

## 식물의 Ecdysteroids 함량에 미치는 광과 식물생장조절제의 영향

채현병 · 부경환 · 진성범 · 이도승 · 김대운 · 조문제<sup>1</sup> · 류기중\*

제주대학교 원예생명과학부, <sup>1</sup>의과대학

(2001년 8월 13일 접수, 2001년 8월 18일 수리)

미역고사리(*Polypodium vulgare* L.)와 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai)에 있어서 광과 methyl jasmonate(MJ), 6-benzylaminopurine(BA), thidiazuron(TDZ), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)가 식물체 중의 ecdysteroids( $\beta$ -ecdysone+polypodine B) 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 수광량을 조절하여 재배한 미역고사리의 잎과 근경 모두 상대광도가 높을수록 ecdysteroids 함량이 감소하였고 쇠무릎 유묘의 배양시 광 조건일 때가 암 조건일 때 보다 ecdysteroids 함량이 낮아 식물의 ecdysteroids 함량은 광에 의해 저하되는 것으로 나타났다. 미역고사리 전엽체와 쇠무릎 유묘의 배양계에서 식물체 중의 ecdysteroids 함량은 배지 중의 MJ와 BA 그리고 TDZ의 농도가 높아짐에 따라 증가된 반면 2,4-D의 농도와는 무관하게 일정한 수준으로 유지되어, 식물의 ecdysteroids 함량은 MJ와 cytokinin 처리에 의해 증가되지만 auxin 처리에 의해서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

**Key words :** ecdysteroids, 미역고사리, 쇠무릎, 광, jasmonate, benzylaminopurine, thidiazuron, cytokinin, 2,4-D, auxin

### 서 론

Ecdysteroids는 곤충의 탈피를 촉진하는 활성을 가진 화합물로서 곤충의 생리연구에 있어서 핵심물질 중의 하나일 뿐만 아니라 해충방제나 곤충생육조절에 이용될 수 있기 때문에 산업적으로도 매우 중요한데 현재 300여 종류가 알려져 있다.<sup>1)</sup> 이 물질은 처음에 곤충에서 분리 동정되었으나 1966년 식물계에서도 발견되며 식물체 중에 함유되어 있는 수준은 곤충에서보다 훨씬 높다는 것이 밝혀졌다.<sup>2)</sup> 비록 전환성과정이 확립되어 있으나 비용이 많이 들기 때문에 현재까지도 ecdysteroids는 유기합성방법으로 생산하지 않고 식물에서 추출하여 얻고 있다.<sup>3)</sup>

식물로부터 ecdysteroids를 생산하고자 하는 경우 우선 이 식물재료의 ecdysteroids 함량이 높아야하므로 식물 ecdysteroids에 관한 지금까지의 연구는 주로 ecdysteroids 생합성 능력이 우수한 식물의 선발에 초점이 있었다.<sup>4)</sup> 그러나 식물체 중의 ecdysteroids 함량은 다른 이차대사물질과 마찬가지로 식물의 종류뿐만 아니라 환경요인에 따라서도 크게 달라지기 때문에 식물의 ecdysteroids 대사에 영향을 주는 요인을 규명하고 최적화함으로써 ecdysteroids의 생산효율을 높일 수 있다.<sup>5-13)</sup>

본 연구에서는 식물의 ecdysteroids 대사계를 이해하고 식물로부터 이 물질을 생산하는데 기초가 되는 자료를 얻을 목적으로 식물의 ecdysteroids 함량에 대한 광과 몇 가지 식물생장조절제의 영향을 미역고사리와 쇠무릎 계에서 조사하였다.

