

석사학위논문

식물의 Ecdysteroid 함량에  
영향을 주는 요인



제주대학교 중앙도서관  
제주대학교 대학원 LIBRARY

농화학과

채 현 병

1999년 12월

# 식물의 Ecdysteroid 함량에 영향을 주는 요인

지도교수 류 기 중  
채 현 병

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

1999년 12월



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

채현병의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	인
위 원	인
위 원	인

제주대학교 대학원

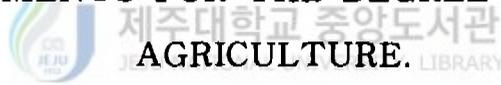
1999년 12월

# Factors Affecting Ecdysteroid Contents in Plants

Hyun-Byung Chae

(Supervised by Professor Key-Zung Riu)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF  
AGRICULTURE.



DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1999. 12

# 목 차

## Summary

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 재료	3
1. 1. 식물시료	3
1. 2. 기구	3
1. 3. 표준품 및 시약	3
2. 방법	4
2. 1. Auxin, cytokinin, methyl jasmonate, 광 처리	4
2. 2. Ecdysteroid 동정 및 정량	4
III. 결과 및 고찰	7
1. 나사미역고사리 및 쇠무릎 중의 ecdysteroid 종류	7
2. 식물체의 ecdysteroid 함량에 미치는 auxin의 영향	12
3. 식물체의 ecdysteroid 함량에 미치는 cytokinin의 영향	14
4. 식물체의 ecdysteroid 함량에 미치는 methyl jasmonate의 영향	16
5. 식물체의 ecdysteroid 함량에 미치는 광도의 영향	17
6. 쇠무릎 발아유묘의 조직부위별 ecdysteroid 함량	23
7. 개화기 쇠무릎의 조직부위별 ecdysteroid 함량	24
IV. 요약	27
V. 참고문헌	28

## Summary

Effects of auxin, cytokinin, jasmonate and light on ecdysteroid contents were investigated in *Polypodium fauriei* L. and *Achyranthes japonica* Nakai, and distribution in each tissue and change with developmental stage of ecdysteroids were studied in *A. japonica*.

1.  $\beta$ -Ecdysone and polypodine B were identified in both *P. fauriei* and *A. japonica*. The major ecdysteroid in these plants was  $\beta$ -ecdysone.

2. Addition of cytokinin and methyl jasmonate in the culture medium increased ecdysteroid contents in both of the plants *P. fauriei* and *A. japonica* whereas auxin did not.

3. The ecdysteroid content of *P. fauriei* was increased when the plant cultured with decreased light intensity. The degree of change in ecdysteroid content was higher in leaf than in root. The ecdysteroid concentration was decreased in the plantlet of *A. japonica* grown in dark whereas increased in the plantlet grown in light. However, the total amounts of ecdysteroid per plant were remained nearly constant in both cases over the 7 weeks of culture period.

4. Roots, stems and leaves of seedling of *A. japonica* which were germinated from seeds contained different levels of ecdysteroid. The highest level of ecdysteroid was observed in root. The ecdysteroid level in leaf was changed with age, young leaf contained more ecdysteroid compared to old one.

5. There were also big difference in the level of ecdysteroid content among the tissue parts of *A. japonica* at flowering stage. The seed and funiculus showed highest level of ecdysteroid content. The ecdysteroid level in funiculus was decreased with maturing whereas that in seed was increased.



# I. 서론

Ecdysteroid는 곤충의 탈피를 촉진하는 활성을 가지고 있어서 곤충탈피호르몬(insect moulting hormone)으로 불리고 있으며(Fukuda, 1944), 이들 중 처음으로 알려진 것은  $\alpha$ -ecdysone으로 1953년 Butenandt와 Karlson 등이 누에의 유충으로부터 단리하였다. 그 후 누에 번데기에서  $\alpha$ -ecdysone보다 활성이 큰  $\beta$ -ecdysone이 단리되었다(Hocks et al., 1953; Nakanishi et al., 1970). 그 후 ecdysone과 유사한 구조와 활성을 가진 많은 steroid 화합물이 알려져 ecdysteroid로 불리고 있는데, ecdysteroid는 steroid핵에 cholest-7-en-6-one이라는 구조적 특징을 가지며 3, 14, 22번 탄소에 공통적으로 수산기를 가지고 있다.

Ecdysteroid는 곤충뿐만 아니라 식물에서도 발견되는데, 그 함량은 곤충보다 훨씬 많은 것으로 알려져 있다(Chou & Lu, 1980). 식물유래의 곤충탈피호르몬(phytoecdysteroid)은 1960년대 후반부터 연구되었으며, Imai 등(1969)은 186과 738속 1056종의 식물에 대한 체계적 분석을 통해 양치 식물에서 봉작고사리, 뱀고사리 등 양치식물의 3과 14속 24종과 주목, 죽백나무, 비자나무, 으름, 비름, 쇠무릎, 백합과의 *Trillium Smalli*, 석죽과의 *Lychnis Miqueliana*, 나한송, 금창초, 국화 등 고등식물의 15과 20속 30종에 ecdysteroid가 들어 있음을 확인하였다.

식물계에서 발견되는 ecdysteroid는 100여 가지 이상이 알려져 있는데, 기본 골격을 이루는 탄소 수에 따라 C<sub>19</sub>, C<sub>21</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>29</sub> 형이 있는데 C<sub>19</sub> steroid는 poststerone, C<sub>21</sub> steroid는 rubrosterone, C<sub>27</sub> steroid는  $\alpha$ -ecdysone,  $\beta$ -ecdysone, ponasteron A, ponasteron B, polypodine B, pterosteron, inokosteron 등이 있고, C<sub>28</sub> steroid로는 makisteron A, makisteron B 등이 있으며, C<sub>29</sub> steroid로는 makisteron C, cyasterone, ajugasterone 등이 있다. 식물계에서 흔히 함유되어 것은 polypodine B, 22-deoxy-20-hydroxyecdysone,  $\beta$ -ecdysone, integristerone인데 이 중에서도  $\beta$ -ecdysone이 가장 많이 발견되고 있다(Lafont & Horn, 1989).

곤충에 대한 활성뿐만 아니라 근래 포유동물에 대한 ecdysteroid의 약리활성이 보고됨(Mosharrof, 1987; Pifferi, 1990; Ibatov, 1995)에 따라 ecdysteroid의 활용분야가 확대될 전망이어서 ecdysteroid의 대량생산에 관심이 모아지고 있다. Ecdysteroid는 비록 유기합성 방법(Kerb et al., 1996; Furlenmeier et al., 1967; Edwards et al., 1968; Kametani et al., 1980)이 확립되어 있으나 합성비용이 많이 들기 때문에 생물자원 특히 식물자원으로부터 분리정제 하는 것이 경제적이다. 그래서 근래 식물계에서의 분포(Warren et al., 1988; Meszaros & Morton, 1994; Grau and Lafont, 1994), 생합성(Grieneisen, 1994) 등 ecdysteroid의 대량생산과 관련된 연구가 활발해지고 있다.

식물체 중의 ecdysteroid 함량은 식물종류나 조직부위에 따라 차이가 있고 (Grebenok & Adler, 1991), 식물생장조절제의 처리에 의해서도 달라지는 것으로 알려져 있다(Camps et al., 1990; Schmelz et al., 1998). 이 연구는 ecdysteroid를 다량 함유하고 있는 것으로 알려져 있는 나사미역고사리(*Polypodium fauriei* L.)와 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai)에 들어있는 ecdysteroid의 종류를 확인하고 식물생장조절제인 auxin, cytokinin, methyl jasmonate 처리와 광 처리가 이들 식물체의 ecdysteroid 함량에 미치는 영향과 식물의 조직부위별 ecdysteroid 함량 변화를 조사함으로써 ecdysteroid의 대량생산이나, 생합성 관련 유전자 클로닝 및 생합성 경로 연구에 기본이 되는 자료를 제공하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1.1. 식물시료

제주도에 자생하고 있는 나사미역고사리(*Polypodium fauriei* L.)와 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai)을 각각 1999년도에 자생지에서 채취하여 사용하였다.

#### 1.2. 기구

식물시료의 균질화에 사용된 Blender로는 Cutting mill (boo-il co., Korea), 시료전처리에는 Centrifuge (Beckman, U.S.A.), Ultrasonic cleaner (Branson, U.S.A.), Vacuum manifold (Restek co., U.S.A.), Vacuum rotary evaporator (Buchi Labortechnik AG., Switzerland) 그리고 ecdysteroid 화합물의 분리와 정량에는 high performance liquid chromatography(Thermo Separation Products, Inc., U.S.A.)를 사용하였다(Table 1).

#### 1.3. 표준품 및 시약

Ecdysteroid 표준품으로는 Sigma사의  $\alpha$ -ecdysone,  $\beta$ -ecdysone, polypodine B를 사용하였고, 식물생장조절제 처리에는 Sigma사의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), benzylaminopurine(BA), methyl jasmonate, thidiazuron를 사용하였다. 20, 22-diol형 ecdysteroid 정제에 PBA cartridge를 사용하였는데 Varian사의 'Bond Elut LRC'(bonded phase-phenyl boronic를 silica에 화학결합 시킨 형)를 사용하였고, 기타 시약은 모두 HPLC grade를 사용하였다. PBA cartridge 고정상 용출액으로 사용된 산성완충용액은 boric acid 200 mM과 lactic acid 5% (w/v)를 포함하는 70% (v/v) methanol 수용액이었으며, 염기성완충용액은 glycine 100 mM 수용액을 1.0N NaOH로 pH를 8.2로 조정된 용액을 사용하였다.

