

염스트레스가 담배식물의 Protein, ATPase 및 Peroxidase 활성에 미치는 영향

이상각·강병화·이학수¹⁾·배길관¹⁾
고려대학교 자연자원대학·충북대학교 농과대학

Effects of Salt Stress on Protein Content, ATPase and Peroxidase Activities in Tobacco.

Sang-Gak Lee, Byeung-Hoa Kang, Hak-Su Lee¹⁾, Gill-Kwan Bae¹⁾ (College of Natural Resources, Korea university, Seoul, 136-701, Korea, ¹⁾College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea)

Abstract : The analysis of biochemical changes in tobacco plant as increase of NaCl concentraion was conducted. Total protein content and soluble protein content were decreased as NaCl concentration was increased, in that steady decreased until 120mM NaCl and largely decreased at 150mM NaCl. The expression of 74Kd subunit was increased until 60mM NaCl. However, the amount of 74Kd protein was decreased from 90mM NaCl. There was no difference for expression of other protein subunits. Chlorophyll a content was significantly decrease as NaCl concentration was increased, but chlorophyll b content was not much decreased. The slow increase up to 120mM NaCl and large increase at 150mM NaCl for ATPase and peroxidase activities indicated that 120mM NaCl could be a limiting concentration for salt injury.

Key words : *Nicotiana tabacum*, NaCl concentration, Protein pattern, ATPase activity, Peroxidase activity.

서 론

식물이 염해에 반응하는 양상은 온도, 광, 습도와 같은 환경뿐만 아니라, 유전적특성이나 식물의 생육단계와 같은 생물적인 요인에 따라, 그리고 관수방법, 토양의 비옥도와 같은 재배환경에 따라 다르게 나타난다^{8,9,15,16}. 식물이 염스트레스를 받게 되면 세포내의 액포의 발달과 엽록체의 변형에 따른 체내의 생화학적 변화가 일어나 식물의 형태적, 해부적, 생리적변화를 수반하게 된다^{7,15,18}.

스트레스환경하에서 체내활성에 가장 민감하게 반응하는 단백질은 염해에 의해서도 증감¹⁷이 나타나 osmoticum으로 정의^{8,10,15} 하지만, 종에 따른 차이가 커 정확하게 방어 단백질인지, 기존 단백질의 스트레스에 의한 분해산물인지는 의문의 여지가 남아있다. 또한 염스트레스하에서 ATPase는 세포내 Na⁺를 액포내로 격리시켜 세포의 대사과정을 보호하는 가장 중요한 역할을 하는 효소로서, 염농도가 높아질수록 염해의 강약은 원형질막의 ATPase보다도 Na⁺의 액포막 격리현상에 관여하는 액포막 ATPase활성이 중요한 것으로 최근에 보고^{2,12,13} 되었다. 수분스트레스하에서

peroxidase활성이 증가하여 리그닌합성^{3,9,10,11,14}과의 관계가 있다 하지만 염스트레스하에서의 정확한 peroxidase의 기작은 밝혀지지 않은 상태이다.

본 실험은 염스트레스시 영향하는 제1보의 생리적 반응의 연구결과를 기초로, 염스트레스에 따라서 생체내에서 일어나는 생화학적인 변화의 구명을 통해 세포대사의 기초자료로 제공하고자 수행하였다.

재료 및 방법

본 실험은 고려대학교 자연자원대학 부속온실에서 1998년 4월부터 6월까지 황색종담배 NC82를 수경재배로 실시하였다. 파종 후 8매의 잎이 전개된 균일한 묘를 선발하여 9 l의 영양액을 채운 포트에 이식하였다. 영양액은 5일간 격으로 교체하였고 용존산소량은 air compressor로 공급하였다. 실험에 이용된 양액은 Hoagland용액의 조성을 변형하여 다음과 같이 1mM KH₂PO₄, 2mM K₂SO₄, 5mM Ca(NO₃)₂, 2mM MgSO₄, 5mM KCl, 25μM H₃BO₃, 4μM ZnSO₄·7H₂O, 0.5μM CuSO₄·5H₂O, 0.05μM H₂MoO₄·

H₂O, 2μM MnCl₂ · 4H₂O, 15μM Fe-EDTA로 조제하였다.

염스트레스는 처리 3일전부터 10mM NaCl로 경화처리하여, 이식 후 20일에 control, 30mM, 60mM, 90mM, 120mM, 150mM, 180mM NaCl로 3주간처리 후 수확하였다. 분석을 위한 시료는 수확시 각 처리별 증위엽 9매제를 표본으로 하여 사용하였다.