### 재료 및 방법

**식물재료.** 미역고사리는 울릉도에서 채취하였다. 광의 영향

에 관한 실험을 위해서 vermiculite를 넣은 포트(35×60×8 cm)에 자생지에서 채취한 미역고사리를 심어 실험실에서 제작한 생육상(80×65×80 cm) 내에 옮겨 재배하였다. 광처리에는 차광율이 90%인 폴리에틸렌 흑색 차광막(한국농경)을 사용했는데 차광막을 생육상에 씌워 수광량을 조절하였다. 생육상 내의 상대광도는 조도계로 각각의 조도를 측정하여 계산하였다. 식물생장조절물질의 영향에 관한 실험에는 기내에서 포자를 배양하여 얻은 전엽체를 사용하였는데 식물생장조절물질은 전엽체의 액체배양에 사용한 MS 기본배지에 소정의 농도가 되도록 각각 첨가하여 처리하였다. 배양액 30 ml가 들어있는 100 ml 삼각 플라스크에 전엽체는 3g을 넣고 25°C 광조건으로 액체배양하였다.

쇠무릎은 제주도에서 채취하였다. 광의 영향에 관한 실험을 위해서는 vermiculite를 넣은 포트에 종자를 심어 생육상 내에서 광 또는 암조건으로 발아시키고 같은 조건을 유지하면서 유묘를 재배하였다. 식물생장조절물질의 영향에 관한 실험에는 배양토인 vermiculite 10g에 MS 기본배지에 각각의 식물생장조절물질을 소정의 농도로 첨가한 배양액 30 ml를 처리하였으며 표면균한 종자를 vermiculite를 넣은 배양병에 심어 기내에서 25°C 광조건으로 발아시키고 같은 조건에서 유묘를 배양하였다.<sup>5)</sup> 본 실험에서 각 처리구는 3반복이었으며 모든 데이터는 평균±표준편차로 표시하였다.

**Ecdysteroids의 추출 및 분석.** 각각의 시료 0.5-1.0g을 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 methanol 10 ml에 혼합한 후 5000 rpm에서 원심분리하여 상정액을 취하였으며, 이 과정을 5회 반복하여 추출하였다. 추출한 용액을 hexane 50 ml로 3회 상분리하여 methanol층을 감압농축하였으며, 건조물을 methanol 2 ml에 녹인 후 그 중 20  $\mu$ l를 HPLC에 주입하였다. HPLC 분석조건은 Table 1에 나타내었다. 이 용매계에서는 20-hydroxyecdysone과 polypodine B가 동일한 peak에서 함께 용

\*연락처

Phone: 82-11-697-6711; Fax: 82-64-756-3351

E-mail : kzriu@cheju.cheju.ac.kr

Table 1. Analytical conditions for RP-HPLC

Column	Phenomenex Prodigy C-18 100Å (4.6 mm×300 mm i.d., particle size 5 μm)			
	time (min)	water (%)	methanol (%)	flow rate (ml/min.)
Mobile phase	0.0	100.0	0.0	1.0
	4.0	60.0	40.0	1.0
	20.0	30.0	70.0	1.0
	30.0	5.0	95.0	1.0
	40.0	5.0	95.0	1.0
	41.0	100.0	0.0	1.0
Other condition	- solvent profile: linear - equilibration time : 3.0 min.			
	- wavelength: UV 243 nm - run time: 40.0 min.			
	- column temperature: ambient			

출<sup>14)</sup>되기 때문에 이 논문에서는 이 두가지를 합쳐서 ecdysteroids로 나타내었다.

결과 및 고찰

식물의 ecdysteroids 함량에 미치는 광의 영향. 차광에 의해 노지의 자연광에 대한 상대광도가 각각 0.01, 0.11, 1.63, 18.6, 35.4%가 되도록 수광량을 조절하여 재배한 미역고사리의 잎과 근경의 ecdysteroids를 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. ecdysteroids의 함량은 잎과 근경간에 차이가 있었는데 수광량이 0.11% 이하에서 근경이 2,300 μg/g(dry wt.)으로 잎의 1,112 μg/g(dry wt.) 보다 약 2배정도 높았다. 수광량을 달리했을 때 식물체 중의 ecdysteroids 함량도 달라졌는데 잎과 근경 모두 수광량이 증가할수록 ecdysteroids 함량은 감소하였다. 근경의 경우 ecdysteroids 함량은 수광량 0.11% 이하에서 2,300 μg/g (dry wt.)이었으나 수광량이 35.4%로 증가함에 따라 1,379 μg/g (dry wt.)로 약 2배 가량 저하되었다. 잎의 경우에는 수광량 0.11% 이하에서 ecdysteroids 함량이 1,112 μg/g(dry wt.)이었으나 수광량이 35.4%로 증가했을 때 222 μg/g(dry wt.)로 약 5배 가량 감소되어 광은 잎의 ecdysteroids 함량에 더욱 큰 영향을 주었다.

