

碩士學位論文

温州蜜柑 (*Citrus unshiu* Marc.) 葉內 Abscisic acid
含量的季節的變化와 器官別脫離에 관한 研究

濟州大學校 大學院

生物學科



1990年 12月

温州蜜柑 (*Citrus unshiu* Marc.) 葉内 Absciscic acid
含量的季節的變化와 器官別脫離에 관한 研究

指導教授 許 仁 玉

申 昌 勳

이 論文을 理學碩士學位 論文으로 提出함.

1990年 12月

申昌勳의 理學碩士學位 論文을 認准함.



JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

審査委員長

委 員

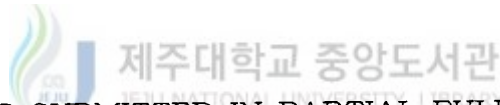
委 員

濟州大學校 大學院

1990年 12月

A Study on Seasonal Changes of Abscissic
Acid Content in the Leaves and Abscission
in Organs of *Citrus unshiu* Marc.

Chang-Hoon Shin
(Supervised by Professor In-Ok Heo)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF NATURAL SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1990. 12

目 次

Summary	1
I. 緒 論	2
II. 材 料 및 方 法	4
III. 結 果 및 考 察	8
IV. 摘 要	15
References	16

Summary

The present study was conducted to investigate seasonal changes of ABA content in the leaves and differences of ABA content according to abscission in organs of *Citrus unshiu* MARC. ABA content was determined by HPLC.

1. Seasonal changes of ABA content in leaves were relatively low from January to April and were the highest in July. On the other hand, ABA content was decreased rapidly in August and then increased gradually until December.

2. The content of ABA during development of flower increased after blooming and was especially the highest in abscission stage.

3. The content of ABA according to abscission of leaves and fruits were the highest in abscission zone before abscission.

I . 緒 論

Abscisic acid (ABA)는 1963年 Addicott에 의해 木花(*Gossypium hirsutum* L.)의 幼葉에서 처음으로 分離, 同定되었고(Addicott, 1983) Ohkuma 等 (1965)이 化學構造를 밝힌 이래, 高等植物에서 뿐만 아니라 下等植物과 몇몇 微生物 等에서도 合成(Norman *et al.*, 1986; Ketter and Dorffling, 1987) 된다고 報告되고 있다.

ABA는 融點이 161-163°C이고, pKa'가 4.8인 弱酸이며 15개의 炭素로 構成된 sesquiterpenoid 物質로써 自然狀態에서 (+) - S - ABA 形態로 存在하며 (Budavari *et al.*, 1989) 빛과 溫度 및 pH의 變化 等に 敏感하여 分解되기 쉽고, 특히 紫外線에 의해 시스 형에서 트랜스 형으로 變化하는 特性이 있다 (Rivier and Crozier, 1987).

ABA의 生理的 役割로는 休眠誘導(Mielke and Dennis, 1975; Page-Degivry *et al.*, 1987; Everat-Bourbouloux, 1987), 老化 및 脫離促進(Sagee *et al.*, 1980; Samet and Sinclair, 1980; Rodriguez *et al.*, 1988), 氣孔開閉 (Ackerson, 1980; Cornish and Zeevaart, 1986; Creelman, 1989) 等に 關與 하는 것으로 報告되고 있다.

Citrus屬 植物에서 ABA에 관한 研究는 *Citrus sinensis* 果實에 高濃度의 ABA를 處理하면 에틸렌 生成과 셀룰라아제 활성도가 높아 脫離가 일어나며 (Rasmussen, 1974), *C. sinensis*의 花芽가 發達하는 동안 ABA가 增加한다고 (Goldschmidt, 1980; Harris and Dugger, 1986)하였으며, 또한 Sagee 等 (1980)은 *C. sinensis* 잎에 ABA를 處理하면 에틸렌 生成이 促進되고, 에틸렌은 셀룰라아제, 폴리갈락트로나아제 등의 活性을 促進시켜 細胞壁을

分解함으로써 脫離가 일어난다고 報告한 바 있다.

