

Cd²⁺이 닭의장풀의 기공개폐에 미치는 영향

이 준 상

(상지대학교 생명과학과)

(2000년 3월 8일 접수, 2000년 4월 20일 채택)

적 요 - Cd²⁺이 닭의장풀의 분리표피와 온전한 잎의 기공개폐에 미치는 영향을 조사하였다. Cd²⁺을 분리표피에 처리하였을 때 기공열림이 촉진되었다. 100 μM Cd²⁺ 처리시 기공은 8.38 μm까지 열렸으나, 대조구는 3.74 μm였다. 대조구의 기공 크기는 일반적으로 작게 열렸다. 따라서, 분리표피가 생리적으로 건강한지를 조사하기 위해, 살리실릭산(SA)과 앱시스산(ABA)을 분리표피에 처리하여 기공크기를 측정하였다. 100 μM SA와 1 μM ABA는 기공열림을 각각 14%와 28% 억제하였다. 비슷한 효과가 다른 중금속인 Al³⁺과 Ag²⁺에서도 발견되는지 이들에 대한 기공개폐 효과를 살펴보았다. Al³⁺과 Ag²⁺도 기공열림을 각각 19%, 41% 촉진하였다. 카드뮴에 의한 기공열림 기작을 이해하기 위해 K⁺ 흡수에 대한 카드뮴의 효과를 조사하였다. Cd²⁺, SA 그리고 ABA는 분리표피에서 K⁺ 흡수를 각각 98%, 28%, 34% 억제하였다. Cd²⁺이 온전한 잎에 미치는 기공개폐의 영향을 조사하기 위해 3주간 성장한 닭의장풀을 Hoagland 용액(0, 5 mM Cd²⁺, 10 mM Cd²⁺)에서 수경 배양한 후 온전한 잎의 기공전도도를 측정하였다. 그 결과, 기공전도도는 대조구에 비해 5 mM Cd²⁺과 10 mM Cd²⁺에서 각각 51%, 70% 감소되었다. 따라서, Cd²⁺은 닭의장풀의 분리표피와 온전한 잎의 기공개폐에 상반된 반응을 보이며, 분리한 표피에서 Cd²⁺에 의한 기공열림은 Cd²⁺이 K⁺ 흡수를 방해하고, 자신이 공변세포로 들어가 팽압을 유도한 결과로 사료된다.

서 론

산업과 농업의 필요성에 의한 중금속 방출 및 이로 인한 토양 오염의 정도는 심각하게 증가하고 있다. 토양 오염의 주범인 중금속에는 원자량이 100을 넘는 원소로서, 납, 수은, 카드뮴 그리고 구리 등이 있다. 중금속은 생명체에 축적되어 효소의 활성을 억제하는 농도에 종종 도달하기도 한다. Cd²⁺은 인간을 비롯한 동물에게 가장 해로운 중금속으로 알려졌고(Chaudri *et al.* 1995), 식물은 Cd²⁺의 농도가 높을수록 식물체의 지상부, 지하부 및 전체 식물의 생산량 감소와 낙화가 촉진되었다(Page *et al.* 1972; Kim 1982; Kim & Park 1992). Kim(1992)은 사르비아, 맨드라미, 채송화, 들나물(*Sedum sarmentosum* Bunge)에서 1 g/l Cd²⁺에 의해서 전체적으로 약 67% 이상의 생장억제가 일어났음을 관찰하였다. Cd²⁺을 비롯한 다른 중금속 및 오존, 이산화황을 비롯한 환경오염원은 식물의 광합성 기작 및 생장을 억제하고 노화를 촉진하는 것이 공통적인 특성이다(Willmer 1983).

