

温州蜜柑 (*Citrus unshiu* Marc.) 葉의 Absciscic Acid 含量에 미치는 Water stress의 影響

許仁玉* · 金星徹**

Effects of Water Stress on Absciscic Acid Content of Leaves in *Citrus unshiu* Marc.

Heo, In-Ok and Seong-Cheol Kim

Abstract

The effects of water stress on changes in endogenous levels of absciscic acid were investigated in *Citrus unshiu* Marc.

In ABA analysis by HPLC, cis-ABA appeared at 7.8min. and trans-ABA, inactive form by UV irradiation appeared at 7.2min. The content of ABA in fresh weight base increased gradually with aging of the leaves and was highest in the defoliated leaf. The resistance to the deficiency of water was highest in the summer leaves and the rate of ABA synthesis was higher in the spring leaves than the old leaves in response to drought.

ABA content in summer leaves was increased by translocation of ABA with the assimilates from spring and old leaves to the importing summer leaves.

I. 서 론

Absciscic acid (ABA)는 1963年 Addicott에 의 하여 本花 (*Gossypium hirsutum* L.)의 幼果에서 처음 分離, 同定된 이래 高等植物의 發芽 및 生長 抑制物質로 알려지고 있으며 (Addicott, 1983), 生理學的인 役割로는 休眠誘起 (Page-

Degivry *et al.*, 1980; Everat-Bourbouloux, 1987), 老化 및 脫離促進 (Davenport *et al.*, 1977; Samet and Sinclair, 1980), 氣孔開閉 (Ackerson, 1980; Kim and Sung, 1985) 등에 關與하는 것으로 報告되고 있다.

ABA는 自然狀態에서 (+)-S-ABA 形態로 存在하며 融點이 160-161°C이고, 15개의 炭素를

* 제주대학교 자연과학대학 생물학과

** 대학원 생물학과

갖는 terpene類의 物質로써 sodium, bicarbonate, chlorform, acetone, ethyl acetate, ether 等에는 잘 녹으나 benzene, petroleum ether에는 녹지 않은 性質이 있으며, pH나 빛에 의해 쉽게 不活性化 된다(Merck Index, 1983). ABA는 前處理 및 展開溶媒에 따라 peak의 時間帶(retention time)와 크기가 다르게 나타나며, 특히 지금까지의 分析技法으로는 수백g의 材料를 必要로 하는 等 分析이 까다로와 現在까지도 生物檢定, paper chromatography, thin layer chromatography, 그리고 gas liquid chromatography에 의하여 分析이 주로 行해지고 있으나 high performance liquid chromatography (HPLC)에 의한 分析方法은 그리 많지 않은 實情이다(Ciha *et al.*, 1977; Anderson, 1985; Majcherczyk *et al.*, 1986; Linskens and Jackson, 1987; Rivier and Crozier, 1987; 許等, 1988).

本 研究에서는 ABA의 化學的 特性인 紫外線에 의한 cis-form에서 trans-form으로의 變化를 確認하고, 温州蜜柑(*Citrus unshiu* Marc.)을 材料로 生成部位, 老化 및 脫離 等の 生理作用에 대한 研究로써 잎의 生長段階에 따른 ABA含量과 water stress가 ABA含量에 미치는 影響을 調査하였다.

II. 材料 및 方法

1. 植物材料

3年生 温州蜜柑(*Citrus unshiu* Marc.)을 內徑 25cm, 높이 30cm 盆에 1989年 4월에 植栽하고, 降雨의 影響을 防止하기 위하여 비닐을 設置하였으며, 供試苗를 1989年 7月 29일부터 灌水를 中止하여 water stress處理를 하였다.

2. 試料採取

1989年 7月 29일부터 8月 15일까지 9日 間隔으로 午前 9:00-10:00에 88年 生成된 잎을 舊葉으로 하고, 89年 生成된 잎은 春葉과 夏葉으로 구분하여 각각 無作爲로 採取하였다. 採取한 잎은 水分蒸發을 막기 위하여 petri-dish에 密封한後 -20℃에 保管시켜 試料로 使用하였다.