미역고사리에서 광은 ecdysteroids의 함량을 감소시키는 것으로 나타났으나 이 식물이 음지식물이라는 점을 고려할 때 광에 의한 ecdysteroids 함량 감소는 광이 ecdysteroids 대사계에 직접 영향을 준 결과이기 보다 일반 대사계에 영향을 준 결과일 가능성이 있다. 만약 광이 ecdysteroids 대사계에 직접 영향을 주지 않는다면 양지식물의 경우에는 ecdysteroids 함량에 영향을 주지 않을 것으로 예상된다. 그래서 양지식물인 쇠무릎계에서 이를 확인하고자 명과 암 조건으로 나누어 쇠무릎 종자를 발아시키고 1주 간격으로 7주 동안 ecdysteroids 함량을 조사하였다(Fig. 2). 발아전 종자의 ecdysteroids 함량은 4,152 μg/g(dry wt.)이었는데 암조건에서 자란 유묘의 경우 시간이 경과함에 따라 증가하여 7주 후에는 7,483 μg/g(dry wt.)으로 약 2배가 되었다. 그러나 명조건에서 자란 유묘의 경우에는 시간이 경과함에 따라 오히려 ecdysteroids 함량이 감소하여 7주 후 650 μg/g (dry wt.)으로 약 1/7로 감소하였다. 음지식물인 미역고사리와 마찬가지로 양지식물인 쇠무릎계에서도 ecdysteroids 함량이 광에

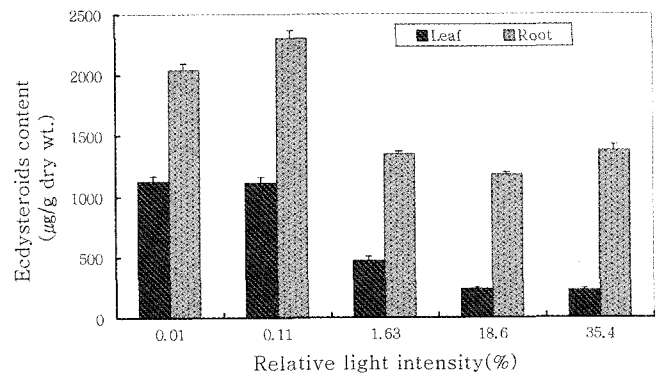


Fig. 1. Change of ecdysteroids content in the leaf and root of P. vulgare with increase of relative light intensity.

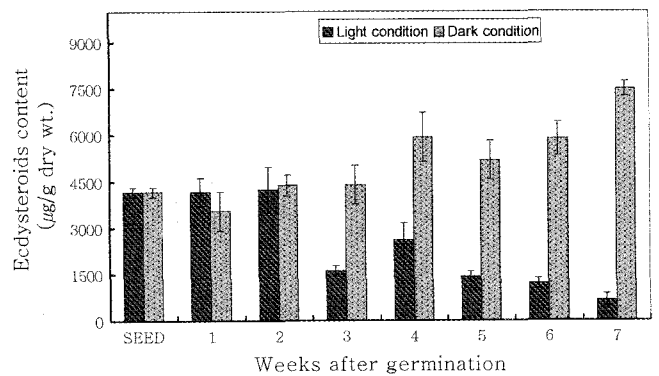


Fig. 2. Change of ecdysteroids content in the seedling of A. japonica during culture with and without light.

