

## 녹두(*Vigna radiata* W.) 하배축의 옥신 유발 에틸렌 생성 과정에서 $Ca^{2+}$ 의 작용.

文惠貞·李埃承

(이화여자대학교 생물학과)

## Role of Calcium on Auxin-Induced Ethylene Production in Etiolated Mungbean(*Vigna radiata* W.) Hypocotyls

Moon, Hye Jeong and June Seung Lee

(Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul)

### ABSTRACT

The effect of  $Ca^{2+}$  on auxin-induced ethylene production in etiolated mungbean (*Vigna radiata* W.) hypocotyls was studied.

Auxin-induced ethylene production by mungbean seedlings which had been germinated in the presence of 5-10mM  $Ca^{2+}$  (High  $Ca^{2+}$ ; HC) is greater than that by seedlings which had been germinated in distilled water (Low  $Ca^{2+}$ ; LC). The effect of  $Ca^{2+}$  on auxin-induced ethylene production was greatly increased after 12hr of incubation period. The stimulation of auxin-induced ethylene production by  $Ca^{2+}$  was specific, since divalent cations, such as  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  did not enhance auxin-induced ethylene production. Calcium also promoted ethylene evolution induced by methionine and 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC).

The effect of  $Ca^{2+}$  on auxin-induced ethylene production was not caused by increase in free IAA or ACC contents of hypocotyl tissue. Dimethyl sulfoxide and Triton X-100, that disrupts the membranes, inhibited ethylene production to a greater extent in LC segments than in HC segments. Addition of  $Ca^{2+}$  to the incubation medium for LC segments resulted in enhancement of ethylene production probably because the membrane integrity is supported under these conditions. Comparison of activity of Ethylene Forming Enzyme(EFE) in LC and HC hypocotyl segments indicated that the enzyme activity of HC was about 2 times higher than that of LC. It is suggested that  $Ca^{2+}$  increases the activity of plasma membrane-bound EFE through its stabilizing effect on the membrane, which in turn brings about promotion of ethylene production.

### 서 론

에틸렌( $C_2H_4$ )은 분자량이 작고(MW. 28.05)상온에서는 기체인 화합물로 식물의 노화, 휴면,

이 연구는 이화여자대학교 교수연구기금 지원에 의해 이루어졌음.

낙엽, 과일의 성숙등 여러가지 생리적 현상을 조절하는 호르몬이다(Abeles, 1973 ; Imaseki *et al.*, 1972 ; Lieberman, 1979). 고등식물에서 에틸렌은 methionine을 전구체로하여 methionine (Met)→S-Adenosylmethionine (SAM)→Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)→C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 의 과정을 통해서 생성된다.

이 과정중에 SAM→ACC의 단계는 ACC Synthase에 의해서 촉매되는 과정인데 Aminoethoxyvinyl glycine (AVG) (Yu *et al.*, 1979), L-Canaline (Murr and Yang, 1975) 등 pyridoxal 효소계 억제제는 이 과정을 억제시킨다. 반면에 IAA는 이 효소의 합성을 촉진시키므로서 에틸렌 생성을 촉진시킨다. (Yu and Yang, 1979 ; Abeles, 1966 ; Yoshii *et al.*, 1980 ; Sakai and Imaseki, 1971).

ACC→C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>의 단계는 아직 순수분리되지 않은 Ethylene Forming Enzyme (EFE)에 의해서 촉매되는 과정인데, Co<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup> 등의 2가양이온 (Yu and Yang, 1979), DNP같은 uncoupler (Apelbaum *et al.*, 1981), n-propylgallate, sodium benzoate 등 free radical scavenger (Apelbaum *et al.*, 1981)는 이 과정을 억제시킨다. 뿐만아니라 phospholipase D, Tween 20, SDS, Triton X-100 등 원형질막의 구조에 영향을 주는 물질들은 이 과정을 현저히 억제시키는 것으로 보아 원형질막의 안정성은 에틸렌 생합성에 중요하며 EFE도 이곳에 위치한다고 생각되고 있다 (Odawara *et al.*, 1979 ; Apelbaum *et al.*, 1981).

Ca<sup>2+</sup>는 세포질에서 second messenger로서 여러가지 생리적 기능을 하는 것으로 식물에서도 IAA의 이동 (Dela Fuente, 1984), IAA의 작용 (Cleland and Rayle, 1977 ; Cooil and Bonner, 1957), cytokinin의 작용 (Saunders *et al.*, 1982), GA의 작용 (Jones and Carbonell, 1984) 등 식물 호르몬의 작용과도 밀접한 관계가 있다. Ca<sup>2+</sup>은 식물 호르몬과의 작용뿐만 아니라 에틸렌의 생성과도 밀접한 관계가 있는데, 최근의 보고에 의하면 Ca<sup>2+</sup>이 에틸렌 생성에 미치는 영향에 대해서 서로 상반되는 결과들이 있다. Ferguson 등 (1983)에 의하면 Ca<sup>2+</sup>은 오이자엽에서 엽록소 분해를 억제시키고, 에틸렌의 생성을 억제시켜서 노화를 지연시킨다고 한다. 반면에 감자 tuber disk, 녹두하배축, 토마토 pericarp disk 등에서는 Ca<sup>2+</sup>이 에틸렌 생성을 촉진시키며 (Burns and Evensen, 1986; Evensen, 1984; Artega, 1984), Lau and Yang (1974)이 의하면 Ca<sup>2+</sup>는 녹두하배축의 에틸렌 생성에 Kinetin과 상승효과를 갖지만 IAA와는 상승효과가 나타나지 않는다는 보고도 있다.

