

# 植物호르몬 및 生長調節物質의 生物檢定技術

## II. Absciscic acid 및 Brassinolide

崔忠惇\*

# Bioassays of Plant Hormones and Plant Growth Regulating Substances

## II. Absciscic Acid and Brassinolide

Choong Don Choi\*

### ABSTRACT

A bioassay is a test system using a living organism (in whole or in part) to determine the presence or relative potency of chemical substances. The development and uses of bioassay are intimately linked to the discovery and characterization of the major classes of plant hormones. An application of this relationship is helpful for understanding the concept of plant hormones as well as the use of bioassay. And plant bioassay have been development and employed not only for the discovery and characterization of the biological activity of plant growth regulators but also have served several important secondary roles.

The ideal bioassay should possess the characteristic of high specificity, great sensitivity, short response time, low cost and ease of obtaining plant material, acceptable ease of manipulation, and minimal space and equipment requirements.

Key words : bioassay, ABA, brassinolide, plant hormone, plant growth regulator.

### 緒 論

生物檢定の始初는 1920年代 Went가 植物體에서 抽出한 物質의 存在를 確認하고 定量을 하기 위하여 귀리의 葉鞘를 利用한 것이라고 볼 수 있는데, 當時에는 生物檢定이라는 用語도 使用하지 않았으며 生理學者들에게 關心을 끌지도 못하였다.

植物호르몬은 植物體의 한 部位에서 合成이 되어 다른 部位로 移行이 되고 低濃度에서 植物의 生理的인 反應을 惹起시키는 有機化合物이어서 實際 農業에 利用하기에 앞서 天然化合物과 合成化合物을 包含한 未知의 新規物質은 植物體에 對한 生理活性作用을 檢定할 必要가 있다. 生物檢定の 目的은 化合物의 活性和 作用性을 究明하여 合成을 위한 情報를

提供하고, 開發 可能性이 있는 化合物을 選拔하고, 適用對象을 設定하기 위하여 適用條件을 推定하기 위한이다. 新規化合物이 合成이 되어서 生産에 이르기 까지는 室内檢定·圃場檢定·劑型研究·安全性 檢定·登錄·生産體系의 完備 等 複雜한 過程을 거 쳐야 하는데, 生物檢定은 主로 첫 段階인 室内檢定 을 圓滑하게 하기 위하여 實施한다. 즉 最小의 努力과 最低費用 最短時間內의 檢定에 目標을 두고서 開發 目標로 하는 化合物의 最小 必要條件을 滿足시키는 化合物만을 效率의으로 選拔하면서 效果를 過小 評價하지 않고 化合物에 對한 最大量의 情報를 얻을 수 있어야 하며, 材料植物을 쉽게 구할 수 있고 處理方法이 簡便해야 하며 最小의 空間과 施備로서 遂行할 수 있어야 한다.

生物檢定の 發展과 利用은 植物호르몬의 發見 및

\* 嶺南作物試驗場 Yeongnam Crop Experiment Station, Milyang 628-800, Korea.

生物學的인 活性的 特性과 密接한 關係가 있으며, 여러가지 重要한 2次的인 作用機作 究明에 寄與하고 있어서 生物檢定의 原理를 熟知하는 것이 植物호르몬의 概念 및 作用性을 理解하기에 앞서 先行되어야 할 것이다.

近來에는 GCMS HPLC 그리고 精密하고 精選된 免疫學의 方法이 開發되면서 生物檢法에 對한 批判도 擡頭되는데, 이러한 物理化學的인 方法이 費用은 많이 들지만 分析時間을 짧게 하고 精密度가 높으며 變異가 적고, 純粹하게 精製되지 않은 抽出物에서 不純物의 存在는 物理化學的인 技術에 의한 것보다 生物檢定에 의한 植物호르몬 檢出에 더 큰 影響을 미친다. 그러나 物理化學的인 方法으로 構造가 決定되고 關連化合物들을 類推할 수는 있지만 未知의 物質에 있어서 植物體에 對한 1次的인 作用을 밝히는 데는 生體組織을 利用한 生物檢定이 꼭 必要

하다.

## 分析技術의 解說 및 實際

### 1. Abscisic acid (ABA)

ABA의 生物檢定은 ABA가 一般的으로 GA나 auxin에 對하여 阻害作用을 하기 때문에 이러한 특성을 利用하여 活性을 檢定하는데 크게 두가지로 區分할 수 있다. 즉 ABA의 生理障害作用(種子の 發芽抑制·伸長抑制)과 줄기에서 葉柄이 떨어지는 現象(離層促進作用) 및 老化促進에 着案하여 檢定을 한다. 또한 눈(芽)의 休眠을 誘導하는 特性을 利用한 檢定法도 많이 利用되고 있다. ABA의 生物檢定法은 表 1에서와 같이 高度로 熟練된 技術과 特殊한 分析施備을 要하는 難易한 檢定法이 있는 反面 最小限의 實驗室 施備만 갖추어서 初步者도 쉽게 行

Table 1. Bioassays for abscisic acid and related inhibitors.

