967). 그러나 그 塊莖의 生長은 長期에 걸쳐서 停滯되어 莖葉만이 生長하는 營養生長期를 경과하여 9월 上旬 以後에 肥大生長이 시작되는 特異한 生育패턴을 보였다(林滿과 石畑, 1991). 定植時期를 바꾸어도 塊莖

의 肥大開始期가 거의 변동이 없는 것은 基本營養生長性보다는 環境의 要因에 의해 誘起될 可能性이 크다 하였다(林滿과 石畑, 1991;Shiwach 등, 1995).

이것은 마의 葉部에서 環境要因의 變化를 感受하여 葉에 內生하는 植物호르몬類의 量的 質的 變動이 일어나서 이것이 地下部로 전류되어 塊莖의 肥大生長을 誘導 할 可能性이 크다. Koda 등(幸田과 吉原, 1993)은 감자의 莖斷片을 無菌의으로 培養하는 生物檢定法을 開發하여 감자 등의 塊莖形成을 制御하는 物質의 存在를 糾明하였다. 그러나 마 塊莖의 肥大生長과 감자의 塊莖形成과는 生理現象이 다르기 때문에 마 塊莖의 肥大生長을 制御하는 生理活性物質의 檢出에 감자의 塊莖形成活性 檢定法을 應用하는 것은 불가능하므로 이에 著者는 마 塊莖의 肥大生長을 制御하는 生理活性物質의 檢索과 同定이 가능한 獨自의 檢定法을 開發하였다(Chang과 Hayashi, 1995).

本 研究에서는 이미 報告한 「microtuber test」(Chang과 Hayashi, 1995)에 의해서 마의 잎에 內生하는 植物生理活性物質의 變動을 檢出하여 塊莖의 肥大生長에 關여하는 것으로 推定되는 生理活性物質의 存在를 究明하였다.

材 料 및 方 法

種芋는 1993年 11월에 수확해 15℃ 條件에 貯藏했던 Solo 品種(*Dioscorea alata* L., cv. Solo yam)(Hayashi 등, 1991)의 塊莖을 利用하였다. 種芋는 배노밀수화제 200배 溶液으로 消毒하여 약 70g씩 切斷한 후 pot 및 圃場에서 栽培하여 供試하였다.

1. 塊莖의 肥大生長에 關與하는 生理活性物質의 探索

1994年 3월 下旬에 砂壤土를 넣은 8 l pot에 種芋를 심어 溫室에서 2個月間 栽培하였다. 그 중에서 展開葉數 12枚를 기준으로 120株를 選拔해서 60주씩 10시간 日長(短日區) 및 自然日長(處理開始時의 日長 13.8時間: 長日區) 條件하에 30回 日長 處理를 하였다. 栽培한 結果는 表 1과 같다.

處理 後, 5株는 莖葉 및 塊莖의 生體重을 측정하고 남아있는 株의 各 區에서 잎을 採取하여 實驗時까지 -80℃냉동고에 保存하였다. 그리고 그림 1의 抽出法으로 葉部에 內生하는 生理 活性 物質을 抽出해서 microtuber test에 의해 活性를 檢定 하였다.

抽出 및 精製法: 短日 및 長日處理를 한 植物體로부터 採取한 잎 1kg씩을 磨碎하여 5 l의 80% methanol을 添加해서 4℃로 2일간 抽出했다. 抽出液을 濾過하고 나머지는 다시 한번 methanol로 추출·여과하여 37℃의 減壓하에 methanol을 제거했다. 이 水溶液의 pH를 3.0으로 調整하고 소량의 물을 넣어 50ml의 水溶液을 만들어 같은 量의 Ethyl acetate로 3회 進탕추출해서 酸性層 (Ethyl acetate phase) 과 中性層(Aqueous phase)으로 分離하였다.

酸性層은 다시 1M NaHCO₃ 용액과 分配하여 그 水相을 pH3.0으로 調整해서 다시 한번 Ethyl acetate로 進탕추출 하였다.(中谷과 幸田, 1992) 그 Ethyl acetate 相을 減壓하에 濃縮·乾固하여 얻어진 추출물을 활성탄흡착 column으로 精製하여 microtuber test의 試料로 했다.

