

## 벼 유묘에서 NaCl처리에 따른 식물 호르몬의 변동

閔庚洙\* · 黃台益\*

### Phytohormones Responses to NaCl Treatment in Rice Seedling

Kyung Soo Min\* and Tay Eak Hwang\*

**ABSTRACT** : Ten days old rice seedlings were treated with NaCl and the contents of endogenous hormones such as GA<sub>3</sub>, ABA, IAA and zeatin were measured by ELISA.

Water content and seedling growth were decreased as the salt concentration was increased. GA<sub>3</sub> increased up to 24 hours after NaCl treatment and decreased thereafter. ABA was raised by four times in 48 hours after NaCl treatment. IAA and zeatin decreased as the NaCl concentration and duration of treatment increased. GA<sub>3</sub> and ABA showed positive and negative correlation with the water content in the plant tissue, respectively.

**Key words** : NaCl, GA<sub>3</sub>, ABA, IAA, Zeatin, Rice.

간척지에서 벼 재배는 염분 장애로부터 발생하는 식물체내 염류 등의 축적과 대사적 장애로 인하여 수량 감소가 발생되고 있다. 간척지에서 재배할 수 있는 비교적 내염성 품종들이 개발되고 있으며 유전학적 연구와 여러 가지 생리적 기전<sup>1,2)</sup>에 대해서 밝혀지고 있다.

염분장애에 대한 식물 호르몬의 대사적 기전에 관한 연구도 활발하여 abscisic acid(ABA)의 염분장애 저항성과 관계가 있는 것으로 나타나고 있다<sup>3,4,7,15,18)</sup>. 특히 내생 ABA의 증가는 건조와 염분 그리고 냉해에 의한다는 보고도 있다<sup>13,20,28)</sup>.

ABA에 의해서 내성의 유전적 발현이 조절된다는 사실도 구명되었다<sup>5,16,18)</sup>. 이와 같은 많은 연구에도 불구하고 식물 호르몬들의 변화에 관한 종합적 연구는 찾아보기가 힘들다. 즉 ABA와 GA<sub>3</sub> 그리고 indole-acetic acid(IAA), zeatin에 관하여 염분장애와 관계를 구명하는 것이 필요하다. 그러나 식물 호르몬은 식물체 등에 극미량으로 존

재하기 때문에 분석이 어렵고, 여러 가지 호르몬을 동시 분석한다는 것은 대단히 어려운 일이었으나 면역측정법의 이용으로 가능하여졌다.<sup>26,27)</sup>

면역측정법은 분석전 복잡한 추출과 정제 과정을 축소할 수 있고 기기분석과 같은 초정밀 분석이 가능하며 하루에 수 백개 시료의 동시 분석이 이루어질 수 있다.

본 연구에서는 ABA와 GA<sub>3</sub> 그리고 zeatin 및 IAA에 대하여 특이성 높은 단일클론 항체를 이용하여 효소 면역 측정법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)에 의한 벼 유묘의 염분장애에 대한 기전을 탐색하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 벼재배 및 NaCl 처리

동진벼, 삼강벼, 안나프르나 3품종을 실험에 이

이 연구는 학술진흥재단 지원에 의해서 수행되었음.

\* 全南大學校 農科大學 (Coll. of Agri, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea) < '96. 8. 30 接受 >

용하였다.

벼 종자는 멸균 vermiculite에 파종하였으며 F Hoagland용액(pH 5.6)을 사용하여 25℃ 온실조건(주간 16시간, 야간 8시간) 하에서 파종, 발아시켜 10일된 유묘에 NaCl (0, 50, 100, 150 mmol)처리를 하였다. 재배 용기는 바닥을 철망으로 하여 관배수가 용이하도록 하여 재배하였다. NaCl 처리는 재배 상자를 배수시키고 염분 농도가 조정된 용액을 포화상태로 처리하였으며 식물 체수분 함량은 시료를 채취하여 칭량하고 나서 85℃에서 48시간 건조시킨 후 칭량하여 감소된 양을 수분 함량으로 계산하였다.