Lee(2000)는 최근 Cd²⁺이 닭의장풀의 엽록소 함유량, 기공 크기, 수분퍼텐셜, 기공전도도에 대한 효과와 기관

내의 카드뮴의 축적에 대하여 조사하였다. 잎에 Cd²⁺의 축적은 여러 생리적인 대사의 활성에 감소를 가져왔다. 카드뮴 처리는 70%의 엽록소 함량 감소를 가져왔으며, 엽록소 a/b 비도 2로 감소하였다. Cd²⁺은 또한 20%의 수분퍼텐셜을 감소시켰다. 카드뮴 처리는 여러 광도(100~1000 μmole m⁻²s⁻¹)에서 광합성 활성을 약 60% 감소시켰으며 기공전도도도 비슷한 반응을 보였다. Cd²⁺에 의한 기공전도도의 감소는, Cd²⁺이 온전한 잎에서는 전반적인 생리적인 활성을 감소시키거나 차단하여, 결과적으로 기공조절기능을 상실하게 한 것으로 추측된다(Lee 2000). 그러나, Cd²⁺ 자체가 어떻게 기공기작에 영향을 주는지 알려진 바는 사실상 전무하다. 기공은 광합성과 증산작용을 조절하는 식물생리 현상의 가장 중심적인 기능을 수행하므로 기공달힘을 연구함으로써 Cd²⁺의 식물에서의 역할을 이해하는데 기여하리라 본다. 특히 분리표피에서의 기공개폐에 대한 Cd²⁺의 역할은 Cd²⁺에 의한 기공 기작을 이해하는데 있어서 매우 중요하다.

따라서, 본 연구는 Cd²⁺이 닭의장풀의 분리표피와 온전한 잎의 기공개폐에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

닭의장풀 (*Commelina communis* L.) 종자를 질석(蛭石), 토탄 그리고 양토 혼합물에 심어, 14시간의 명기와 10시간의 암기, 20°C의 온도와 80 $\mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (metal halide lamp)의 광도 하에서 재배하였다. 일주일에 한번 주기로 복합비료(윈더그로 2호)를 1g/L의 농도로 주었으며, 발아 후 3주 동안 자란 식물을 실험에 사용하였다.

2. 분리한 표피의 기공 개폐 측정

잎을 따서 증류수로 채운 plastic petri-dish에 잎의 아랫면이 위로 향하도록 한 다음, 기공을 닫게 유도하기 위해서 암실에 1시간 가량 놓는다. 그 후 면도칼과 핀셋을 이용하여 Lee and Bowling (1992)에 따라 표피를 분리한 다음, 10 mM MES-KOH buffer (50 mM KCl, pH 6.15)를 포함하는 5 cm 직경의 plastic petri-dish에 띄운다. 이들 petri-dishes는 온도 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$)와 광도 (200 $\mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$)가 일정하게 유지되며, normal air 또는 CO_2 free air를 지속적으로 공급받을 수 있는 표피 배양 탱크에 설치하였다. CO_2 free air는 실험실 공기를 soda lime과 2 M KOH 용액을 통과시켜서 얻었다. 분리표피를 광조건에서 2시간 동안 배양한 후 실험에 따라, Cd^{2+} (Cadmium Chloride 1-hydrate, Sigma), ABA (Sigma), SA (Sigma), Ag^{2+} (Silver Nitrate, Sigma), Al^{3+} (Aluminum Chloride, Yakuri Chemical Co.)을 처리한 후 1.5시간 동안 암처리하였다.

암처리 후 표피는 슬라이드 글라스 위에 놓고 비디오 카메라를 거쳐 모니터와 연결시킨 현미경을 통하여 관찰하였다. 기공의 크기는 모니터 상에서 보정한 자를 이용하여 40개의 기공을 측정한 후 평균한 값이다.

3. K^+ 흡수량의 측정

분리표피를 petri-dish에 담겨있는 10 mM MES-KOH buffer (50 mM KCl, pH 6.2) 5 ml에 넣은 후 2시간 동안 배양하였다. 기공을 열게 하기 위해 CO_2 -free air를 지속적으로 공급하였다. 2시간 후에 분리표피에 100 μM Cd^{2+} , 100 μM SA와 1 μM ABA를 처리하고 1.5시간 동안 암처리하였다. Petri-dish에 있는 분리표피를 꺼내어 무게를 잰 후 남아 있는 용액을 이온 크로마토그래피 (DX-120, Dionex)을 이용하여 K^+ 농도를 측정하였다.

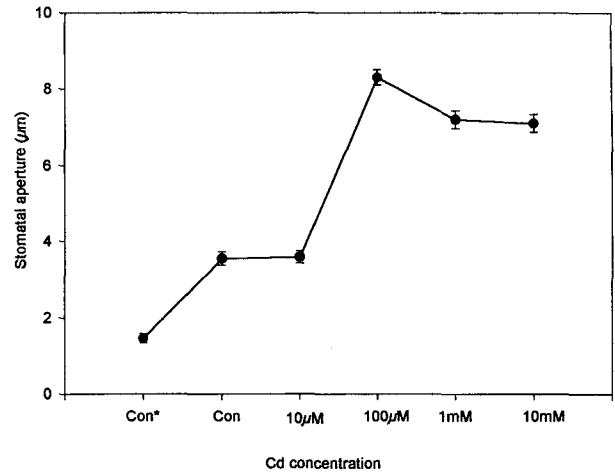


Fig. 1. The effect of Cd^{2+} on stomatal apertures of epidermal strips in *Commelina communis* L.. Con* indicates the stomata aperture before the chemicals were treated and Con indicates the results after the chemicals were treated. Each point is the mean (\pm s.e.m.) of 2 measurements and 40 stomatal apertures were measured.