中性層은 水溶液을 不溶性 PVP(Polyvinylpyrrolidone)를 충전시킨 column에 흡착시켰다. 이 column을 PH 3.5의 蒸溜水 400ml로 용출했다. 용출된 水溶液을 다시 pH 3.0으로 조정한 후 P-1 cellulose (H Whatman)를 충전시킨 column을 통해 이온교환을 하여(Matuo등, 1988)

Table 1. Effects of day length on the growth of yam plants (*D. alata* L., cv. Solo Yam).

Day` length (hr)	Fr. weight(g)		Dry weight(g)	
	Tuber	Top	Tuber	Top
Natural*	5.4 ± 2.4	126.6 ± 25.6	0.6 ± 0.3	20.9 ± 5.8
10	65.2 ± 7.6	124.4 ± 20.1	8.2 ± 1.3	19.5 ± 5.3

Each value represents the mean ± SD of 5 replicates.
Duration of treatment : from May 21 to June 21, 1994.
*Natural day length is 14.03 hours.

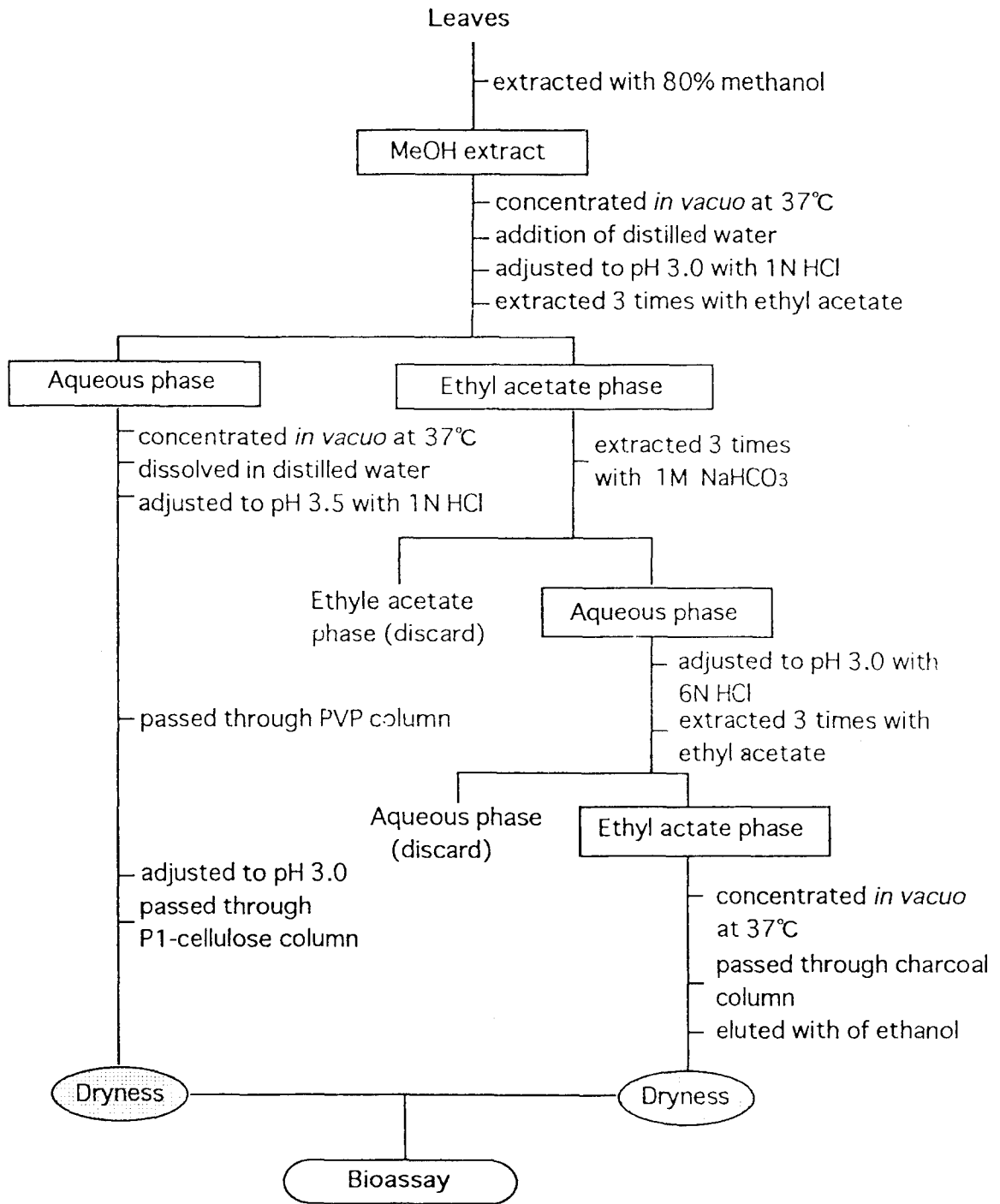


Fig. 1 Flow diagram showing procedures for extraction of biologically active substances from yam leaves.

中性層 抽出물을 얻어 microtuber test의 試料로 했다.

1) 塊莖의 肥大生長에 대한 活性物質의 檢索

上記의 추출로 얻어진 抽出物 가운데 短日處理區의 酸性層 및 中性層의 試料에 대해 각각의 抽出物의 濃度を 變化시켜 microtuber test로 活性를 檢定했다.

각각의 抽出物을 1ml의 DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹여서 그중 0.3ml(잎의 생체중 300g에 해당)을 50ml의 MS 배지 용액에 넣었다. 그리고 3ml의 檢液중에 葉重(생체중)으로 換算하여 0, 0.3, 1, 3, 6, 및 9g 相當量의 抽出物을 포함한 溶液으로 作成하여 檢液을 만들었다.

2) 短日處理와 長日處理간의 活性 比較

抽出操作으로 얻어진 短日處理 및 長日處理區의 酸性層과 中性層의 일부를 試料로 사용하여 검액 3ml중에 잎의 生體重으로 3g 相當量의 抽出物이 포함된 檢液을 作成하여 이 檢液을 microtuber test를 하였다.