ABA는 物理化學的 特性으로 인해 變化되기 쉽고 植物體內的 含量이 微量이므로 分析이 어려웠으나, high performance liquid chromatography(HPLC)와 gas chromatography(GC)에 의한 分析技法이 開發되었고, 특히 HPLC detector의 感度向上으로 少量의 試料에서 分析이 可能하게 되었다(Anderson, 1985; Majcherczyk *et al.*, 1986; Linskens and Jackson, 1987).

또한, 지금까지 報告된 ABA의 生理機作에 관한 研究는 주로 落葉性 植物에서 行하여졌으며 常綠性 植物에서의 研究(Rasmussen, 1975; Jones *et al.*, 1976; Sagee *et al.*, 1980; 許 等, 1988)는 未洽한 實情이다.

이에 本 研究는 HPLC를 利用하여 溫州蜜柑(*Citrus unshiu* MARC.)을 材料로 ABA의 生成時期 및 脫離 等の 生理作用에 관한 研究로써 葉內 ABA 含量의 季節的 變化와 器官別 脫離에 따른 含量의 差를 檢討하고자 實施하였다.



11. 材料 및 方法

1. 實驗材料

濟州大學校 附屬農場에 植栽된 11年生 溫州蜜柑(*C. unshiu* MARC.)을 供試材料로 使用하였다.

2. 試料採取

(1) 잎은 生成時期에 따라 1989年 4月 9일부터 1990年 3月 9일까지 1個月 間隔으로 採取하였다.

(2) 꽃은 花芽段階, 滿開前段階, 滿開段階, 落花段階로 각각 區分하여 1990年 5月 7일부터 1990年 5月 25일까지 6日 間隔으로 採取하였다.

(3) 과실은 1990年 7月 3일에 正常果, 落果, 落果直前果實, 및 落果直前果實의 離層部位로 區分하여 採取하였다.

(4) 잎은 1990年 8月 9일에 正常葉, 落葉, 落葉直前葉, 및 落葉直前葉의 離層部位로 區分하여 採取하였다.

試料採取는 午前 10時경에 行하였으며 水分蒸發을 막기 위해 유리접시에 密封한 후 -20°C 에 保管시켜 實驗材料로 使用하였다.

3. 水分含量 測定

採取한 試料 3g을 80°C에서 48시간 乾燥시켜 乾物量을 測定한 후, 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 Fig. 1과 같이 行하였으며 (許 等, 1988), ABA의 HPLC에 의한 分析은 0.1M phosphate buffer (pH 2.6) 와 acetonitrile를 2:1로 混合한 溶媒를 μ -Bondapak C₁₈ Column에 分當 1ml씩 湧出하여 uv 254nm에서 檢出시켰다(Table 1).

Table 1. The operational condition for HPLC analysis of ABA

Instrument	Waters Associates Model 441	
	Injector: Model U6K	
	Pump : Model 590	
	Detector: Model 441	
Column	μ -Bondapak C ₁₈ (30 cm X 3.9 mm)	
Solvent	0.1M phosphate buffer : acetonitrile	
	2	1
Flow rate	1.0 ml/min	
Injected volume	10 μ l	
Wave length	254 nm	
Chart speed	0.5 cm/min	