의해 감소되는 점으로 미루어 볼 때 광은 식물의 ecdysteroids 대사계에 직접 영향을 줄 가능성이 크다.

식물의 ecdysteroids 함량에 미치는 jasmonate의 영향. Jasmonate가 미역고사리의 ecdysteroids 함량에 미치는 영향을 미역고사리 포자의 기내배양을 통해 유기시킨 전엽체의 액체배양계에서 조사하였다. 소량의 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 MJ를 녹인 후 각각 소정의 농도가 되도록 첨가한 MS 기본배지에서 미역고사리 전엽체를 3일간 현탁배양한 후 ecdysteroids 함량을 조사하였다. 여기서 액체배양계를 사용한 이유는 액체배지의 jasmonate 농도를 조절하는 것이 어렵거나 토양처리

보다 jasmonate를 보다 정량적으로 처리할 수 있는 장점이 있기 때문이었다. 조사된 MJ 농도 0-448 nM 범위 내에서 56 nM 까지는 MJ의 농도에 따른 식물체 중의 ecdysteroids 함량에는 차이가 없었다(Fig. 3). 그러나 MJ 농도 56 nM 이상에서는 MJ의 농도가 증가됨에 따라 식물체의 ecdysteroids 함량도 증가되었는데 MJ농도가 56 nM 이하인 배지에서 배양한 전엽체의 ecdysteroids 함량이 1,000  $\mu\text{g/g}$ (dry wt.) 이하였으나 MJ의 농도 448 nM에서는 2,626  $\mu\text{g/g}$ (dry wt.)으로 2.5배 이상 증가했다.

쇠무릎의 경우 MJ를 각각 소정의 농도로 첨가한 MS 기본 배양액을 처리한 배양토에 종자를 파종하고 3주간 배양한 후 발아한 유묘의 ecdysteroids 함량 변화를 측정하여 Fig. 4와 같았다. 무처리구의 ecdysteroids 함량이 3,661  $\mu\text{g/g}$ (dry wt.)이었음에 비해 MJ를 56 nM 처리하였을 때 5,505  $\mu\text{g/g}$ (dry wt.)으로 약 1.5배 증가하여 미역고사리에서와 마찬가지로 MJ 처리에 의해 ecdysteroids 함량이 증가되는 것으로 나타났다. 그러나 쇠무릎의 경우 미역고사리와 달리 MJ 56 nM 이하에서 ecdysteroids 함량을 증가시킨 반면 그 이상의 농도에서는 ecdysteroids 함량 증가효과가 없었다. 미역고사리와 쇠무릎간에 ecdysteroids 함량증가 효과를 나타내는 MJ의 농도 범위가 다른 것은 MJ의 처리방법의 차이에 따른 결과일 수도 있지만 식물종류에 따라 MJ에 대한 감수성이 다르기 때문에 나타난 결

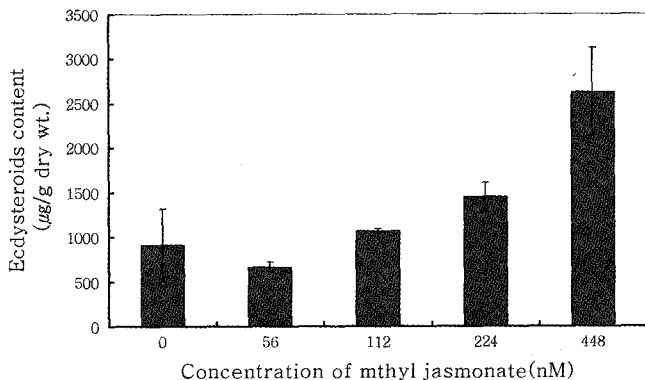


Fig. 3. Change of ecdysteroids content in the prothallis of *P. vulgare* with increase of methyl jasmonate level in the culture medium.

