

綠豆 下胚軸과 잎에서의 에틸렌 生成에 대한 Methyl Jasmonate의 效果

孔 垠 化 · 金 佑 澤¹ · 李 垞 承*

梨花女子大學校 自然科學大學 生物科學科, ¹延世大學校 理科學大學 生物學科

Methyl jasmonate(MeJA)가 녹두(*Phaseolus radiatus* L.) 하배축과 잎에서 에틸렌 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 녹두 하배축 조직에서의 에틸렌 생성은 MeJA의 농도에 비례해서 감소했으며 그 억제 효과는 3시간 이후부터 현저하게 나타났다. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase의 활성에 대한 MeJA의 억제 효과 역시 3시간 이후부터 나타났으며 ACC synthase의 활성에는 별 효과가 없었다. 450 μM MeJA가 포함된 배지에서 배양시킨 녹두 하배축 조직에서 옥신 유발 에틸렌 생성은 대조구에 비하여 현저히 억제되었는데 이러한 옥신 유발 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 억제 기작을 알아보기 위하여 ACC synthase의 활성과 ACC oxidase의 활성을 조사하였다. MeJA는 옥신이 처리된 조직내 ACC양과 ACC synthase 활성 및 ACC oxidase의 활성을 감소시켰다. 따라서 옥신 유발 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 억제 효과는 MeJA가 ACC synthase의 활성 뿐만 아니라 ACC oxidase의 활성을 감소시킴으로써 나타난다고 볼 수 있다. 하배축과는 반대로 4.5 μM로 처리한 잎 조직에서의 에틸렌 생성은 대조구에 비해 약 50% 촉진되었으며 옥신에 의해 유발된 에틸렌 생성량은 MeJA에 의해 증가되었다. 잎에서의 MeJA에 의한 에틸렌의 합성 증가는 ACC oxidase의 활성 증가에 기인하였으며 ACC synthase의 효소활성은 변화가 없었다. 따라서 MeJA는 녹두의 서로 다른 조직에서 에틸렌 합성에 대해 서로 상반된 효과를 나타내었다.

주요어: methyl jasmonate, ACC synthase, ACC oxidase, IAA, 에틸렌

식물은 외부 환경으로부터 기계적 자극이나 병원균의 공격을 받았을 때 여러가지 방어에 관계되는 물질을 합성함으로써 공격에 대처하는데(Bowles, 1990), 특히 상처(wounding) 받은 토마토와 감자 등의 식물에서는 방어에 관계되는 화학물질인 단백질 분해효소 억제제를 유도함으로써 식물을 보호하는 기능을 수행한다(Green and Ryan, 1972).

이와 같은 상처에 의한 유전자의 발현은 식물의 상처부위로부터 유리되는 단백질 분해효소 억제제 유도인자(proteinase inhibitor-inducing factor; PIIF)라고 명명된 화학적 신호에 의해 유도되는 것으로 확인되었다(Green and Ryan, 1972; Ryan, 1974). 이 단백질 분해효소 억제제 유도인자로는 상처나 병원균의 감염으로 분해된 세포벽의 분획인 oligouronides(Farmer et al., 1989), 식물 성장 조절물질인 abscisic acid (ABA)와 옥신 그리고 methyl jasmonate (MeJA)와 jasmonic acid(Farmer and Ryan, 1990; Farmer et al., 1992; Staswick, 1992), 18개의 아미노산으로 구성된 내재적인 polypeptide인 systemin (Pearce et al., 1991) 등이 알려지고 있다.

최근에 상처로 인한 단백질 분해효소 억제제 유전자의 발

현에 jasmonic acid가 관여한다는 이론이 제안되었다(Farmer and Ryan, 1992). 이 이론에 의하면 상처는 systemin을 활성화시키고 활성화된 systemin은 systemic signal로 작용하여 세포막의 수용체와 결합함으로써 lipase가 활성화되어 막으로부터 linolenic acid를 방출하고 linolenic acid로부터 차례로 여러가지 중간산물을 통해 MeJA가 합성되고 이것이 유전자를 활성화시킴으로써 단백질 분해효소 억제제 유전자가 발현된다는 것이다(Pearce et al., 1991; Farmer and Ryan, 1990). 이렇게 MeJA가 식물 방어에 관여하는 신호 전달자로 알려지면서 최근 관심의 대상이 되고 있다.

Jasmonate는 여러 과(科)의 식물에 널리 분포하며, 기본적인 화학구조는 C-3, C-6, C-7에서 대치되는 cyclopentanone ring에 의해 특징지어진다. 생합성 경로는 linolenic acid로부터 시작해서 중간산물인 13(S)-hydroperoxy-linolenic acid와 phytydienoic acid를 거쳐 최종적으로 jasmonic acid가 합성된다. 고등식물에서 jasmonic acid의 생합성 경로는 미성숙 열매, 발아된 종자의 자엽초와 잎에서 일어난다고 알려지고 있다 (Vick and Zimmerman, 1984). 생합성 경로의 세포내 위치는 아직 완전히 알려지지 않았으나 몇가지 단계는 엽록체막과 결합된 효소에 의해 촉매된다는 보고가 있다(Vick and Zimmerman, 1987).