식물호르몬 분석용 시료는 채취 즉시 -70℃에 보관하였으며, 식물 호르몬의 조작은 4℃의 dim light cold room에서 수행하였다.

## 2. 호르몬의 추출과 정제

5g의 시료를 80% MeOH (BHT 5mg/1) 50 ml 증가하여 4℃에 48 시간 방치하여 추출되도록 하였다. 추출액을 감압 농축하여 1g/ml로 MeOH를 가하여 TLC에 의한 정제를 시도하였다. 20×20×0.1cm (F<sub>254</sub> Merck) Silica gel TLC plate에 전개시켜 분리하였다. 전개 용매로 GA<sub>3</sub>는 ethylacetate : chloroform : acetic acid (15:5:1), ABA는 toluene : ethylacetate : acetic acid (50:30:4) IAA는 chloroform : methanol (9:1), zeatin은 n-butanol : acetic acid : H<sub>2</sub>O (12:3:5) 이었다.

## 3. 항체와 효소 conjugate

소요되는 항체는 hybridoma cell을 증식시켜 mouse복강에 주입, 복수암을 유발시켜 복수를 채취하여 protein A-Sepharose 4B column chromatography하여 사용하였다. 식물 호르몬에 alkaline phosphatase의 결합은 Weiler의 방법 등에 따라 조제하였다<sup>21,22,23,24,25</sup>.

## 4. ELISA

시료는 IAA의 경우 diazomethane으로 methylation시켰으며, 나머지는 TLC에서 회수하여 소량 MeOH에 다시 용해시켰으며, 적정 buffer

에 희석하여 분석에 사용하였다.

### 1) ELISA protocol

- ① plate coating : overnight of 4℃ 0.2 ml cAb (capture antibody) (reagent 4)
- ② decant cAb solution, add mAb dilute mAb (reagent 5) and incubated for overnight at 4℃
- ③ block plate with 200ml reagent 8
- ④ add to each tube 50 $\mu$ l TBS, 100 $\mu$ l sample or standard and 50 $\mu$ l AP (reagent 6) mix and incubated for 1 hr. at room temp. in the dark
- ⑤ decant and rinse with tube 4~5 times with distilled water
- ⑥ add 200 $\mu$ l reagent 7 and incubated for 30min. at 37℃
- ⑦ stop enzyme activity with 50 $\mu$ l of 5N KOH
- ⑧ read absorbance at 405

### 2) ELISA reagent

- ① 50mM NaHCO<sub>3</sub> buffer, pH 9.6
- ② TBS (150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM Tris, pH 7.5)
- ③ TBS + gelatin (1g gelatin/TBS 1 $\ell$ )
- ④ dilute appropriate amount of cAb in reagent 1 (1 $\mu$ g/ml)
- ⑤ dissolve appropriate amount of mAb in reagent 3 (0.1 $\mu$ g/ml)
- ⑥ dilute AP-labeled tracer hormone with reagent 3
- ⑦ fresh prepare substrate 1mg of p-nitrophenylphosphate per ml of buffer (Sigma direction 0)
- ⑧ blocking solution 1% bovine serum albumin / reagent 2)

## 결과 및 고찰

### 1. TLC 정제

일정량 시료 또는  $^{14}\text{C-GA}_3$   $10^6$  CPM을 전개시킨 후 silica gel로부터 MeOH로 다시 추출하였다.  $^{14}\text{C-GA}_3$ 는  $R_f$  부위에서 99.5% 이상이 회수되었으며, 시료를 전개시킨 후 모든 전개 부위를 절단하여 ELISA에 의해서 조사하였던 바 그 결과는 그림 1에 표시한 바와 같이 spot부위에서 특이적으로 대부분 검출되고 있어서 이하의 실험에서 문제없이 사용할 수 있음을 확인하였고  $^3\text{H-ABA}$ 와  $^3\text{H-IAA}$ 도 같은 방법을 사용하여 결과를 얻었다.