3) 短日處理와 長日處理간의 酸性層 抽出物 活性 比較

短日處理 및 長日處理區의 凍結 保存 했던 잎 300g을 2.0 l의 80% methanol로 추출해서 그림 1의 抽出操作에 따라 精製하여 그 산성층의 추출물에 포함된 活性를 處理간에 比較했다. 즉, 本 實驗의 活性炭 吸着 column의 溶液은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 및 100% 에탄올 溶液으로 200ml씩 溶出하여 각각의 溶出液을 減壓하에 濃縮·乾固하여 酸性層의 추출물을 얻었다. 그리고 검액 3ml 중에 잎 3g(生體重) 相當量의 추출물이 포함된 檢液을 작성하여 그 檢液을 microtuber test에 供試하였다.

2. 葉部에 内生하는 活性物質의 經時的 活性 變化

1994년 4월 20일 圃場에 심은 마 품종(*D. alata*)을 供試했다. 6월 5일부터 10월 5일까지 월 2회(上旬과 下旬) 잎 400g(생체중)씩 採取하여 -80℃에 凍結 保存했다. 10월 中旬에 凍結 保存했던 400g의 잎을 갈아서 3 l의 80% methanol로 抽出하여 그림 1의 抽出法에 따라 精製하였다. 한편, 本 實驗에서 활성탄 吸着 column에 의한 精製 操作은 우선 최초의 試料를 吸着한 column을 30% ethanol 용액 300ml로 洗淨하고 이어서 100% ethanol 용액 300ml로 溶出해서 減壓濃縮後 酸性 층의 抽出物을 얻었다. 그리고 檢液에 3g(생체중) 相當量의 추출물이 함유된 검액을 작성

해서 이 檢液을 microtuber test의 試料로 하였다.

3. Gas chromatography에 의한 Jasmonic acid(JA)의 同定

10시간 日長(短日)에서 처리된 植物體를 採取하여 동결 보존되었던 잎 400g(생체중)을 抽出·精製 하였다. 그 산성층의 추출물을 乾固하여 methanol 안에서 diazometan으로 methyl化하였다.(林滿, 1986) methyl化物은 680ml의 아세톤에 녹여서 gas chromatography로 分析하였다. 分析 機種은 gas chromatography 모델 GC-7A(島津製作所)로 水素炎 이온化 檢出器(FID)를 사용하였다. 標品の m-JA산(methyl Jamonate, $C_{15}H_{26}O_3$ 和光純藥 工業KK.) 1mg을 20ml의 아세톤에 溶解하여 分析 하였다.