Name of bioassay	Type of response	Conc. range of assay ( $\mu\text{g/ml}$ )	Time required	
			preparation	assay
duckweed growth inhibition	growth inhibition of fronds	$0.3 \times 10^{-5}$ -0.3	0	7days
rice seedling growth inhibition	inhibition of elongation	0.03- 2.64	2days	7days
duckweed dormant bud induction	induction of resting bud	0.0015 -1.48	0	5days
potato dormant bud break inhibition	inhibition of quiescence	5.0- 25.0	0	14days
ash embryo dormancy induction	dormancy induction	2.64	1days	10days
bean embryonic axis growth inhibition	inhibition of growth	1.32- 10.57	0	7days
lettuce seed germination inhibition	inhibition of germination	0.01- 2.64	0	1-2days
cotton petiole abscission	stimulation of abscission	0.02- 20.0	14days	1days
oat coleoptile segment growth inhibition	inhibition of elongation	0.03- 2.64	4days	1days
oat mesocotyl segment growth inhibition	inhibition of elongation	0.002 -20.0	2-3days	1days
radish leaf senescence promotion	inhibition of elongation	0.025 -2.5	18days	2-4days
dayflower stomatal closure	decrease in transpiration	0.003- 26.4		3hrs
barley transpiration inhibition	transpiration reduction	0.03		5min.
mung bean root tip phytochrome mediated adhesion interaction	increased root attachment to glass	0.00005- 0.00015	3days	12min.

할 수 있는 簡便한 檢定法도 있다. 여러가지 方法中에서 어떤 檢定法을 擇하느냐는 各者의 慣習과 技術水準 및 實驗室의 保有 機資材 그리고 ABA의 어떤 特性을 主目的으로 檢定하느냐에 따라 다르다. 예를들면 귀리 鞘葉伸長抑制 檢定法은 普遍的으로 利用하는 檢定法이지만 特殊한 ABA活性을 檢定하는 데는 좀개구리밥 休眠芽 誘導 檢定과 같은 定性的인 檢定法을 擇하는 것이 바람직하다. 좀 더 完壁한 特性을 檢定하려면 목화 葉柄脫離 檢定 · 상치種子 發芽抑制 檢定 · 강남콩 胚軸伸長抑制 檢定 · 벼 幼苗伸長抑制 檢定 등을 利用하기도 하고, 氣空閉閉 檢定法은 ABA類의 獨特한 反應을 檢定하는데 最適의 方法이지만 操作이 難易하고 熟練된 技術이 必要하기 때문에 初學者들에게는 어려움이 있다.

本稿에서는 實驗室의 基本的인 施備로서 遂行할 수 있고 또한 누구나 쉽게 適用할 수 있는 몇가지 生物檢定法을 比較해서 紹介하고자 한다.

#### (1) 벼 幼苗伸長抑制 檢定法 (rice seedling growth inhibition test)

이 檢定法은, ABA類가 細胞伸長에 있어서 강한 抑制作用을 보인다고 알려져 있는데, 벼 幼苗 第2 葉鞘의 細胞는 伸長力이 強하며 低濃度의 細胞伸長 抑制物質에 對해서도 敏感하게 反應을 하기 때문에 이런 特殊한 原理를 利用한 簡便한 方法으로 GA의 效力檢定에는 逆利用하고 있다.

##### 1) 準備物 및 施備

矮性 벼 種子(Tanjinbozu, Waito-C), 脫脂綿 또는 濾過紙, 샤레(높이 5 cm), 人工氣象調節裝置나 光照射가 可能한 發芽器

##### 2) 遂行方法

샤레에 種子를 50粒씩 置床하여(催芽시킨 種子를 利用하기도 한다) 檢定溶液을 濃度別로 處理한다(對照區는 蒸溜水). 溶液의 蒸發을 防止하기 위하여 두껍을 덮어서 冷白色 螢光燈(2,000 lux) 下에 30℃로 維持하면서 7日間 連續光을 照射시킨 後 第2 葉鞘의 長이를 測定하여 活性을 檢定하는데 濃度가 높을수록 葉鞘長이 短縮된다. 이 檢定法으로 5 ppm 以下의 低濃度까지 檢定이 可能하며, 構造上으로 trans-ABA가 cis-ABA에 比하여 活性이 多少 強하게 나타난다(그림 1).

#### (2) 상치種子 發芽抑制 檢定法 (lettuce seed germination inhibition test)

이 檢定法은 acetone이나 hexane 같은 有機溶媒에 種子를 前處理하여 播種하면 下胚軸과 幼根의

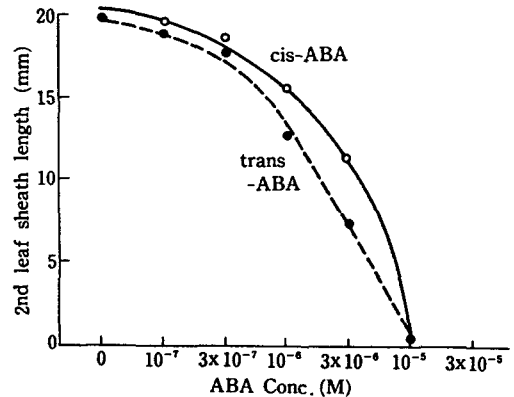


Fig. 1. Response of rice seedling growth induced by ABA

伸長을 阻害하여 種子發芽를 抑制하는 原理를 利用한 것으로 材料植物을 쉽게 구할 수 있고 方法이 簡便하기 때문에 初學者들이 利用하기에 適合한 檢定法이라 할 수 있다.