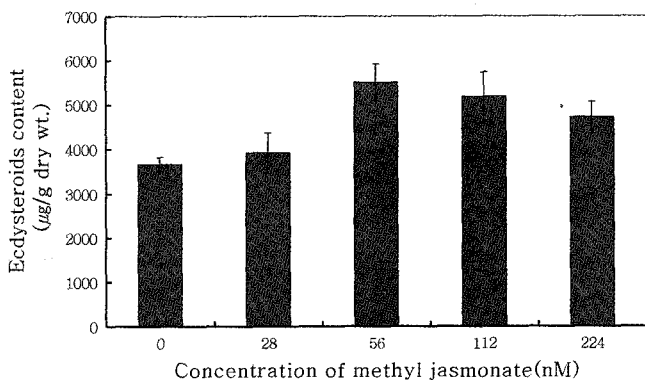


Fig. 4. Change of ecdysteroids content in the seedling of *A. japonica* with increase of methyl jasmonate level in the culture medium.

과일 가능성이 크다. 실제 Schmelz등도 시금치에서 MJ의 처리가 식물체 중의 ecdysteroids를 증가시키는 것으로 보고했는데 시금치 뿌리의 경우 ecdysteroids 함량이 증가되는 MJ의 농도 범위는 223 nM까지로 쇠무릎과는 달랐다.<sup>9)</sup>

식물의 ecdysteroids 함량에 미치는 cytokinin의 영향. Cytokinin의 하나인 BA를 농도별로 처리한 배양액에 미역고사리 전엽체를 치상하여 3주간 현탁배양한 후 ecdysteroids의 함량을 분석한 결과는 Fig. 5와 같았다. BA가 없는 배지에서 배양한 식물체의 ecdysteroids 함량은 909  $\mu\text{g/g}$ (dry wt.)이었으나 BA의 농도가 증가함에 따라 ecdysteroids 함량도 증가하여, BA 50  $\mu\text{g/ml}$  처리구에서는 ecdysteroids 함량이 3,141  $\mu\text{g/g}$ (dry wt.)으로 무처리구에 비해 3배정도가 되었다. 이 결과는 Camps 등이 미역고사리 전엽체에 BA를 처리하여 ecdysteroids 함량 변화를 조사한 연구에서 BA 처리가 식물체 중의 ecdysteroids 함량을 증가시키는 것으로 보고한 것과 유사하였다.<sup>6)</sup>

TDZ는 강력한 cytokinin 활성을 가진 화합물인데 이 물질을 농도별로 처리한 배양토에 쇠무릎 종자를 치상하여 3주간 배양한 후 발아한 유묘의 ecdysteroids 함량 변화를 측정하여 보았다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 TDZ를 처리하지 않은 대조구의 경우 ecdysteroids 함량이 3,661  $\mu\text{g/g}$ (dry wt.)이었으나 TDZ 150 ng/ml 처리구에서는 5,624  $\mu\text{g/g}$ (dry wt.)으로 증가하여 최대치에 도달했다. BA 뿐만 아니라 TDZ의 처리에 의해서도 식물체 중의 ecdysteroids 함량이 증가된다는 본 실험 결과로

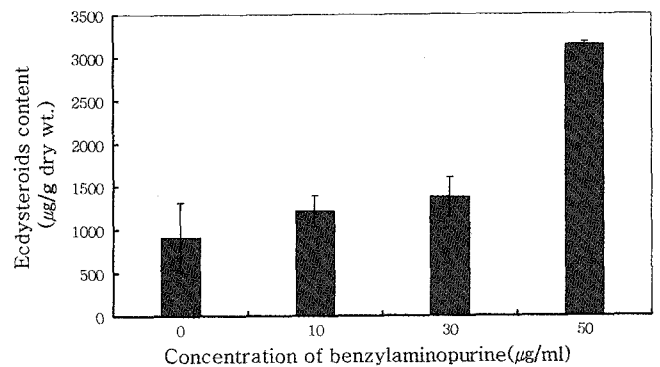


Fig. 5. Change of ecdysteroids content in the prothallis of *P. vulgare* with increase of benzylaminopurine level in the culture medium.