結果 및 考察

1. 塊莖의 肥大生長에 關與하는 生理 活性物質의 探索

10시간 日長(短日) 處理한 植物의 잎에서 얻어진 酸性層 및 中性層의 抽出物에 대하여 그 추출물의 濃度を 變化시켜 塊莖의 肥大生長에 대한 活性物質을 檢출하여 그 結果를 그림2에 표시하였다.

塊莖의 肥大生長을 促進하는 活性物質은 兩층의 추출물을 檢出하였으나 兩層間에 活性의 정도에는

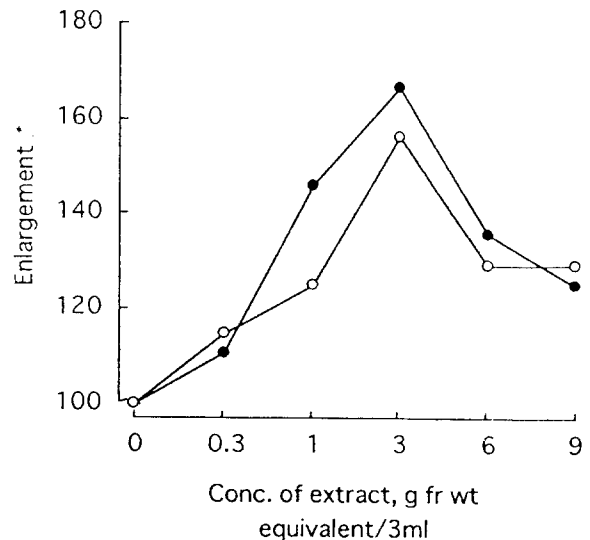


Fig. 2 Tuber-enlargement activey in ethlyl acetate(●) and aqueous(○) phases obases obtained from yam leaves in 10hour day length.
*Relative weight of tuber for control(= 100)in microtuber test.

Table 2. Comparison of the tuber-enlargement activities obtained from yam leaves in natural and 10hours day length conditions.

Day length (hr)	Enlargement*	
	Aqueous phase	Ethyl acetate phase
Natural	100.6±13.7	68.5±18.7
10	149.9±27.1	160.6±25.8

Each value represents the mean ±S.D.

Concentration of the extract in the assay medium was 3g fresh weight equivalent/3ml

*Relative weight of tuber for control (=100) in microtuber test

큰 差異가 없었다.

濃度간에는 3ml의 검액 중에 포함된 추출물의 濃度가 0.3, 1 및 3g(잎의 생체중) 相當量으로 增加할수록 活性은 급격히 强해져, 中性層 및 酸性層에 있어서 相對指數는 각각 156, 167로 크게 促進되는 活性을 얻었다. 그러나 6 및 9g 相當量에서는 3g 相當量보다 活性이 低下되었다.

평균 14시간의 自然日長(長日區)와 10시간 日長(短日區) 條件에서 30回 處理한 植物(표1)의 잎에 含

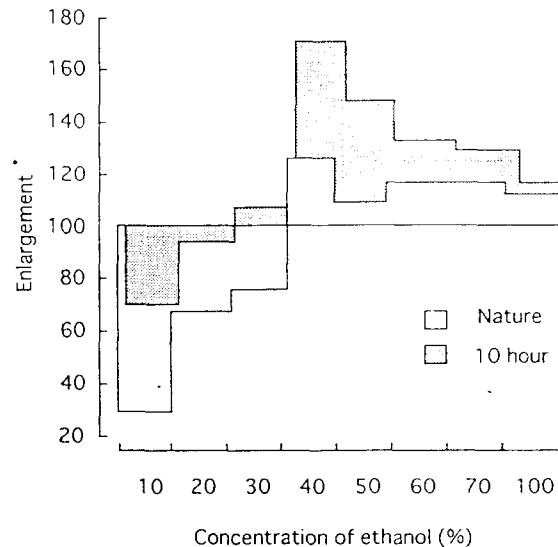


Fig. 3 Histogram representing microtuber test of a charcoal adsorption chromatography of the acidic ethyl acetate soluble fraction of extract obtained from yam leaves.