##### 1) 準備物 및 施備

상치種子, 샤레, 濾過紙, 人工氣象調節裝置

##### 2) 遂行方法

샤레에 濾過紙를 깔고 크기가 均一한 種子를 40~50粒씩 置床한 다음 檢定液을 濃度別로 種子가 充分히 吸收할 程度로 處理하고 對照區(無處理)는 蒸溜水를 使用하는데, ABA類는 不溶性이어서 acetone이나 methanol에 溶解시켜서 溶媒를 飛散시킨 後 檢定에 使用한다. 處理한 샤레를 白色 螢光燈下에서 25℃로 維持시킨다. 處理後 3日間은 每 6時間마다 發芽率을 調査하고 4日부터는 24時間마다 測定하는데, 檢定期間은 5~7日이 所要되지만 一般的으로 處理後 24~48時間에 發芽率을 調査한다. 種皮에서 눈(芽)이 1mm 程度 突出되면 發芽로 看做하는데 區別하기 어려울 때는 렌즈나 顯微鏡으로 觀察한다.

評價方法은 處理別(濃度別) 經時的인 發芽率을 調査하여 評價하기도 하고, 處理別 50%가 發芽하는데 所要되는 期間(時間)으로 評價하기도 하는데 通常 前者를 많이 利用한다. 이 方法으로 뿌리와 下胚軸의 伸長을 測定하여 活性을 檢定할 수도 있지만 發芽率 檢定에 比하여 濃度間 差가 뚜렷하지 않다(그림 2).

#### (3) 밀 子葉鞘伸長抑制 檢定法 (wheat coleoptile growth inhibition test)

이 檢定法은 밀의 子葉鞘가 暗條件에서 伸長力이

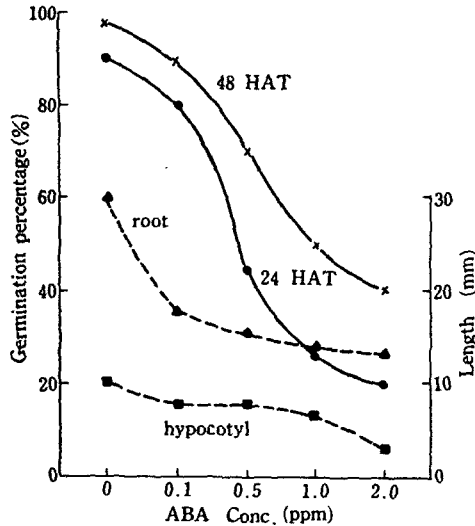


Fig. 2. Influence of germination, root growth and hypocotyl elongation induced by ABA for lettuce seed.

매우 강하여 auxin類에는 細胞의 伸長이 促進되지만 ABA類에 對해서는 強한 抑制作用을 나타내는 原理를 利用한 것인데, 天然 auxin과 合成 auxin 間의 活性을 比較하는데도 많이 利用하고 있다.

#### 1) 準備物 및 施備

밀 種子, 버미큐라이트 또는 가는모래(海砂), 恒溫器, sucrose, 磷酸緩衝溶液(pH 5.0), 綠色電球, 三角 flask, 진탕항온수조, 렌즈 또는 顯微鏡

#### 2) 遂行方法

크기가 均一한 밀 種子(種皮를 除去한 種子)를 選別하여 蒸溜水에 浸種시켜 水分을 吸收시킨 다음 버미큐라이트에 胚가 위로 向하도록 1cm 길이로 播種을 한다. 25°C 恒溫器에서 暗條件으로 60時間 經過시킨 後 子葉鞘가 3cm 内外의 生育이 均一한 個體를 골라서 供試材料로 한다. 子葉鞘의 先端部는 auxin의 含量이 높기 때문에 2~3mm 除去하고 子葉鞘 上部의 切片을 만든다(이 操作은 綠色光이나 赤色光下에서 遂行한다). 1% sucrose를 含有하는 磷酸緩衝溶液에 檢定物質을 溶解시켜 三角 flask에 適當量을 取해 10mm로 切斷한 子葉鞘 切片을 10個씩 넣어 진탕항온기에서 25°C 暗狀態로 24時間 經過시킨 後 顯微鏡下에서 子葉鞘의 伸長程度를 測定하여 活性을 檢定한다. 對照區에서 約 20mm 伸長하는데, 伸長沮害活性은 對照區에 대한 %로 나타낸다. 0.01~1μg/ml 範圍의 濃度에서 檢定이 可能하고, 伸長抑制 程度는 濃度가 높아짐에

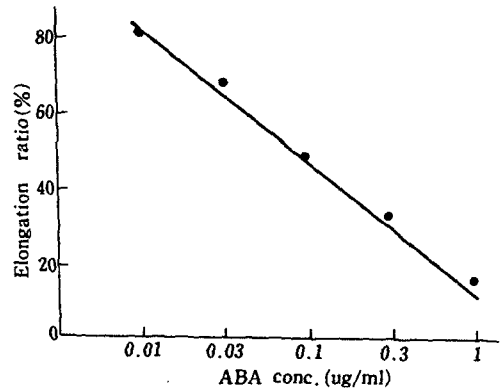


Fig. 3. Effect of ABA on the *Triticum* coleoptile elongation.

따라 거의 直線의으로 增加한다(그림 3).

#### (4) 목화 葉柄脫離 檢定法(cotton petiole abscission test)

Addicott 등이 목화 幼苗를 利用하여 脫離誘導物質을 探索하던 中 創案한 檢定法으로, 下胚軸에서 葉柄이 分化되는 部位는 脫離層이 發達되어 있기 때문에 ABA類를 處理하면 脫離層으로 移行하여 葉柄의 脫離가 促進되는 原理를 利用하고 있다. 檢定에 있어서 材料植物을 구하기가 쉽고 特殊한 分析 機資材를 要하는 것은 아니지만 檢定에 必要한 期間이 다른 檢定法에 比하여 길고, 또한 活性을 評價하는데 있어 難易한 點도 있으며, 主觀的인 判斷이 크게 加味되기 때문에 初學者들에게는 細心한 注意가 必要하며 檢定個體 및 反復數를 늘려야 한다.