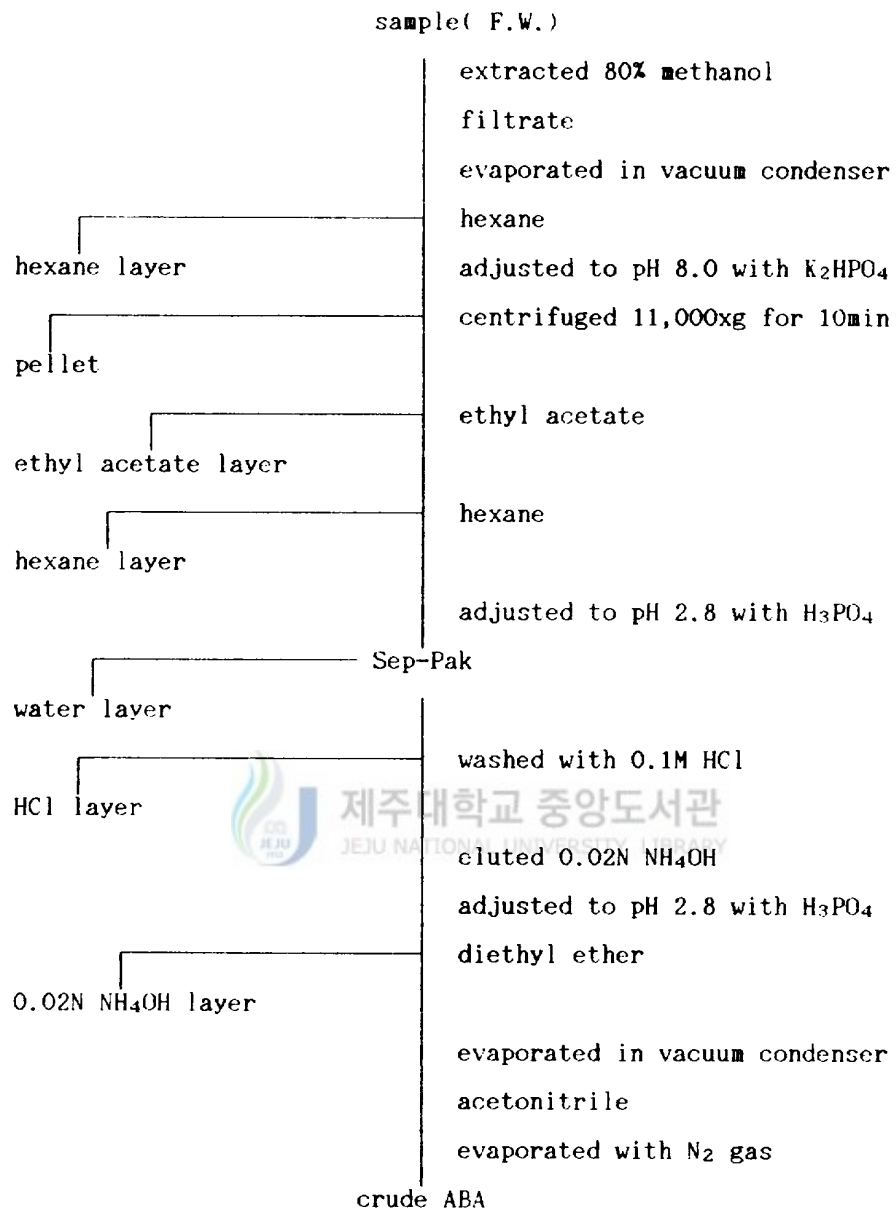


Fig. 1. The scheme of extraction and separation of ABA(許等, 1988).

5. 標品 ABA의 調製 및 檢量線의 作成

標品 ABA의 調製는 東京化成工業株式會社の abscisic acid(G. R. grade) 100mg을 메탄올 100ml에 溶解시킨 후, 다시 100배로 稀釋하여 標品溶液으로 하였다. 檢量線의 作成은 HPLC 注入量을 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 및 25 μ l로 3回 反復 注入하여 얻어진 peak의 높이를 平均하여 計算하였다.



III. 結果 및 考察

標品 ABA와 각 試料의 HPLC에 의한 分離는 acetonitrile과 0.1M phosphate buffer를 1:2로 混合한 溶媒로 湧出시켜 chromatogram을 比較한 結果, retention time이 7.8分帶에서 同一하게 確認되었다(Fig. 2).

試料에서 抽出한 crude ABA를 定量하기 위하여 peak높이와 ABA 含量과의 關係를 調査한 結果, standard curve의 關係式은 $Y=4.7X - 4.2$ 이며, 相關係數가 0.99로 높은 相關을 보였다(Fig. 3).