3. 相對水分含量 測定

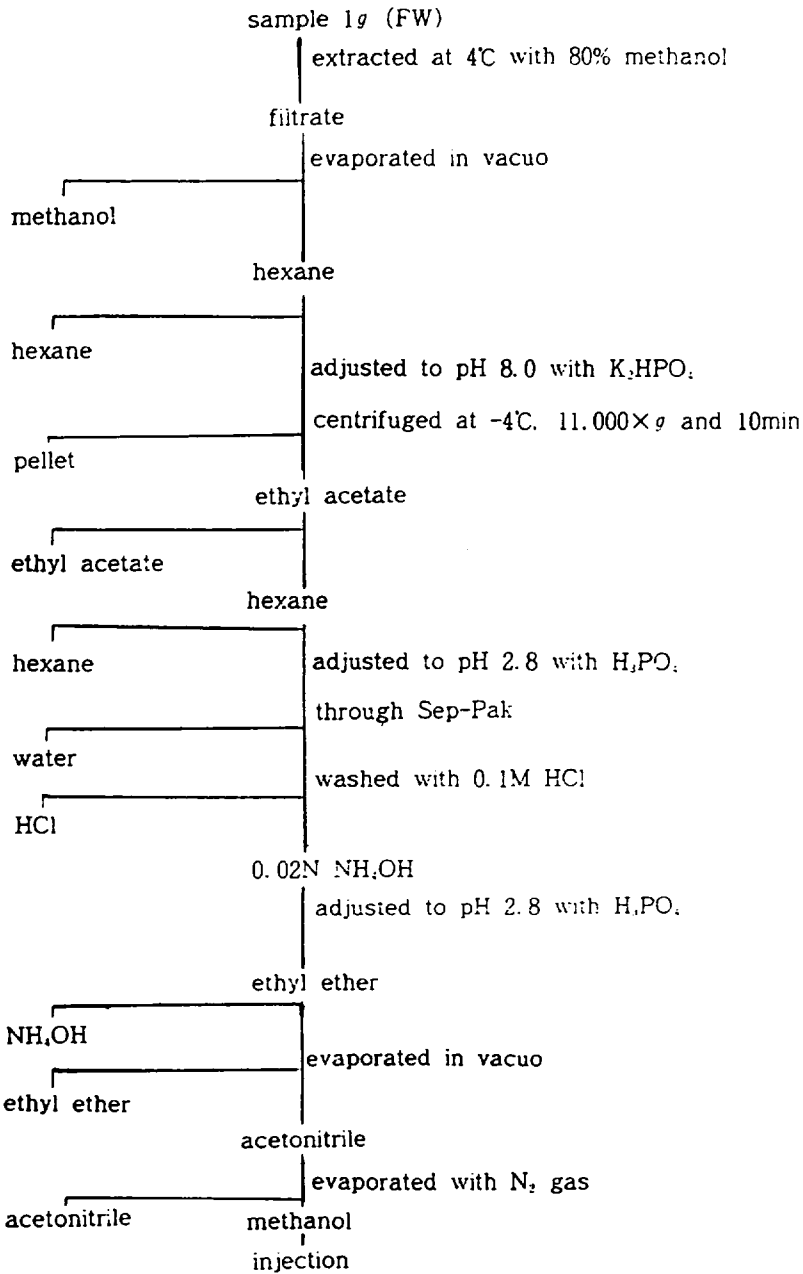
温州蜜柑 葉 3g을 80℃의 dry oven에서 48시간 乾燥시킨 後 乾物量을 測定하여 生體量과의 差를 生體量에 대한 百分率로 算出하였다.

4. ABA의 抽出 및 HPLC 分析

ABA의 抽出 및 分離는 scheme 1과 같이 行하였으며(許等, 1988), HPLC 分析 時 컬럼은 μ -Bondapak C₁₈, 溶媒는 acetonitrile과 0.1M phosphate buffer를 1:2로 混合하여 使用하였고, 波長은 254nm, 流速은 1.0ml/min, 注入量은 10 μ l로 하여 實施하였으며, standard ABA는 東京化成工業株式會社의 abscisic acid(G. R. grade)를 使用하였다.