### 2. 생장율

10일된 유묘에 0, 50, 100, 150mM NaCl을 처리하여 7일 후 지상부와 지하부의 생육을 조사하였다. 유묘는 3가지 품종 모두 염처리에 의해서 지상부와 지하부 모두 억제되었다. 염분 농도가 높아지면 생육도 더욱 억제되었다. 특히 품종간의 차이도 크게 나타났다. 동진벼는 안나프르나에 비해서 훨씬 염분에 감수성으로 나타났다. 동일 품종에 있어서 지상부와 지하부를 비교하면 지하부가 10%정도 더 피해를 받는 것으로 관찰되었다 (그림 2).

### 3. 수분흡수

벼 유묘에 50mM NaCl처리 후 120시간까지 식

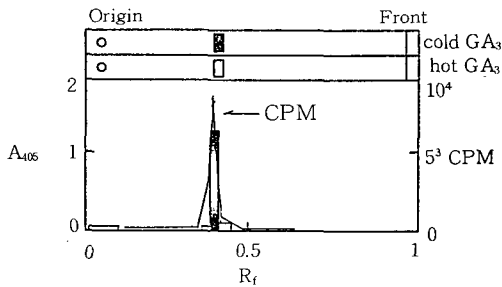


Fig. 1. Distribution of immunoreactivity and recovery of  $^{14}\text{C-GA}_3$  on chromatograms of cold and hot  $\text{GA}_3$ .

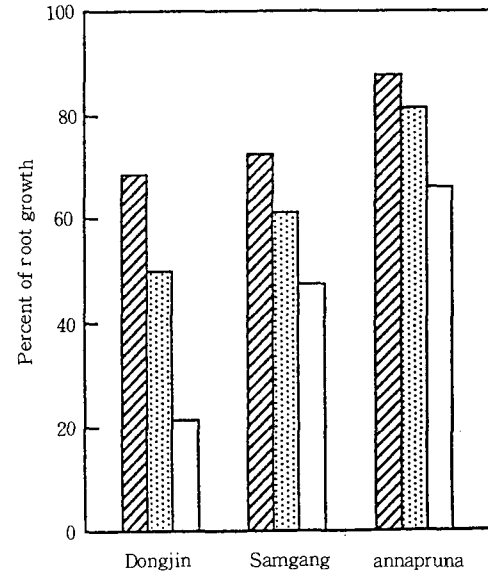
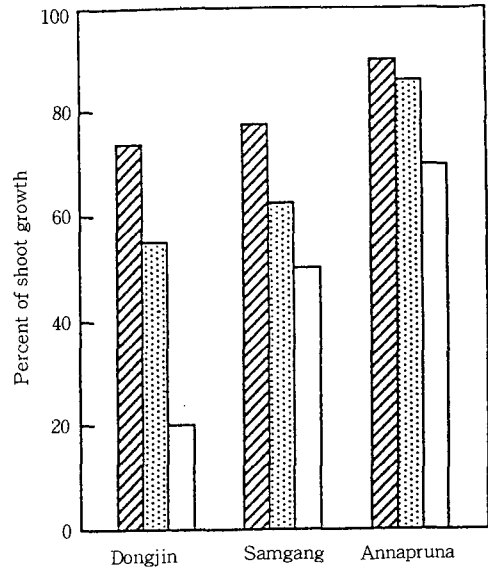


Fig. 2. Effect of 50mM (hatched), 100mM (dotted) and 150mM (white) NaCl on the growth of Dongjin, Samgang and Annapurna seedlings. Percent of relative growth inhibition of the shoot (above) and root (below) is shown.