4. 기공전도도의 측정

3주간 자란 닭의장풀을 Hoagland 용액에서 4일간 배양하였다. 배양 후 온전한 잎의 기공전도도는 LI-6400 Portable Photosynthesis System (LI-COR, Lincoln Nebraska)을 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 분리표피에서 Cd^{2+} 농도에 따른 기공 크기를 측정한 것이다. 거의 모든 Cd^{2+} 농도에서 기공열림이 촉진되었으며, 100 μM Cd^{2+} 에서 그 효과가 가장 컸다. 100 μM Cd^{2+} 에서의 기공 크기는 대조구에 비해 2.24배 증가하였다. 이 결과는 매우 이의적이다. Cd^{2+} 은 인간을 비롯한 동물에게 가장 해로운 중금속이고, 식물에서는 생리적인 대사활성을 차단시키거나 억제시켜 결국에는 고사되게 만들었다 (Kim 1982, 1992; Kim & Park 1992; Chaudri *et al.* 1995; Lee 2000). Lee (2000)는 최근 Cd^{2+} 이 온전한 잎의 기공개폐에 미치는 영향을 조사하기 위해 3주간 성장한 닭의장풀을 Hoagland 용액 ($\pm 5 \text{ mM}$ Cd^{2+})에서 수경 배양한 후 여러 광도 (100~1000 $\mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$)에서 기공전도도를 측정하였다. 그 결과, 기공전도도는 대조구에 비해 거의 모든 광도에서 약 70% 감소되었다.

100 μM Cd^{2+} 처리시 기공은 8.38 μm 까지 열렸으나,

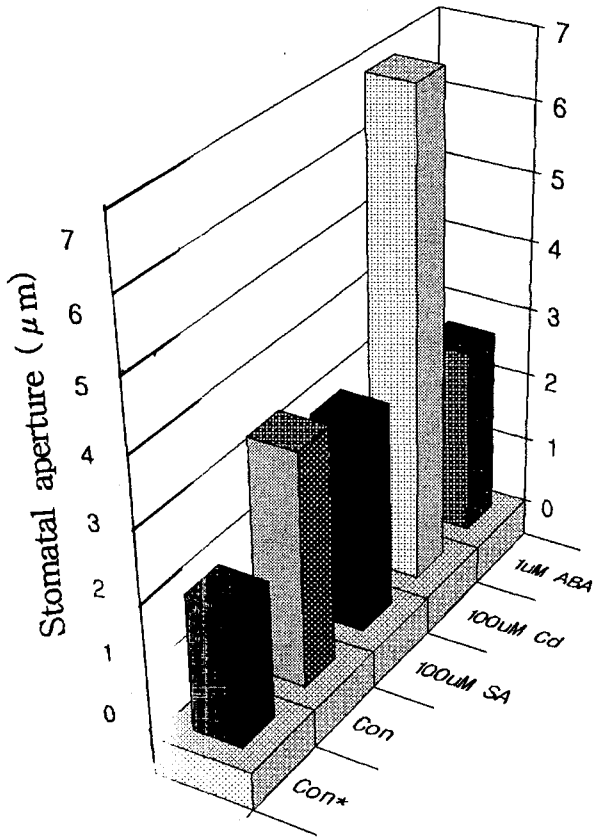


Fig. 2. The effect of Cd²⁺, Salicylic acid (SA), Abscisic acid (ABA) on stomatal apertures of epidermal strips in *Commelina communis* L.. Con* indicates the stomata aperture before the chemicals were treated and Con indicates the results after the chemicals were treated. Each point is the mean (\pm s.e.m.) of 2 measurements and 40 stomatal apertures were measured.