## 2. 방법

### 2.1. Auxin, cytokinin, methyl jasmonate, 광 처리

Auxin으로는 2,4-D 그리고 cytokinin으로는 BA를 1N NaOH에 녹여 200 mg/L 농도의 stock solution 만들었고, thidiazurone은 소량의 methanol에 녹여 물로 희석하여 20 mg/L stock solution을 만들었으며 methyl jasmonate는 1% tween 80에 유화시켜 10  $\mu$ M stock solution을 만들어 사용하였다. Sucrose 5%, agar 0.8%를 포함하는 MS기본배지(Collin et al., 1998)에 각 성장조절물질의 stock solution을 일정한 농도가 되도록 첨가하여 배지를 만들고 나사미역고사리 전엽체와 쇠무를 종자를 치상하여 26°C에서 배양하였다.

광처리는 투광율이 90%인 폴리에틸렌 흑색 차광막(한국농경)을 사용하여 수광 정도를 조절하고, 조도계로 각각의 조도를 측정된 후 노지를 기준으로 상대광도 35.4, 18.6, 1.63, 0.11, 0.01%의 광조건에서 나사미역고사리를 재배하였다. 그리고 시료 채취는 잎과 뿌리를 구분하여 채취하였다. 쇠무를 종자를 파종하여 암처리구의 경우는 완전히 밀봉처리하였고, 명처리구는 자연광을 수광할 수 있도록 노출처리하였다. 시료 채취는 종자 파종 후 1주일 간격으로 7주간 실시하였다.

### 2.2. Ecdysteroid 동정 및 정량

Ecdysteroid의 동정 및 정량을 위하여 다음과 같이 식물체 시료를 methanol로 추출한 후 정제과정을 거쳐 HPLC로 분석하였다. 식물체는 채취 후 마쇄하고 폴리에틸렌 시료병에 넣어 냉동보관하며 사용하였다. 마쇄한 시료 100 mg에 10 ml methanol을 가하여 원심분리(2,500rpm×5min)한 후 Advantech Toyo 5C여지( $\varnothing$ 47mm)로 여과하였다. 여과잔사를 등량의 methanol로 2회 더 추출하고 추출액의 최종부피를 methanol을 가하여 50 ml로 맞춘 후 분액여두에 옮겼다. Hexane 50 ml로 3회 분배 정제한 후 methanol층을 농축수기에 모아 220 mbar (50°C 이하)의 조건에서 메탄올을 유거시키고, 100 mbar진공에서 시료 중에 포함되어 있는 잔류수분 등을 모두 유거시켰다.

정제를 위해 감압건고한 농축수기에 염기성완충용액을 5 ml 가하여 초음파 처리하면서 완전히 내용물을 용해시킨 후 0.45  $\mu\text{m}$  Acrodisc LC PVDF(Gelman,  $\text{\O}30$  mm )로 여과하였다. 여과액을 정확히 3 ml 취하여 미리 methanol 5 ml를 흘려 활성화시킨 PBA카트리지에 분당 1 ml의 유속이 되도록 흘려 넣었다. 계속하여 메탄올 5 ml로 용출시켜 회수하여  $\alpha$ -ecdysone 시험용 검액으로 하였다. 다시 PBA cartridge에 산성완충용액 5 ml를 보내어  $\beta$ -ecdysone, polypodine B분석용 검액으로 하였다.

검량선 작성 및 정량을 위하여  $\alpha$ -ecdysone,  $\beta$ -ecdysone, polypodine B 표준품 일정량을 methanol에 녹여 각각 50, 100, 50 mg/L 농도의 stock solution을 조제하였다.  $\alpha$ -ecdysone을 일정배율로 희석하여 mobile phase I 그리고  $\beta$ -ecdysone, polypodine B 혼합표준용액을 제조하고 일정배율로 희석하여 mobile phase II에서 얻어진 chromatogram peak의 area를 기준으로 검량선을 작성하였다. 시료추출 및 정제과정에서 얻은 검액 20  $\mu\text{l}$ 를 HPLC에 주입하여 얻은 chromatogram의 peak area에 따른 농도를 산출하였다. 이 때의 HPLC조건은 Table 1과 같다.



Table 1. Analytical conditions for RP-HPLC.

Pump	Spectra Physics (TSP), P-2000			
Detector	Spectra Physics (TSP), UV-1000			
Column	Phenomenex Prodigy C-18 100A (4.6 mm × 300 mm i.d., particle size 5 μm)			
Integrator	S/W : FLO-ONE FOR WINDOWS (VER 3.60), Packard.			
Injector	Rheodyne injector, 20 μl loop			
Mobile phase I	time (min)	water (%)	methanol (%)	flow rate (ml/min)
	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
Mobile phase II	15% 2-propanol / 85% water (v/v), flow rate (0.8 ml/min)			
Other condition	<ul style="list-style-type: none"> <li>- solvent profile : linear</li> <li>- equilibration time : 3.0min.</li> <li>- wavelength : UV243nm</li> <li>- run time : 40.0min.</li> <li>- column temperature : ambient</li> </ul>			

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 나사미역고사리 및 쇠무릎 중의 ecdysteroid 종류.

식물체에 흔히 발견되는 ecdysteroids는 polypodine B, 22-deoxy-20-hydroxyecdysone,  $\beta$ -ecdysone, integristerone인데 이중에서  $\beta$ -ecdysone이 주성분으로 알려져 있다(Latont & Horn, 1989). 본 실험에서는 상업적으로 시판되고 있는  $\alpha$ -ecdysone,  $\beta$ -ecdysone, polypodine B를 표준품으로 사용하여 HPLC에 의해 나사미역고사리와 쇠무릎에 들어 있는 ecdysteroid를 동정하였다(Fig. 1).

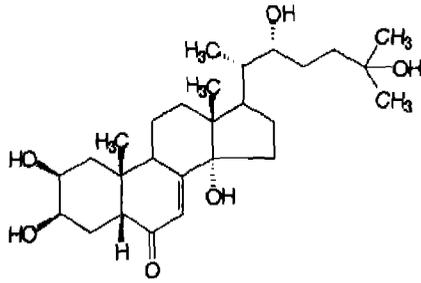
HPLC로 ecdysteroid 화합물을 분리할 때 이동상으로 methanol-water 용매계를 이용하는 경우 polypodine B와  $\beta$ -ecdysone는 분리되지 않고 같은 retention time을 갖는 것으로 보고되어 있다(Rober et al, 1994). 그런데 Camps 등(1990)이 polypodine B와  $\beta$ -ecdysone 양자는 2-propanol - water 용매계를 사용하여 분리할 수 있는 것으로 보고하였다. 그래서 본 실험에서는 나사미역고사리와 쇠무릎에서 ecdysteroid 동정 및 정량을 위해 두 가지 이동상을 사용하였다(Table 1).

Ecdysteroid의 동정 및 정량을 위한 전처리과정 중 나사미역고사리와 쇠무릎 식물체의 methanol 추출물에 이물질이 많이 존재하여 정제과정에 PBA 카트리지를 사용하였다. 표준품으로 사용된  $\alpha$ -ecdysone,  $\beta$ -ecdysone, polypodine B 중 탄소 20, 22위치에 수산기를 가진 polypodine B와  $\beta$ -ecdysone는 PBA 카트리지(bonded phase-phenyl boronic을 silica에 화학 결합시킨 형)에서 ester결합을 하고 있다가 산성 완충액에 의해 용출되었고, 탄소 20위치에 수산기가 없는  $\alpha$ -ecdysone은 methanol에 용리되었다. 각각의 용매를 분획으로 받아 농축하여 ecdysteroid 동정 및 정량을 위한 검액으로 사용하였다.

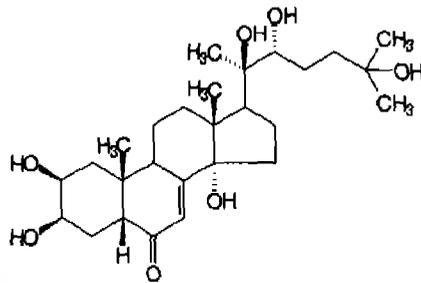
쇠무릎의 methanol 추출물을 PBA 카트리지로 정제했을 때 산성 완충액에 의해 용출되는 분획을 Mobile phase II(2-propanol - water, isocratic)로 분리했을 때, retention time 18.20 min의 polypodine B와 retention time 21.50 min의  $\beta$ -ecdysone이 검출되었다(Fig. 2). Peak의 크기로 보아 쇠무릎 중에는  $\beta$ -ecdysone이 주성분이고 polypodine B는 미량으로 존재하는 것으로 나타났다.

자료는 제시하지 않았지만 HPLC 분석결과 나사미역고사리 전엽체도 쇠무릎과 마찬가지로  $\beta$ -ecdysone이 주성분이었고 polygodine B는 미량이 함유되어 있는 것으로 나타났다. Galbraith 등(1996)은 의하면 시금치에  $\alpha$ -ecdysone이 존재하며, cytochrome p450에 의해서  $\beta$ -ecdysone으로 전환되는 것으로 보고하였다. Fig. 2.에서 보는 바와 같이 나사미역고사리와 쇠무릎 모두에  $\beta$ -ecdysone이 다량 검출되었기 때문에 이들 식물에서 전구체인  $\alpha$ -ecdysone이 있을 것으로 추정되어 나사미역고사리와 쇠무릎에서  $\alpha$ -ecdysone의 존재유무를 확인해 보았다. Mobile phase I (methanol-water, gradient)으로  $\alpha$ -ecdysone 표준용액과 PBA 카트리지에서 methanol로 용출된 검액을 분석하였다.  $\alpha$ -ecdysone 10 ppm 표준용액의 retention time은 22.10 min 이었으나, methanol fraction을 3배 농축하여 얻은 검액의 chromatogram에서는 같은 retention time을 갖는 peak가 없었다. 이 검액에 표준용액을 첨가하여  $\alpha$ -ecdysone의 존재 유무를 확인하였으나, Fig. 3에 나타난 바와 같이 쇠무릎에는  $\alpha$ -ecdysone이 없는 것으로 나타났다. 쇠무릎에서와 마찬가지로 나사미역고사리 전엽체를 분석한 결과  $\alpha$ -ecdysone은 검출되지 않았다(자료를 제시하지 않았음).