본 논문은 이와같이 여러가지 상반되는 결과들에 대하여 Ca<sup>2+</sup>이 에틸렌 생성에 어떤 영향을 미치며 그 작용기작은 무엇인가를 밝히기 위한 것이다.

### 재료 및 방법

**실험재료** 녹두 (*Vigna radiata* Wilzeck)를 12시간 증류수나 5~10mM CaCl<sub>2</sub> 용액에서 침액시킨 후, 증류수나 5~10mM CaCl<sub>2</sub>가 들은 6% 한천배지에 각각 심어 습도가 90% 이상, 온도는 23±1°C로 유지되는 암실에서 3일간 발아시켰다. 증류수에서 침액되고 자란 녹두하배축은 Low Ca<sup>2+</sup> (LC)라고 하며, 5~10mM CaCl<sub>2</sub>에서 침액되고 자란 녹두하배축을 High Ca<sup>2+</sup> (HC)라고 하였다. 하배축의 길이가 3~4cm되는 황화조직의 정단 끝꼭부 바로 아랫부분을 절단기를 사용하여 1cm로 잘라서 사용하였다.

<sup>3</sup>H-Indole-3-acetic acid (<sup>3</sup>H-IAA, 1.084 mCi/ml)는 Amersham (U.K.)에서 구입하였다.

**에틸렌 생성량 측정** 에틸렌 생성량의 측정은 15ml vial에 완충용액(Mcs/Tris buffer, 5mM, pH6.7)과 필요한 시약을 혼합한 배지(1ml)에 조직절편 20개씩을 넣고 산소를 충전하여 실리콘 마개로 막아 암소 ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ )에서 incubation시킨다. 일정한 시간후에 용기내 기체 1ml를 주사기로 채취하여 gas chromatograph (Shimazu GC-9A, Flame Ionization Detector, Porapak Q column 100~200 mesh, 90 Air: 0.5kg/cm<sup>2</sup>, Carrier: 50ml/min, He: 0.5 kg/cm<sup>3</sup>)로 에틸렌 생성량을 측정하였다.

실험의 목적에 따라 배지의 양, 조직절편수 등을 조절하였다.

**조직내의 ACC 정량** Lizada and Yang(1983)의 방법을 수정하여 ACC가 에틸렌으로 전환되는 것을 이용하여 생성된 에틸렌을 gas chromatograph로 정량하였다. 증류수에서 키운 Low Ca<sup>2+</sup> 하배측 조직절편(LC) 20개를 IAA가 들은 배지에서 일정시간(18시간)동안 incubation시키고, 10mM CaCl<sub>2</sub>가 있는 배지에서 키운 High Ca<sup>2+</sup> 하배측 조직(HC) 절편 20개를 IAA와 10mM CaCl<sub>2</sub>의 배지에서 incubation시킨후, 조직절편을 각각 수거하여 완충용액으로 잘 씻고, 3% sulfosalicylic acid 5ml를 넣어 막자사발로 같은 뒤에 10, 000rpm에서 30분간 원심분리 하였다. 원심분리한 후 상등액을 취하여, 2N HCl로 활성화시킨 이온교환 column(Dowcx-50W, H<sup>+</sup> form, bed volume 2ml)에 아미노산을 흡착시켰다. 흡착된 아미노산은 2N NH<sub>4</sub>OH (4ml)로 흘러내려 동결건조(-50°C) 한 후 증류수(2ml)로 녹였다. 이중 0.8ml를 취하여 15ml vial에 넣고 0.1ml의 10mM HgCl<sub>2</sub>를 첨가한 뒤 실리콘 마개로 막아 얼음에 10분간 채워둔후 0.1ml NaOCl(5% NaOCl: 포화된 NaOH, 2:1, V/V)를 주사기로 주입하여 다시 얼음에 채워 두었다. 10분이 지난 후 기체 1ml를 주사기로 채취하여 생성된 에틸렌을 측정후 ACC의 표준 곡선을 이용하여 ACC양을 계산하였다.