*Relative weight of tuber for control(=100) in microtuber test.

有된 활성물질의 활성을 檢定한 結果 塊莖의 肥大生長에 대한 活性은 長日區와 短日區에서 크게 차이가 있어 短日區의 추출물에서 促進活性이 認定되었으나 長日區의 추출물에서는 促進活性이 檢出되지 않았다(표2). 短日區의 結果는 그림2와 같이 中性層 및 酸性層의 양쪽 추출물에서 促進作用이 檢出되었고 그 活性의 정도는 비슷했다. 그러나 長日區의 산성층 및 중성층의 추출물에는 促進活性이 거의 없었으며 산성층의 추출물에는 生長 抑制 活性이 檢出되었다.

酸性層의 추출물을 活性炭 吸着 column으로 精製하여 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 및 100% Ethanol 용액으로 溶出하여 各 濃度에 대한 추출물의 活性을 檢定한 結果, 40% 에탄올 용출구의 추출물에서 가장 큰 促進活性이 인정되어 短日區 추출물의 相對指數는 167, 長日區의 指數는 127이었다. 그러나 장일구에서는 에탄올 30% 이하의 용출구에서 강한 抑制活性이 나타났다(그림3).

본 실험에 사용했던 短日區 및 長日區의 식물체에 있어서 地上部의 重量에는 거의 차이가 없었으나 塊莖의 重量은 兩區間에 명확한 차이가 있었다(표1). 이와 같은 결과로 부터 마의 葉部에서 日長의 變化를 感受하여 内生하는 生理 活性物質의 量的, 質的인 變動이 일어나 이 물질이 塊莖部로 전류됨으로서 塊莖의 肥大生長이 이루어지는것으로 推定되었다.

2. 葉部에 内生하는 活性物質의 經時的 活性變化
圃場에 栽培한 마를 供試하여 6월 상순부터 10월 상순까지 매월 2회(上旬과 下旬)씩 잎을 採取하여 抽

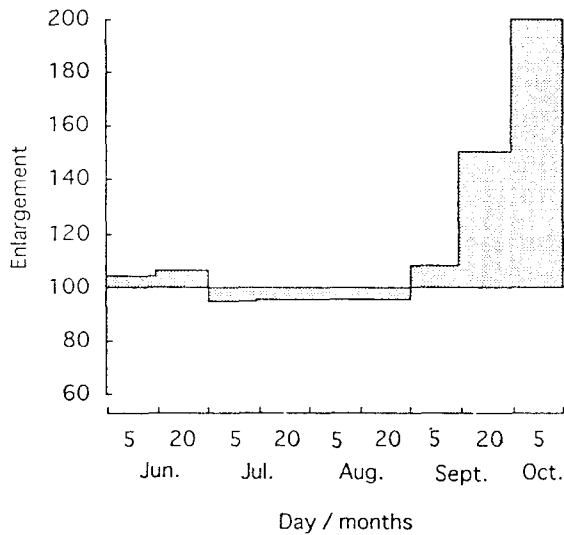


Fig. 4 Histogram representing seasonal changes in microtuber test of a charcoal adsorption chromatography of the acidic ethyl acetate soluble fraction of extract obtained from yam leaves. *Relative weight of tuber for control(=100) in micro tuber test.

출한 각각의 酸性層의 추출물이 塊莖의 肥大生長에 미치는 作用은 그림 4에 나타낸 바와 같다.

6, 7 및 8월의 잎추출물에는 小塊莖의 肥大生長을 制御하는 活性은 거의 檢出되지 않았다. 그러나 9월 초순의 잎추출물에는 塊莖의 肥大生長을 促進하는 弱한 活性이 檢出되어 9월 하순 및 10월 초순의 추출물에서는 강한 促進活性이 檢出되었다. 이 結果로 부터 9월~10월의 1개월에 活性物質이 현저하게 活性化되는 것을 알 수 있었다. 이와같은 結果는 마의 生育 패턴이 營養生長에서 塊莖의 肥大生長으로 轉換하는 時期와 植物生理活性物質이 活性化되는 時期가 일치하고 있는 것이 明確해졌다.