*교신저자: Fax (02) 360-2363
© 한국식물학회 [서울] 1994

외부에서 처리한 jasmonate는 낮은 농도로도 다양한 생물학적 활성을 나타낸다고 알려지고 있다(Sembdner and Parthier, 1993). Jasmonate는 벼나 밀 유식물의 생장을 억제시키며 (Dathe *et al.*, 1981; Yamane *et al.*, 1981a, b), 10^{-5} M 이상의 농도에서 줄기와 뿌리의 생장을 억제시킨다고 알려졌다(Sembdner and Klose, 1985). 대두 캘러스 성장과 cytokinin에 의한 세포분열도 jasmonate에 의해 크게 억제되나 무 자엽초 생장은 촉진시킨다는 것이 밝혀졌다(Ueda and Kato, 1982a). 또 다른 jasmonate에 의한 생리적 활성에 대한 억제효과는 꽃가루 발아에서 보고된 바 있다(Yamane *et al.*, 1981a, 1982). Jasmonate는 이러한 억제 효과 뿐만 아니라 여러가지 촉진 효과도 나타낸다. 보리 잎 절편에 MeJA 처리시 엽록소 함량과 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase 활성이 감소하면서 잎의 노화가 촉진된다고 알려지고 있다(Reinhard *et al.*, 1987; Parthier, 1991). 또한, 성숙한 토마토 열매에서의 MeJA는 lycopene 축적을 억제시키고 β -carotene 합성을 자극하며 에틸렌 생성을 촉진시킨다고 보고되고 있는데(Saniewski and Czapski, 1983), 토마토에서의 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 촉진 효과는 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase와 ACC oxidase의 활성을 증가시킴으로써 나타난다고 알려지고 있다(Saniewski *et al.*, 1987). 또한 벼의 잎 절편에서도 MeJA가 ACC 의존적 에틸렌 합성을 촉진시킨다는 보고가 있는 반면(Chou and Kao, 1992), 해바라기 유식물의 하배측 절편에서는 MeJA가 ACC에서 에틸렌으로의 전환을 억제시키는 것으로 알려져 있다(Bailly *et al.*, 1992). 이처럼 MeJA는 식물의 종류와 성장과정에 따라 에틸렌 생성에 미치는 영향이 다르게 나타난다. 따라서 본 실험에서는 에틸렌 생합성이나 작용과정을 밝히는데 많이 쓰이는 녹두를 사용하여 녹두 하배측과 잎에서 MeJA가 에틸렌 생성에 미치는 영향과 그 작용기작을 에틸렌 생합성 과정에서 밝히고자 했다.

재료 및 방법

재 료

녹두(*Phaseolus radiatus* L.) 하배측을 사용하기 위해 녹두를 흐르는 수도물에 12시간 정도 침액시킨 후, 0.5%(w/v) 환천 배지에 심어 습도가 90% 이상, 온도는 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지되는 암실에서 3일간 발아시켰다. 하배측의 길이가 3~4 cm되었을 때 황화조직(etiolated tissue)의 정단 굴곡부 바로 아랫부분을 절단기를 사용하여 0.8~1 cm로 잘라서 사용하였다.

또한 잎을 실험재료로 사용하기 위해서 물에 불린 녹두를 질석(vermiculite)에 심어 온도 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 가 유지되는 온실 안에서 빛을 주면서 약 10일 정도 키운 뒤 제 1복엽을 사용하였다.

에틸렌 생성량 측정

에틸렌 생성량의 측정은 15 mL vial에 완충용액(Mes/Tris buffer, 10 mM, pH 6.8), chloramphenicol(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2% sucrose와 IAA나 MeJA 등을 혼합한 배지 2 mL에 조직절편 20 개씩을, 그리고 33 mL vial에 필요한 시약을 혼합한 배지 10 mL에 잎절편 0.2 g씩 넣고 실리콘 마개로 막아 암소($26 \pm 1^\circ\text{C}$)에서 80~100 rpm으로 흔들며 주면서 배양시켰다. 일정한 시간이 지난 후에 GC용 주사기로 용기내 기체를 1 mL 취하여 gas chromatography(Shimadzu GC-9A, Flame Ionization Detector, Porapark Q Column 100~200 mesh, 90°C , air, 0.5 kg/cm^2 ; hydrogen, 0.6 kg/cm^2 ; carrier, 60 mL/min)로 에틸렌 생성량을 측정하였다.

조직내의 ACC 정량

ACC가 에틸렌으로 전환되는 것을 이용하여 생성된 에틸렌을 gas chromatography로 정량하였다. 이 방법은 Kim *et al.*(1992)의 방법을 이용하였다. 녹두 하배측과 잎 조직 1 g씩을 IAA나 MeJA 등을 혼합한 배지에 각각 넣고 18시간 동안 배양시켰다. 일정 시간이 지난 후 조직을 각각 수거하여 완충용액으로 잘 씻고 80% 에탄올을 넣고 80°C 에서 2시간 동안 끓인다. 그 뒤 조직의 추출액을 40°C 에서 speed vacuum(Hetovac, VR-1)으로 돌려서 남은 pellet을 증류수(2 mL)로 녹였다. 이 중 0.8 mL를 취하여 15 mL vial에 넣고 0.1 mL의 10 mM HgCl_2 를 첨가한 뒤 실리콘 마개로 막아 얼음에 15분간 채워둔 후 0.1 mL NaOCl(5% NaOCl: 포화된 NaOH, 2:1, v/v)를 주사기로 주입하여 얼음에 채워두었다. 10분 후 기체 1 mL를 주사기로 취하여 생성된 에틸렌을 측정할 후 ACC 표준 곡선을 이용하여 ACC양을 계산하였다.