물체 중의 수분 함량을 관찰하였다. 3품종 모두 24시간까지는 큰 변화를 보이지 않았다. 그러나 24시간 이후 시간이 지남에 따라서 수분 함량은

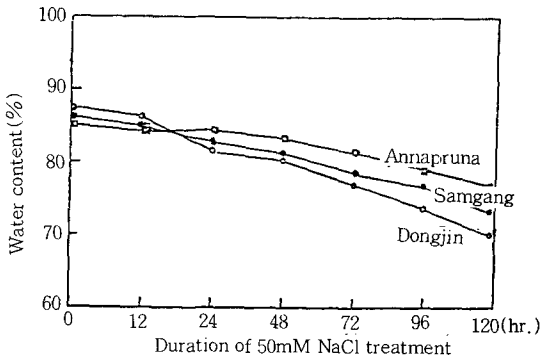


Fig. 3. Changes of water content of 10 days old rice seedlings imposed to 50mM NaCl.

점차 감소하였다. 동진, 삼강, 안나프르나가 70, 73, 75% 약간의 차이를 나타내고 있었다(그림 3).

#### 4. Phytohormones

그림 4에서 보는 바와 같이 유묘에 50mM NaCl처리에 의한  $GA_3$ 의 함량 변동은 동진벼는 43 nmol에 26nmol까지 감소되었고, 안나프르나는 38nmol에서 28nmol로 감소되었다.  $GA_3$ 는 3품종 모두 12시간부터 감소가 관찰되었고 시간이 지남에 따라 감소되지만 72시간 이후는 크게 변동되지 않았다.

ABA의 함량은 NaCl처리에 의한 시간과 비례하여 증가하였다. 특히 품종간 차이가 크게 나타나서 동진벼는 31nmol까지 증가하고 안나프르나는 13nmol까지만 증가함이 관찰되었다. 동진벼는 처리 후 17배, 안나프르나는 5.2배 ABA의 함량이 증가하였다.

옥신 중 대표적인 IAA는 120시간 염분처리에 의해서 생체 중 함량이 50%정도 감소되는 것으로 조사되었다. 품종간에도 감소의 폭은 비슷하게 관찰되었다.

Zeatin도 염분 처리 시간에 반비례하여 생체 중 함량이 감소되었다. 동진벼는 당초 17nmol에서 6nmol까지, 그리고 삼강벼는 12nmol에서 5nmol로 감소되었다.