III. 結果 및 考察

展開溶媒를 acetonitrile과 0.1M phosphate buffer(pH 2.6)를 1:2로 混合하여 使用하였을 때 標品の retention time은 7.8分으로 確認되었고(Fig. 1a), ABA의 特性인 紫外線에 대한 反應을 갖고 確認한 結果, 標品試料에 紫外線을 處理한 後 20分에는 cis-form에서 trans-form으로 變化하고, 處理 後 60分까지 變化하다가 그 후 安定되고 있었으며(Fig. 1), 이는 Rivier and Crozier(1987)의 보고와 일치하였다.



Scheme 1. The procedure for the extraction and separation of ABA.

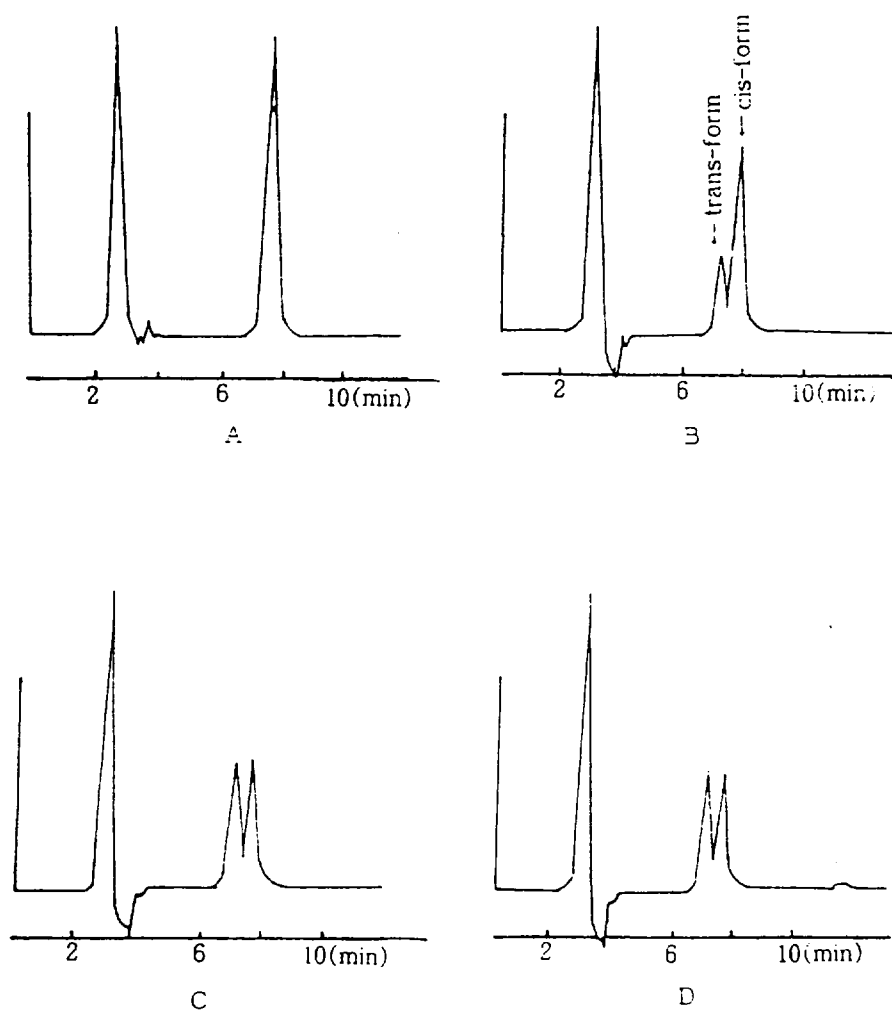


Fig. 1. Changes of standard ABA by UV irradiation.

Irradiation time : A, 0 min; B, 20min; C, 40min; D, 60min.

HPLC conditions : Mobile phase, acetonitrile : 0.1M phosphate buffer (pH 2.6) = 1 : 2;
chart speed, 0.5cm/min; sensitivity, 0.1; injection volume, 10 μ l.