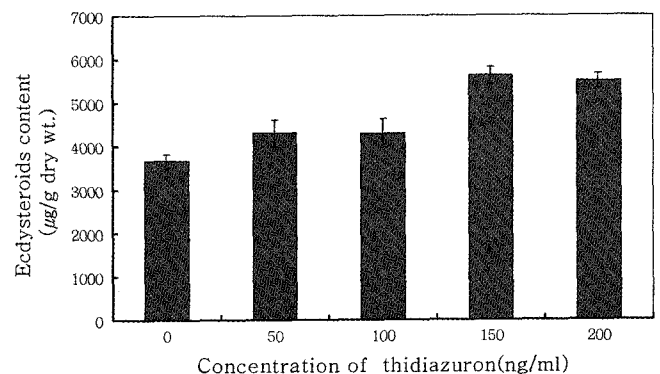


Fig. 6. Change of ecdysteroids content in the seedling of *A. japonica* with increase of thidiazuron level in the culture medium.

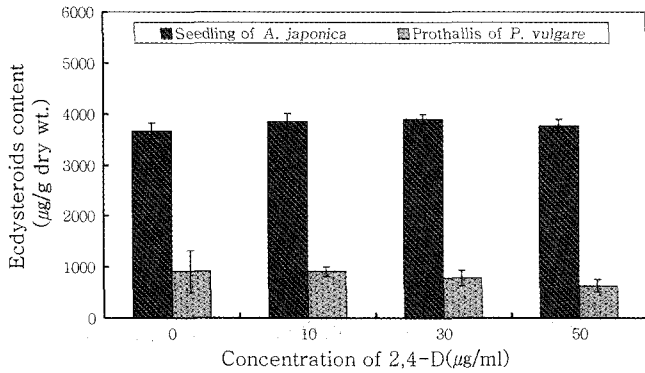


Fig. 7. Change of ecdysteroids content in the prothallis of *P. vulgare* and the seedling of *A. japonica* with increase of 2,4-D level in the culture medium.

미루어 볼 때 cytokinin류 화합물은 일반적으로 식물의 ecdysteroids 함량을 증가시키는 작용이 있는 것으로 생각된다.

식물의 ecdysteroids 함량에 미치는 auxin의 영향. 식물체의 ecdysteroids 함량에 대한 auxin의 영향을 보기 위하여 2,4-D의 농도를 달리한 배지에서 배양한 미역고사리와 쇠무릎 식물체의 ecdysteroids 함량을 조사하였다. 미역고사리의 경우에는 2,4-D 배지에서 3일간 배양한 전엽체에 대하여 조사하였고, 쇠무릎의 경우에는 종자를 2,4-D 배지에서 발아시켜 3주간 배양한 유묘에 대하여 조사하였다. Fig. 7에 보는 바와 같이 2,4-D의 농도가 다른 배지에서 자란 미역고사리와 쇠무릎 모두 ecdysteroids 함량에는 차이가 없었다. Camps 등도 미역고사리 전엽체에 2,4-D를 처리했을 때 ecdysteroids 함량이 크게 달라지지 않는 것으로 보고했다.<sup>6)</sup> 그러므로 auxin 류는 식물의 ecdysteroids 함량에 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 1999년도 제주대학교 발전기금 학술연구비와 아열대원예산업연구센터 연구비에 의해 연구되었으며, 재정지원에 감사드린다.