총단백질함량은 1N NaOH, 가용성단백질은 0.1M Tris-HCl (pH 7.8)로 추출하여 Bradford방법⁹⁾에 의해 정량하였고 표준물질은 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다. SDS-PAGE를 위한 단백질 추출 및 정제는 총단백질을 추출하는 방법으로 생엽 5g을 액체질소에 넣고 추출용액 [30mM Tris (pH8.7), 1mM ascorbic acid, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0.5% PVP]을 가해 마쇄하여 33000g로 15분간 원심분리하여 상정액만 추출하였다. 상정액의 4배에 해당하는 0.07% 2-mercaptoethanol을 함유한 냉각아세톤을 처리하여 -20℃에서 1시간 침전시킨 후 33000g에서 10분간 원심분리하여 정제하였다. 각 처리별 단백질함량을 정량하여 15μg의 단백질을 함유한 시료와 SDS reducing buffer[60mM Tris (pH 6.8), 10% Glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, bromophenol blue]에 1:2로 희석시켜 전기영동에 사용하였다. 전기영동은 1차원(1D) SDS-PAGE로 실시하였다. Peroxidase활성은 MacAdam et al¹⁰⁾과 Evans의 방법¹¹⁾에 따라 생엽 1g을 액체질소상태에서 마쇄하여 추출용액[0.1M Tris-HCl(pH 7.3), 0.02M sucrose, 5% (w/v) PVP, 10ml MgCl₂, 2mM EDTA, 2mM K₂HPO₄] 5ml를 가하여 20000g에서 원심분리하여 상정액을 활성도측정에 사용하였다. 3.2M guaiacol을 0.1ml, 649mM H₂O₂를 0.05ml과 0.01mM Tris-HCl 완충액(pH 7.3)을 3.12ml를 취한 후 준비된 시료 0.02ml을 가하여 436nm에서 흡광도 증가변화를 측정하였다. ATPase활성은 Leonard and Hotchkiss의 방법¹²⁾에 따라 생엽 1g을 액체질소상태하에서 마쇄하여 추출용액(0.1M Tris-HCl, pH 7.8 5ml)을 가하여 추출하여 효소활성측정에 이용하였다. ATPase반응 혼합액은 70mM Tris-MES(pH 6.5 0.3ml, 30mM MgCl₂ 0.1ml, 20mM ATP 0.1ml, 증류수 0.4ml, 그리고 추출용액 0.1ml을 첨가 혼합하였다. 수조(30℃)에서 1시간 반응 후 25% trichloroacetic acid로 정지시켰다. 유리된 Pi는 Fiske-subbarow법에 따라 820nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 KH₂PO₄를 사용하였다. 엽록소형광은 암조건에 엽을 방치한 후 chlorophyll fluorescence meter(FIM 1500, ADC, UK)를 이용하여 Fv/Fm수치를 구하였다. 전질소 함량은 micro-kjeldahl법, 환원당은 Bernfeld의 방법¹³⁾으로 glucose을 표준물질로 정량하였으며, 엽록소함량은 Arnon의 방법¹⁴⁾으로 실시하였다.

결과 및 고찰

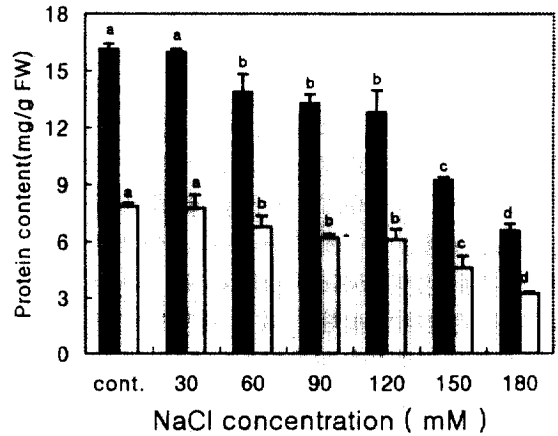


Fig.1. Protein content of tobacco grown for 3 week under different NaCl concentrations. ; total protein, ; soluble protein. The ranges of standard deviation were marked on top of each bar. The same letters on each bar are not significantly different with Duncan's multiple range test(p=0.05)