温州蜜柑에서의 ABA 存在 및 分離를 확인하기 위하여 Standard ABA와 温州蜜柑葉에서 抽出한 ABA 溶液의 HPLC Chromatogram을 비교한 結果, 7.8分帶에서 peak가 나타나 温州蜜柑 葉에서의 ABA 존재를 確認할 수 있었다 (Fig. 2).

ABA 定량을 하기 위하여 ABA 濃도와 absorbance의 關係를 調査한 結果, 相關係數 $r=0.9998$ 로 比例關係가 成立하였다 (Fig. 3).

葉齡別 ABA 含量은 落葉이 2775ng으로 가장 많았고 夏葉이 400ng으로 가장 적었으며, 葉齡이 增加할수록 ABA 含量이 增加하였다 (Fig. 4). 이는 本花 (*Gossypium hirsutum* L.)의 경우 幼葉에서 ABA含量이 가장 높고, 葉齡이 增加할수록 含量이 減少한다는 報告 (Jordan, 1975) 및 도꼬마리 (*Xanthium strumarium* L.)의 경우 ABA와 phaseic acid (PA)는 幼葉에서 가장 높은 含量을 보이며 葉齡이 增加함에 따라 含量이 減少하는 반면 ABA-glucose ester (ABA-GE)는 增加한다는 報告 (Raschke and Zeevaart, 1976; Cornish and Zeevaart, 1984)와는 反對의 結果를 보였다. 한편 大豆 葉은 葉齡이 增加할수록 ABA含量이 增加하고 葉이 褐變되는 時期에 갑자기 增加하며 (Samet and Sinclair, 1980). Citrus葉의 경우 $10\mu\text{M}$ 의 ABA를 處理했을 때 ethylene의 合成이 誘導되고 脫離를 促進한다고 報告 (Sagee *et al.*, 1980) 하였는데, 위의 結果와 比較해 볼 때 葉齡增加에 따른 ABA 含量增加, 落葉이 된 후 褐色으로 變化하는 점, 그리고 落葉이 되는 時期에 ABA 含量이 최대가 되는 점 등이 위의 報告와 一致하여, 葉內 ABA 含量이 葉의 老化 및 脫離에 크게 關與하고 있음을 보여 주었다.

乾燥處理 後 葉의 葉齡에 따른 水分含量의 變化는 舊葉에서 乾燥日數가 增加함에 따라 水分含

량이 뚜렷한 減少를 나타냈으며, 乾燥 18일째 落葉이 된 舊葉의 경우 55%의 減少率을 보였다. 반면 春葉과 夏葉에 있어서는 乾燥日數가 增加했음에도 불구하고 對照區와 거의 같은 含量을 보였으며, 水分含量의 減少에 대한 抵抗力이 크게 나타났다 (Fig. 5). 이는 수분증발을 방지하기 위한 기공의 작용으로써 氣孔閉鎖에 의한 것으로 여겨지며, 보통 전체葉의 ABA 含量이 增加하기 전에 氣孔閉鎖가 일어나고 그에 대한 反應은 어린잎일수록 敏感하게 나타난다는 Ackerson (1980), Henson (1981a, 1981b, 1981c). 그리고 Cornish and Zeevaart (1985)의 報告와 一致하였다.

乾燥處理에 의한 ABA 含量의 變化는 乾燥 9일째 生體量 1g에 대하여 舊葉에서 375ng, 夏葉에서 275ng이 增加한 것에 비하여 春葉은 590ng의 增加를 나타냈으며, 乾燥 18일째 舊葉이 2025ng, 春葉이 1500ng의 增加를 보여 夏葉의 750ng 增加에 비하여 약 2~3배의 增加를 나타냈다 (Fig. 6). 한편 乾燥 9일째 ABA 含量 增加량을 볼 때 春葉은 舊葉의 약 1.6배, 夏葉의 2.2배의 增加를 보였는데 이는 未熟한 葉이 成熟한 葉보다 ABA 合成速度가 빠르다는 Zeevaart (1977)의 報告와 一致하였다.