近年, Koda등(Koda와 Kikuta, 1991;幸田과吉原, 1993;中谷과 幸田, 1992)은 莖斷片培養法을 이용해서 地下의 塊莖 및 塊根部에 同化産物을 貯藏하는 作物의 抽出物로 부터 塊莖形成 活性을 比較하여 塊莖形成과 肥大生長의 開始가 季節別 生理活性物質의 變動에 起因하는 것을 檢定하였다.

마는 營養 生長기에 있어서 同化産物을 줄기나 뿌리의 분열에 利用하지만 短日에 들어가면 塊莖의 肥大生長이 開始되어 대부분 同化産物을 貯藏器官의 塊莖에 축적한다(林滿과 石畑, 1991;Shiwachi 등, 1995).

이 生育上의 轉換은 외부의 環境要因 變動에 기인하지만 직접적인 變動을 일으키는 것은 環境要因의 變動을 수용해서 植物體內의 植物生理 活性物質의 활성 變化에 있다고 思料된다.

3. Gas chromatography에 의한 Jasmonic acid (JA)의 同定

실리콘 SE-30의 固定相에서 標品 m-JA(A)와 試料(B)의 methyl化物의 gas chromatography 分析結果를 그림 5에 나타내었다.

標品 m-JA의 保持時間은 5:13분이었다. 한편, 試料의 分析으로 多數의 피크가 檢출되었으나 그 피크 중 m-JA에 같은 保持時間에 명확한 피크가 檢출되어 10시간 日長(短日)에서 30회 處理 되어진 마의 잎에 JA산이 內生하는 것이 確認되었다.

피크의 면적으로 10시간 日長(短日)에서 30회 처리된 植物의 잎 1kg에 포함되어 있는 JA酸의 含量을 換算하였을 때 290 μ g이었다. 그러나, JA酸은 抽出 操作의 過程에서 量的인 손실이 있다고 생각되어지며, 그 短日處理 잎에는 290 μ g/kg 이상의 m-JA酸이 內生하고 있는 것으로 思料된다.

최근 植物의 잎에 內生하는 JA酸이나 같은 構造를 갖은 物質이 감자 등의 塊莖 形成 物質로서 주목을 받고 있다(幸田과吉原, 1993;Matsuki 등, 1992). 또한 *D. opposita*에도 JA酸이 內生하며 주아 形成에도 關與하는 것이 보고되고 있다(Koda와 Kikuta, 1991).

短日 條件下에서 誘導되는 塊莖의 肥大生長은 잎이 日長의 變化를 感受하여 內生하는 植物生理活性物質의 變動과 전류에 의해 誘起되는 것을 示唆하고 있다. 이 生長의 制御機構에 대한 解明을 위해서는 生理活性物質의 活性을 檢定할 수 있는 새로운 檢定法의 確立이 필수 불가결하므로 미지의 活性物質을 檢定할 수 있다고 推定되는 microtuber test를 開發하였다(Chang과 Hayashi, 1995). 따라서 本 論文에서는 日長의 變化에 感應해서 變動하며 塊莖의 肥大生長에 關與한다고 추정되는 잎의 內生 生理 活性 物質을 microtuber test로 檢出하였다.

著者は 短日處理한 마의 잎에서 얻은 산성추출물의 microtuber test에서 小塊莖의 肥大生長과 함께 根의 生長이 促進되고 줄기가 發生되지 않았으므로 塊莖의 肥大生長에 IAA 및 JA酸의 參與 可能性이 높