염스트레스에 따른 총단백질과 가용성단백질함량의 변화는 그림 1과 같다. 처리에 따른 총단백질의 변화는 염농도가 높아질수록 감소하였다. 그러나 대조구와 30mM에서는 처리간의 유의성은 없었으며, 60mM, 90mM, 120mM간에도 처리간의 차이 없이 염농도가 증가하여도 완만한 감소를 나타냈다. 높은 농도의 150mM이상에서는 큰 감소를 보여 염해에 크게 영향하였다. 가용성단백질도 총단백질의 변화와 같은 경향을 보이고 있으며, 전보에서 보고한 결과와 같이 염농도가 높아질수록 성장제한이 크게 일어나는 120mM까지는 단백질의 함량변화가 크지 않아 이 농도까지는 세포내의 이온의 균형이 생체내의 활성을 유지하는 것으로 사료된다.

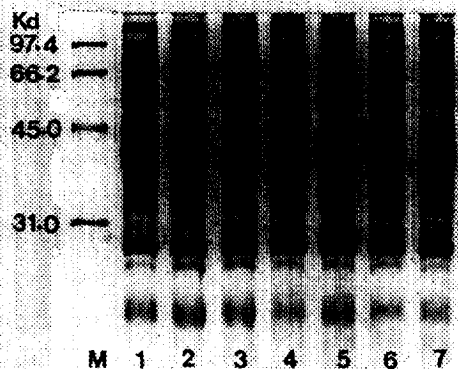


Fig.2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of total proteins extracted from 9th leaf of tobacco plant with different NaCl concentrations. Estimated molecular weight in kilodalton were indicated. Lane 1;control, Lane 2;30mM NaCl, Lane 3;60mM NaCl, Lane 4;90mM NaCl, Lane 5;120mM NaCl, Lane 6;150mM NaCl, Lane 7;180mM NaCl, M ;molecular weight marker

염스트레스에 따른 총단백질의 전기영동 양상은 그림 2와 같다. 염스트레스에 따른 생화학적반응에서 단백질의 일부의 증감이 나타났으나, 염농도가 높아질수록 새로운 polypeptide의 생성이나 소멸한 밴드는 없었다. 그러나 그림 2(화살표)에서 약 74Kd의 polypeptide의 단일 밴드만이 큰 변화가 관찰되었다. 대조구의 polypeptide band의 양이 30mM, 60mM까지는 증가하고 90mM부터는 양적인 감소가 뚜렷이 관찰되었다. 74Kd의 polypeptide band의 양적변화는 새로운 유전자의 발현에 의한 저항기작으로 생각된다. 특히 체내의 생리적인 염분장해에 적용 할 수 있는 범위까지는 양적증가에 의해, 염분장해의 범위의 농도하에서는 양적감소의 변화양상을 보여 74Kd 단백질이 삼투압을 조절하는 osmoticum의 기능의 유전자와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다.

식물체내의 각 기관의 물질대사의 중요한 역할을 하는 전질소, 당 및 엽록소함량의 변화는 표 1과 같다. 전질소의 함량은 염농도가 높아질수록 60mM까지는 약간 증가하다가 90mM부터는 감소하였다. 환원당은 염농도가 높아질수록 감소하였지만 처리농도간에서는 큰 차이는 없었다. 식물의 생리적 상태의 기준이 되는 염스트레스에 따른 엽록소의 변화는 표 1과 같이 총엽록소함량의 변화는 30mM의 일시적인 증가되는 염농도가 높아질수록 감소하였다. 그러나 엽록소a/엽록소b율은 염농도가 높아질수록 감소하였으나, 각각의 엽록소a와 엽록소b의 염스트레스에 반응하는 정도가 상이하였다. 엽록소a는 60mM부터 염농도가 증가할수록 크게 감소하였으나 엽록소b는 처리농도에 따라 큰 변화가 없어 염스트레스에 따라 엽록소변화는 엽록소a가 민감하게 반응하였다. 처리기간 중 담배의 염스트레스에 따른 가시적인 피해현상은 30mM에서는 엽색이 좀 진해졌으나 염농도가 높아질수록 황화현상이 나타났다. 이는 염농

도가 높아질수록 과량의 Na⁺흡수가 타 양분의 흡수를 저해한 영양결핍현상으로 사료된다.