**Ethylene Forming Enzyme의 활성 측정.** *In vivo* 에서 EFE의 활성은 Hoffman과 Yang(1982)의 방법을 수정하여 ACC가 에틸렌으로 전환되는 것을 이용하여 측정하였다. High Ca<sup>2+</sup> 조직 절편 30개를 10<sup>-5</sup>M IAA와 10mM CaCl<sub>2</sub> 배지에서 18시간 incubation시킨 후, 조직절편을 각각 수거하여 완충용액으로 씻었다. 씻은 조직절편을 10<sup>-5</sup>M AVG에 2시간 incubation하여 조직내의 ACC Synthase의 활성을 억제시킨 다음 완충용액으로 씻어 5mM ACC를 첨가한 배지에서 진공상태로 ACC를 조직내에 침투시켰다. 다시 조직절편을 완충용액으로 씻고 15ml vial에 완충용액 1ml만 들어있는 배지에서 마개를 한후 1시간동안 incubation시킨 뒤 에틸렌 생성량을 측정하였다.

**조직내의 Free-<sup>3</sup>H-IAA 양 측정** Low Ca<sup>2+</sup> 하배측 조직 1cm 길이 절편 20개는 <sup>3</sup>H-IAA(242, 606cpm)가 있는 배지에, High Ca<sup>2+</sup> 조직절편 20개는 같은 양의 <sup>3</sup>H-IAA와 10mM CaCl<sub>2</sub>가 들은 배지에서 18시간 동안 incubation시켰다. 18시간후 이들 조직절편을 차가운 완충용액(4°C)으로 씻어낸 다음, 80% 에탄올 0.2ml를 넣어 녹여서 filter paper (Whatman No. 1)에 추출액을 한점에 적어 butanol: acetic acid: water(4:1:5, v/v/v)에서 전개시켰다. 전개된 filter paper를 말려 0.5cm 간격으로 자른 후, scintillation fluid(PPO 10g, POPOP 0.25g, Naphthalene 100g, Dioxane 1,000 ml)에 각각 넣고, 일정시간이 경과한 후에 Liquid Scintillation Counter (Beckman, LS 6800)로 방사능양을 측정하였다.

실험결과

Ca<sup>2+</sup>이 옥옥신으로 유발되는 에틸렌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 증류수에 침액시키고 기른 LC하배측 조직을 IAA가 농도별로 들은 배지에 넣어 6시간 incubation시키고, 대조구로는 5mM CaCl<sub>2</sub>에 침액시키고 5mM CaCl<sub>2</sub>가 포함된 배지에서 기른 HC하배측 조직절편을 여러가지 농도의 IAA와 5mM CaCl<sub>2</sub>가 포함된 배지에서 같은 시간동안 incubation시켜 생성된 에틸렌의 양을 비교하였다(Fig. 1) 옥옥신의 농도 10<sup>-5</sup>M이하에서는 Ca<sup>2+</sup>가 옥옥신으로 유발되는 에틸렌 생성을 촉진시키지 않으나 비교적 고농도인 10<sup>-4</sup>~10<sup>-3</sup>M에서는 50~100%증가시킨다. 실험과정에서, Ca<sup>2+</sup>의 효과는 seedling단계에서부터 Ca<sup>2+</sup>에 처리된 조직으로 측정해야 에틸렌 생성촉진효과가 일정하게 나타나지 incubation 단계에만 Ca<sup>2+</sup>를 처리하면 효과가 일정하지 않기 때문에 이후의 실험에서 Ca<sup>2+</sup>의 효과는 seedling단계에서부터 Ca<sup>2+</sup>에 처리된 조직으로 행하였다.

이와같은 옥옥신 농도에 대한 Ca<sup>2+</sup>의 효과가 incubation시간에 따라서 어떻게 나타나는가를 조사하기 위해서 Fig. 2와 같은 실험을 하였다. Fig. 2는 LC및 HC조직을 10<sup>-3</sup>~10<sup>-4</sup>M의 옥옥

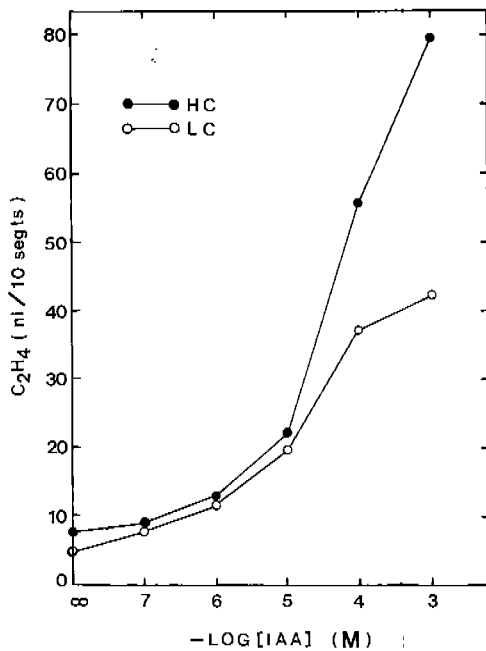


Fig. 1. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the auxin induced ethylene production. Twenty segments excised from seedling grown either in CaCl<sub>2</sub>(5mM) containing medium (HC) or distilled water (LC), were incubated with various concentrations of auxin for 6hrs, and the amount of ethylene produced was measured at the end of this period.