ACC synthase의 활성측정

ACC synthase의 활성은 Boller *et al.*(1979) 방법을 변형하여 측정하였다. 녹두 하배측 조직과 잎 절편을 MeJA가 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에서 각각 일정시간 동안 배양 후 각 조직을 4 g씩 수거하여 완충용액으로 잘 씻은 후 4°C 에서 4 mM DTT, 0.5 μM pyridoxal phosphate(PLP), 10 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 2 M NaCl이 포함된 pH 8.5의 100 mM HEPES buffer 4 mL를 넣어 막자사발로 같은 뒤에 가아제로 걸러낸 후 25,000 g에서 15분간 초원심분리(Beckman L5-50)하였다. 원심분리가 끝난 후 각 상정액 2 mL를 취하여 0.5 mM DTT, 0.5 μM PLP, 1 mM EDTA를 포함한 pH 8.5의 2 mM HEPES buffer로 평형시킨 Sephadex G-25 column(2X

11 cm, bed volume, 30 mL)에 통과시킨다. 2 mL씩 받은 각각의 분획들을 280 nm에서 흡광도를 읽어 단백질이 많은 분획을 고른다. 그런 다음 0.4 mL씩 준비된 효소용액과 0.5 μM PLP를 포함한 pH 8.5의 50 mM HEPES buffer에 SAM을 넣은 반응용액 0.6 mL를 15 mL vial에 넣고 실리콘 마개로 막아 30°C에서 1~2시간 효소와 기질을 반응시킨 후 0.1 mL의 10 mM HgCl₂을 주사기로 주입하여 얼음에 15분간 채우고, 다시 0.1 mL의 NaOCl(5% NaOCl과 포화상태의 NaOH, 2:1, v/v)을 주사기로 주입 후 10분간 얼음에 채워둔 후 기체 1 mL를 GC용 주사기로 취해서 에틸렌 생성량을 측정하여 효소활성을 비교하였다.

ACC oxidase의 활성 측정

*In vivo*에서 ACC oxidase의 활성은 ACC가 에틸렌으로 전환되는 것을 이용하여 측정하였다. 이 방법은 Hoffman과 Yang (1982)의 방법을 수정하여 이용하였다. 녹두 하배축과 잎 절편에 MeJA를 처리한 실험구와 완충용액만 넣어준 대조구를 실리콘 마개로 막아 암소(26±1°C)에서 80~100 rpm으로 흔들며 주면서 일정시간 배양시킨 후 조직을 각각 수거하여 완충용액으로 씻었다. 씻은 조직 절편을 10⁻⁵ M AVG가 포함된 배지에 2시간 배양시켜 조직내의 ACC synthase의 활성을 억제시킨 다음 완충용액으로 씻어 1 mM ACC를 첨가한 배지에서 진공상태로 ACC를 조직내에 침투시켰다. 다시 조직 절편을 완충용액으로 잘 씻고 15 mL vial에 완충용액 1 mL만 들어있는 배지에서 마개를 한 후 1시간 동안 배양시킨 뒤 에틸렌 생성량을 측정하였다.

결 과

녹두 하배축에서의 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 효과

MeJA가 녹두 하배축에서 에틸렌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 하배축 조직에 MeJA를 농도별로 처리하여 18시간 동안 배양시킨 뒤에 생성된 에틸렌을 측정하여 대조구와 비교하였다(Fig. 1). MeJA가 첨가된 배지에서의 에틸렌 생성은 MeJA의 농도가 증가함에 따라 점점 감소되어 450 μM에서는 대조구에 비해 56% 억제되었다. 또한 MeJA의 에틸렌 생성에 대한 억제 효과가 시간에 따라서 어떤 변화를 나타내는지 알아보았다(Fig. 2). 그 결과 450 μM MeJA를 처리한 실험구에서는 3시간만에 에틸렌 생성이 대조구에 비해 40% 정도 감소되었으며 그 효과가 거의 같은 정도의 비율(40~50%)로 24시간까지 지속되었다.

녹두 하배축을 포함한 여러 식물 조직에서 옥신이 에틸렌의

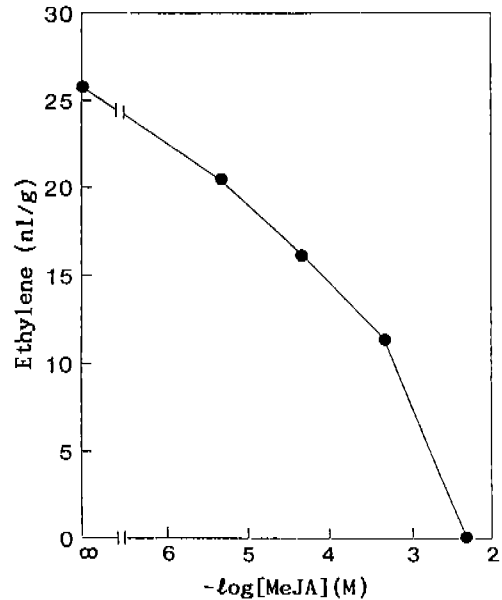


Fig. 1. Effect of various concentrations of MeJA on ethylene production in mungbean hypocotyl segments. Ethylene production was measured at the end of an 18 h incubation period.

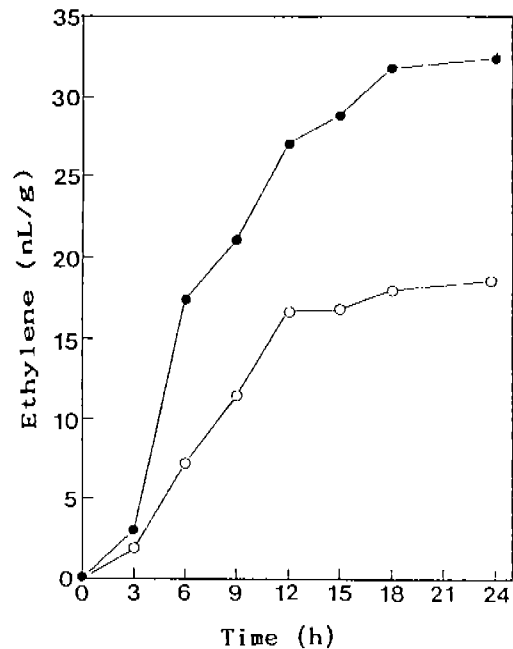


Fig. 2. Time courses of ethylene production in mungbean hypocotyl segments. Open circles denote ethylene production in the presence of 450 μM MeJA and closed circles denote ethylene production in the absence of MeJA.