#### 1) 準備物 및 施備

목화種子, 샤레, 핀셋, 人工氣象調節裝置, 버미큐라이트, 寒天, 분주기

#### 2) 遂行方法

목화種子를 버미큐라이트에 播種하여 水分含量을 80% 程度로 維持시키면서 30°C 20,000 lux 連續光下에 2週間 生育시킨다. 生育이 均一한 個體를 選別하여 葉柄과 頂芽部를 0.3~0.5mm 길이로 子葉을 除去하고 下胚軸은 上部 10mm 길이로 下部를 切斷하여 explant를 만든다. 1~2%의 寒天을 高壓殺菌器에서 殺菌後 凝固시켜서 핀셋으로 explant의 下胚軸을 寒天에 5mm 길이로 移植한다. 檢定液을 1% 寒天에 加해서 濃度를 調節하여 분주기로 explant의 切斷部位에 5ml씩 處理한다(脫脂綿에 溶液을 吸收시켜 切斷部位에 附着시켜서 explant의 切斷面을 通하여 吸收되게 할 수 있지만 幼植物이기 때문에 操作이 까다롭다). 處理한

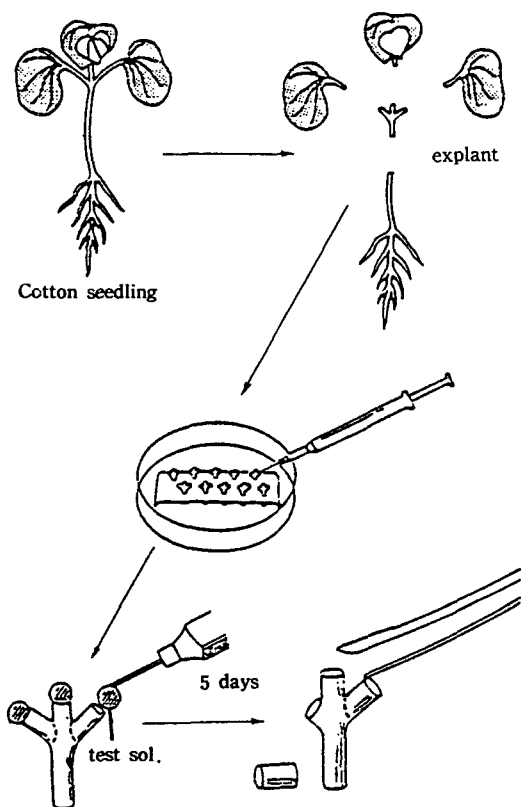


Fig. 4. The cotton petiole abscission bioassay

explant 를 30°C 暗狀態로 5日間 經過시키면서 一定時間마다(每 12時間 또는 24時間) 핀셋 先端部나 용수침 저울의 錘를 利用하여 一定量의 무게를 切斷部位에 加하면 葉柄基部가 下胚軸에서 脫離된다(그림 4). 濃度가 높을수록 빨리 脫離되는데 活性度는 脫離始作時間·脫離速度·全體 脫離數의 세 가지 特性으로 脫離指數를 無處理와 對比하여 評價하는데, 一般적으로 無處理의 脫離指數는 45程度이고  $10^{-4}M$  以下の 濃度에서는 無處理와 差異가 없는 것으로 보아 이 檢定法으로는  $10^{-4}M$  以上の 濃度에서 活性檢定이 可能한 것으로 생각된다(그림 5).

## 2. Brassinolide (BR)

Brassinolide 는 steroid系의 新規 化合物로서 國內에서는 거의 紹介가 되지 않아 生物檢定法에 앞서 概略적으로 言及하고자 한다. 1970年 Mitchell 等に 의해서 처음으로 活性이 認定되었으나 抽出 精製의 어려움과 適切한 生物檢定法의 未確立으로 研究가 進展되지 않았다. 1979年 Grove 等이 X-線 結晶分析에 의해 構造를 밝혀 命名하였으며 1980

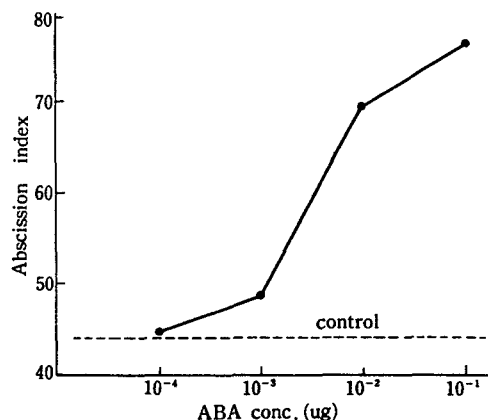


Fig. 5. Effect of ABA for the petiole abscission.

年代부터 活潑하게 研究가 進行되고 있다.

다른 植物호르몬에 比하여 構造적으로 複雜하며, B ring 이 lactone 型과 ketone 型·C-2 水酸基와 C-28 methyl 基의 有無·炭素數(27, 28, 29)에 따라 構造의인 分類를 한다. 지금까지 檢出된 天然 brassinolide 는 16種의 植物에서 20餘種이지만 每年 새로운 關連化合物이 分離되고 있어 植物界에는 지금보다 훨씬 많은 brassinolide 類가 存在할 것으로 生理學者들은 豫見하고 있으며(그림 6), 植物體에서의 分布는, 初期에는 花粉에서만 檢出되었지만 分析技術의 發展에 의해 잎·줄기·未熟種子에서도 檢出되고 있다(表 2).