단위 葉 當 ABA 含量은 乾燥 9일째 舊葉에서 110ng, 夏葉에서 40ng이 增加한 것에 비하여 春葉은 259ng으로 舊葉보다 2.4배, 夏葉보다 6.5배의 含量增加를 나타냈고, 乾燥 18일째 落葉이 된 舊葉에서 621ng, 春葉에서 535ng, 夏葉에서 109ng의 含量增加를 나타내어 舊葉과 春葉에서의 ABA 含量增加가 夏葉의 5~6배로 나타났다 (Table 1). 한편 乾燥處理에 의하여 落葉이 된 舊葉의 경우 ABA含量이 葉 當 811ng으로 최대 값을 나타내었고, 이 때 水分含量이 55% 減少하는 점으로 보아 stress性 脫離에는 水分含量 또한

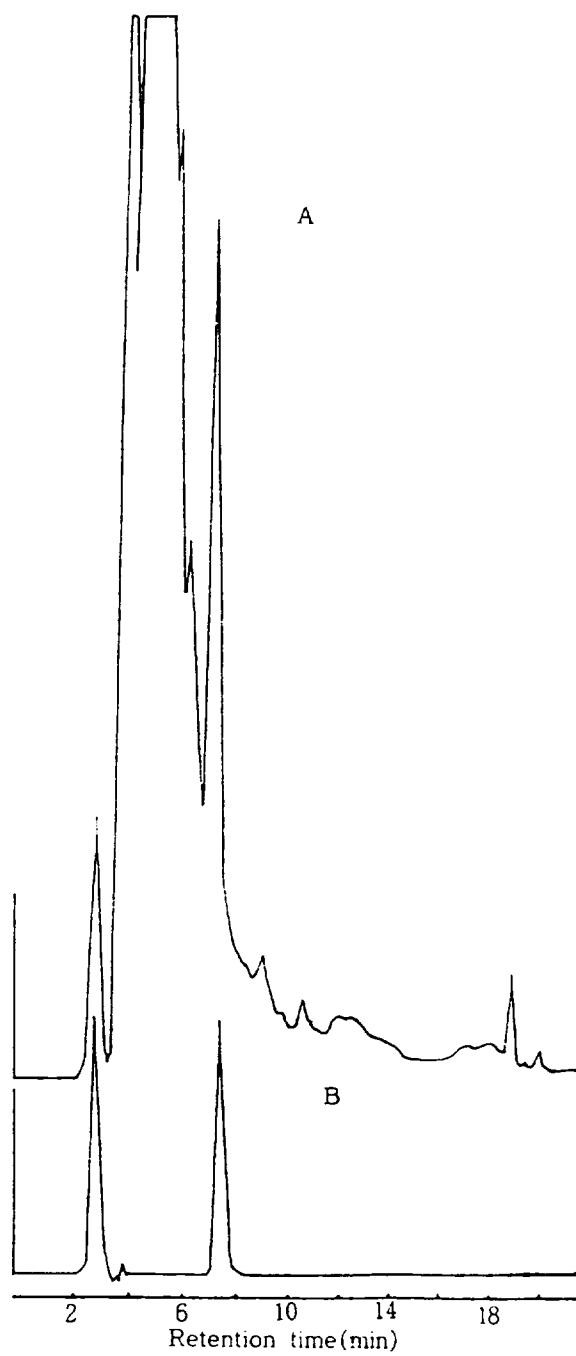


Fig. 2. Comparison of ABA isolated in *Citrus unshiu* leaves(A) with standard ABA(B) by HPLC.

The HPLC conditions were as described in figure 1.

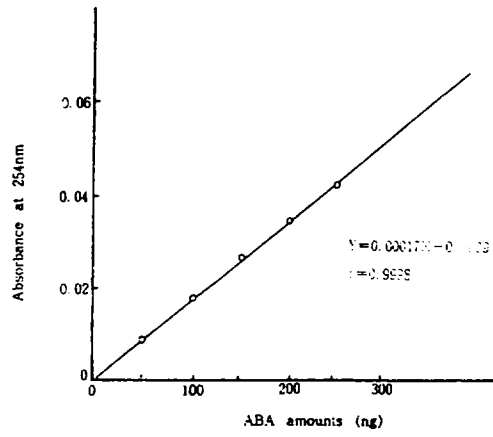


Fig. 3. Relationship between standard ABA amounts and absorbance for ABA quantitative analysis by HPLC.