합성을 크게 증가시키는 것이 잘 알려져 있다(Yang and Hoffman, 1984). 따라서 하배축에서의 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 억제효과가 옥신과 연관되어진 생리적 현상인지를 조사하기

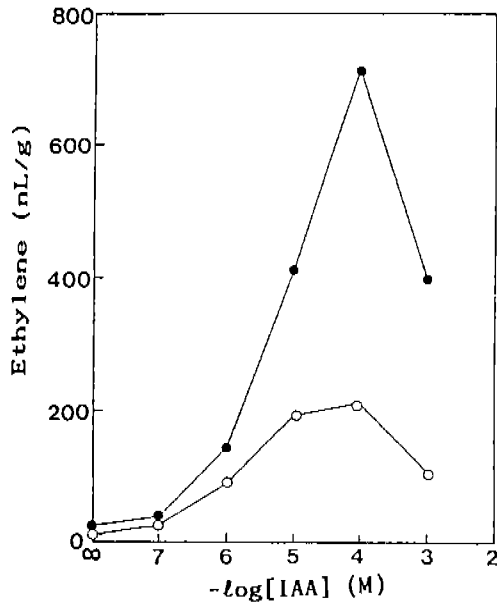


Fig. 3. Effect of MeJA on IAA-induced ethylene production in mungbean hypocotyl segments. Segments were incubated for 18 h. Open circles indicate ethylene production in the presence of 450 μ M MeJA and various concentrations of IAA. Closed circles indicate ethylene production in the absence of MeJA and in the presence of various IAA.

Table 1. Effects of MeJA and IAA on ACC synthase activity, endogenous ACC content, and ACC oxidase activity in mungbean hypocotyl segments. After 18 h incubation, the ACC synthase activity was assayed using 100 μ M SAM as substrate

Treatment	ACC synthase activity (nmole/mg)	ACC content (M)	ACC oxidase activity (nL/g)
Control	0.45	8.91×10^{-7}	137.8
MeJA ^a	0.42	9.19×10^{-7}	56.4
IAA ^b	1.19	1.12×10^{-5}	140.4
IAA ^b +MeJA ^a	0.52	2.47×10^{-6}	59.5

^aThe concentration of MeJA was 450 μ M.

^bThe concentration of IAA was 100 μ M.

위하여 각각의 IAA 농도에 450 μ M MeJA를 첨가한 후 조직을 넣고 18시간 배양시킨 뒤 에틸렌 생성량을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 MeJA가 포함된 배지에서의 에틸렌 생성이 IAA 농도가 높을수록 억제 정도가 심하게 나타나 10^{-4} M IAA가 포함된 배지에서는 대조구에 비해 70% 이상의 억제율을 나타냈다. 이 결과에 의하면 MeJA가 에틸렌 생성을 억제시키는 경로는 옥신 유발 에틸렌 생성 경로와 어떤 관계가 있을 것이라고 생각하여 볼 수 있다.

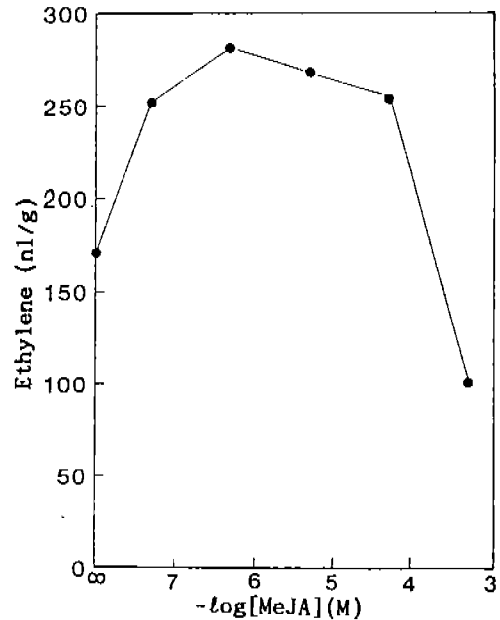


Fig. 4. Effect of various concentrations of MeJA on ethylene production in mungbean leaf segments. Ethylene production was measured at the end of an 18 h incubation period.

따라서 MeJA가 어떤 기작으로 에틸렌 생성을 억제시키는가를 알아보기 위하여 에틸렌 생합성 경로에 관여하는 효소인 ACC synthase, ACC oxidase의 활성과 조직내 ACC양을 조사하였다(Table 1). 먼저 450 μ M MeJA를 처리한 조직에서의 ACC synthase의 효소활성이 대조구에 비해 93%로 MeJA에 의한 억제 효과가 거의 나타나지 않았으며 이를 확인하기 위해 조직내 ACC를 정량한 결과도 대조구의 103%로 억제효과를 나타내지 않았다. 이 두 결과는 MeJA가 에틸렌 생합성 과정 중 SAM에서 ACC로 전환되는 단계에는 영향을 미치지 않는다는 것을 말해준다. 이에 반해 IAA와 MeJA를 함께 처리한 배지에서의 조직 내 ACC양이 IAA만 처리한 조직에 비해 약 80%나 감소되었으며 ACC synthase의 활성 역시 IAA만 처리한 조직에 비해 56% 억제되었는데 이 결과는 MeJA 단독으로는 ACC synthase의 활성에 영향을 미치지 않는다는 결과와는 상반되는 것이다. 따라서 MeJA는 ACC synthase의 합성을 유도하는 옥신의 작용을 억제시킴으로써 옥신 유발 에틸렌 생성을 감소시키는 것으로 생각된다.