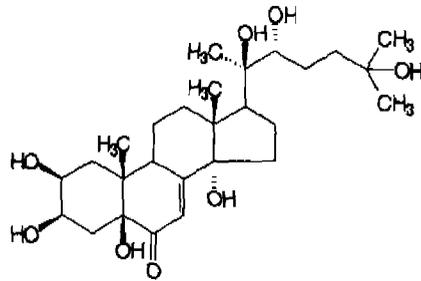




$\alpha$ -ecdysone (ecdysone)



$\beta$ -ecdysone (20-hydroxyecdysone)



polypodine B

Fig. 1. Chemical structures of three typical ecdysteroids

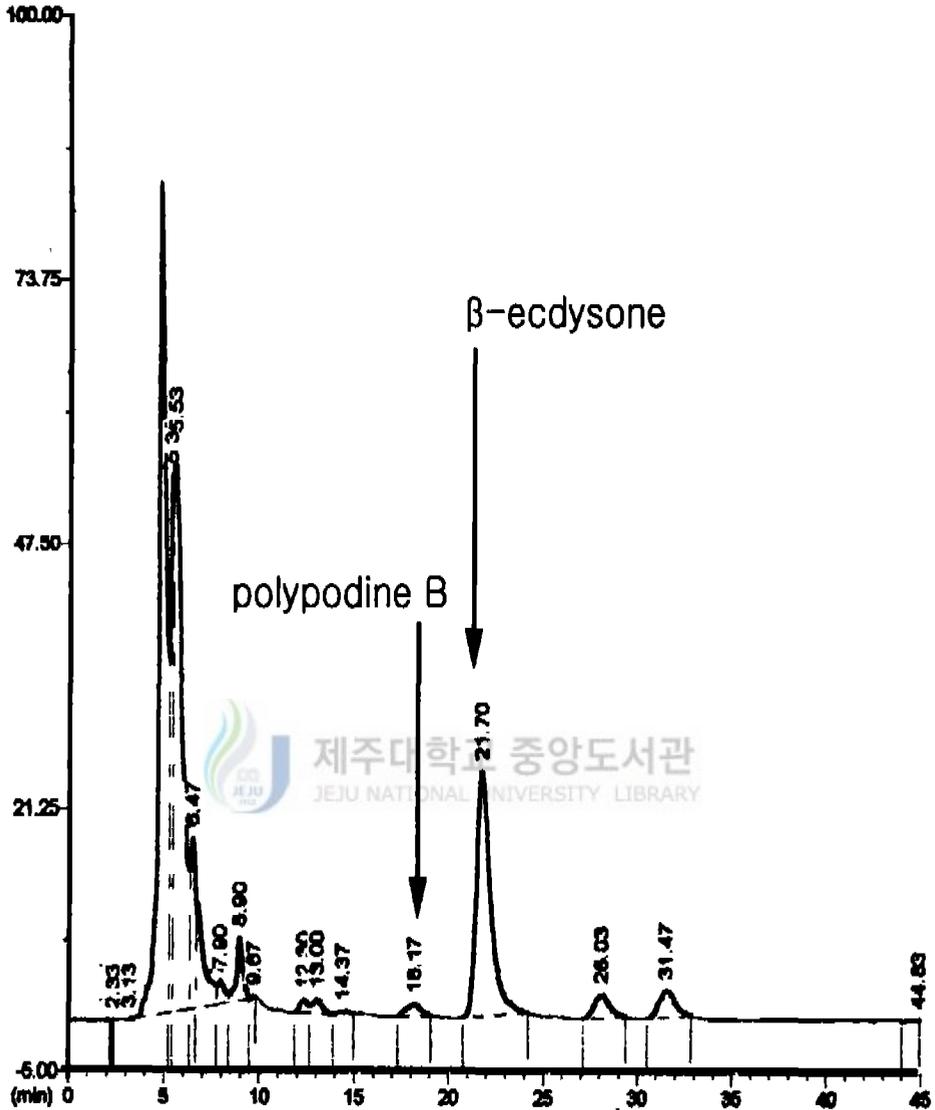
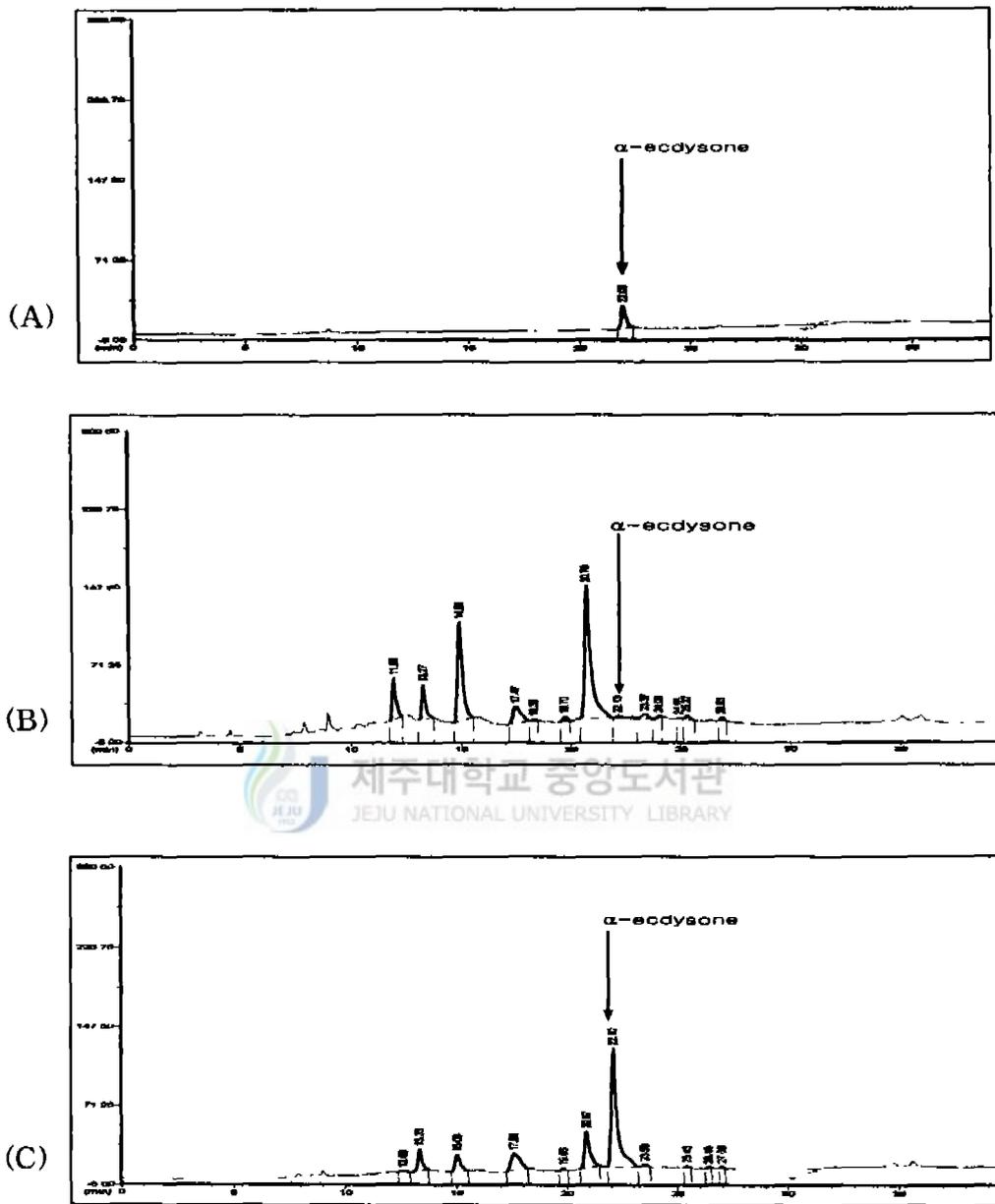


Fig. 2. The HPLC chromatogram of the ecdysteroids fraction of *A. japonica* which is obtained by eluting methanol extract through PBA cartridge with acidic buffer.



**Fig. 3. The chromatograms of methanol extracts from *A. japonica***

(A) Standard solution of  $\alpha$ -ecdysone(10ppm).

(B) Methanol fraction from PBA cartridge.

(C) Addition of 50ppm  $\alpha$ -ecdysone to (B) solution.

## 2. 식물체의 ecdysteroid 함량에 미치는 auxin의 영향.

나사미역고사리와 쇠무릎 중의 ecdysteroid 함량에 미치는 auxin의 영향을 조사하기 위하여 MS기본배지에 auxin의 하나인 2,4-D를 0, 10, 30, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  되도록 첨가하고, 나사미역고사리 전엽체와 쇠무릎 종자를 치상한 후 3주간 배양한 결과 나사미역고사리 전엽체에서는 2,4-D 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 농도가 증가할수록 다소 감소하는 경향을 보였으나 무처리구의 편차범위 안에 들어 실질적인 ecdysteroid 함량 변화는 없는 것으로 나타났다(Fig. 4). 쇠무릎에서도 배지중의 2,4-D의 농도가 달라도 식물체중의 ecdysteroid 함량 차이를 보이지 않았다(Fig. 5). 본 실험결과와 유사하게 Camps 등 (1990)도 미역고사리 전엽체에 2,4-D를 0, 0.3, 1, 3, 10, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  되도록 처리한 결과 미역고사리 전엽체의 ecdysteroid 함량에 영향을 주지 않는 것으로 보고하였다.