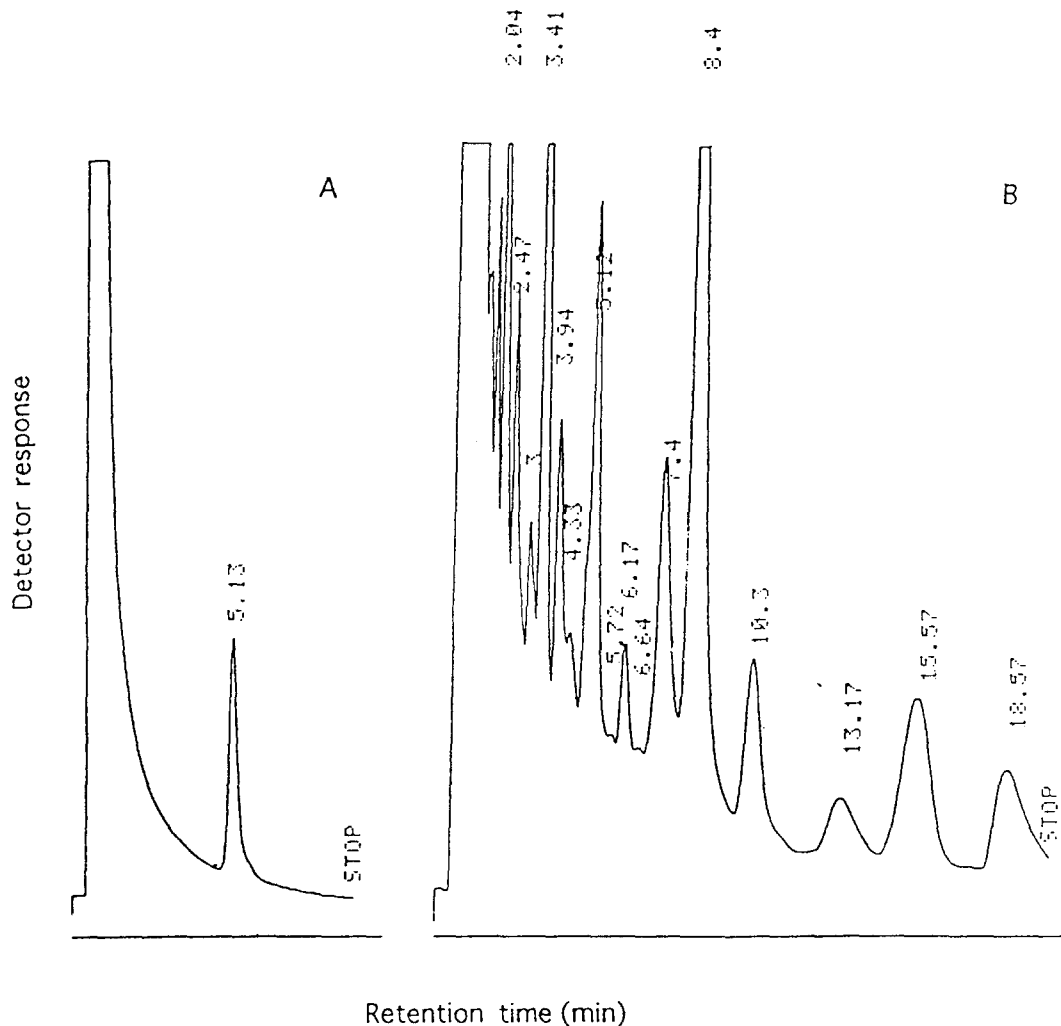


Fig. 5 Gas chromatograms of the methylated samples extracted from leaves under 10hour day length(B) and of the methyl jasmonate 0.1 μ g(A). The sample was washed with 30% ethanol and eluted with 100% ethanol from charcoal column in Fig. 15. GC condition: glass column (3mm \times 2m) packed with 5% SE; N₂ flow rate, 50ml/min; column tem. 180 $^{\circ}$ C.

다고 생각하였다. 또한 高濃度域에서 그 活性이 低下되어 JA酸의 關係 可能性이 示唆되었다(Chang 등, 1995).

그리하여 gas chromatography로 分析한 結果, 抽出液 중에 多量의 JA산이 存在하는 것을 밝히게 되었다. 이상의 結果에서 短日에 의해 誘起되어진 마 塊莖의 肥大生長은 短日 條件下의 앞에서 活性化 시키는 生理 活性 物質에 의해 起因될 可能性이 큰 것으로 推定되었다. 산성층 및 중성층에서 檢出되어진 物質의 同定이나 生長의 抑制 機構 등의 聯關에 관한 解析

등은 以後의 研究課題이다.

摘要

마 植物體를 長日 및 短日 條件으로 日長處理한 각각의 잎으로부터 分離·精製한 抽出物을 microtuber test로 檢定하였다.