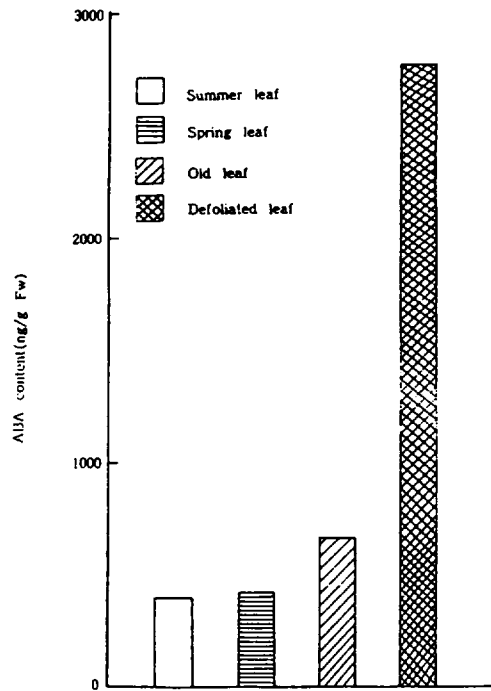


Fig. 4. ABA content in intact *Citrus unshiu* leaves of different ages. Data were ABA content in the leaves before drought.

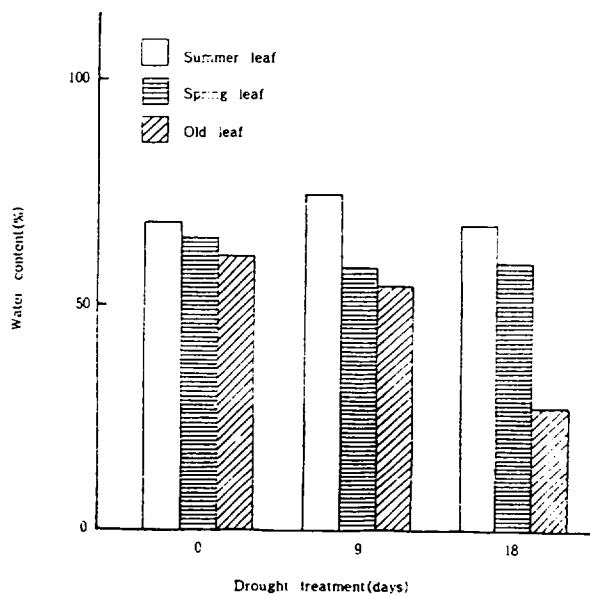


Fig. 5. Changes of water content throughout the water in intact *Citrus unshiu* leaves of different ages.

The old leaf of the 18th day was defoliated leaf by the drought.

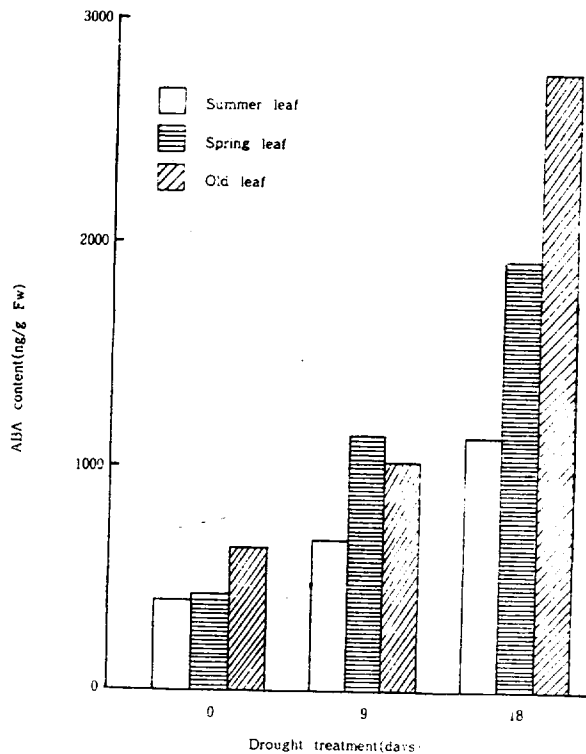


Fig. 6. Changes of ABA content due to drought in intact *Citrus unshiu* leaves of different ages.