植物體內에서의 生長調節機能은 auxin 과 類似한 點이 많고 여러가지 生物檢定에서도 auxin 과는 synergistic effect 를 나타내지만 GA와 같이 細胞伸長을 促進시키기도 한다. 또한 ethylene 의 前驅物質인 ACC의 含量을 增加시켜 上偏生長(epinasty)을 誘導하는 경우도 있으며, 既存 5種의 植物호르몬에 比하여 極히 微量으로 活性을 나타내는 것이 가장 큰 特徵이며, 아직까지 實際 農業에 利用되지 않는다고 있지만 不良環境에서의 生育增進 및 收量增대 效果가 있는 것으로 밝혀져 앞으로 여러가지 農業災害 輕減의 側面에서 利用할 수 있는 可能性이 窺보인다.

生理活性檢定은 上偏生長을 誘導하는 作用을 利用한 葉身基部 屈折反應 檢定法이 가장 널리 利用되고 있으며, 細胞分裂과 細胞伸長이 同時に 이루어지는 特性을 利用한 雙子葉植物의 胚軸伸長 檢定法도 많이 利用된다. Beta-cyanin 生成 및 ACC 含量變化에 의한 活性檢定도 있지만 分析技術이 까다롭고 化學的인 理解를 要하기 때문에 特殊한 目的 外

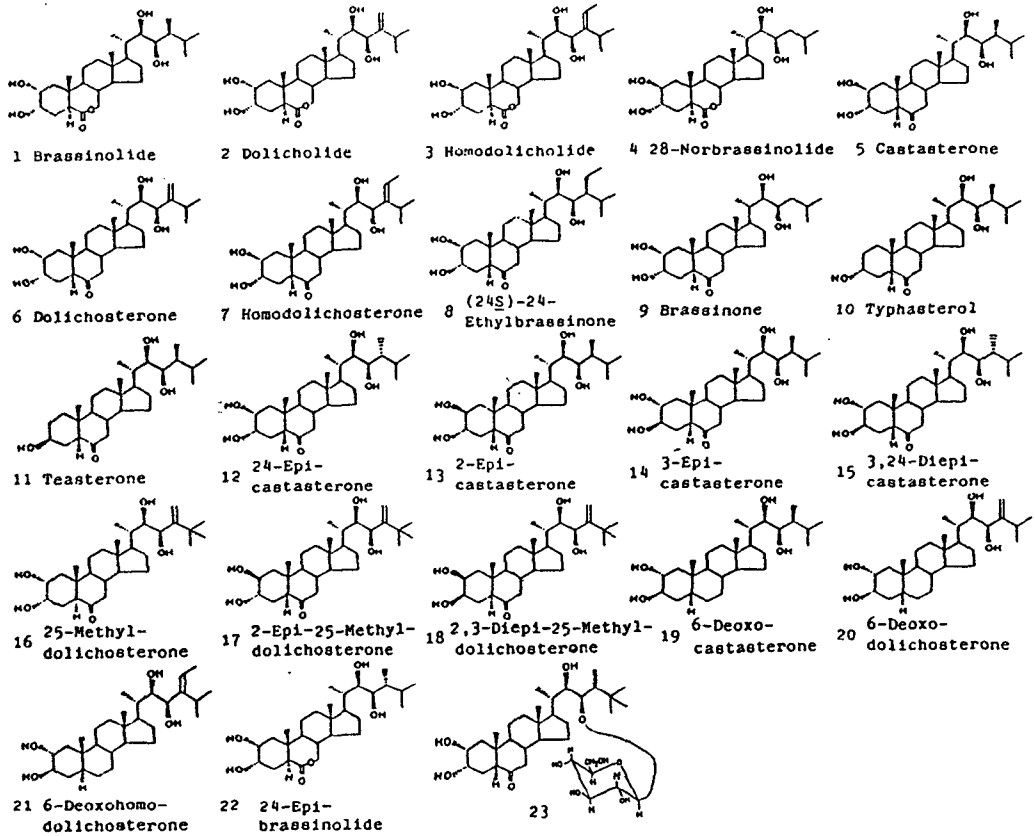


Fig. 6. Structures of Natural Brassinosteroids.<sup>6)</sup>

Table 2. Distribution and content of brassinolides in the vegetable kingdom.

Species (portion)	<i>Bra. n</i> <sup>1)</sup> pollen	<i>Bra. c</i> <sup>2)</sup> fruit	<i>Cas. c</i> <sup>3)</sup> leaf	<i>The. s</i> <sup>4)</sup> leaf	<i>Dis. r</i> <sup>5)</sup> leaf	<i>Dot. l</i> <sup>6)</sup> seed	<i>Pha. p</i> <sup>7)</sup> seed	<i>Typ. l</i> <sup>8)</sup> pollen	<i>Ory. s</i> <sup>9)</sup> stem
C <sub>27</sub> Steroid									
Norbrassinolide		2 <sup>10)</sup>			4				
Brassinone		1		2	3		4		
C <sub>28</sub> Steroid									
Brassinolide	7	2		2	3	5			
Dolicholide						7			
Castasterone		2	5	4	4	5	5		3
Dolichosterone						6			2
6-Deoxocastasterone			6			5			
6-Deoxodolichosterone						5			
Typhasterol				3					
Teasterol				3					
C <sub>29</sub> Steroid									
Homodolicholide						5			
Homodolichosterone						5			
Ethylbrassinone		1		1					