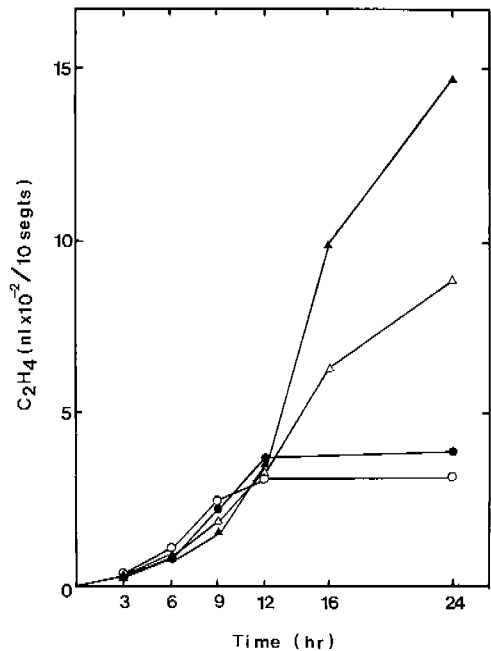
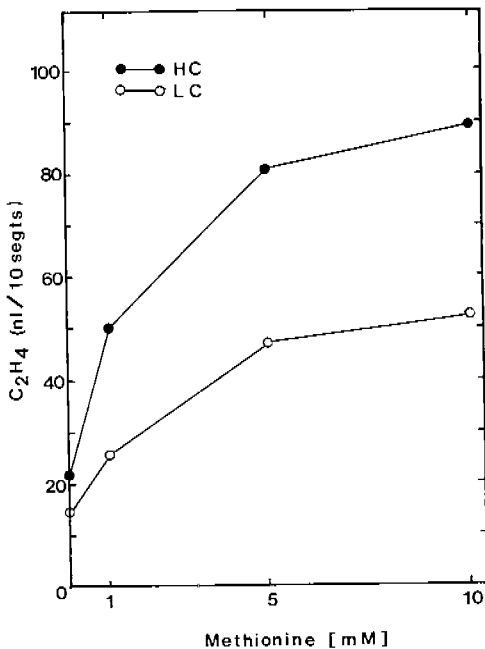


Fig. 2. Time course for ethylene production from LC and HC hypocotyl segments treated with 10<sup>-3</sup> -10<sup>-4</sup>M of IAA. ○-○, LC in 10<sup>-4</sup>M IAA; ●-●, HC in 10<sup>-4</sup>M IAA+ 10mM CaCl<sub>2</sub>; △-△, LC in 10<sup>-3</sup>M IAA; ▲-▲, HC in 10<sup>-3</sup>M IAA +10mM CaCl<sub>2</sub>

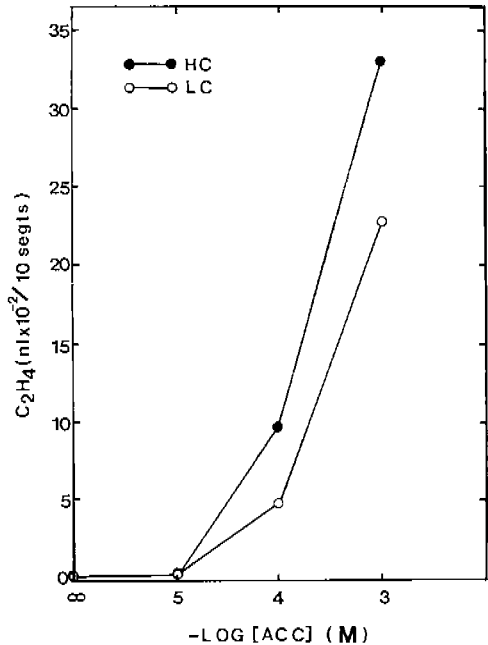
신이 포함된 배지에 넣고 incubation하여 각 시간동안 생성된 에틸렌의 양을 비교한 것이다. 그림에서와 같이  $Ca^{2+}$ 에 의한 오옥신으로 유발되는 에틸렌 생성은 12시간까지는 큰 차이가 없으나 16시간이후부터 현저한 차이를 나타내어  $10^{-3}M$  IAA를 넣을때 24시간에는 HC가 LC보다 약 60% 많은 에틸렌을 생성하였다.

$Ca^{2+}$ 에 의한 에틸렌 생성촉진현상이 다른 2가양이온에 의해서도 같은 효과를 나타내는가 알아보기 위해서 같은 방법의 실험을  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ 로 해보았으나, 이러한 양이온들은 오히려 에틸렌 생성을 어느 정도 억제시킨다는 것을 알수 있었다(Data not shown).