그러면 MeJA가 에틸렌 생합성 단계에서 마지막 단계인 ACC에서 에틸렌으로의 전환을 촉매하는 ACC oxidase에는 어떤 영향을 주는지 알아본 결과 MeJA만 처리한 조직에서의 ACC oxidase 활성이 대조구에 비해 약 60%나 감소되었으며 IAA와 MeJA를 함께 처리한 조직에서의 ACC oxidase 활성 역시 IAA만 처리된 조직에 비해 약 58%까지 감소되었다. 이

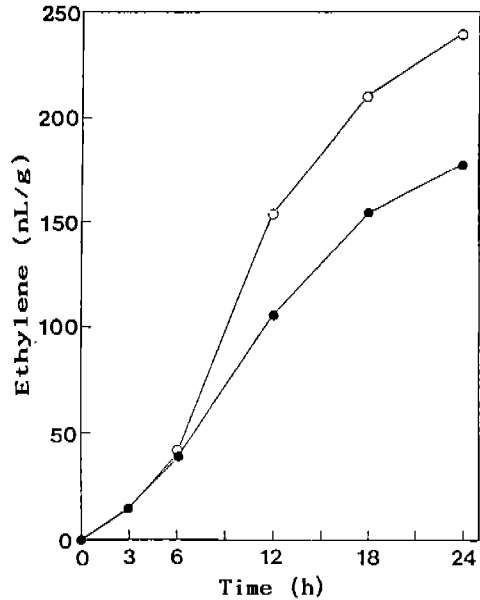


Fig. 5. Time courses of ethylene production in mungbean leaf segments. Open circles denote ethylene production in the presence of 4.5 μM MeJA and closed circles denote ethylene production in the absence of MeJA.

결과들로 보아 하배측에서의 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 억제 효과는 ACC를 에틸렌으로 전환시키는 효소인 ACC oxidase의 활성을 감소시킴으로써 나타난다고 할 수 있으며 옥신 유발 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 억제 작용은 MeJA가 옥신에 의한 ACC synthase 활성 증가를 억제시킴으로써 ACC 양을 감소시키고 동시에 ACC oxidase 활성도 저하시킴으로써 나타난다고 생각된다.

녹두 잎 절편에서의 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 효과

MeJA가 잎에서도 하배측 조직에서와 같이 에틸렌 생성에 대한 억제 효과를 나타내는지 알아보기 위하여 MeJA를 농도별로 처리한 잎 조직을 18시간 동안 배양시킨 후 에틸렌 생성량을 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 하배측과는 달리 MeJA를 처리한 잎 조직에서의 에틸렌 생성은 대조구에 비해 촉진되었으며 그 촉진 효과는 4.5×10^{-7} M에서 48%였으며 4.5×10^{-4} M까지도 비슷한 정도의 효과가 있었으나 4.5×10^{-3} M에서는 에틸렌 생성을 억제시켰다. MeJA의 에틸렌 생성에 대한 촉진 효과가 시간에 따라서 어떤 변화를 나타내는지 알아본 결과 잎에서는 MeJA의 효과가 6시간까지도 나타나지 않다가 12시간이 되어서야 에틸렌 생성이 대조구에 비해 46% 증가되며 그 이후에는 효과가 지속적으로 나타났다(Fig. 5). 이것은 잎에서의 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 생리적 효과가 하배측에서의 억제 효과에 비해서 대단히 느리게 나타난다는 것을 의미한다.

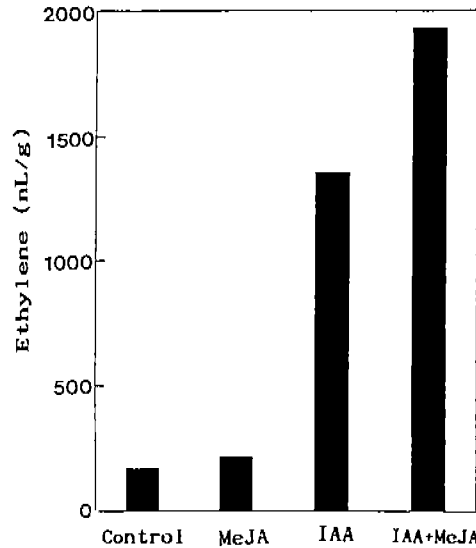


Fig. 6. Effects of MeJA and IAA on ethylene production in mungbean leaf segments. Ethylene production was measured at the end of an 18 h incubation period. The concentrations of MeJA and IAA were 4.5 μM and 100 μM , respectively.

Fig. 6은 잎에서의 옥신 유발 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 효과를 본 것으로 잎 조직을 10^{-4} M IAA와 함께 처리하였다. 그 결과 대조구가 169 nL/g의 에틸렌을 생성한데 비해 IAA를 처리했을 경우에는 1355 nL/g으로 대조구에 비해 무려 700%의 증가를 보였으며 IAA와 MeJA를 함께 처리했을 때에는 1931 nL/g으로 IAA만 처리했을 때보다 43%가 더욱 증가하였다. 이것은 IAA와 MeJA가 함께 있을 때에 에틸렌 생성이 더욱 촉진됨을 보여주는 것으로 MeJA가 IAA와 상승적으로 에틸렌 생성을 촉진시킨다고 할 수 있다.