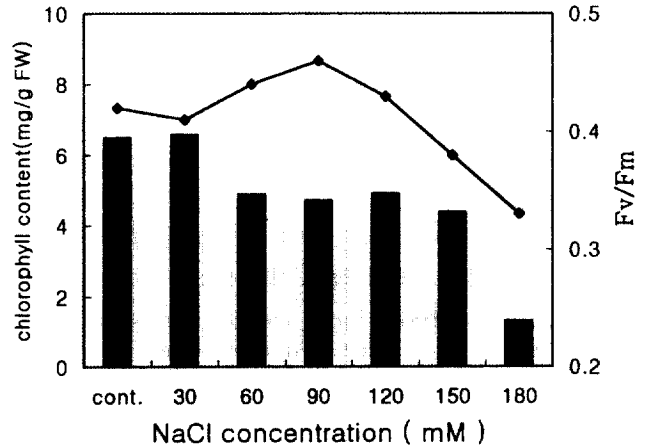


Fig. 3. Fluorescence yield (left vertical bar) and chlorophyll (right vertical bar) content of tobacco grown for 3 weeks under different NaCl concentrations.

광에너지 전달과정 중 들뜬에너지가 광학II 안테나에 의해 수확된 후 광학II 반응중심으로 전달되어 광화학반응에 이용되는 효율을 의미하는 Fv/Fm의 수치는 그림 3의 결과와 같다. 염스트레스에 따른 형광수율은 대조구와 비교하여 30mM에서는 약 2%의 미미한 감소를 보였지만, 염농도가 높아질수록 60mM, 90mM, 120mM에서는 증가하다가 150mM 이상에서는 급격히 감소하였다. 엽록소함량과 형광수율관계를 비교하면 30mM, 60mM, 90mM에서 엽록소함량은 감소하였으나 형광효율이 증가한것은 염스트레스에 따른 성장특성 중 엽면적의 감소와 엽후의 증가로 단위면적당 세포수의 증가에 연관된것으로 추론되지만, 이는 좀 더 연구를 통해 구명할 과제로 사료된다.

Table 1. Effects of different NaCl concentration on total nitrogen, reducing sugar and chlorophyll contents in tobacco.

NaCl concentration	Total nitrogen (% DW)	Reducing sugar (mg DW)	Chl		Total chl	Chl a/b
			a	b		
Control	4.22 ± 0.19 ^c	69.38 ± 6.18 ^a	5.07 ± 0.55 ^a	1.41 ± 0.06 ^a	6.48 ± 0.61 ^a	3.6 ± 0.3 ^a
30mM	4.45 ± 0.15 ^b	53.03 ± 4.40 ^b	5.07 ± 0.95 ^a	1.50 ± 0.22 ^a	6.57 ± 1.16 ^a	3.4 ± 0.2 ^a
60mM	4.50 ± 0.13 ^a	47.12 ± 6.07 ^b	3.56 ± 0.51 ^b	1.32 ± 0.31 ^a	4.88 ± 0.37 ^b	2.7 ± 1.1 ^{ab}
90mM	4.17 ± 0.16 ^c	47.67 ± 4.13 ^b	3.31 ± 0.37 ^b	1.41 ± 0.34 ^a	4.72 ± 0.32 ^b	2.3 ± 0.8 ^{bc}
120mM	3.92 ± 0.16 ^d	41.52 ± 3.65 ^{bc}	3.29 ± 0.80 ^b	1.62 ± 0.24 ^a	4.91 ± 0.74 ^b	2.0 ± 0.7 ^{bc}
150mM	2.87 ± 0.03 ^a	41.20 ± 6.81 ^{bc}	2.79 ± 0.60 ^b	1.60 ± 0.15 ^a	4.39 ± 0.58 ^b	1.7 ± 0.4 ^c
180mM	2.18 ± 0.03 ^f	29.84 ± 6.62 ^c	0.76 ± 0.16 ^c	0.55 ± 0.22 ^b	1.31 ± 0.39 ^c	1.4 ± 0.2 ^c

*The same letters in a column are not significantly different with Duncan's multiple range test (p=0.05).