$Ca^{2+}$ 이 오옥신 유발 에틸렌 생성을 촉진시키는데 에틸렌 생성의 궁극적 전구체인 methionine 이나, 에틸렌 생성의 전단계물질인 ACC를 처리했을때에도  $Ca^{2+}$ 은 같은 효과를 나타내는가 확인하기 위해서 Fig. 3, Fig. 4에서와 같은 실험을 하였다. Fig. 3는 LC와 HC조직에서 1~10mM의 methionine을 넣고 18시간후에 생성된 에틸렌의 양을 비교한 것으로 이때에도 HC는 LC보다도 약 60% 많은 에틸렌이 생성된 것을 볼수 있다. 또한 Fig. 4에서와 같이 ACC를 넣어 줄때에도  $10^{-3} \sim 10^{-4}M$ 의 ACC에서는 HC가 LC보다 30~40% 많은 양의 에틸렌이 생성된다는 것을 알수 있었다.



**Fig. 3.** Effect of  $Ca^{2+}$  on the methionine induced ethylene production. Twenty segments excised from seedlings grown either in  $CaCl_2(5mM)$  containing medium(HC) or distilled water(LC), were incubated with various concentrations of methionine for 18hrs, and the amount of ethylene produced was measured at the end of this period.



**Fig. 4.** Effect of  $Ca^{2+}$  on the ACC induced ethylene production. Twenty segments excised from seedlings grown either in  $CaCl_2(5mM)$  containing medium(HC) or distilled water(LC), were incubated with various concentrations of ACC for 18hrs, and the amount of ethylene produced was measured at the end of this period.

**Table 1.** Effect of CaCl<sub>2</sub> on free IAA contents in mungbean hypocotyl segments.

Ca <sup>2+</sup> Status	Free IAA(cpm)
Low Ca <sup>2+</sup>	1522
High Ca <sup>2+</sup>	1700

a: Total radioactivity of 20 segments.

**Table 2.** ACC content from LC and HC mungbean hypocotyl segments incubated for 12hrs in buffer containing 10<sup>-3</sup>M IAA

Ca <sup>2+</sup> status	ACC content(M)
Low Ca <sup>2+</sup>	1.45 × 10 <sup>-5</sup>
High Ca <sup>2+</sup>	1.49 × 10 <sup>-5</sup>

**Table 3.** Effect of DMSO on ethylene production from LC and HC mungbean hypocotyl segments incubated for 18 hrs in buffer containing 10<sup>-3</sup>M of IAA.

Treatment	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> production nl/10 segts (% control)	
	Low Ca <sup>2+</sup>	High Ca <sup>2+</sup>
Control	643(100)	921(143)
DMSO(5%)	451(70)	693(108)
DMSO(5%)+CaCl <sub>2</sub> (10mM)	830(129)	938(146)
CaCl <sub>2</sub> (10mM)	918(143)	1449(225)

이와같이 Ca<sup>2+</sup>는 IAA, methionine, ACC 등에 의해서 유발되는 에틸렌 생성을 모두 촉진시키는데, 이것은 Ca<sup>2+</sup>가 에틸렌 생성 경로의 어느 특정한 중간 단계에 작용하는 것은 아닐 가능성이 크다는 것을 의미한다. Lau and Yang(1973)에 의하면 kinetin은 오옥신으로 유발되는 에틸렌 생성을 촉진시키며, Ca<sup>2+</sup>는 이 과정에 상승효과를 나타내는데 그것은 kinetin이 조직내 free IAA level을 높이기 때문이라고 하였다(Lau and Yang, 1973). 본 실험에서도 앞에서 관찰된 Ca<sup>2+</sup>에 의한 에틸렌 생성 촉진 현상이 조직내 free IAA level을 높이기 때문인지를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. LC조직과 HC조직을 <sup>3</sup>H-IAA가 포함된 배지에 incubation하여 free IAA의 양을 조사한 결과 LC조직이나 HC조직에서의 free IAA의 양은 차이가 없었다(Table 1). 따라서 Ca<sup>2+</sup>은 조직내 IAA의 conjugation을 억제시켜 free IAA의 양을 증가시키므로서 에틸렌 생성을 촉진시킨다고 볼수는 없다.

Table 2는 Ca<sup>2+</sup>의 효과가 SAM에서 ACC로 전환되는 과정에 작용하는가를 알아보기 위해서 HC조직과 LC조직 ACC의 양을 조사하였으나, ACC의 양에서도 차이가 없는 것으로 보아 Ca<sup>2+</sup>는 이 과정에도 직접적으로 참여하지 않는 것으로 생각된다.

Ca<sup>2+</sup>는 일반적으로 막의 안정성에 상당히 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있으며(Mayne, 1986), 에틸렌 생성 경로에서 ACC→C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>의 과정은 막에 있다고 생각되는 EFE에 의해서 조절된다고 믿고있는데 Ca<sup>2+</sup>의 작용이 이 과정에 영향을 미치는 가를 확인하기 위해서 Table 3, 4와 같은 실험을 하였다. Table 3은 LC와 HC조직에서 오옥신 유발 에틸렌 생성에서 DMSO의 효과에 대한 Ca<sup>2+</sup>의 영향을 조사한 것이다. LC와 HC조직에서 5% DMSO만을 처리하여 18시

**Table 4.** Effect of Triton X-100 on ethylene production from LC and HC mungbean hypocotyl segments incubated for 18hrs in buffer containing  $10^{-3}$ M of IAA.