The old leaf of the 18th day was defoliated leaf by the drought.

중요한 要因으로 作用한다고 할 수 있었으며 (Davenport *et al.*, 1977), 舊葉의 경우 乾燥處理時 ABA含量이 크게 增加하였음에도 불구하고 다른 葉보다 水分減少率이 크게 나타났다.

Table 1. ABA content was due to drought in intact *Citrus unshiu* leaves of different ages

The old leaf of the 18th day was defoliated leaf by the drought. Data were obtained in leaf base.

Leaf	Drought treatment (days)		
	0	9	18
	ng/L	ng/L	ng/L
Summer	58	98	167
Spring	152	411	687
Old	190	300	811

이상의 結果를 볼 때 ABA의 含量增加率은 春葉에서 가장 높게 나타났으며, 夏葉에서의 ABA 增加는 도꼬마리의 경우 幼葉에서의 ABA와 PA의 높은 含量이 成熟한 葉에서 合成된 ABA가 節管을 통해 幼葉으로 移動·蓄積된 것이라는 報告 (Zeevaart, 1977, 1980; Cornish and Zeevaart, 1984)와 비교해 볼 때 舊葉 및 春葉에서 合成된 ABA가 夏葉에 蓄積된 것이라고 추측된다.

氣孔開閉에 대한 ABA의 生理的인 役割로서, 葉肉細胞에서 合成된 少量의 ABA가 apoplast를 통해 孔邊細胞에 放出됨으로써 氣孔이 닫히게 되어 植物이 water stress에 抵抗하는데 (Beardsell and Cohen, 1975; Cornish and Zeevaart, 1986). water stress 週期동안 氣孔을 닫히도록 誘導하는 量 以上の ABA가 合成·蓄積되는 原因은 앞으로 더욱 研究해야 할 事項으로 여겨진다.

IV. 摘 要

温州蜜柑 (*Citrus unshiu* Marc.) 葉의 abscisic acid (ABA) 含量에 미치는 water stress의 影響에 대하여 調査하였다.

HPLC에 의한 ABA 分析에 있어서 cis-ABA는 7.8분에 나타났고 紫外線處理에 의한 不活性 形態인 trans-ABA는 7.2분에 나타났다. 葉齡에 따른 ABA含量은 落葉이 가장 높았고, 夏葉이 가장 낮았으며 葉齡이 增加할수록 ABA含量이 增加하였고, 水分減少에 대한 抵抗力은 幼葉일수록 높게 나타났다. 乾燥處理에 따른 葉內 ABA含量은 乾燥日數가 增加할수록 ABA含量도 增加하였고, ABA含成率은 舊葉보다 春葉이 높게 나타났다.

夏葉의 ABA는 舊葉 또는 春葉에서 合成된 後 夏葉으로 移動되어 蓄積된 것으로 推測된다.

References

- Addicott, F. T. 1983. Abscisic acid. Praeger Press, New York. pp.113-146.
- Ackerson, R. C. 1980. Stomatal response of cotton water stress and abscisic acid as affected by water stress history. *Plant Physiol.*, 65 : 455-459.
- Anderson, J. M. 1985. Simultaneous determination of abscisic acid and jasmonic acid in plant extracts using high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatogr.*, 330 : 347-355.