염스트레스에 따른 ATPase활성변화는 그림 4와 같다. ATPase는 세포내 Na⁺을 액포내로 격리시키는데 관여하는 막단백질로서 이 효소의 활성이 크면 H⁺/Na⁺antiport에 의한 세포내로의 Na⁺격리가 활발히 일어나 세포내 이온농도가 적절히 유지된다고 알려져 있다. 본 실험의 결과는 ATPase활성은 염농도가 높아질수록 증가하였다. 염처리에 따라 염농도가 높아질수록 ATPase활성은 30mM과 60mM 사이에는 25%가 증가하였으나 120mM까지는 처리간의 약 10%정도로 점진적인 증가를 하였다. 150mM에서는 ATPase활성의 증가폭이 컸고 180mM까지 유지되었다. 결과적으로 염해의 정도는 Na⁺의 격리에 관여하는 ATPase 활성이 중요하며 전보에서 보고한 염농도가 증가할수록 Na⁺의 증가가 세포내 대사과정에 크게 영향을것으로 사료되지만, 세포내 Na⁺에 의한 직접효과로 ATPase의 활성이 증가된것인지 또한 염해에 의한 방어기작으로 새로운 유전자의 발현이 ATPase의 활성을 증가 시키는것인지는 보충연구가 수행되어야 될것같다.

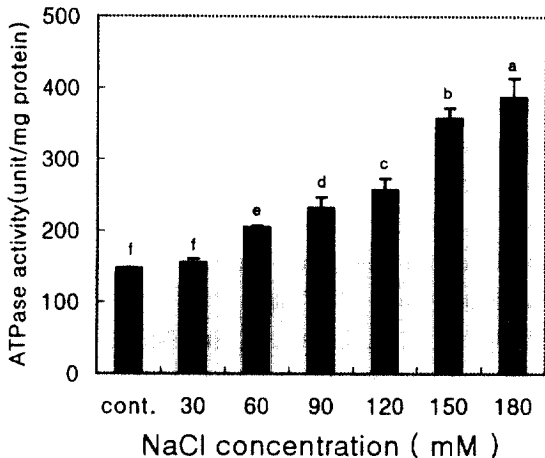


Fig. 4. ATPase activity of tobacco grown for 3 week under different NaCl concentrations. The ranges of standard deviation were marked on top of each bar. The same letters on each bar are not significantly different with Duncan's multiple range test(p=0.05).

체내의 스트레스에 민감하게 반응하여 H₂O₂의 제거에 관여하는 peroxidase은 외세포공간과 액포에 존재한다. 염스트레스에 따른 peroxidase활성은 그림 5와 같다. 염농도가 높아질수록 peroxidase활성은 120mM까지는 직선적으로, 150mM이상에서는 급격히 증가하였다. 염처리에 따른 peroxidase의 활성은 30mM에서 60mM까지 증가폭은 완만하였지만, 염농도가 높아질수록 대조구와 비교하여 90mM에서 200%, 120mM에서 250%, 150mM에서 약 350%로 활성이 크게 증가하였다. 본 실험의 결과 처리농도에 따라 120mM과 150mM에서 활성차이가 크게 일어나 단백질함

량과 더불어 peroxidase도 환경스트레스에 대한 생리기능 및 생화학적대사를 설명하는 지표로서 이용이 가능할것으로 사료된다. 최근에는 peroxidase가 여러가지의 대사과정에 직접관여 세포내의 방어효소복합체로서 주요한 기능을 수행하는 것으로 연구^{8,15)}되고있다.

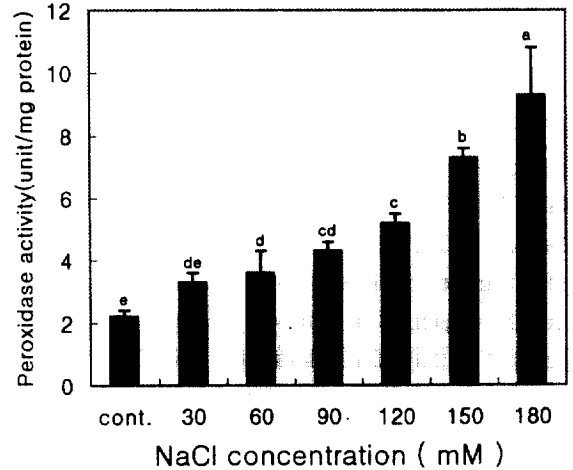


Fig. 5. Peroxidase activity of tobacco grown for 3 week under different NaCl concentrations. The ranges of standard deviation were marked on top of each bar. The same letters on each bar are not significantly different with Duncan's multiple range test(p=0.05).

이상의 결과를 종합하면 단백질함량, 전질소함량, 엽록소 a/엽록소 b율, 엽록소의 형광수율, ATPase활성 및 Peroxidase의 활성이 염농도가 높아질수록 중·감의 폭이 120mM에서 큰 변화가 일어나 담배의 염해에 따른 체내의 생화학적인 제한 범위로 사료된다.