1. 短日處理 앞에서 얻어진 抽出液의 酸性층과 中

性층의 抽出物은 小塊莖의 肥大生長을 促進하는 강한 活性이 認定되었다. 그러나 長日處理 앞에서는 추출물 활성이 나타나지 않았다.

2. 短日處理한 酸性層의 抽出物을 活性炭 吸着 column 으로 精製하여 各농도의 活性을 生物檢定 (microtuber test)한 結果 40%에달을 용출구의 추출물에서 가장 큰 促進活性이 나타났다.
3. 圃場에서 栽培중인 植物에서 經時的으로 잎을 採取하여 抽出物의 活性 變化를 檢定했을 때 塊莖의 生長이 停滯해 있는 時期(9월 상순)까 지는 活性이 나타나지 않았으나 9월 중순 이후 活性이 나타나 10월 상순에는 강한 活性이 認 定되었다. 이 活性의 變化는 塊莖의 肥大生長 패턴과 거의 一致했다.
4. 短日處理한 앞에서 얻어진 酸性層의 抽出物에 多量의 JA산이 含有되어 있는 것이 밝혀졌다. 잎 1kg에 포함된 JA산의 量은 290 μ g/kg으로 推 定되었다.

以上의 結果에서 마 塊莖의 肥大生長은 單一條件 下的 葉에 形成되어진 生理活性物質에 의해 起因될 可能性이 큰 것으로 推定되었다.

引 用 文 獻

Chang, K. J. and Hayashi, M. 1995. Ecophysiological Studies on Growth and Enlargement of Tuber in Yams (*Dioscorea spp.*). Ⅰ. Development of bioassay method using microtubers of yams. Japanese Journal of Tropical Agriculture 39(1) 39-46.

Chang, K. J., Shiwachi, H. and Hayashi, M. 1995. Ecophysiological Studies on Growth and Enlargement of Tuber in Yams (*Dioscorea spp.*). Ⅱ. Detection of effect of plant growth regulators on growth and enlargement of microtubers of yams, Japanese Journal of Tropical Agriculture 39(2) 69-75.

Coursey, D. G. 1967 Yams. Longmans. (London) p.230.

Gregory, E. L. 1956 Some factors for tuberization in the potato plant. Amer. J. Bot. 43:281-288.

Hayashi, M., Sakata, Y., Tominaga, S., Taura, S. and Nakamura, M. 1991 Introduction of tropical plants. Kagoshima Univ. Res. Center S. Pac. Occasional Papers No. 21: 13-16.

林滿. 1986. 稻種子の休眠現象に關する生理學的研 究-とくに發芽抑制物質との關聯において. 鹿兒島大 學 農學部 學術報告 36 : 1-43

林滿, 石畑清武. 1991. ヤムイモ(*Dioscorea spp.*) の生 育ならびに塊莖の肥大生長について第2報. ソロヤム (Dioscorea alata L.)の塊莖の肥大生長におよぼす環 境要因の影響. 熱帯農業 35: 79- 83.

Koda, Y and Y. Kikuta. 1991. Possible involvement of jasmonic acid in tuberization of yam plants. Plant Cell Physiol 32: 629-633.

幸田泰則, 吉原照彦. 1993. 植物内生形態抑制物質に 關する 化學的研究. 植物の化學 調節 28: 8-22.

Matsuki, T., H. Tazaki, T. Fujimori and T. Hogetsu. 1992. The influences of jasmonic acid methyl ester on 微細管ules in potato cells and formation of potato tubers. Biosci. Biotech. Biochem. 56 : 1329-1330.

Matsuo, T., H. Mitsuzono, R. Okada and S. Itoo. 1988. Variation in the levels of major free cytokinins and free abscisic acid during tuber development of sweet potato. J Plant Growth Regul 7 : 249-258.

中谷 誠, 幸田泰則. 1992. バレイシイモ 莖斷片培養 法を用いた 數種塊根莖作物の抽出物 の塊莖形成活 性の比較. 日作記 61: 393-400

Shiwachi, M., Chang, K. J. and Hayashi, M. 1995. Ecological and Morphological Characterization and General Evaluation of the Introduced Yams (*Dioscorea alata* L.), The Bulletin of The Faculty of Agriculture, Kagoshima University No 45 :1-17

(접수일 : 1996년 11월 10일)