Treatment	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Production nl/10segs (% control)	
	Low Ca <sup>2+</sup>	High Ca <sup>2+</sup>
Control	852(100)	1221(143)
Triton X-100(0.03%)	49(6)	263(31)
Triton X-100(0.03%)+CaCl <sub>2</sub> (10mM)	285(30)	365(43)
CaCl <sub>2</sub> (10mM)	1217(143)	1552(182)

**Table 5.** Comparative activity of *in vivo* EFE from HC and LC mungbean hypocotyls incubated for 18hrs in buffer containing  $10^{-3}$ M of IAA.

Collection Time	EFE Activity (nl C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /10segs)	
	Low Ca <sup>2+</sup>	High Ca <sup>2+</sup>
30 min	19.70	43.53
60 min	40.96	89.49

간 incubation 시켰을때 LC에서는 451nl, HC에서는 693nl로 HC가 LC보다 약 40% 많은 에틸렌을 생성하였으나, 여기에 10mM의 Ca<sup>2+</sup>을 첨가하여 에틸렌 생성을 비교했을때 LC 830nl, HC 938nl로서 그 차이는 약 20%로 줄어들어 Ca<sup>2+</sup>는 DMSO에 의한 에틸렌 생성 억제 효과를 감소시키는 것을 알수 있었다.

Table 4는 같은 방법의 실험을 또다른 막의안정성에 영향을 미치는 Triton X-100에 대한 Ca<sup>2+</sup>의 효과를 본 것이다. 0.03%의 Triton X-100만을 처리했을때는 LC에서 49nl, HC에서는 263nl로 HC가 LC보다 약 5배나 많은 에틸렌을 생성하였으나 여기에 10mM의 Ca<sup>2+</sup>을 처리했을때는 LC 285nl, HC 365nl로 그 차이는 현저히 줄어들어 Ca<sup>2+</sup>가 Triton X-100에 의한 억제효과를 크게 감소시키는 것을 볼수 있었다. 이 두실험에서는 DMSO나 Triton X-100은 막의안정성에 영향을 주어 LC에서나 HC조직에서 모두 에틸렌의 생성을 감소시키지만 HC조직보다 LC조직에서 더 크게 억제시키며 여기에서 Ca<sup>2+</sup>는 막의안정성을 높여 그 억제 효과를 감소시키는 것으로 생각된다.

Ca<sup>2+</sup>이 막의안정성을 높인다면 막에 위치하는 ACC에서 에틸렌으로의 전환을 촉매하는 EFE의 활성에 영향을 줄 것이다. Table 5에서 보면 HC조직은 LC조직보다 EFE의 활성도가 2배이상 높은 것을 알수 있는데 이러한 결과들은 Ca<sup>2+</sup>이 에틸렌 생성 경로에서 어디에 직접적인 작용을 한다기보다는 막의안정성에 영향을 주고 따라서 EFE의 활성을 높이므로써 에틸렌 생성을 촉진시키는 것이 아닌가 생각된다.

## 고 찰

Ca<sup>2+</sup>이 에틸렌 생성에 미치는 영향에 대해서는 식물의 종류나 조직에 따라 서로 상반되는 보고들이 많다(Ferguson *et al.*, 19883; Lieberman and Wang, 1982; Evensen, 1984).

본 실험은 녹두하배축조직에서  $Ca^{2+}$ 가 에틸렌의 생성을 촉진시키는 결과를 얻었는데 그 촉진 효과는 12시간 이상 incubat ion시킨 조직에서만 나타났다(Fig. 2). 또한  $Ca^{2+}$ 은 에틸렌 생성 경로에서 중요한 free IAA의 level을 높이지도 않고 (Table 1), ACC의 양도 증가시키지 않으며 (Table 2), 오옥신 유발 에틸렌 생성뿐만 아니라 methioninc, ACC유발 에틸렌의 생성도 촉진시킨다(Fig. 1,3,4).

$Ca^{2+}$ 가 에틸렌 생성을 촉진시킨다는 보고는 많다(Evensen, 1984; Lau and Yang, 1975; Green, 1983). Evensen(1984)에 의하면 감자절편에서  $Ca^{2+}$ 는 에틸렌 생성을 촉진시키는데 이것은  $Ca^{2+}$ 가 ACC의 양을 증가시키기 때문이라고 설명하고 있는데 이것은 본 실험의 결과와는 다르다. 아마도 그는 50mM의  $Ca^{2+}$ 를 사용하였기 때문에 고농도에서 오는 일종의 stress때문에 생길 결과가 아닌가 생각된다.