잎에서의 에틸렌 생성이나 옥신 유발 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 촉진 효과가 에틸렌 생합성 경로 중 어떤 과정에 영향을 미치는지 알아보기 위해 조직내 ACC양과 ACC synthase, ACC oxidase의 활성을 측정, 비교하였다(Table 2). 그 결과 ACC양이나 ACC synthase 활성에 있어서 대조구와 MeJA가 단독으로 처리된 실험구간에 차이가 거의 나타나지 않았으며 또한 IAA와 MeJA를 같이 처리한 조직에서의 IAA만 처리한 조직에서의 ACC양과 ACC synthase 활성 역시 거의 같았다. 따라서 이 결과들은 잎에서의 에틸렌 생성이나 옥신 유발 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 촉진효과가 에틸렌 생성 경로 중 SAM에서 ACC로 전환되는 단계와는 무관하다는 것을 말해주고 있다.

그러면 잎에서의 에틸렌 생성이나 옥신 유발 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 촉진 효과가 ACC에서의 에틸렌으로의 전환을 촉매하는 ACC oxidase의 활성 증가에 의한 것인지 알아본

Table 2. Effects of MeJA and IAA on ACC synthase activity, endogenous ACC content, and ACC oxidase activity in mungbean leaf segments. After 18 h incubation, the ACC synthase activity was assayed using 10 μ M SAM as substrate

Treatment	ACC synthase activity (nmole/mg)	ACC content (M)	ACC oxidase activity (nL/g)
Control	0.57	2.31×10^{-6}	988
MeJA ^a	0.56	2.19×10^{-6}	1,633
IAA ^b	0.81	2.86×10^{-5}	1,079
IAA ^b +MeJA ^a	0.52	2.47×10^{-5}	1,915

^aThe concentration of MeJA was 4.5 μ M.

^bThe concentration of IAA was 100 μ M.

결과 MeJA를 처리한 조직에서의 ACC oxidase 활성이 대조구에 비해 65%로 증가되었으며 IAA와 MeJA를 같이 처리해 준 조직에서의 ACC oxidase 활성도 IAA만 처리한 조직보다 78% 증가되었다. 따라서 잎 조직에서의 에틸렌 생성이나 옥신 유발 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 촉진 효과는 MeJA가 ACC에서 에틸렌으로 전환되는 단계를 촉매시키는 ACC oxidase의 활성을 증가시킴으로써 나타난다고 할 수 있다.

고 찰

휘발성 MeJA는 식물의 종류에 따라 에틸렌 생성에 미치는 영향이 다르게 나타난다. 예를 들면, 토마토와 사과 열매에서는 에틸렌 생성이 증가했고(Saniewski *et al.*, 1987), 벼의 잎 조직에서도 에틸렌 합성을 촉진시킨(Chou and Kao, 1992) 반면 해바라기 유식물의 하배측에서는 에틸렌 생성을 억제시킨다는 보고가 있다(Bailly *et al.*, 1992).

본 실험에서는 해바라기 유식물의 하배측과 같이 녹두 하배측에서도 MeJA가 에틸렌 생성을 억제시키는지 알아본 결과 MeJA 농도에 비례해서 에틸렌 생성이 억제되었다(Fig. 1). MeJA가 에틸렌 생성을 억제시킨다면 에틸렌 생성경로 중 어떤 단계에 영향을 미치는가를 알아본 결과 MeJA를 처리한 실험구와 대조구에서의 ACC synthase의 활성이 거의 비슷함을 볼 수 있었다(Table 1). 이것은 MeJA 처리 조직과 처리하지 않은 조직에서의 ACC양이 변화가 없는 결과(Table 1)와 일치되는 것으로 이 두 결과로 보아 녹두 하배측에서 MeJA가 에틸렌 생합성 과정 중 SAM에서 ACC로 전환되는 단계에는 영향을 미치지 않는다고 할 수 있다. 이러한 MeJA의 에틸렌 생성 억제 효과가 ACC 전단계에는 나타나지 않은 것으로 보아 에틸렌 합성의 마지막 단계인 ACC에서 에틸렌으로의 전환 단계에 나타나는지 알아보기 위해 ACC에서 에틸렌으로의

전환을 촉매하는 ACC oxidase의 활성을 측정하였는데 그 결과 MeJA를 처리한 조직에서 ACC oxidase 활성이 대조구에 비해 현저하게 감소됨을 볼 수 있었다(Table 1). 이 결과는 해바라기 유식물에서의 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 효과가 ACC에서 에틸렌으로의 전환을 억제시킨다는 보고(Bailly *et al.*, 1992)와 일치한다. 이처럼 MeJA가 ACC oxidase의 활성에 영향을 미침으로써 에틸렌 생성에 관여한다는 보고가 많은데 어떤 기작으로 효소 활성을 조절하는지는 확실하지 않다. 그러나 Bailly *et al.*(1992)은 ACC oxidase system이 원형질막이나 액포막과 연관되어 있으므로 아마 MeJA가 막 성질이나 막과 관련된 과정에 영향을 줌으로써 ACC oxidase 활성을 변화시킨다고 주장한 바 있다.