1) *Brassica napus* L. 2) *Brassica campestris* L. var *pekinensis* 3) *Castanea crenata* Sieb. et Zucc 4) *Thea sinensis* L. 5) *Distilium racemosum* Sieb. et Zucc 6) *Dolichos lablab* L. 7) *Pharbitis purpurea* Voigt 8) *Typha latifolia* L. 9) *Oryza sativa* L. 10) 1: 1ng/kg 2: 1-10ng/kg 3: 10<sup>-2</sup>-10<sup>2</sup>ng/kg 4: 10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup>ng/kg 5: 10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup>ng/kg 6: 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup>ng/kg 7: 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>ng/kg

에는 많이 사용하지 않는다. 한편 brassinolide의 동시에 供試하면 形態의인 反應의 差異點을 쉽게 確 活性檢定에는 可能한 限 既知의 auxin 이나 GA를 認할 수 있으며 既存 호르몬에 比하여 低濃度에서

**Table 3.** Bioassay methods of brassinolides.

method name	source of tissue	light condition
rice lamina inclination bioassay	lamina joint	dark
azukibean epicotyl elongation bioassay	epicotyl section	dark
maize etiolated mesocotyl section elongation bioassay	root section	dark
mung bean hypocotyl root formation bioassay	hypocotyl section	light
crass seedling root elongation bioassay	intact plant	dark
bean etiolated hypocotyl hook opening bioassay	root section	dark
pea hook expansion bioassay	hypocotyl section	dark
bean etiolated hypocotyl elongation bioassay	hypocotyl section	dark
cucumber hypocotyl elongation bioassay	hypocotyl section	dark
jerusalem artichoke tuber slice weight change bioassay	tuber slice	
pea apical section elongation bioassay	epicotyl section	dark
pigweed beta-cyanin formation bioassay	intact plant	light
bean second internode elongation bioassay	intact plant	light
cucumber cotyledon expansion bioassay	cotyledon	dark

도 강한 활성이 있다는 것을 알 수 있다. 表 3에 서와 같이 大部分의 檢定法이 材料植物을 쉽게 구할 수 있고 特別한 機資材가 없어도 可能하기 때문에 다른 호르몬의 檢定에 比하여 初歩者도 쉽게 행할 수 있는 長點이 있다.

(1) 벼 第2葉身基部 屈折反應 檢定法(rice lamina inclination test)

初期에는 auxin類와 GA類의 生物檢定에 利用되어 왔으나 brassinolide類에 敏感한 反應을 보여서, 普遍的이고 가장 代表的인 檢定法으로 대두되고 있다. 材料를 쉽게 구할 수 있고 檢定方法이 簡便해서 初歩者가 活用하기에 適合하다.

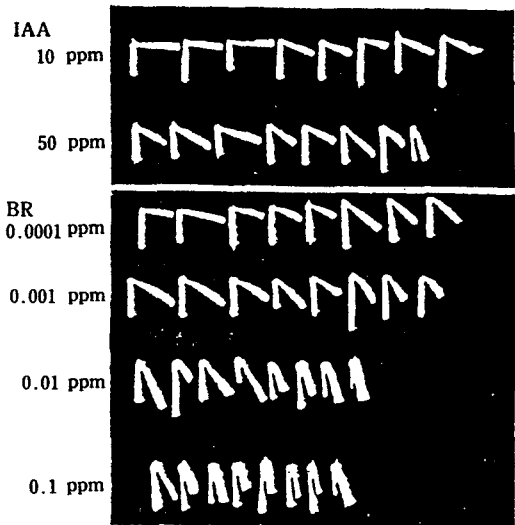
1) 準備物 및 施備

벼種子, 恒溫器, 寒天, 紗레, 플라스틱 用器

2) 遂行方法

벼種子를 2日間 浸種시켜 催芽시킨다. 0.8~1% 寒天培地를 殺菌한 플라스틱 用器에 2~3cm 넣어서 充分히 식힌 後 催芽種子를 表面에 播種해서 25℃ 恒溫器에서 暗條件으로 5~7日 經過시킨다. 3葉이 出現하면 反應度가 떨어지기 때문에 出現前에 第2葉身の 基部에서 上下 1cm씩 切斷해서 葉身基部를 包含하는 切片을 만들어 증류수에 浸漬하여 24時間 暗狀態로 두면 葉身基部를 中心으로 屈角이 形成된다. 屈折角이 均一한 個體를 選別하여 檢定液을 넣은 紗레에 浸漬시켜 48時間 暗狀態로 培養하면 濃度에 따라 葉身基部의 屈折角度가 다르게 나타난다. 活性이 強할수록 屈折角이 커지며, IAA와 比較하여 보면 brassinolide가 50,000배 以上の 活性이 있다는 것을 알 수 있다(그림 7).

(2) 무우 下胚軸伸長 檢定法(ridish hypocotyl



**Fig. 7.** Biological activities of IAA and brassinolide on rice lamina inclination test.

elongation test)

Brassinolide가 幼植物의 細胞分裂과 細胞伸長을 促進한다는 事實에 着案하여 筆者가 日本 宇都宮大學의 Dr. Takematsu Dr. Takeuchi와 함께 創案한 檢定法인데, 切片과 無傷植物(intact plant)의 下胚軸 部位別 伸長反應 및 光條件에 따른 反應을 同時에 檢定할 수 있는 利點이 있다. 生物檢定の 基本要件인 材料植物을 쉽게 구할 수 있고 操作이 簡便하며, auxin이나 GA의 伸長反應과는 쉽게 區別할 수 있어 누구나 活用할 수 있으리라 여겨진다.