### 참고문헌

- Dinan, L. (2001) Phytoecdysteroidss: biological aspects. *Phytochem.* **57**, 325-339.
- Nakanishi, K., Koreeda, M., Sasaki, L., Chang, M. L., Hsu, H. Y. (1966) Insect hormones. I. the structure of ponasterone A,

- an insect molting hormones from the leaves of *Podocarpus nakaii* H. *Chem. Comm.* 915-917.
- Kim, J. G., Kim, S. E., Han, S. J. and Noh, S. K. (1995) Studies on the biological activities of phytoecdysone from *Acyranthes japonica* I. Effects of molting hormone extracted from *A. japonica* on mounting and cocoon characters of *Bombyx mori*. *J. Korean Seric. Sci.* **37**(2), 127-131.
- Lafont, R. and Wilson, I. D. (1996) In *The Ecdysone Handbook*. 2nd ed. The Chromatographic Society, Nottingham. p. 525.
- Schmelz, E. A., Grebenok, J. R., Galbraith, D. W. and Bowers, W. S. (1998) Damage-induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach: A rapid root response involving the octadecanoic acid pathway. *J. Chem. Eco.* **24**(2), 339-359.
- Camps, F., Claveria, E., Coll, J., Marco, M. P., Messeguer, J. and Mele, E. (1990) Ecdysteroids production in tissue cultures of *Polypodium vulgare*. *Phytochem.* **29**, 3819-3821.
- Farmer, E. E., Johnson, R. R. and Ryan, C. A. (1992) Regulation of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **98**, 995-1002.
- Reixach, N., Lafont, R., Camps, F. and Casas, J. (1999) Biotransformations of putative phytoecdysteroids biosynthetic precursors in tissue cultures of *Polypodium vulgare*. *J. Eur. Biochem.* **266**, 608-615.
- Grebenok, R. J., Galbraith, D. W., Benveniste, I. and Feyereisen, R. (1996) Ecdysone 20-monooxygenase, a cytochrome P450 enzyme from spinach, *Spinacia oleracea*. *Phytochem.* **42**(4), 927-933.
- Farmer, E. E. and Ryan, C. A. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell.* **4**, 129-134.
- Grebenok, R. J. and Adler, J. H. (1991) Ecdysteroids distribution during development of spinach. *Phytochem.* **9**, 2905-2910.
- Grebenok, R. J. and Adler, J. H. (1993) Ecdysteroids biosynthesis during the ontogeny of spinach leaves. *Phytochem.* **33**(2), 341-347.
- Jarvis, T. D., Earley, F. G. and Rees, H. H. (1994) Inhibition of the ecdysteroids biosynthetic pathway in ovarian follicle cells of *Locusta migratoria*. *Pesticide. Biochem. Physiol.* **48**, 153-162.
- Wilson, I. D., Morgan, E. D. and Murphy, S. J. (1990) Sample preparation for the chromatographic determination of ecdysteroids using solid-phase extraction methods. *Analytica Chimica Acta.* **236**, 145-155.

---

**Effects of Light and Some Plant Growth Regulators on Ecdysteroids Contents in *Polypodium vulgare* L. and *Achyranthes japonica* Nakai**

Hyun-Byung Chae, Kyung-Hwan Boo, Seong-Beom Jin, Do-Seung Lee, Dae-Woon Kim, Moon-Jae Cho<sup>1</sup> and Key-Zung Riu\* (*Faculty of Horticultural Life Science, College of Agriculture; <sup>1</sup>Medical School, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea*)

**Abstract:** Effects of light, methyl jasmonate(MJ), 6-benzylaminopurine(BA), thidiazuron(TDZ), and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) on the contents of ecdysteroids ( $\beta$ -ecdysone+polypodine B) in *Polypodium vulgare* L. and *Achyranthes japonica* Nakai were studied. When the plants of *P. vulgare* were cultured under light control, the ecdysteroids contents in both leaves and rhizomes decreased with increasing light intensity. The ecdysteroids contents in *A. japonica* were also lower when cultured under light than under dark. Among the tested plant growth regulators, MJ, BA, and TDZ increased the ecdysteroids contents in both *P. vulgare* and *A. japonica*.

---

Key words: ecdysteroids, *Polypodium vulgare*, *Achyranthes japonica*, light, jasmonate, cytokinin, benzylaminopurine, thidiazuron, 2,4-D, auxin

\*Corresponding author