#### 5. 수분과 호르몬 관계

식물체의 수분 함량과 호르몬의 농도와의 관계는 그림 5와 같다. 그 결과 대부분의 식물 호르몬

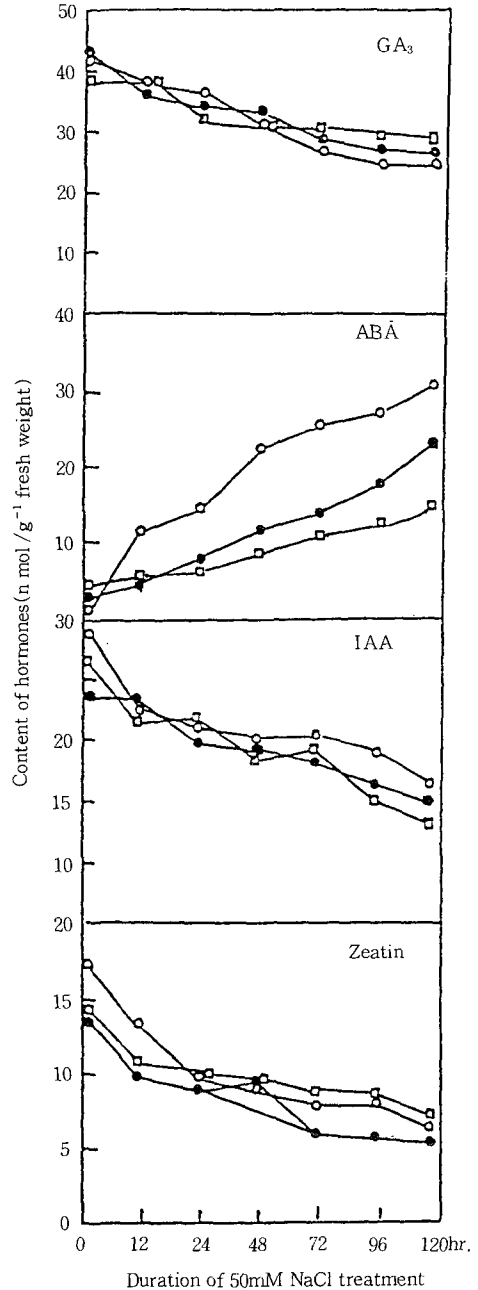


Fig. 4. Changes in the content of phytohormones in root imposed to 50mM NaCl.

○ Dongjin, ● Samgang, □ Annapurna.

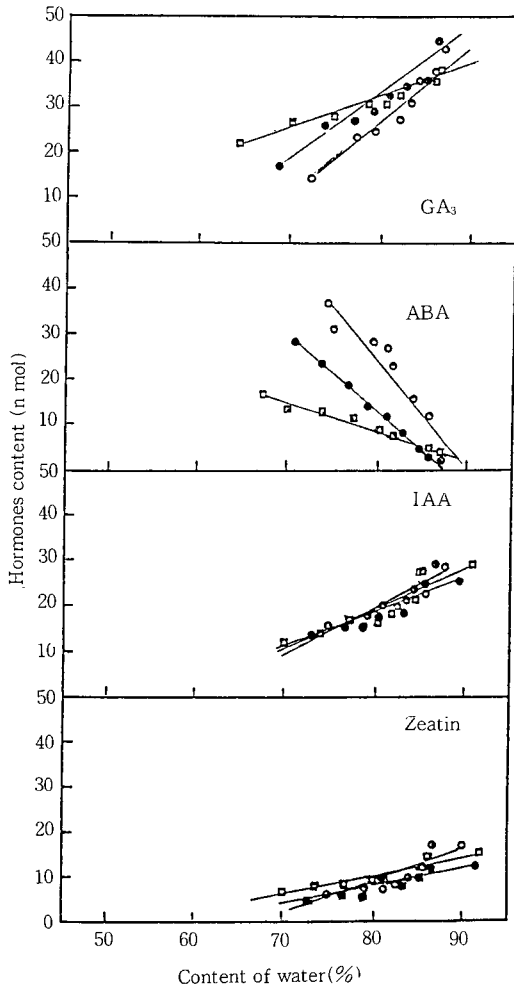


Fig. 5. Relationship of hormone content and water content.

○ Dongjin, ● Samgang, □ Annapurna.

은 수분함량과 상관성이 있었으며 ABA의 경우 크게 유의성이 확인되었다. ABA는 수분의 감소가 증가 요인임을 알 수 있었고, GA<sub>3</sub>와 IAA도 같은 경향이였다.

식물호르몬에 있어서 상호작용에 대해서 IAA와 ABA의 관계를 Rehm 등<sup>8,9,10</sup>이 GA 및 ethylene, cytokinin 과의 길항작용 관계는 Khan 등<sup>11,12,14</sup>에 의해서 구명되었다. 이와 같이 식물생장에 있는 식물 호르몬간에는 서로 연관하다.

본 연구결과는 수도의 염분 장애에 대한 내성

과 감수성에 따라서 식물 호르몬 함량의 변동될 수 있음을 확인하였다. 따라서 식물호르몬의 변동을 면역측정방법에 의하여 내염성 정도의 판단이 가능함을 확인하였다.