溫州蜜柑 葉內 ABA 含量의 季節的인 變化를 알아보기 위하여 試料 1g當 ABA의 月別 含量을 分析한 結果, 1月에서 4月까지는 500ng 以下로 比較적 낮았고, 5月에는 898ng으로 增加하기 시작하여 7月에 2,261ng으로 가장 높았다. 또한 8月에는 358ng으로 급격히 減少하였고 9月부터 12月까지는 500ng 水準을 維持하였다(Fig. 4). 이러한 結果는 개암나무(*Corylus avellana* L.) 잎의 發達에 따른 Indoleacetic acid와 ABA 含量에 관한 研究에서 落葉이 되는 時期에 IAA 含量이 減少하는 반면, ABA 含量이 增加한다는 報告(Rodriguez et al., 1988) 및 Citrus屬 植物의 잎이 脫離가 6,7月에 일어난다는 報告(岩崎藤助, 1966)와 比較해 볼때, 本 實驗結果에서 常綠樹인 溫州蜜柑이 6月과 7月에 ABA 含量이 크게 增加하는 것으로 보아 이 時期에 脫離가 일어나는 것으로 思料된다.

꽃의 發達에 따른 ABA 含量은 花芽時가 334ng, 滿開前時가 239ng, 滿開時가 263ng, 그리고 落花時가 381ng으로 開花 후 ABA 含量이 增加하는 傾向을 보였고, 특히 꽃의 脫離되는 時期에 가장 含量이 많았다(Table 2).