1) 準備物 및 施備

무우種子, 紗레, 관병 또는 試驗管(直徑 1 cm,

높이 3~5 cm), 人工氣象調節裝置

2) 遂行方法

깨끗하게 씻은 모래(海砂)에 무우種子를 1 cm 길이로 播種하여 25°C 溫室에서 自然光으로 5~7 日間 生育시켜 下胚軸이 2~3 cm의 均一한 個體를 選別한다(下胚軸이 3 cm 以上 伸長하면 反應이 크지 않아서 活性을 評價하는데 어려움이 있다). 供試材料를 切片과 無傷植物의 두가지 形態로 準備하는데, 切片은 子葉과 生長點이 附着된 下胚軸切片 그리고 子葉은 除去하고 生長點만 附着된 下胚軸切片을, 無傷植物은 下胚軸 全體를 利用하는데, 材料를 여러가지 形態로 操作하는 것은 子葉과 生長點 그리고 뿌리의 有無에 따른 反應의 差異를 檢定하기 위한 것이다.

切片은 檢定液을 넣은 沙畵에 浸漬시키고 無傷植物은 靚병에 溶液을 넣어 뿌리가 浸漬되게 한다. 人工氣象調節裝置를 利用하여 明條件(2,500 lux) 및 暗條件에서 24 時間 培養 後 各 部位別 下胚軸 伸長反應을 檢定한다. GA와 IAA를 같이 供試하여 檢定해 보면 brassinolide 類의 伸長反應이 이 들 호르몬과는 反應이 다르다는 것을 알 수 있고, 對照區에 대한 伸長率이 暗條件에서는 낮은 傾向이지만, GA나 IAA에 比해서는 높으며, 各 部位別 伸長率이 50~70%인 것으로 보아 brassinolide 는 子葉生長點 뿌리 切斷面 等 植物體의 全 部位로 吸收된다는 것을 알 수 있다(表 4).

(3) 녹두 下胚軸伸長 및 뿌리形成檢定法(mung bean hypocotyl-root formation test)

이 檢定法도 前者와 비슷한 原理로 brassinolide 가 細胞의 伸長과 分裂을 同時에 促進시키며 切斷面에서 發根을 促進시키는 作用을 利用한 것으로 比較

Table 4. Effect of HBR, GA<sub>3</sub> and IAA on the hypocotyl elongation of radish

Hypocotyl section	HBR 3 ppm	GA <sub>3</sub> 30 ppm	IAA 30 ppm
A <sup>1)</sup>	172 <sup>4)</sup> (123) <sup>5)</sup>	105 (105)	116 (101)
B <sup>2)</sup>	150 (121)	106 (106)	122 (105)
C <sup>3)</sup>	170 (116)	101 (106)	132 (80)

- 1) A : section with cotyledon and growing point
- 2) B : section with growth point
- 3) C : upper hypocotyl of intact plant
- 4) based on the untreated control (light)
- 5) dark condition.

的 簡單하다.

1) 準備物 및 施備

녹두種子, 버미큐라이트, 사레, 人工氣象調節裝置

2) 遂行方法

種子를 버미큐라이트에 播種하여 25°C 人工氣象調節裝置에서 光을 照射시킨다. 10 日間 經過시키면 下胚軸이 7~8 cm 伸長되는데 生育이 均一한 個體를 골라서 子葉基部로부터 2~5 cm 길이로 切斷하여 子葉과 生長點이 附着된 下胚軸 切片을 만든다. 이 切片을 檢定液을 濃度別로 넣은 沙畵에 浸漬시켜 25°C에서 7 日間 連續光을 照射하면서 培養시킨 後 下胚軸의 伸長反應과 切斷面에서 뿌리 發根數를 調査하여 活性을 評價하는데 10<sup>-10</sup>M의 低濃度에서도 反應을 나타낸다.

(4) 강남콩 第 2 節間伸長 檢定法(bean second internode elongation test)

이 檢定法은 Mitchell 等이 植物系에 brassinolide 라는 새로운 活性物質이 存在하고 GA보다 細胞伸長性이 훨씬 強하다는 것을 처음으로 證明한 方法으로 有名하며, 그 後 여러 生理學者들에 의해 檢定方法이 部分的으로 改善되어 오늘에 이르고 있다. 材料植物을 쉽게 구할 수 있고 敏感한 反應을 보이기 때문에 많이 利用된다.

1) 準備物 및 施備

강남콩種子, 모래(海砂)나 버미큐라이트, 人工氣象調節裝置, spray

2) 遂行方法

種實의 크기가 均一한 種子를 播種하여 25°C 人工氣象調節裝置에서 6~7 日間 連續光을 照射하면

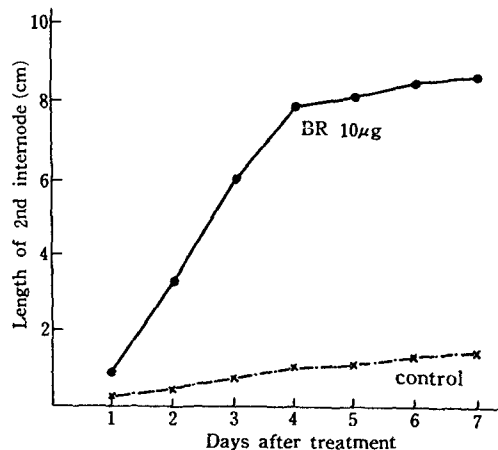


Fig. 8. Elongation of the second internode of bean plant after application brassinolide.