- Beardsell, M. F. and D. Cohen. 1975. Relationships between leaf water status, abscisic acid levels, and stomatal resistance in maize and sorghum. *Plant Physiol.*, 56: 207-212.
- Ciha, A. J., M. L. Brenner, and W. A. Brun. 1977. Rapid separation and quantification of abscisic acid from plant tissues using high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.*, 59: 821-826.
- Cornish, K. and J. A. D. Zeevaart. 1984. Abscisic acid metabolism in relation to water stress and leaf age in *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol.*, 76: 1029-1035.
- Cornish, K. and J. A. D. Zeevaart. 1985. Movement of abscisic acid into the apoplast in response to water stress in *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol.*, 78: 623-626.
- Cornish, K. and J. A. D. Zeevaart. 1986. Abscisic acid accumulation by in situ and isolated guard cells of *Pisum sativum* L. and *Vicia faba* L. in relation to water stress. *Plant Physiol.*, 81: 1017-1021.
- Creelman, R. A. 1989. Abscisic acid physiology and biosynthesis in higher plant. *Plant Physiol.*, 75: 131-136.
- Davenport, T. L., W. R. Jordan and P. W. Morgan. 1977. Movement and endogenous levels of abscisic acid during water stress-induced abscission in cotton seedlings. *Plant Physiol.*, 59: 1165-1168.
- Everat-Bourbouloux, A. 1987. Distribution of free and bound forms of cis-trans and trans-trans abscisic acid in broad-bean plants in relation to apical dormance. *Plant Physiol.*, 70: 648-652.
- Henson, I. E. 1981. a. Changes in abscisic acid content during stomatal closure in pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke). *Plant Sci. Lett.*, 21: 121-127.
- Henson, I. E. 1981. b. Genotypic variation in pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke.), in the ability to accumulate abscisic acid in response to water stress. *J. exp. Bot.*, 32(131): 899-910.
- Henson, I. E. 1981. c. Stomatal responses of pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke.), genotypes, in relation to abscisic acid and water stress. *J. exp. Bot.*, 32(131) 1211-1221.
- 許仁玉, 松本和夫, 近泉愔次郎, 門屋一臣, 水谷房雄, 日野昭. 1988. ウンシュウミカン樹の各種器官内 ABA含量に及ぼすストレス処理の影響. 園學要旨, pp.16-17.
- Jordan, W. R., K. W. Brown, and J. C. Thomas. 1975. Leaf age as a determinant in stomatal control of water loss from cotton during water stress. *Plant Physiol.*, 56: 595-599.
- Kim, J. S. and M. W. Sung. 1986. Effects of abscisic acid on some physiological response of the leaves in *Nicotiana tabacum* L. *Kor. J. Bot.*, 29(1): 41-51.
- Linskens, H. F. and J. F. Jackson. 1987. High performance liquid

- chromatography in plant sciences, Springer, Berlin Heidelberg New York. pp. 39-71.
- Majcherczyk, A., L. Rakoczy and A. Huttermann. 1986. Improvements in methods for determination of abscisic acid and indol-3-acetic acid by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatogr.*, 357: 399-408.
- Merck Index. 1983. The merck index. Merck & Co. Inc. p.5.
- Page-Degivry, M. T. L., A. Boillot, F. Loques and C. Bulard. 1987. An analysis of the role abscisic acid on the differential expansion and chlorophyll synthesis of the two cotyledons of dormant apple embryo in culture. *Plant Physiol.*, 68: 87-92.
- Raschke, K, and J. A. D. Zeevaart, 1976. Abscisic acid content, transpiration, and stomatal conductance as related to leaf age in plants of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol.*, 58: 169-174.
- Rivier, L, and A. Crozier. 1987. Principles and practice of plant hormone analysis. Academic press. pp.111-167.
- Sagee, O., R. Goren, and J. Riov. 1980. Abscission of *Citrus* leaf explants. *Plant Physiol.*, 66: 750-753.
- Samet, J. S. and T. R. sinclair. 1980. Leaf senescence and abscisic acid in leaves of fieldgrown soybean. *Plant Physiol.*, 59: 1164-1168.
- Zeevaart, J. A. D. 1977. Sites of abscisic acid synthesis and metabolism in *Ricinus communis* L. *Plant Physiol.*, 66: 788-791.
- Zeevaart, J. A. D. 1980. Changes in the levels of abscisic acid and metabolites in excised leaf blades of *Xanthium strumarium* during and after water stress. *Plant Physiol.*, 66: 672-678.