수도는 염분의 처리에 의해서 생체중의 수분이 감소하였다. 수분의 흡수와 증산의 비율을 본 연구에서는 조사하지는 않았으나 뿌리는 염분에 노출되었을 때 삼투압의 불균형과 이온 농도 차이에 의해서 수분 흡수가 저해된다는 것은 잘 알려진 사실이다<sup>6</sup>. NaCl 처리에 의한 수분흡수는 품종간에도 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 내염성 품종으로 알려진 안나프르나는 감수성 비인 동진벼보다 더 많은 수분을 함유하고 있었다. ABA는 수분 stress에 의해서 증가됨은 잘 알려져 있다<sup>3</sup>. 그러나 GA<sub>3</sub>와 IAA, zeatin 등의 내염성 관련성의 연구는 그리 많지 않다. 본 연구 결과 이 호르몬이 내염과 직접 관련 여부는 확인되지 않았으나 염분장애에 따라서 함량이 변동하고 식물체의 생장에 영향을 미치고 있음이 확인되었다. 식물 호르몬의 분석에 응용된 단일클론 항체와 ELISA는 정밀 분석이 가능한 간편한 방법이라는 사실을 확인할 수 있었다.

식물체로부터 추출 후 TLC에 의한 정제만으로 ELISA에 의하여 정량분석이 가능하였다. 그리고 1일 500개 정도의 시료 분석을 할 수 있는 신속성도 확인하였다.

본 연구 결과 염분장애에 의해서 GA<sub>3</sub>, ABA, IAA, zeatin의 함량이 변화되었고, 이의 분석은 단일클론항체를 이용한 ELISA에 의해서 효과적으로 분석할 수 있음을 입증하였다.

## 적 요

벼의 10일된 유묘에 0, 50, 100, 150mmol의 NaCl을 처리하여 수분 흡수와 생육 그리고 GA<sub>3</sub>와 ABA, IAA, zeatin의 내생 호르몬 수준을 단일클론 항체를 이용한 ELISA에 의해서 분석하였다.

1. 수분 함량은 50mM NaCl 처리에 의해서 동진벼, 삼강벼, 안나프르나 모두 시간이 지남에 따

- 라서 감소하였다. 처리 5일째 수분함량은 동진(71%), 삼강(75%) 안나프르나(79%) 순으로 높았다.
2. 염분처리에 의해서 지상부와 지하부 생육은 모두 억제되었다. 지하부가 지상부보다 억제되었다. 지상부와 지하부는 안나프르나 <삼강< 동진 순으로 생육이 억제되었다.
  3. GA<sub>3</sub>와 IAA는 염분처리에 의해서 시간이 지남에 따라서 감소되었으며 zeatin도 감소 경향을 나타내었다.
  4. ABA는 염분 농도와 시간에 따라 증가되었으며 염분처리 24시간에 크게 증가되었다. 특히 동진벼는 2nmol에서 31nmol 까지 증가되었으나 안나프르나는 4.5nmol에서 15nmol까지만 증가되었다.
  5. 수분 함량의 증감에 따라 식물호르몬의 함량이 변동됨을 알 수가 있었다.