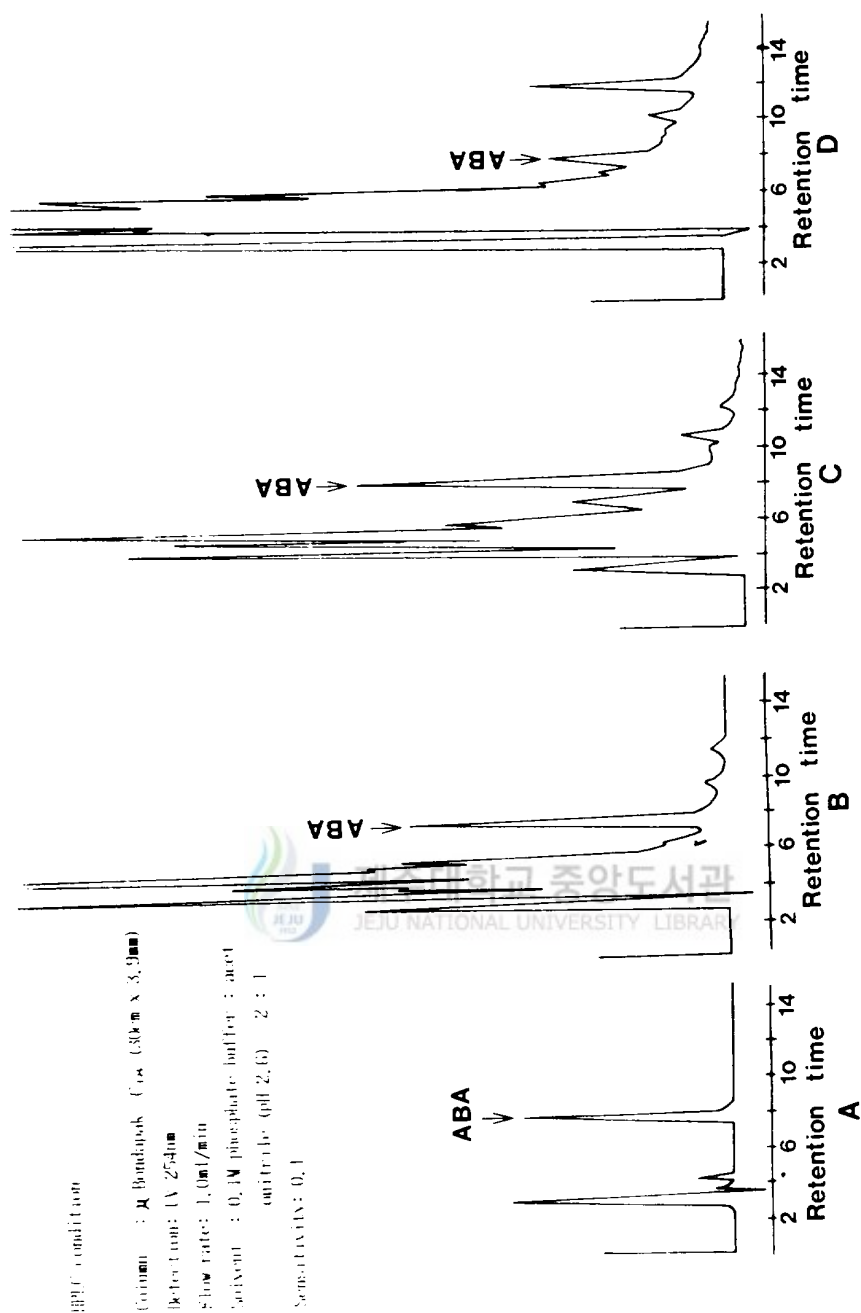


Fig. 2. Comparison of HPLC chromatogram of stand ABA and crude extract from *Citrus unshiu*.

A: standard ABA, B: fruit, C: leave, D: flower

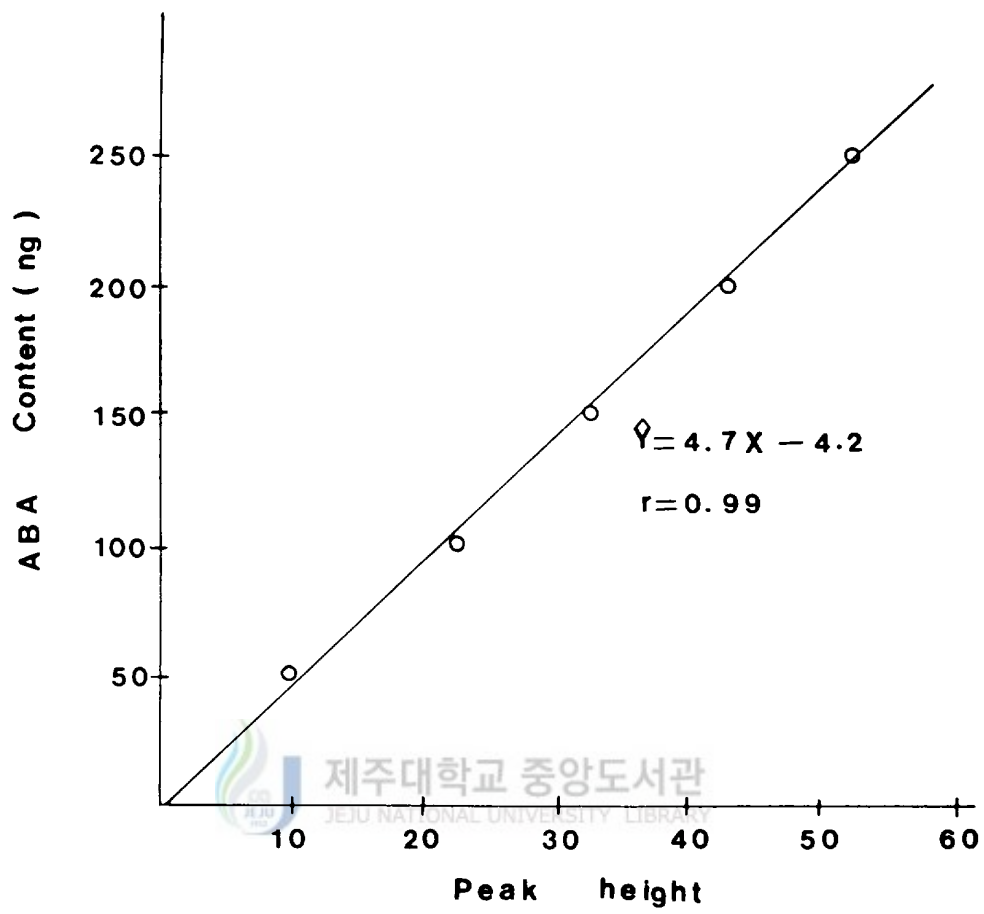


Fig.3. Standard curve for ABA quantitative analysis by HPLC.