Lau and Yang(1973, 1975)은 녹두하배축에서  $Ca^{2+}$ 는 kinetin에 의해서 유발되는 에틸렌 생성에 상승적으로 작용하는데 이것은 kinetin이 조직의 IAA흡수를 촉진시키고, IAA의 conjugation을 억제시키므로 세포내 free IAA level을 높이기 때문에 결국 에틸렌 생성을 촉진시킨다고 했는데, 이 과정에서  $Ca^{2+}$ 의 역할은  $Ca^{2+}$ 가 kinetin의 흡수를 촉진시키고, kinetin대사를 촉진시키기 때문이라고 설명하고 있으나 그 해석이 분명치 않다.

Lieberman등에 의하면 사과절편을 잘라 놓으면 시간이 경과함에 따라 에틸렌 생성율이 점점 감소하는데 이때  $Ca^{2+}$ 를 처리한 조직은 그 감소가 지연된다고 하였다(Lieberman and Wang, 1982). 마찬가지로 사과에서 분리한 원형질체로부터의 에틸렌생성도  $Ca^{2+}$ 가 있어야만 생성물의 감소가 지연된다는 보고도 있다(Anderson *et al.*, 1979). 이러한 보고들은 모두  $Ca^{2+}$ 가 막의 안정성에 대한 효과로 생각할수 있다.

반면에  $Ca^{2+}$ 가 노화를 지연시키고 따라서 노화에서 수반되는 에틸렌의 생성을 억제시킨다는 보고도 있다(Ferguson *et al.*, 1983). 그러나 이 과정에서의  $Ca^{2+}$ 의 역할은 다른 측면에서 설명되어야 할 것 같다. 일반적으로 식물조직, 특히 과일, 에서 노화가 진행되기전 어린 조직에서는 조직내 ACC의 양이 극히 작고, 또한 ACC Synthase의 활성은 낮다. 그러나 노화가 시작되면서 그 효소의 활성이 급격히 증가되어 ACC의 양이 증가되고 이어서 에틸렌의 생성도 증가되는데 이때 생성된 에틸렌은 다시 ACC Synthase의 활성을 또한 촉진시키므로 에틸렌의 생성은 급격히 증가한다. 그러나 일단 노화가 진행되면 ACC, 에틸렌의 양도 동시에 감소하다가 ACC의 양은 다시 증가하지만 에틸렌의 생성량의 증가는 없다. 이것은 노화에 의해서 막의 안정성이 파괴되어 막에 있다고 생각되는 EFE의 활성이 낮아져서  $ACC \rightarrow C_2H_4$ 로의 전환이 어려워졌기 때문이라고 생각된다.

Ferguson등(1983)에 의하면 오이 떡잎에서  $Ca^{2+}$ 는 엽록소 분해를 억제시키고 또한 에틸렌의 생성도 억제시킨다고 하였는데 이 경우  $Ca^{2+}$ 가 에틸렌 생성을 억제시킨 것처럼 보인것은 아직 노화가 시작되지 않은 떡잎에서 ACC Synthase활성이 낮은 상태에서  $Ca^{2+}$ 가 노화 자체를 지연시키므로 노화가 시작되면서 수반되는 ACC Synthase의 활성 증가를 지연시키므로 결국 에틸렌의 생성이 억제된 것으로 설명되어야 한다.

본 실험의 Fig. 2에서 나타난 incubation시간에서 나타난 결과나, Table 3,4의 DMSO, Triton X-100의 효과에 대한  $Ca^{2+}$ 의 회복 효과등을 볼때, 또한, Table 5의 HC, LC에서 EFE의 활성도등을 비교해 볼때,  $Ca^{2+}$ 는 에틸렌 생성 경로중 어느 특정한 단계에 직접 작용한다기 보다는 막의 안정성에 관계하여 간접적으로 작용하는 것이 아닌가 생각된다.



## 적 요

Ca<sup>2+</sup>이 녹두(*Vigna radiata* W.)하배축 조직에서 옥옥신으로 유발되는 에틸렌 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