에틸렌은 여러 식물 호르몬에 의하여 영향을 받아 길항작용을 하는데, 옥신은 에틸렌 생성 경로 중 속도 제한 단계의 효소인 ACC synthase의 합성을 유도하여 ACC의 양을 증가시킴으로써 에틸렌 생성을 촉진시키는 것으로 알려졌다(Yu *et al.*, 1979). IAA를 농도별($0 \sim 10^{-3}$ M)로 MeJA와 함께 처리한 실험구와 IAA를 단독으로 처리한 대조구를 비교하여 볼 때 IAA와 MeJA가 함께 있을 때가 IAA만 있을 때보다 에틸렌 생성이 급격히 감소됨을 볼 수 있었다(Fig. 3). 이 결과로 MeJA가 옥신 유발 에틸렌 생성단계에서 옥신이 관여하는 단계에 영향을 주어 에틸렌 생성을 억제시킬 것이라고 생각할 수 있다. 따라서 MeJA가 옥신 유발 에틸렌 생성과정 중 영향을 미치는 부위를 명확히 알기 위해 먼저 옥신이 관여하는 SAM에서 ACC로의 전환 단계를 촉매하는 ACC synthase를 부분 분리하여 그 활성을 조사한 결과 MeJA와 IAA를 함께 처리한 조직에서의 효소 활성이 IAA만 처리한 조직에 비해 약 50%가 감소되었으며 이러한 효소 활성의 저하로 인해 조직내의 ACC양도 약 80%가 감소되었다(Table 1). 이 두 결과는 IAA가 처리되지 않은 조직에서는 MeJA가 SAM \rightarrow ACC 단계에 영향을 미치지 않는다는 결과와 상반되는 것으로서 녹두 하배측에서의 옥신 유발 에틸렌 생성에 대해서는 MeJA가 ACC synthase의 합성을 촉진시키는 옥신의 작용을 억제시킴으로써 결과적으로 ACC양을 감소시킨다고 할 수 있다. 즉 MeJA가 직접적으로 ACC synthase 활성을 저하시키는 것이 아니라 옥신의 작용을 억제시킴으로써 간접적으로 ACC synthase의 활성을 감소시키는 것으로 생각된다.

MeJA에 의한 옥신 유발 에틸렌 생성의 감소가 에틸렌 합성의 마지막 단계에도 나타나는지 알아보기 위하여 ACC oxidase의 활성을 측정한 결과 IAA와 MeJA를 함께 처리한 조직의 효소 활성이 IAA만 처리한 조직에 비해 90%나 억제되었다(Table 1). 따라서 옥신 유발 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 억제 효과는 ACC oxidase의 활성을 저하시킴으로써 나타난다고 할 수 있다. 결론적으로 녹두 하배측에서 MeJA는 옥

신에 의한 ACC synthase의 합성 촉진을 억제시킴으로써 간접적으로 ACC양을 감소시키고 또한 ACC oxidase의 활성을 현저히 저하시킴으로써 옥신 유발 에틸렌 생성을 억제시킨다고 할 수 있다.

이러한 MeJA의 효과가 같은 식물이라도 기관에 따라 다른지 알아보기 위해 잎에서의 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 효과를 보았다(Fig. 4). 그 결과 하배측과는 달리 에틸렌 생성이 촉진되었으나 촉진 효과는 하배측에서의 억제 효과에 비해 그리 크지 않았다. 이러한 MeJA에 의한 에틸렌 생성 촉진이 에틸렌 생합성 경로 중 어떤 단계에 영향을 미치는지 알아보기 위해 하배측에서 했던 실험을 반복한 결과 MeJA를 처리한 조직과 처리하지 않은 조직간의 ACC synthase의 활성과 조직내 ACC양은 거의 변화가 없었으며(Table 2), ACC oxidase 활성에 있어서는 MeJA 처리 조직이 대조구에 비해 65%의 증가율을 보였다(Table 2). 또한 옥신 유발 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 촉진 효과 역시 ACC synthase의 활성과는 무관하며 ACC oxidase의 활성을 증가시킴으로써 나타났다(Table 2). 이것으로 잎에서는 MeJA가 ACC oxidase의 활성을 증가시킴으로써 에틸렌 생성을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 벼의 잎 절편에서 MeJA가 ACC에서 에틸렌으로의 전환을 촉매하는 ACC oxidase 활성을 증가시켜서 에틸렌 생성을 촉진시킨다는 보고(Chou and Kao, 1992)와 일치한다. 한편 올리브의 온전한 잎에서는 ACC synthase와 ACC oxidase 활성을 모두 증가시킴으로써 에틸렌 생성을 촉진시키며 올리브의 절단된 잎에서는 ACC oxidase의 활성을 억제시킨다는 보고도 있다(Sanz et al., 1993). Sanz et al.(1993)은 절단된 잎에서의 ACC oxidase 활성이 저하된 이유를 MeJA에 의해 유도된 기공 닫힘에 의해 외부에서의 ACC uptake를 방해함으로써 나타난다고 설명하고 있다. 그러나 절단된 벼의 잎과 녹두 잎에서는 MeJA가 ACC oxidase 활성을 증가시킨다는 결과와는 맞지 않은 것으로 보아 ACC oxidase 활성 억제와 기공 닫힘에 의한 ACC uptake의 방해와는 별 상관관계가 없는 것으로 생각된다. 이처럼 에틸렌 생성에 대한 MeJA의 효과가 한 기관이라도 식물의 종에 따라, 그리고 같은 종이라도 기관에 따라, 다르게 나타나는 것은 확실하나 그 작용 기작에 있어서는 확실히 밝혀지지 않고 있다.

사 사

본 연구는 교육부 기초과학연구소 육성지원연구비(BSRJ-93-422)에 의하여 수행된 것임.

인 용 문 헌

Bailly, C., F. Corbineau and D. Come. 1992. The effect

of abscisic acid and methyl jasmonate on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conversion to ethylene in hypocotyl segments of sunflower seedlings, and their control by calcium and calmodulin. *Plant Growth Regulation* **11**: 349-355.

Boller, T., R.C. Hener and H. Kende. 1979. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* **145**: 293-303.

Bowles, D.J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 873-907.

Chou, C.M. and C.H. Kao. 1992. Methyljasmonate, calcium, and leaf senescence in rice. *Plant Physiol.* **99**: 1693-1694.