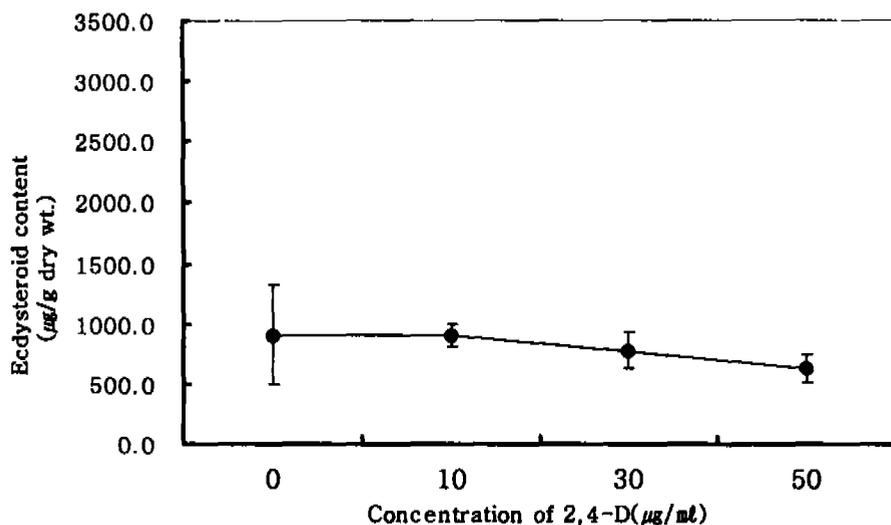


Fig. 4. Change of ecdysteroid content in the prothallis of *P. fauriei* with increase of 2,4-D level in the culture medium.

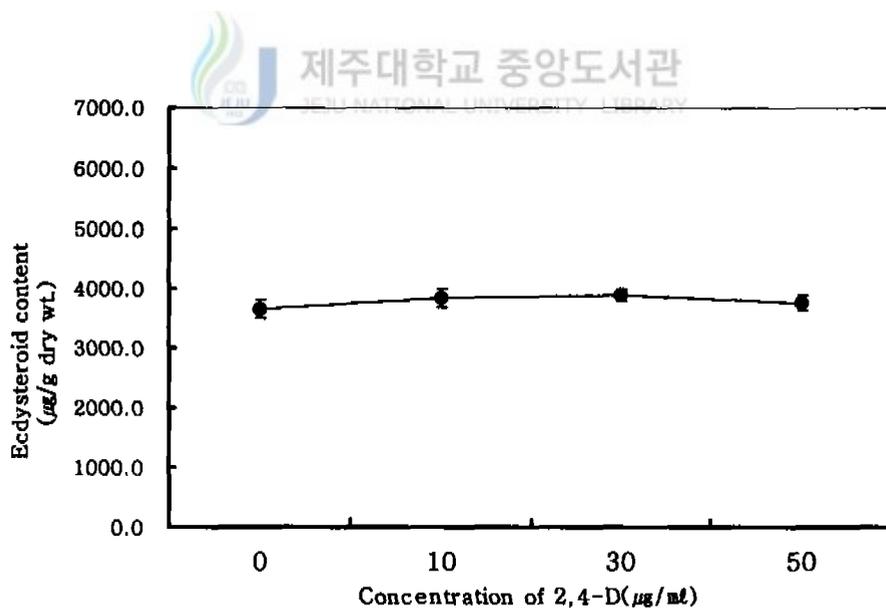


Fig. 5. Change of ecdysteroid content in the root of *A. japonica* with increase of 2,4-D level in the culture medium.

### 3. 식물체의 ecdysteroid 함량에 미치는 cytokinin의 영향.

나사미역고사리의 ecdysteroid 함량에 미치는 cytokinin의 영향을 조사하기 위하여 MS기본배지에 cytokinin의 하나인 BA를 0, 10, 30, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  되도록 처리하고, 나사미역고사리 전엽체를 치상한 후 3주간 배양하여 식물체의 ecdysteroid 함량을 조사하였다. 그 결과 무처리구에서 ecdysteroid 함량이 909  $\mu\text{g}/\text{g}(\text{dry wt.})$ 이었으며 BA처리농도 증가에 따라 ecdysteroid 함량이 증가하였다. BA 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리구에서 ecdysteroid 함량이 3,141  $\mu\text{g}/\text{g}$ 으로 무처리구에 비해 3배정도 함량이 증가하였다(Fig. 6).

쇠무릎의 ecdysteroid 함량에 미치는 cytokinin의 영향을 조사하기 위하여 MS 기본배지에 cytokinin의 하나인 thidiazuron을 0, 50, 100, 150, 200 ppb 되도록 처리하고, 쇠무릎 종자를 치상한 후 3주간 배양하고 식물체의 ecdysteroid를 분석하였다. 그 결과 무처리구의 ecdysteroid 함량이 3,666  $\mu\text{g}/\text{g}(\text{dry wt.})$ 에서 thidiazuron 150 ppb 처리구의 함량이 5,624  $\mu\text{g}/\text{g}$ 으로 증가하였다가 200 ppb 처리구의 함량이 5,493  $\mu\text{g}/\text{g}$ 으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 7). Thidiazuron을 처리한 쇠무릎의 경우 150 ppb까지 증가하였고, 200 ppb에서는 오히려 감소하였다.

본 실험에서 나사미역고사리, 쇠무릎 모두 cytokinin 처리에 의해 ecdysteroid 함량이 증가하는 것으로 나타났는데 Camps 등 (1990)도 미역고사리 전엽체에 cytokinin에 하나인 BA를 0, 0.3, 1, 3, 10, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  되도록 처리한 결과 BA처리 농도가 증가할 수록 ecdysteroid 함량이 증가한 것으로 보고하였다.

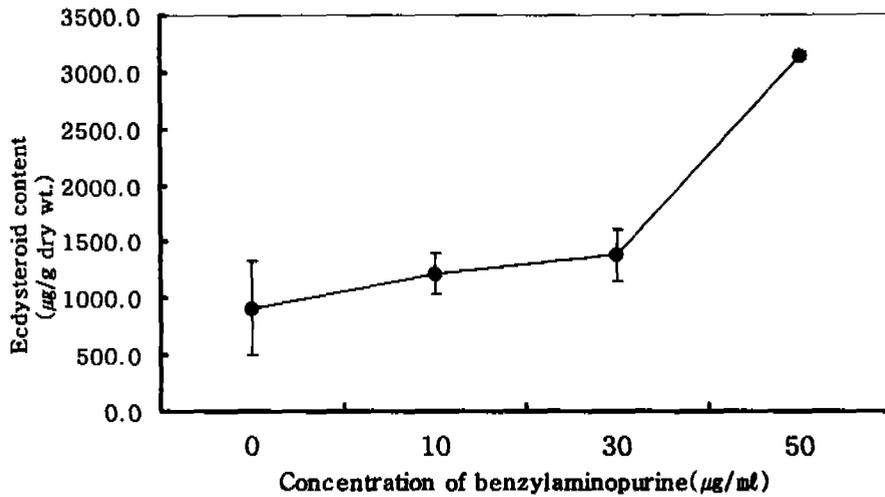


Fig. 6. Change of ecdysteroid content in the prothallis of *P. fauriei* with increase of benzylaminopurine level in the culture medium.

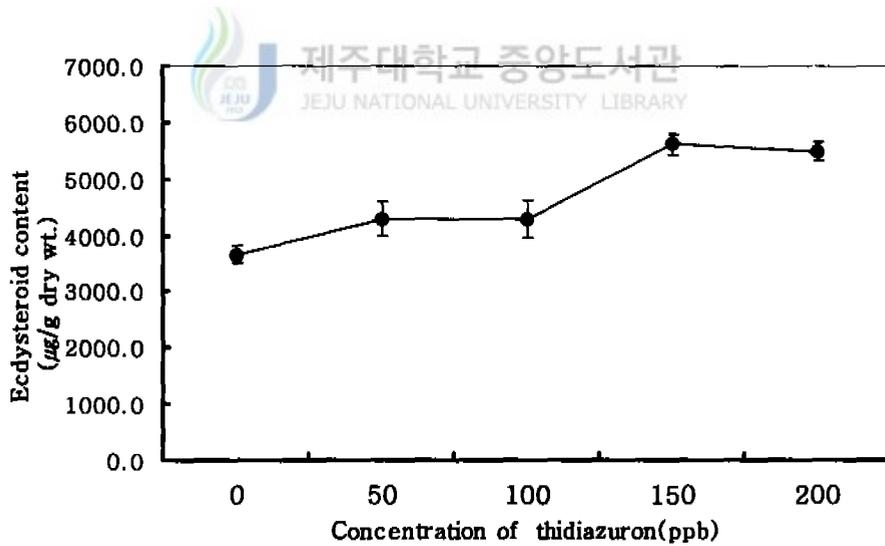


Fig. 7. Change of ecdysteroid content in the *A. japonica*. with increase of thidiazurone level in the culture medium.

#### 4. 식물체의 ecdysteroid 함량에 미치는 methyl jasmonate의 영향.

나사미역고사리와 쇠무릎 중 ecdysteroid 함량에 미치는 methyl jasmonate의 영향을 알아보기 위하여 MS기본배지에 methyl jasmonate를 0, 56, 112, 224, 448 nM이 되도록 처리하고, 나사미역고사리 전엽체와 쇠무릎 종자를 치상한 후 3주간 배양하였다. 식물체 분석결과 나사미역고사리 전엽체의 무처리구에서는 ecdysteroid 함량이 평균 909  $\mu\text{g/g}$ (dry wt.)이었으며, Methyl jasmonate 처리농도 증가함에 따라 ecdysteroid 함량 또한 증가하였으며 448 nM 처리하였을 때 2,626  $\mu\text{g/g}$ 으로 4배정도 함량이 증가하였다(Fig. 8). 쇠무릎의 경우 무처리구의 ecdysteroid 함량이 3,661  $\mu\text{g/g}$ (dry wt.)이었으며, methyl jasmonate를 56nM 처리하였을 때 5,505  $\mu\text{g/g}$ 으로 2배정도 증가하였으나, methyl jasmonate 처리농도가 그 이상 증가하면 식물체 중의 ecdysteroid 함량은 오히려 감소하여 224nM 처리하였을 때 4,719  $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다(Fig. 9).