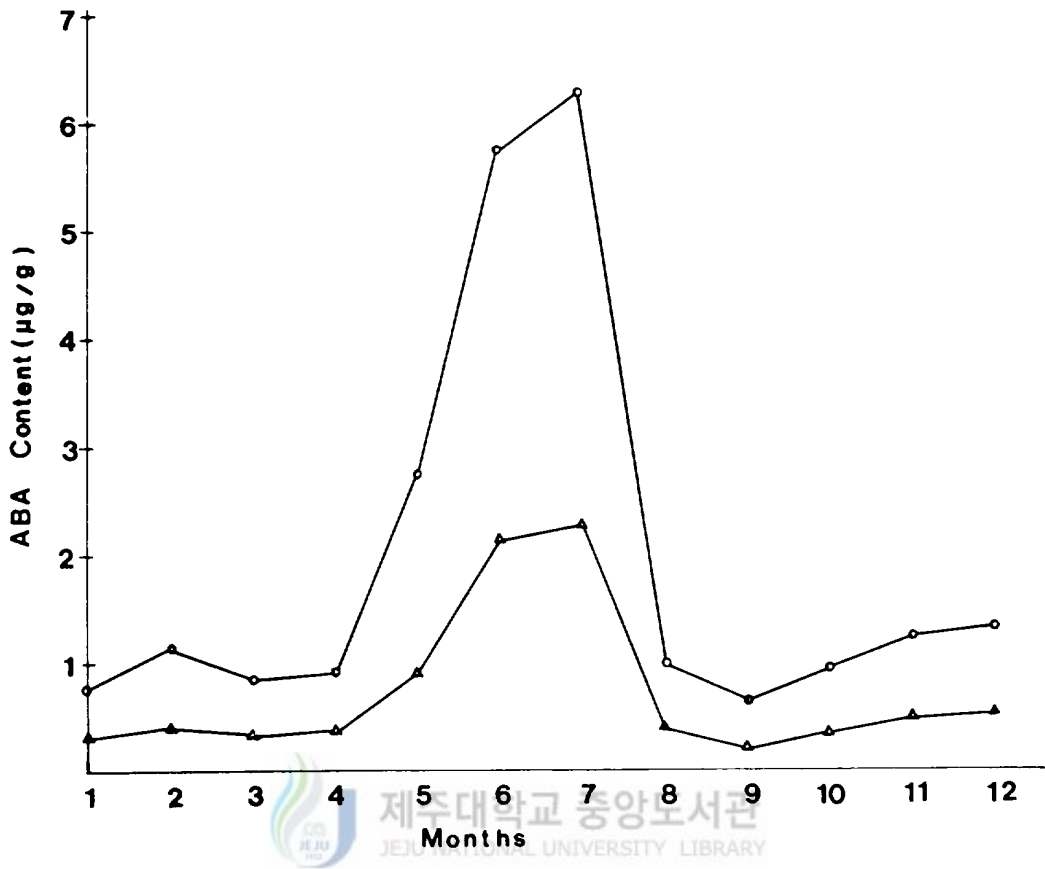


Fig.4. Changes of ABA in *Citrus unshiu* leaves from April 1989 to March 1990.
 Δ :Fresh weight, \circ :Dry weight

Table 2. ABA contents in the development of the *Citrus unshiu* flower
unit:ng/g

Stage	ABA content	
	Fresh weight	Dry weight
Bud	334	1,237
Before blooming	239	965
Blooming	263	1,143
Abscission	381	1,088

이러한 결과는 *C. sinensis* 꽃의 발달에 따른 ABA 함량에 관한 연구에서 꽃의脫離되는 時期에 ABA 함량이 가장 많다는 報告(Goldschmidt, 1980; Harris and Dugger, 1986)와 一致하였다. 한편, 花芽時에 ABA 함량이 多少 많은 原因은 本 實驗에서 究明하기가 어려워 追後 具體的인 檢討가 必要하다고 여겨진다.