Chou, C.M. and C.H. Kao. 1992. Stimulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent ethylene production in detached rice leaves by methyl jasmonate. *Plant Science* **83**: 137-141.

Dathe, W., H. Ronsh, A. Preiss, W. Schade, G. Sembdner and K. Schreiber. 1981. Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* **153**: 530-535.

Farmer, E.E., G. Pearce and C.A. Ryan. 1989. *In vitro* phosphorylation of plant plasma membrane proteins in response to the proteinase inhibitor inducing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1539-1542.

Farmer, E.E. and C.A. Ryan. 1990. Interplant communication: air-borne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7713-7716.

Farmer, E.E. and C.A. Ryan. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**: 129-134.

Green, T.R. and C.A. Ryan. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense against insects. *Science* **175**: 776-777.

Hoffman, N.E., S.F. Yang, A. Ichihara and S. Sakamura. 1982. Stereospecific conversion of 1-aminocyclopropane carboxylic acid to ethylene by plant tissues. *Plant Physiol.* **70**: 195-199.

Kim, W.T., A. Silverstone, W.T. Yip, J.G. Dong and S.F. Yang. 1992. Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase mRNA by auxin in mung bean hypocotyls and cultured apple shoots. *Plant Physiol.* **98**: 465-471.

Liberman, M. 1979 Biosynthesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **30**: 533-591.

Meyer, A., O. Miersch, C. Butter, W. Dathe and G. Sembdner. 1984. Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J. Plant Growth Regul.* **3**: 1-8.

Miersch, O., A. Meyer, S. Vorkefeld and G. Sembdner. 1986. Occurrence of (+)-7-iso-jasmonic acid in *Vicia faba* L. and its biological activity. *J. Plant Growth Regul.* **5**: 91-100.

Parthier, B. 1990. Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence?. *J. Plant Growth Regul.* **9**: 57-63.

- Parthier, B., C. Bruckner, W. Dathe, B. Hause and G. Herrmann, *et al.* 1992. Jasmonates: metabolism, biological activities, and modes of action in senescence and stress responses. In *Progress in Plant Growth Regulation*, C.M. Karssen, L.C. Van Loon and D. Vreugdenhil (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 276-285.
- Pearce, G., D. Strydom, S. Johnson and C.A. Ryan. 1991. A polypeptide from tomato leaves activates the expression of proteinase inhibitor genes. *Science* **253**: 895-897.
- Saniewski, M., J. Nowacki and J. Czapski. 1980. The effect of methyl jasmonate on ethylene production and ethylene-forming enzyme activity in tomatoes. *J. Plant Physiol.* **129**: 175-180.
- Sanz, L.C., J.C. Fernandez-Maculet, E. Gomez, B. Vioque and J.M. Oliast. 1993. Effect of methyl jasmonate on ethylene biosynthesis and stomatal closure in olive leaves. *Phytochemistry*. **33**: 285-289.
- Sembdner, G. and B. Parthier. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **44**: 569-589.
- Staswick, P.E. 1992. Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiol.* **99**: 804-807.
- Vick, B.A. and D.C. Zimmerman. 1984. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.* **75**: 458-461.
- Yamane, H., H. Takagi, H. Abe, T. Yokota and N. Takahashi. 1981. Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. *Plant & Cell Physiol.* **22**: 689-697.
- Yu, Y.B., D.O. Adams and S.F. Yang. 1979. Regulation of auxin-induced ethylene production in mungbean hypocotyl. Role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Plant Physiol.* **63**: 589-590.

(1994. 11. 19 接受)

Effect of Methyl Jasmonate on Ethylene Production in Mungbean Hypocotyls and Leaf Segments

Kong, Eun-Wha, Woo Taek Kim¹ and June Seung Lee*

Department of Biology, Ehwa Womans University, Seoul 120-750, Korea; and

¹*Department of Biology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea*

ABSTRACT

Effects of methyl jasmonate (MeJA) on ethylene production in mungbean (*Phaseolus radiatus* L.) hypocotyl and leaf segments were studied. Ethylene production in mungbean hypocotyl segments was decreased in proportion to MeJA concentrations and 450 μ M of MeJA showed 50% inhibitory effect. This inhibitory effect appeared after 3 h of incubation period and continued for 24 h. Inhibition of ethylene production by MeJA was due to the decrease in 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase activity. However, MeJA treatment had no effect on ACC content and ACC synthase activity. MeJA also inhibited auxin-induced ethylene production in hypocotyls. To investigate the mechanisms of the inhibitory effect of MeJA on the auxin-induced ethylene production, ACC synthase and ACC oxidase activity were examined after MeJA treatment. MeJA decreased the ACC content and ACC synthase activity as well as ACC oxidase activity in the auxin-treated tissue. These results suggest that the inhibition of MeJA on auxin-induced ethylene production is not due to the direct inhibitory effect of MeJA on the ACC synthase, but to the inhibition of the ability of IAA to promote the synthesis of ACC synthase. In contrast, ethylene production from the detached mungbean leaves was stimulated by MeJA. The rate of ethylene production increased approximately 65% over the control after 12 h of incubation period by 4.5 μ M MeJA. When MeJA was applied to detached leaves along with IAA, the effect of MeJA appeared to be additive. In an effort to elucidate mechanisms of MeJA action on auxin-induced ethylene production in the leaf tissue, enzyme activities of ACC synthase and ACC oxidase were examined. MeJA stimulated ACC oxidase activity but did not affect ACC synthase activity in leaf tissue. Together, these results suggest that MeJA plays different roles in the ethylene production in the different mungbean tissues.

Keywords : methyl jasmonate, ACC synthase, ACC oxidase, IAA, ethylene

*Corresponding author: Fax +82-2-360-2385