요 약

본 실험은 담배에서 염스트레스에 따른 생리적 반응의 연구결과(제1보)를 기초로, NaCl를 농도별로 처리하여 생체내에서 일어나는 생화학적인 변화의 구명을 통해 염해기작의 기초자료로 얻고자 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다. 총단백질과 가용성단백질은 염농도가 높아질수록 감소하였으며 처리간에는 120mM까지는 완만히 감소하였고, 150mM에서는 급격한 감소를 나타냈다. 전기영동 패턴은 염농도의 증가에 따라 새로운 polypeptide band의 생성과 소멸은 없었으며 약 74Kd의 polypeptide band에서 30mM과 60mM까지는 뚜렷한 양이 증가하였고 90mM부터는 감소하였다. 엽록소함량은 염농도의 증가에 따라 감소하였으며 특히 염해에 의한 반응은 엽록소b보다는 엽록소a가 민감하였다. ATPase활성과 peroxidase의 활성은 염농도가 높아질수록 120mM까지는 일정하게 증가하였으나 150mM에서 급격히 증가하여 담배의 염해의 생화학적인 제한범위는

120mM로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Arnon, D. I. 1949. Copper enzyme in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24 : 1-15.
2. Ayala, F., J. W. O'Leary, and K. S. Schumaker. 1996. Increased vacuolar and plasma membrane H⁺-ATPase activities in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *J. Exp. Bot.* 47(294) : 25-32.
3. Bacon, M. A., D. S. Thompson, and W. J. Davies. 1997. Can cell wall peroxidase activity explain the leaf growth response of *Lolium temulentum* L. during drought?. *J. Exp. Bot.* 48(317) : 2075-2085.
4. Bernfeld, P. 1995. Amylase, α and β . *Method. Enzymol.* 1 : 149-158.
5. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
6. Evans, J. J. 1970. Spectral similarities and kinetic differences of two tomato plant peroxidase isoenzymes. *Plant Physiol.* 45 : 66-69.
7. Greenway, H and R. Munns. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190.
8. Hurkman, W. J. 1992. Effects of salt on plant gene expression : A review. *Plant and Soil.* 146 : 145-151.
9. Ingham, L. M., M. L. Parker, and K. W. Waldron. 1998. Peroxidase : Changes in soluble and bound forms during maturation and ripening of apples. *Physiol. Planta.* 102 : 93-100.
10. Lechno, S., E. Zamski, and E. Tel-Or. 1997. Salt stress-induced responses in cucumber plants. *J. Plant Physiol.* 150 : 206-211.
11. Lee, S. G., B. H. Kang, H. S. Lee, K. K. Bae and J. Y. Roh. 1997. Changes of biochemical activities harvested leaves of tobacco plant during maturing period. *J. Kor. Soci. Tob. Sci.* 19(2) : 77-82.
12. Leonard, R. T. and C. W. Hotchkiss. 1976. Cation-stimulated adenosine triphosphate activity and cation transport in corn root. *Plant Physiol.* 58 : 331-335.
13. Long, A. R., J. L. Hall, and L. E. Williams. 1997. Chromatographic resolution, purification and characterization of H⁺-PPase and H⁺-ATPase from *Ricinus cotyledons*. *J. Plant Physiol.* 151 : 16-24.
14. MacAdam, J. W., C. Nelson, and R. Sharp. 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiol.* 99 : 872-878.
15. Michael, C.S., M. G. Catherine, and E. F. Leland. 1994. Whole-plant response to salinity. In R. E. Wilkison(ed.) *Plant-environment interactions*. Marcel Dekker, Inc. New York. 199-244.
16. Misra, A. N., S. M. Sahu, M. Misra, P. Singh, I. Meera, N. Das, M. Kar, and P. Sahu. 1997. Sodium chloride induced changes in leaf growth, and pigment and protein contents in two rice cultivars. *Biologia Plantarum.* 39(2) : 257-262.
17. Sweby, D. L., B. I. Huckett, and M. P. Watt. 1994. Effects of nitrogen nutrition on salt-stressed *Nicotiana tabacum* var. Samsun in vitro plantlets. *J. Exp. Bot.* 45(276) : 995-1008.
18. Volkmar, K. M. Y. Hu, and H. Steppuhn. 1998. Physiological responses of plants to salinity : A review. *Can. J. Plant Sci.* 78 : 19-27.