잎의 脫離에 따른 試料 1g當 ABA 함량을 比較한 結果, 落葉直前 잎의 離層部位가 2,449ng으로 가장 많았고, 落葉 및 落葉直前 잎이 각각 1,086ng, 1,697ng으로 正常葉 358ng에 비하여 모두 함량이 높았다(Table 3). 이러한 結果는 大豆(*Glycine max* M.)에서 잎이 떨어지기 直前인 잎의 黃變되는 時期에 갑자기 ABA 함량이 增加하고(Samet and Sinclair, 1980), 꿀풀科의 植物인 *Coleus rehneltianus* 잎이 脫離直前에 IAA 함량이 減少하며 ABA 함량이 增加한다는 報告(Bottger, 1970)와 比較해 볼때 正常葉에 비하여 落葉에서 ABA 함량이 많고 落葉이 되기 直前에 ABA 함량이 最大가 되는 점이 本 實驗

결과와 一致하며 葉内 ABA가 잎의 老化 및 脫離에 크게 關與하는 것으로 思料된다. 또한 落葉이 落葉直前 前보다 ABA 含量이 적은 것은 잎이 떨어진 후, ABA가 多少 分解되어 버린 것으로 推測된다.

Table 3. ABA contents in *Citrus unshiu* leaves according to abscission
unit:ng/g

	ABA content	
	Fresh weight	Dry weight
Control	358	984
Abscission	1,086	2,549
Before abscission	1,697	3,788
Abscission zone	2,449	4,621

한편, *C. sinensis* 잎에 1mM의 ABA를 處理했을때 에틸렌 合成이 誘導되어 脫離가 일어나며 (Sagee *et al.*, 1980), 大豆(*G. max* M.) 잎에 200ppm의 ABA를 處理하면 잎의 脫離가 일어난다는 報告(Sloger and Caldwell, 1970)와 比較했을때 外生 ABA도 内生 ABA와 脫離에 있어서 生理的 作用이 同一한 것으로 思料된다.

果實의 脫離에 따른 ABA 含量은 落果直前 果實의 離層部位가 1,603ng으로 가장 많았고, 落果가 1,180ng, 落果直前果實이 1,462ng으로 正常果 193ng에 비하여 모두 含量이 높았다(Table 4). 이러한 結果는 木花(*G. hirsutum* L.)의 열매가 成熟함에 따라 ABA 含量이 增加하며, 脫離되는 時期에 含量이

Table 4. ABA contents in *Citrus unshiu* fruits according to abscission
unit:ng/g

	ABA content	
	Fresh weight	Dry weight
Control	193	742
Abscission	1,180	3,831
Before abscission	1,462	4,540
Abscission zone	1,603	4,715

가장 높다는 報告(Davis and Addicott, 1972)와 比較해 볼 때, 果實의 脫離되는 時期에 ABA 含量이 많은 점이 本 實驗結果와 一致하며 앞에서와 같이 果實의 脫離에도 ABA가 크게 關與하는 것으로 思料된다.

IV. 摘 要

溫州蜜柑(*Citrus unshiu* MARC.) 葉內 Abscisic acid(ABA) 含量的季節的變化 및 器官別 脫離에 따른 ABA 含量的 差를 HPLC로 分析한 結果는 다음과 같다.

1. 葉內 ABA 含量의 季節的 變化는 1-4월에 비교적 낮았으며, 7월에 가장 높은 반면 8월에 급격히 減少한 후, 12월까지 완만하게 增加하였다.
2. 꽃의 發達에 따른 ABA 含量의 變化는 開花 후 增加하는 傾向을 나타냈고, 특히 脫離되는 時期에 가장 많았다.
3. 잎과 과실의 脫離에 따른 ABA 含量은 脫離直前의 離層部位에서 가장 많았다.



References

- Ackerson, R. C. 1980. Stomatal response of cotton water stress and abscisic acid as affected by water stress history. *Plant Physiol.*, 65:455-459.
- Addicott, F. T. 1983. *Abscisic acid*. Praeger Press, New York. pp. 3-21.
- Anderson, J. M. 1985. Simultaneous determination of abscisic acid and jasmonic acid in plant extracts using high performance liquid chromatography. *J. of Chromatogra.*, 330:347-355.
- Bottger, M. 1970. Die hormonale regulation des blattfalls bei *Coleus rehmeltianus* Berger. *Planta*, 93:205-213.
- Budavari, S., A. Smith and P. E. Heckelman. 1989. The merck index. Merck & Co. Inc. p. 2.
- 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 plants. *Physiologia Planta.*, 75:131-136.
- Davis, L. A. and F. T. Addicott. 1972. Abscisic acid: correlations with abscission and with development in the cotton fruit. *Plant Physiol.*, 49:644-648.