1葉이 完全히 展開된다. 檢定液을 濃度別로 調節하여 spray로 頂芽部에 處理하여 25°C로 4日間 明條件으로 經過시켜서 第2節間の 伸長率을 測定하여 活性을 評價한다. 그림 8에서와 같이 處理後 4日까지는 伸長率이 增加하다가 5日째부터는 伸長이 鈍化되기 때문에 一般的으로 處理後 4日에 測定하여 評價한다.

## 結 言

以上에서와 같이 植物호르몬의 生理活性檢定은 特정한 植物에 對하여 特異한 反應을 나타내는 化合物 固有의 特性을 利用하여, 天然物에서 分離한 物質이나 新規 合成된 化合物이 어느 程度의 活性이 있으며 또한 效力을 既存 物質과 比較하여 開發可能性 與否를 檢定하는 것이다.

新規物質이 어느 系列인지를 전혀 가름할 수 없는 경우에는 지금까지 利用하고 있는 檢定法을 應用하여 새로운 檢定法을 考察해야 하며, 경우에 따라서는 定性的인 分析 外에 定量分析까지도 並行해야 하는 어려움이 있다. 植物호르몬은 特有의 反應最適濃度가 있으며 未知의 物質을 檢定할 때는 既知의 物質을 供試할 必要가 있는데, 濃도에 따라 反應이 發現되지 않는 경우도 있기 때문에 既知物質의 最適濃도와 關連지워서 濃度を 設定하면 活性評價에 도움이 된다. 또한 植物호르몬은 微量으로 植物體内の 生理反應을 나타내기 때문에 檢定을 遂行하는데 있어서 微量의 藥劑를 取扱하는 方法이나 均一한 植物體를 育成하는 技術 및 生育狀態에 따라 檢定時期의 選定 등은 附隨的인 것이지만 熟達되어야 하고, 檢定條件을 同一하게 하기 위한 細心한 注意와 植物體에 나타나는 微細한 現象까지도 注視하는 觀察力을 가지는 것도 生物檢定에서는 必히 要求된다.

## 引 用 文 獻

1. 倉石 晋, 1981, 農藥實驗法(除草劑編), 소프트サイエンス社.
2. 細辻豐二, 1985, 農藥生物檢定法, 全國農村教育協會.
3. 池川信夫·丸茂晋吾, 1984, 生理活性物質의 바이오아쯔세이, 講談社.
4. 森下忠志·安部活·內山正昭·高律戶秀·池川信

- 夫·谷澤尙人·丸茂晋吾, 1982, 라미나조인토테스트における brassinosteroid lactone 及びその 6-Ketone 體의 構造와 活性との 關係, 日植調昭和 57年度發表集.
5. 増田芳雄·膝見允行, 1971, 植物ホルモン, 朝倉書店.
6. 竹松哲夫·竹內安智·古口正己, 1985, 新しい植物生長調節物質 브라시노라이드類의 生理作用と 農業および 生物生産 への 利用, 植調 18(12): 1-15.
7. 藤田文雄, 1985, 브라시노라이드의 農藥利用 への 期待, 化學と生物, 23(11): 717-725.
8. Cerana, R., A. Bonetti, M.T. Marre, P. Lado and E. Marre, 1983, Effect of brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in Azuki bean epicotyls, *Physiol. Plant.*, 59: 23-27.
9. Galston, A.W. and H. Warburg, 1959, An analysis of auxin-GA interaction in pea stem tissue, *Plant Physiol.*, 34: 16-22.
10. Henry, E.W., L.J. Dungey and D.M. Bracciano, 1985, The effect of brassinolide on growth of little marrel and alaska pea, *Plant Physiol.*, 77(suppl. 4): 42.
11. Mitchell, J.W., N.B. Mandava, J.F. Worley and J.R. Plimmer, 1970, Brassins—a new family of plant hormones from rape pollen, *Nature*, 225: 1065-1066.
12. Mitchell, J.W. and L.E. Gregory, 1972, Enhancement of overall plant growth, a new response to brassins, *Nature new biology*, 239: 253-254.
13. Mitchell, J.W. and A.L. George, 1986, Methods of studying plant hormones and growth-regulating substances.
14. Okada, K. and K. Mori, 1983, Synthesis of brassinolide analogus and their plant growth promoting activity, *Agri. Biol. Chem.*, 47(1): 89-95.
15. Tanimoto, E. and Y. Masuda, 1971, Role of the epidermis in auxin-induced elongation of light-grown pea stem segments, *Plant Cell Physiol.*, 12: 663-673.

16. Takematsu, T., Y. Takeuchi and M. Koguchi, 1983, Bioassay methods and physiology of brassinolides, *Chem. Regu. Plant*, 18(1) : 38-54.
17. Worley, J.F. and J.W. Mitchell, 1971, Growth responses induced by brassin(fatty plant hormones) in bean plants, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 96(3) : 270-273.
18. Yopp, J.H., L.H. Aung and L.S. George, 1986, Bioassay and other special techniques for plant hormones and PGRs, *PGR Soc. America*.