Seedling 단계로부터 5~10mM Ca<sup>2+</sup>이 포함된 배지에서 기른 녹두 하배축(High Ca<sup>2+</sup>; HC)조직은 증류수에서 기른 녹두 하배축(Low Ca<sup>2+</sup>; LC)조직에서보다 옥옥신 유발 에틸렌 생성이 2배정도 많다. Ca<sup>2+</sup>에 의한 촉진효과는 12시간 이후에, 10<sup>-3</sup>M IAA의 농도에서 크게 나타나며, 다른 2가양이온에 대해 특이성을 갖는다. Ca<sup>2+</sup>는 IAA 이외에도 methionine, 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid에 의한 에틸렌 생성도 같은 정도로 촉진시킨다. 이와같은 Ca<sup>2+</sup>의 옥옥신 유발 에틸렌 생성 촉진 효과는 조직내의 free IAA 양이나, ACC양을 증가시키는 것에 의해 나타나는 것은 아니다. 막 안정성에 영향을 주는 Dimethyl sulfoxide나 Triton X-100은 HC보다 LC조직에서 더 크게 에틸렌 생성을 억제시킨다. 그러나 Ca<sup>2+</sup>의 첨가에 의해 LC조직의 에틸렌 생성이 증가한다. LC와 HC에서의 Ethylene Forming Enzyme(EFE)활성을 비교했을때, HC에서 EFE활성이 LC보다 2배정도 크게 나타난다. 이것은 Ca<sup>2+</sup>이 막의 안정성을 높여서 막에 위치하고 있다고 생각되는 EFE의 활성을 높이기 때문에 에틸렌 생성을 촉진시킨다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Abeles, F. B. 1966. Auxin stimulation of ethylene evolution. *Plant Physiol.* **41** : 585-588.
- Abeles, F. B. 1973. Ethylene in plant biology. Academic press, New York pp. 1-302.
- Anderson, J. D., M. Lieberman and R. N. Stewart. 1979. Ethylene production by apple protoplasts. *Plant Physiol.* **63** : 931-935.
- Apelbaum, A., S. Y. Wang, A. C. Burgoon, J. E. Baker and M. Lieberman. 1981. Inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transfer, uncouplers of oxidative phosphorylation, and free radical scavengers. *Plant Physiol.* **67** : 74-79.
- Arteca, R. N. 1984. Ca<sup>2+</sup> acts synergistically with brassinosteroid and indole-3-acetic acid in stimulating ethylene production in etiolated mungbean hypocotyl segments. *Physiol. Plant.* **62** : 102-104.
- Burns, J. K. and K. B. Evensen. 1986. Ca<sup>2+</sup> effects on ethylene, carbon dioxide and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity. *Physiol. Plant.* **66** : 609-615.
- Cleland, R. E. and D. L. Rayle. 1977. Reevaluation of the effect of calcium ions on auxin-induced elongation. *Plant Physiol.* **60** : 709-712.
- Cooil, B. J. and J. Bonner. 1957. The nature of growth inhibition by calcium in the *Avena* coleoptile. *Planta* **48** : 696-723
- Dela Fuente, R. K. 1984. Role of calcium in the polar secretion of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* **76** : 342-346.
- Evensen, K. B. 1984. Calcium effects on ethylene and ethane production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in potato disks. *Physiol. Plant.* **60** : 125-128.
- Ferguson, I. B., C. B. Watkins and J. E. Harman, 1983. Inhibition by calcium of senescence of detached cucumber cotyledons: Effect on ethylene and hydroperoxide production. *Plant Physiol.* **71** : 182-186.
- Green, J. 1983. The effect of potassium and calcium on cotyledone expansion and ethylene evolution induced by cytokinins. *Physiol. Plant.* **57** : 57-61

- Jones, R. L. and J. Carbonell. 1984. Regulation of the synthesis of barley aleurone  $\alpha$ -amylase by gibberellic acid and calcium ions. *Plant Physiol.* **76** : 213-218
- Lau, O. L. and S. F. Yang. 1973. Mechanism of a synergistic effect of kinetin on auxin-induced ethylene production: Suppression of auxin conjugation. *Plant Physiol.* **51** : 1011-1014
- Lau, O. L. and S. F. Yang. 1975. Interaction of kinetin and calcium in relation to their effect on stimulation of ethylene production. *Plant Physiol.* **55** : 738-740
- Lau, O. L. and S. F. Yang. 1976. Stimulation of ethylene production in the mungbean hypocotyls by cupric ion, calcium ion and kinetin. *Plant Physiol.* **57** : 88-92
- Lieberman, M. and S. Y. Wang. 1982. Influence of calcium and magnesium on ethylene production by apple tissues slices. *Plant Physiol.* **69** : 1150-1155.
- Mayne, R. G. and H. Kende. 1986. Ethylene biosynthesis in isolated vacuoles of *Vicia faba* L. - requirement for membrane integrity. *Planta* **167** : 159-165.
- Murr, D. P. and S. F. Yang. 1975. Conversion of 5'-methylthioadenosine to methionine by apple tissue. *Phytochemistry* **14** : 11291-1292.
- Odawara, S., A. Watanabe and H. Imaseki. 1977. Involvement of cellular membranes in regulation of ethylene production. *Plant & Cell Physiol.* **18** : 569-575.
- Sakai, S. and H. Imaseki. 1971. Auxin-induced ethylene production by mungbean hypocotyl segments 1. *Plant & Cell Physiol.* **12** : 349-359.
- Sakai, S. and H. Imaseki. 1972. Ethylene biosynthesis: Methionine as an *in vivo* precursor of ethylene in auxin-treated mungbean hypocotyl segments. *Planta (Ber.)* **105** : 165-173.
- Yosii, H., A. Watanabe and H. Imaseki. 1980. Biosynthesis of auxin-induced ethylene in mungbean hypocotyls. *Plant & Cell Physiol.* **21**(2) : 279-291.
- Yu, Y. B., D. O. Adams and S. F. Yang. 1979. Regulation of auxin-induced ethylene production in mungbean hypocotyls: Role of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid 1. *Plant Physiol.* **63** : 589-590.

(1989. 8. 29 接受)