Schmelz 등(1998)도 본 실험결과와 유사하게 시금치에 methyl jasmonate 처리하여 ecdysteroid 함량을 확인한 결과 잎, 지상부 전체에는 영향을 주지 않았고, 뿌리에서는 ecdysteroid 함량을 증가시켰으나, 뿌리에 일정농도 처리까지는 증가 요인으로 작용하고 그 이후부터 ecdysteroid 함량 변화에 영향을 주지 않는 것으로 보고하였다.

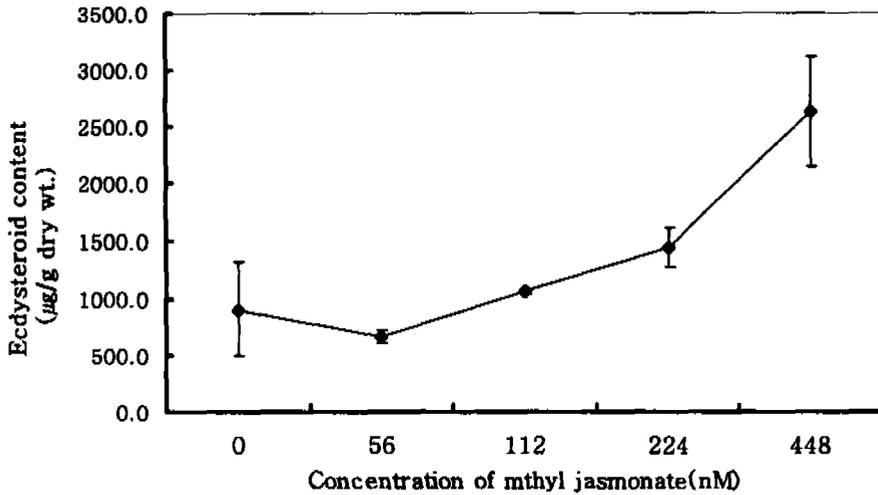


Fig. 8. Change of ecdysteroid content in the prothallis of *P. fauriei* with increase of methyl jasmonate level in the culture medium.

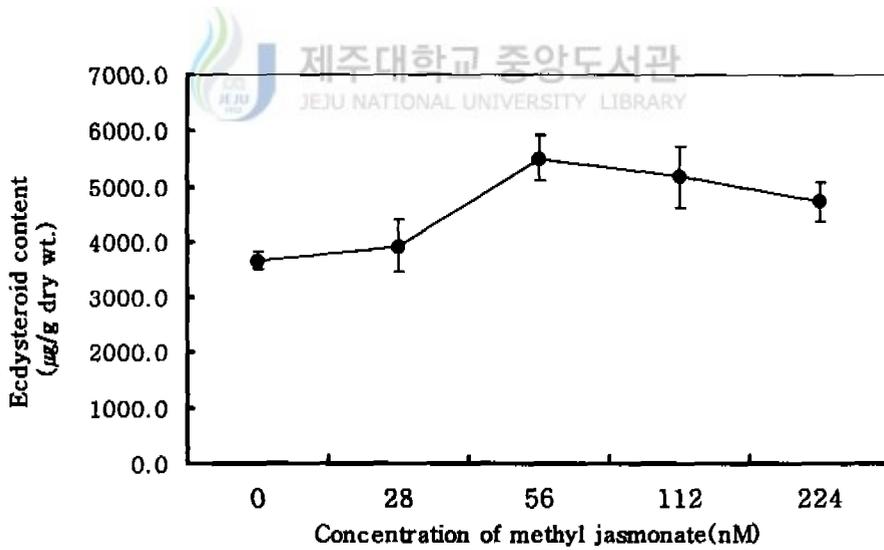


Fig. 9. Change of ecdysteroid content in the *A. japonica* with increase of methyl jasmonate level in the culture medium.

## 5. 식물체의 ecdysteroid 함량에 미치는 광도의 영향.

나사미역고사리를 90% 폴리에틸렌 흑색 차광막을 사용하여 광 처리한 결과 식물체의 생육은 수광량이 적을수록 양호한 경향을 보였는데 노지를 기준으로 상대광도 35.4, 18.6, 1.63, 0.11, 0.01 %의 광 조건 중에서 0.11 % 일 때 가장 양호하였다.

식물조직내 ecdysteroid의 함량은 광도에 따라 큰 차이를 보였는데, 광도가 낮을수록  $\beta$ -ecdysone 및 polypodine B의 함량 모두 높아지는 경향을 보였다. 광도의 저하에 따라 ecdysteroid 함량이 증가하는 비율은 식물의 잎보다 뿌리에서 크게 나타났다(Fig 10, 11). 상대광도 35.4%에서 자란 나사미역고사리 잎의 ecdysteroid 총량( $\beta$ -ecdysone + polypodine B)이 222  $\mu\text{g/g}$  (dry wt.)인데 비해 상대광도 0.11 %에서 자란 나사미역고사리 잎의 ecdysteroid 총량은 1,112  $\mu\text{g/g}$  (dry wt.)으로 5배 이상 함량이 높게 나타났다.

광도가 낮을 때 나사미역고사리 중 ecdysteroid 함량이 증가한 것은 polypodine B의 증가보다는 주로  $\beta$ -ecdysone이 많아진 결과였다(Fig. 12, 13). 나사미역고사리중 polypodine B는 잎에서 222 ~ 1,123  $\mu\text{g/g}$  (dry wt.), 뿌리에서 1,180 ~ 2,046  $\mu\text{g/g}$  (dry wt.)의 분포를 보였다. 그 분포량을 조직중 전체 ecdysteroid 총량에 대한 비율로 최저 8.56%(광 조건 35.4%의 root)에서 최고 41.4%(광 조건 35.4%의 leaf)로 조사되었다.  $\beta$ -ecdysone의 함량변화에 따라 polypodine B의 함량도 비슷한 비율로 증가, 감소하는 경향을 보였다. Camps 등(1990)은 *P. vulgare*의 전엽체에서 polypodine B의 경우 건조물을 기준으로 할 때 0.03 ~ 0.1%범위에서 분포한다고 보고하였는데 본 실험에서는 함량이 53 ~ 379  $\mu\text{g/g}$  (dry wt.)으로 다소 적게 나타났다.

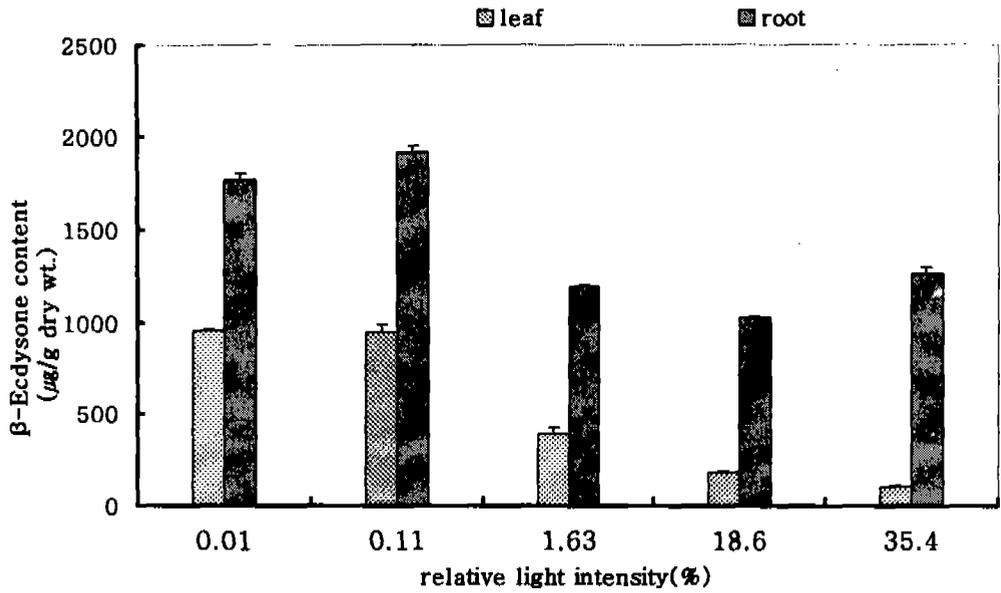


Fig. 10. Change of  $\beta$ -ecdysone content in the leaf and root of *P. fauriei* with increase of relative light intensity.

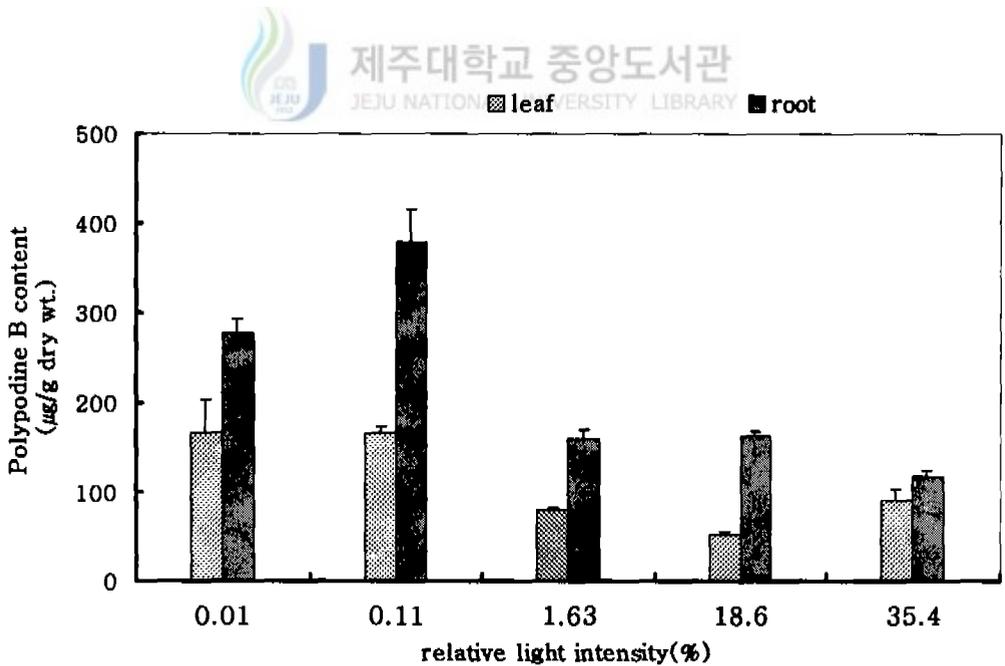


Fig. 11. Change of polypodine B content in the leaf and root of *P. fauriei* with increase of relative light intensity.