- 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 dominance. *Plant Physiol.*, 70:648-652.
- Goldschmidt, E. E. 1980. Abscisic acid in citrus flower organs as related to floral development and function. *Plant and Cell Physiol.*, 21(1):193-195.
- Harris, M. J. and W. M. Dugger. 1986. Levels of free and conjugated abscisic acid in developing floral organs of the navel orange (*Citrus sinensis* L.). *Plant Physiol.*, 82:1164-1166.
- 許仁玉, 松本和夫, 近泉惚次郎, 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處理の影響. *園學要旨*. pp. 16-17.
- Jones, W. W., C. W. Coggins and T. W. Embleton. 1976. Endogenous abscisic acid in relation to bud growth in alternative bearing Valencia orange. *Plant Physiol.*, 58:681-682.
- 岩崎藤助. 1966. *カンキツ栽培法*. 朝倉書店. pp. 62-66.
- Ketter, J. and K. Dorffling. 1987. Abscisic acid metabolism *Ceratocystis coerulescens*. *Physiologia Planta.*, 69:278-282.
- 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 indole-3-

- acetic acid by high performance liquid chromatography. J. of Chromatogra., 357:399-408.
- Mielke, E. A. and F. G. Dennis. 1975. Hormonal control of flower bud dormancy in Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.). J. Amer. Soc. Hort. Sci., 100(3):285-287.
- Norman, S. M., R. D. Bennett, S. M. Poling, V. P. Maier, and M. D. Nelson. 1986. Paclobutrazol inhibits abscisic acid biosynthesis in *Cercospora rosicola*. Plant Physiol., 80:122-125.
- Ohkuma, K., F. T. Addicott, O. E. Smith, and W. E. Thiessen. 1965. The structure of abscisin II. Tetrahedron Lett., 29:2529-2535.
- Page-Degivry, M. T. L., A. Boillot, F. Loques and C. Bulard. 1987. 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.
- Rasmussen, G. K. 1974. Cellulase activity in separation zones of citrus fruit treated with abscisic acid under normal and hypobaric atmospheres. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 99:229-231.
- Rasmussen, G. K. 1975. Cellulase activity endogenous abscisic acid and ethylene in four citrus cultivars during maturation. Plant Physiol., 56:765-767.
- Rivier, L. and A. Crozier. 1987. Principles and practice of plant hormone analysis. Academic Press. pp. 111-167.
- Rodriguez, A., M. J. Canal and R. S. Tames. 1988. Indoleacetic

- acid, abscisic acid and phenolic substances during development of hazel leaves. *Physiologia Planta.*, 73:92-96.
- Sagee, O., R. Goren and J. Rivov. 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 field-grown soybean. *Plant Physiol.*, 59: 1164-1168.
- Sloger, C. and B. E. Caldwell. 1970. Response of cultivars of soybean to synthetic abscisic acid. *Plant Physiol.*, 46: 634-635.



謝 詞

本 論文을 完成하는데 있어 實驗設計에서 부터 論文作成에 이르기까지 指導와 鞭撻을 아끼시지 않으신 許仁玉 教授님께 먼저 깊은 感謝를 드립니다. 그리고 論文審査를 해주신 金文洪 教授님, 鄭忠德 教授님과 많은 가르침을 주신 吳文儒 教授님, 李龍弼 教授님, 吳德鐵 教授님, 金源澤 教授님, 李和子 教授님, 高碩贊 教授님, 金世宰 教授님께 感謝를 드립니다.

또한 實驗過程과 論文作成에 있어 助言과 激勵을 아끼지 않으신 高京秀 博士님께 깊은 感謝를 드리오며 植物生理學實驗室 학형들에게도 고마운 마음을 전합니다.

끝으로 한없는 사랑으로 저를 보살펴 주신 부모님과 동생들에게 感謝드리며 이 조그마한 結實을 바칩니다.