## LITERATURE CITED

1. Akbar M, I.E Gunawardena and F.N Ponnampereuma. 1986. Breeding for soil stresses. In Progress in Rainfed Lowland Rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, pp.263-267.
2. Khush G.S and D Hillerislambers. 1976. Genetics of salt tolerance in rice. In Rice Genetics. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, pp.399-409.
3. Bray E.A. 1991. Regulation of gene expression by endogenous ABA during draught stress. In WJ Davies, HG Jones, eds, Abscisic Acid, Physiology and Biochemistry. BIOS Scientific Publisher, Oxford, UK, pp.81-89.
4. Chandler P.M and M Robertson. 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 45:113-141.
5. Galvez A.F, P.J Gulick and J Dvorak. 1993. Characterization of early stages of genetic salt-stress responses in salt tolerant *Lophopyrum elongatum*, salt-sensitive wheat, and their amphiploid. Plant Physiol 103:257-265.
6. Greenway H and R Munns. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. Annu Rev Plant Physiol 31:149-190.
7. Hetherington A.M and R.S Quatrano. 1991. Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. New Phytol 119:9-32.
8. Ketring D.L and P.W Morgan. 1970. Physiology of oil seeds. I. Regulation of dormancy in virginia-type peanut seeds. Plant Physiol. 45, 268-273.
9. \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1971. Physiology of oil seeds. II. Regulation of dormancy in virginia-type peanut seeds by plant growth regulators. Plant Physiol. 47, 488-492.
10. \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1972. Physiology of oil seeds. IV. Role of endogenous ethylene and inhibitory regulators during natural and induced after ripening of dormant virginia-type peanut seeds. Plant Physiol. 50, 382-387.
11. Khan A.A. 1967. Inhibition of gibberellic acid-induced germination by abscisic acid and reversal by cytokinins. Plant Physiol. 43, 1463-1465.
12. Kochhar T.S. 1983. Interaction of abscisic acid and kinetin on growth of haworthia callus *in vitro*. Experimetia /switzerland. 39, 780-781.
13. Lee T.M, H.S Lur and C Chu. 1993. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. I. Endogenous abscisic acid levels. Plant Cell Eviron 16:481-490.

14. Liu W.C and H.R Carns. 1961. Isolation of abscisin, an abscission accelerating substance. *Science*. vol. 134, 384-385.
15. Milborrow B.V. 1971. Abscisic acid. In T-W Goodwin, ed, *Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, London, UK, pp137-151.
16. Mohapatra S.S, R.J Poole and R.S Dhindsa. 1988. Abscisic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. *Plant Physiol* 87:468-473.
17. Rehm M.M and M.G Cline. 1973. Rapid growth inhibition of avena coleoptile segments by abscisic acid. *Plant Physiol*. 51:93-96.
18. Skiver K and J Mundy. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2:503-512.
19. Steward C.R and G Voetberg. 1985. Relationship between stress-induced ABA and proline accumulation and ABA-induced proline accumulation in excised barley leaves. *Plant Physiol*. 79, 24-27.
20. Walker-Simmons M.K. 1987. ABA-levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol* 84:61-66.
21. Weiler E.W, J Eberle, R Mertens, R Ataorn, M Feyerabend, P.S Jourdan, A Arnscheidt and U Wiczorek. 1986. Antisera-and monoclonal antibody-based immuno-assay of plant hormones. In *Immunology in plant science*. Soci. Experi. Biol. seminar No. 29. pp27-58. Cambridge Univ. press.
22. \_\_\_\_\_, Jourdan P.S and W Conrad. 1981. Levels of indole-3-acetic acid in intact and decapitated coleptiles as determined by a specific acid and highly sensitive solid-phase enzyme immunoassay. *Planta* 153:561-571.
23. \_\_\_\_\_. 1980a. Radioimmunoassay for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. *Planta* 148:262-272.
24. \_\_\_\_\_. 1980b. Radioimmunoassay for transzeatin and related cytokinins. *Planta* 149:155-162.
25. \_\_\_\_\_. 1981. Radioimmunoassay for pmol-quantities of indole-3-acetic acid for use with highly stable(<sup>125</sup>I)-and (<sup>3</sup>H) IAA derivatives as radiotracers *Planta* 153: 319-325.
26. \_\_\_\_\_ and Ute Wiczorek. 1981. Determination of femtomol quantities of gibberellic acid by radioimmunoassay. *Planta* 152:159-167.
27. Whang T.E and H.O Lim. 1988. Production on monoclonal antibodies against abscisic acid and its application. *Proc. Mol. Biol. & Genet.* 3(2):95-100.
28. Yalow R.S and S.A Berson. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39:1157-1175.
29. Zeevaart J.A.D and R.A Creelman. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol* 39:439-473.