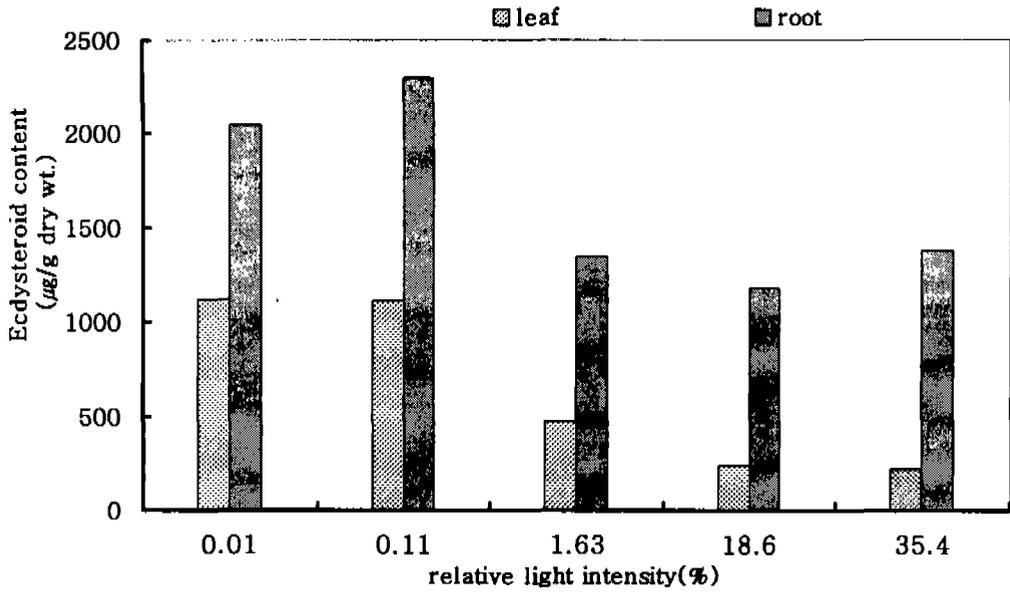


Fig. 12. Change of ecdysteroid content in the leaf and root of *P. fauriei* with increase of relative light intensity.

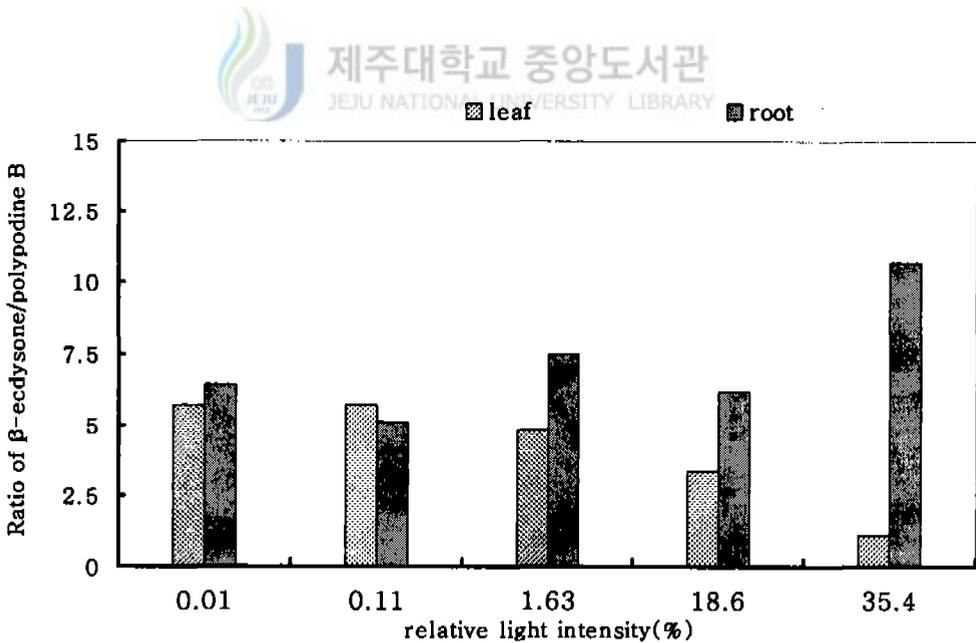


Fig. 13. Changes of the ratio of  $\beta$ -ecdysone / polypodine with increase of intensity.

식물의 성장과 ecdysteroid 함량 변화의 추이를 보기 위하여 쇠무를 종자를 명과 암 조건으로 나누어 파종한 후 7주간의 성장기간에 따른 ecdysteroid 함량을 1주 간격으로 조사하였다. 식물체의 일정 건물 중 ecdysteroid 함량은 암 처리하였을 때 최초 종자의 ecdysteroid 함량이 4,152  $\mu\text{g/g}$  (dry wt.)에서 7주 후 7,483  $\mu\text{g/g}$ 으로 2배정도 함량이 증가하였으며, 광 처리를 하였을 때 7주 후 650  $\mu\text{g/g}$ 으로 7배정도 함량이 감소하였다(Fig. 14). 그러나 식물체 각각의 ecdysteroid 총량을 계산하여 본 결과 일정량이 항상 유지되고 있다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 15).

시금치에서는 종자 발아 후 일정기간 동안 식물 개체내 총 ecdysteroid 함량은 증가한 것으로 알려져(Grebenok & Adler, 1991) 있어 본 실험 결과와 차이가 있는데, 이는 식물체중 ecdysteroid의 함량차이나 변화 정도가 식물에 종류에 따라 다르기 때문인 것으로 생각된다.

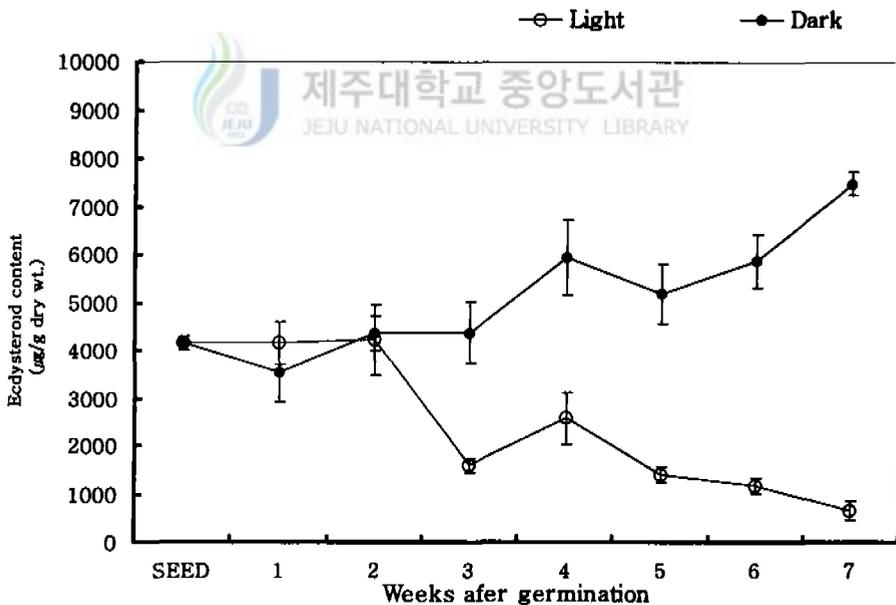


Fig. 14. Change of ecdysteroid content in the seedling of *A. japonica* during culture with and without light.

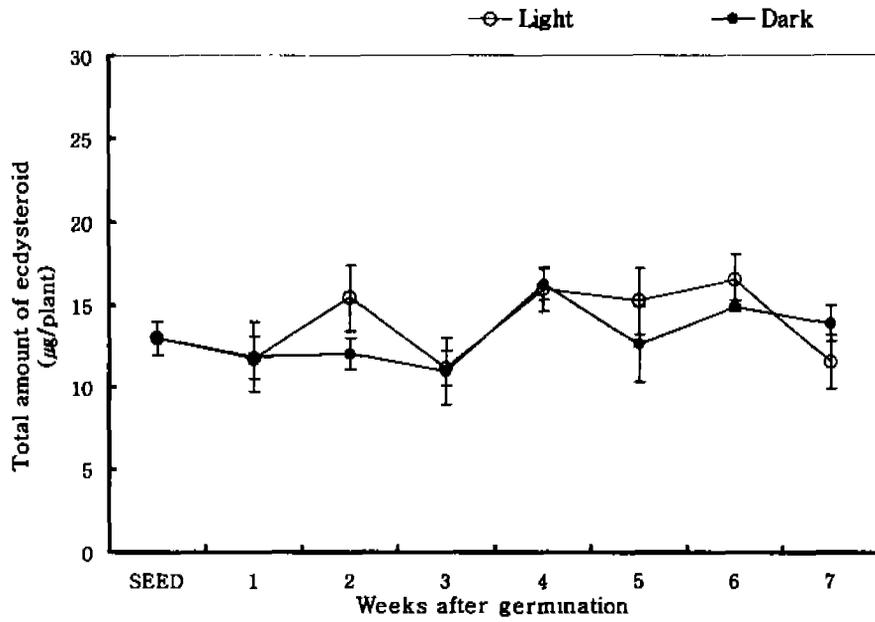


Fig. 15. Change of total amount of ecdysteroid per plant during culture of *A. japonica* with and without light.

## 6. 쇠무릎 발아유묘의 조직부위별 ecdysteroid 함량

쇠무릎 시물체의 조직부위별 ecdysteroid 함량 변화를 조사하기 위하여, 쇠무릎 종자를 파종하여 발아한 후 45-50일 경과하여 3단계의 잎이 형성된 식물개체를 조직별로 뿌리, 줄기, 1단계 잎, 2단계 잎, 3단계 잎으로 나누어 분석하였다. Ecdysteroid의 함량은 뿌리, 잎, 줄기 순이었으며 1단계 잎보다 새로 형성된 3단계 잎에서 10배 이상 함량이 높게 조사되었다(Fig. 16).

Grebenok & Adler 등(1991)은 시금치에서 생육단계별 ecdysteroid 함량 변화를 확인한 결과 새로 생성되는 잎에 ecdysteroid 함량이 높게 나타났고, 각각의 잎의 함량은 시간이 지남에 따라 감소하는 것으로 보고 하였다. 또한 미역고사리 전엽체의 성장 시기에 따른 ecdysteroid 함량을 조사한 결과에 의하면 전엽체는 60일까지 급격한 성장을 하며 그 이후에는 생장이 완만하게 감소하며, ecdysteroid 함량도 60일까지 증가하는 경향을 보이다가 그 이후에는 함량 변화가 적은 것으로 보고되어 있다(Camps et al, 1990). 본 실험에서도 시금치에서 새로 생성된 잎의 ecdysteroid 함량 증가와 같이 쇠무릎에서 1단계 잎의 함량인  $68 \mu\text{g/g}$ (dry wt.)보다 3단계 새로 생성된 잎에서  $1,127 \mu\text{g/g}$ 으로 15배 이상 함량이 높게 나타났다.

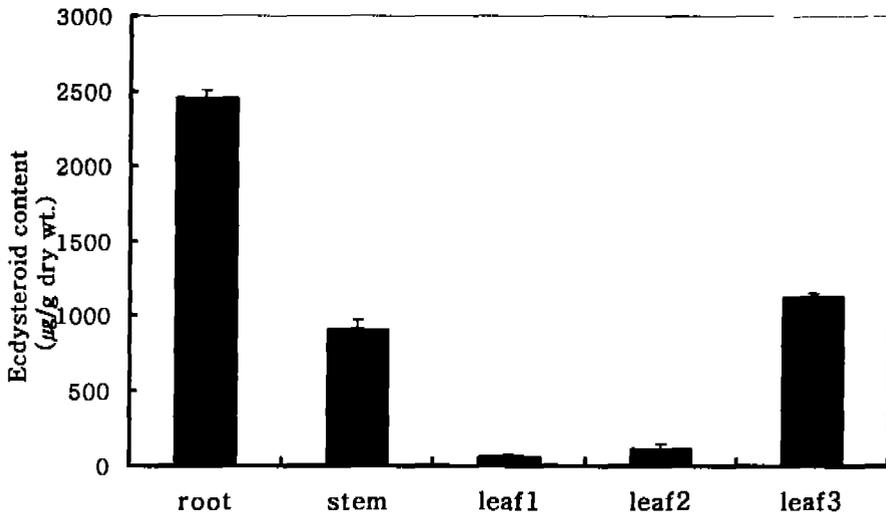


Fig. 16. Ecdysteroid contents in root, stem and leaf of *A. japonica*.

## 7. 개화기 쇠무릎의 조직부위별 ecdysteroid 함량.

식물체의 ecdysteroid 함량은 조직부위별로 다를 뿐만 아니라 생육단계에 따라서도 달라지는 것으로 알려져 있다(Sardiny et al, 1974; Camps et al., 1990; Grebenok & Adler, 1991). 그래서 개화기의 쇠무릎을 채취하여 뿌리, 자엽, 자엽자루, 줄기, 마디, 가지, 잎, 잎자루, 꽃대, 종자 등으로 구분하고(Fig. 17), 각 조직부위별 ecdysteroid 함량을 조사해 보았다.

Fig. 18은 개화기인 9~10월 동안 9월 20일, 10월 5일, 10월 20일 등 3회에 걸쳐 자생지에서 쇠무릎을 채취하여 식물체 조직부위별로  $\beta$ -ecdysone의 함량을 조사한 결과이다. 식물체 조직 부위별 건물중  $\beta$ -ecdysone의 함량은 조직의 종류에 따라 상당한 차이를 보였는데, 줄기, 마디, 가지, 자엽, 자엽자루, 잎, 잎자루의 경우 500  $\mu\text{g/g}$  이하였고, 뿌리는 이보다 높은 약 1000  $\mu\text{g/g}$  수준이었고, 꽃대와 종자에서는 약 1500 ~ 4500  $\mu\text{g/g}$ 으로 매우 높았다.

식물체 시료 채취시기별 각 조직부위의  $\beta$ -ecdysone의 함량은 줄기, 마디, 가지, 자엽, 자루, 잎, 잎자루, 뿌리의 경우 큰 차이가 없었으나, 꽃대와 종자의 경우에는 큰 차이가 있었다. 꽃대의 경우 9월 20일 채취한 시료의  $\beta$ -ecdysone 함량이 4439  $\mu\text{g/g}$ 이었으나 10월 5일 채취한 시료는 2272  $\mu\text{g/g}$ 이었고, 10월 20일 채취한 시료는 1674  $\mu\text{g/g}$ 으로 급격히 감소하였다. 반면 종자의 경우에는 9월 20일 채취한 시료의  $\beta$ -ecdysone 함량이 1637  $\mu\text{g/g}$ 이었으나 10월 5일 채취한 시료는 3327  $\mu\text{g/g}$ 이었고, 10월 20일 채취한 3985  $\mu\text{g/g}$ 으로 오히려 급격히 증가하였다. 그러므로 개화기에 쇠무릎의 종자가 성숙함에 따라 꽃대에 있던  $\beta$ -ecdysone이 종자로 전이되어 축적되는 것으로 생각되었다.

Fig. 19는  $\beta$ -ecdysone에서와 마찬가지로 9~10월 동안 9월 20일, 10월 5일, 10월 20일 등 3회에 걸쳐 채취한 쇠무릎 식물체의 조직부위별 polypodine B의 함량을 조사한 결과이다. 식물체 조직부위별 건물중 polypodine B의 함량은 꽃대와 종자에서 217  $\mu\text{g/g}$ 으로 117  $\mu\text{g/g}$  ~ 176  $\mu\text{g/g}$  범위의 다른 조직에 비해 상대적으로 높았으나  $\beta$ -ecdysone에 대해서는 조직부위별 함량차이가 많지 않은 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 채취시기가 다른 시료간에도 polypodine B의 함량은 차이가 별로 없었는데, 시료채취시기에 따라  $\beta$ -ecdysone 함량차이가 컸던 꽃대와 종자에서도 별 차이가 관찰되지 않았다.

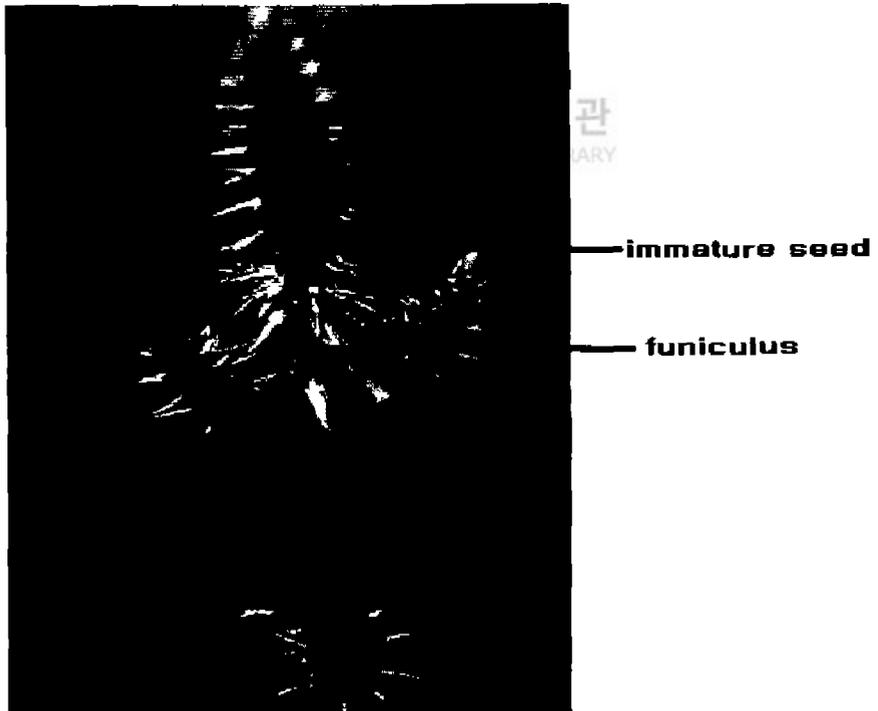
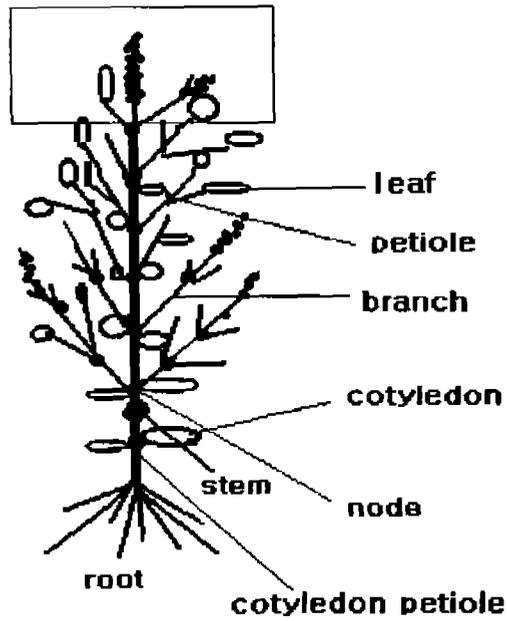


Fig. 17. The illustration of tissue parts (above) and the photograph of flower parts (below) of *A. japonica*.

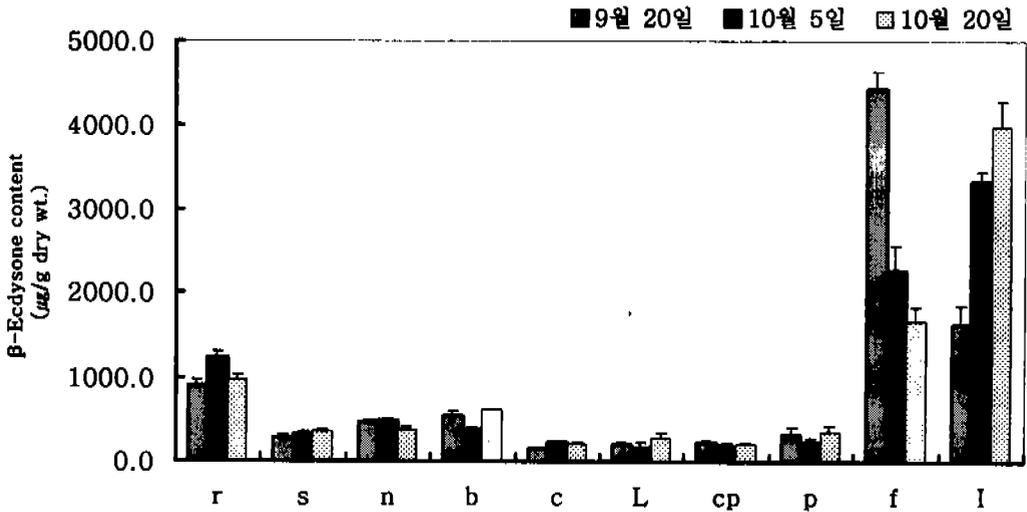


Fig. 18. Contents of  $\beta$ -ecdysone in each tissues of *A. japonica* at flowering stage.

r: root, s: stem, n: node, b: branch, c: cotyledon, L: leaf,  
cp: cotyledon petiole, p: petiole, f: funiculus, l: Immature seed

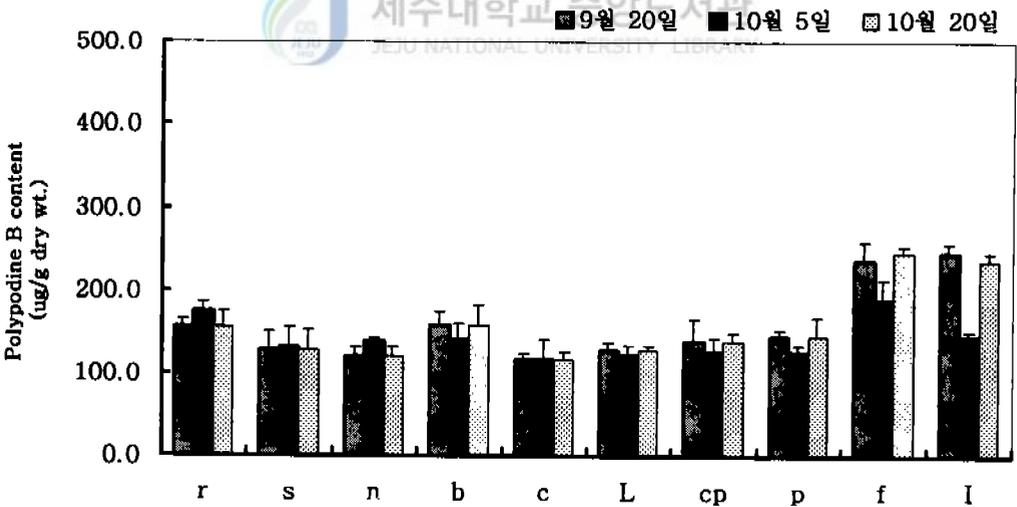


Fig. 19. Content of polypodine B in each tissues of *A. japonica* at flowering stage.

r: root, s: stem, n: node, b: branch, c: cotyledon, L: leaf,  
cp: cotyledon petiole, p: petiole, f: funiculus, l: Immature seed

## IV. 요약

나사미역고사리(*Polypodium fauriei* L.)와 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai.) 식물체에 들어있는 ecdysteroids의 종류를 확인하고, auxin, cytokinin, methyl jasmonate, 광도가 식물체의 ecdysteroids 함량에 미치는 영향과 함께 식물체 조직 부위별 ecdysteroids 함량을 조사하였다.

1. 나사미역고사리와 쇠무릎 식물체 모두에서  $\beta$ -ecdysone과 polypodine B가 검출되었으며,  $\alpha$ -ecdysone은 검출되지 않았다. 두 식물의 주된 ecdysteroid는  $\beta$ -ecdysone이었다.

2. 배지중의 auxin 농도는 나사미역고사리와 쇠무릎 식물체 내의 ecdysteroid 함량에 영향을 주지 않은 반면, cytokinin과 methyl jasmonate는 농도가 증가할수록 식물체 내의 ecdysteroids 함량도 증가되었다.

3. 나사미역고사리의 ecdysteroids 함량은 수광량이 적을수록 증가비율은 식물의 지하부 보다 지상부에서 크게 나타났다. 그러나 쇠무릎의 경우에 종자를 암조건으로 배양했을 때 건물 중 ecdysteroids 함량이 증가하는 반면 명조건으로 배양했을 때 감소하는 경향을 보였지만 식물 개체당 edysteroids 총량은 일정하게 유지되는 것으로 나타났다.

4. 쇠무릎 종자에서 발아하여 3번째 잎이 전개된 유묘의 ecdysteroid 함량은 조직부위별 차이가 있었으며 뿌리가 가장 많았고, 줄기와 잎은 비슷한 수준이었다. 그리고 잎의 경우 새로 분화되는 잎의 ecdysteroid 함량이 가장 높았다.

5. 개화기의 쇠무릎의 경우에도 조직 부위에 따라 ecdysteroid 함량이 큰 차이를 보였는데, 이 때는 꽃대와 미숙종자에 ecdysteroid가 가장 많았다. 또 식물조직 각 부위의 ecdysteroid 함량은 생육시기에 따라 상당한 변화를 보였는데 미숙종자가 성숙되는 특정시기에 꽃대에 다량함유 되어있던 ecdysteroids가 급격히 감소한 반면 미숙종자의 ecdysteroids 함량이 급격히 증가하는 것으로 나타났다.

## V. 참고문헌

- Camps, F., Claveria, E., Coll J., Marco, M. P., Marco J., Mele E. (1990) "Ecdysteroid production in tissue cultures of *Polypodium vulgare*", *Phytochemistry*, Vol. 29, No 12, pp. 3819-3821.
- Chapple, C. (1998) "Molecular-Genetic analysis of Plant Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases", *Annu. Rev. Plant Physiol. plant Mol. Biol.*, 49, pp. 311-343.
- Creelman, R. A., Mullet, J. E. (1997) "Biosynthesis and action of jasmonates in plants", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Vol. 48, pp. 355-81.
- DE Souza, N. J., Ghisalberti, E. L., Rees, H. H., Goodwin, T. W. (1970) "Studies on insect moulting hormones: Biosynthesis of ecdysone, ecdysterone and 5 $\beta$ -hydroxyecdysterone in *Polypodium vulgare*", *Phytochemistry*, Vol. 9, pp. 1247-1252.
- Grebenok, R. J., Adler, J. H. (1991) "Ecdysteroid distribution during development of spinach, *Phytochemistry*", Vol. 30. No. 9, pp. 2905-2910.
- Grebenok, R. J., Galbraith, D. W., Benveniste, I., Feyereisen, R. (1996) "Ecdysone 20-monooxygenase, a cytochrome p450 enzyme from spinach, *Spinacia oleracea*", *Phytochemistry*, Vol. 42, No. 4, pp. 927-933.
- Harborne J. B. (1988) "Introduction to Ecological Biochemistry", Academic press, pp120-146.

양철신 (1997) "HPLC에 의한 식물체중의 ecdysteroid 화합물 분석", 제주대학교 석사학위논문, pp 1-30.

Lloyd-Jones, J. G., Rees, H. H., and Goodwin, T. W. (1972) "Biosynthesis of Ecdysterone from cholesterol in *Taxus Baccata*", *Phytochemistry*, Vol. 12, pp. 569-572.

Modin, R. F., Alred, P. A., Tjerneld, F. (1994) "Utilization of temperature-induced phase separation for the purification of ecdysone and 20-hydroxyecdysone from spinach", *J. Chromatography*, pp. 229-236.

Schmelz, E. A., Grebenok, R. J., Galbraith, D. W., Bowers, W. S. (1998) "Damage-induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach: a rapid root response involving the octadecanoic acid pathway", *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 24, No. 2, pp. 339-360.



The United States Pharmacopeial Convention, Inc. (1990), *The United States Pharmacopeia /The National Formulary USP XXII/NF XVII*, pp. 1557-1568

Wilson, I. D., Morgan, E. D., Murphy, S. J. (1990) "Sample preparation for the chromatographic determination of ecdysteroids using solid-phase extraction methods", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 236, pp. 145-155.

Wilson, I. D., Morgan, E. D., Murphy, S. J., (1993) "Boronic Esters as Derivatives for Supercritical Fluid Chromatography of Ecdysteroids", *J. Chromatography* 639, pp. 281-285.

## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 아낌없는 지도와 격려를 하여주신 류기중 교수님께 진심으로 감사드리며, 심사를 하여 주신 유장걸 교수님, 자연과학대학 화학과 이선주 교수님의 지도, 조언에 깊은 감사를 드립니다.

평소 가르침으로 이끌어주신 강순선 교수님, 고정삼 교수님, 현해남 교수님, 김찬식 교수님께 감사드립니다.

그리고 유기화학 실험실에서 동고동락하는 마음으로 생활하면서 도움을 준 경환이, 성범이, 도승이, 진환이와 많은 가르침을 준 양철신 선배님 및 조교선생님들께 고마움을 전합니다.