대조구는 3.74 μ m 열렸다. 대조구의 기공 크기는 일반적으로 작게 열렸다. 이는 분리표피가 정상적으로 환경적인 신호에 따라 활발하게 반응하지 않는다는 것을 의미한다. 따라서, 분리표피가 생리적으로 건강하지를 조사하기 위해, 기공에 대한 그 효과가 잘 알려진 살리실릭산(SA)과 앱시스산(ABA)을 분리표피에 처리하여 기공크기를 측정하였다(Fig. 2). 100 μ M SA와 1 μ M ABA는 기공열림을 각각 14%와 28% 억제하였다. SA와 ABA에 의한 기공닫힘 효과는 매우 뚜렷하다. Manthe *et al.* (1992)은 1 μ M SA를 pH 5.0에서 닭의장풀의 분리표피에 처리할 경우 기공열림이 67% 억제되었다고 보고하였다. 1 μ M ABA는 기공열림을 약 19% (Ral *et al.* 1986) 또는 약 72% (McAinsh *et al.* 1990) 억제되었다. 따라서, 본 실험 재료의 분리표피는 건강하며, 정상적으로 여러 화합물에 대한 반응을 보여주고 있으나, 그 반응 정도가 다소 미

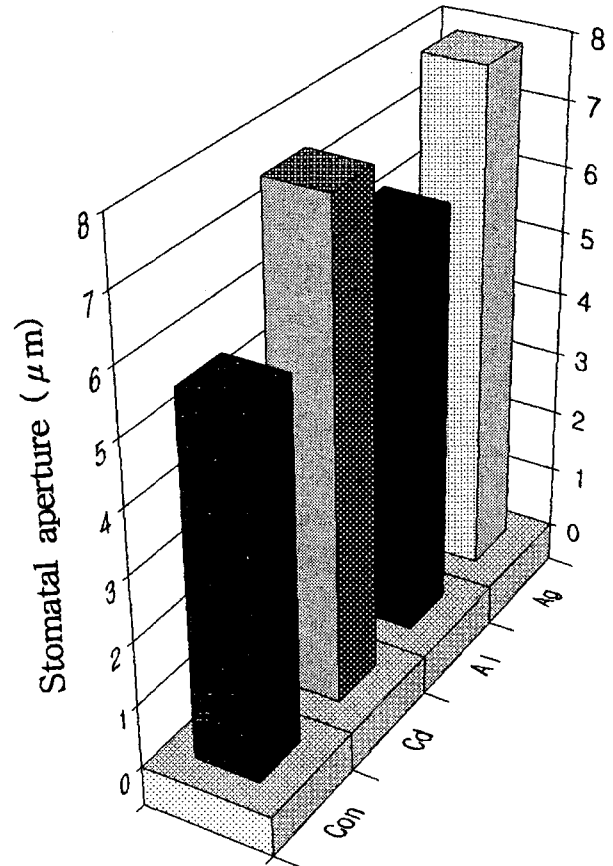


Fig. 3. The effect of Cd²⁺, Al³⁺, Ag²⁺ on stomatal apertures of epidermal strips in *Commelina communis* L.. Each point is the mean (\pm s.e.m.) of 2 measurements and 40 stomatal apertures were measured.

약하다 할 수 있다.

비슷한 효과가 다른 중금속인 Al³⁺과 Ag²⁺에서도 발견되는지 이들에 대한 기공개폐 효과를 살펴보았다(Fig. 3). Al³⁺과 Ag²⁺도 기공열림을 각각 19%, 41% 촉진하였다. Ag²⁺는 기공열림을 34% 촉진한 Cd²⁺보다 그 효과가 컸다. 반면에 3가 양이온을 띠는 Al³⁺의 경우는 그 효과가 다른 중금속에 비해 적었다. 이러한 중금속에 따른 기공개폐에 따른 다른 효과는 이들 중금속이 얼마나 수월하게 세포 속으로 들어가는지에 의해 좌우되는 것으로 추측된다. 실제로 아직도 Cd²⁺이 어떻게 세포막을 통과하는지는 알려지지 않았지만(Rausser 1995), 액포에서는 Cd²⁺/H⁺ antiporter에 의해 수송되는 것으로 알려졌다(Salt & Wagner 1993).

Fig. 4는 분리표피에서 Cd²⁺, ABA, SA가 K⁺의 흡수에 미치는 영향을 조사한 것이다. Cd²⁺, ABA 그리고 SA는 분리표피에서 K⁺ 흡수를 각각 98%, 28%, 34% 억제하였다. ABA와 SA에 의한 K⁺의 세포 내 흡수의 억제

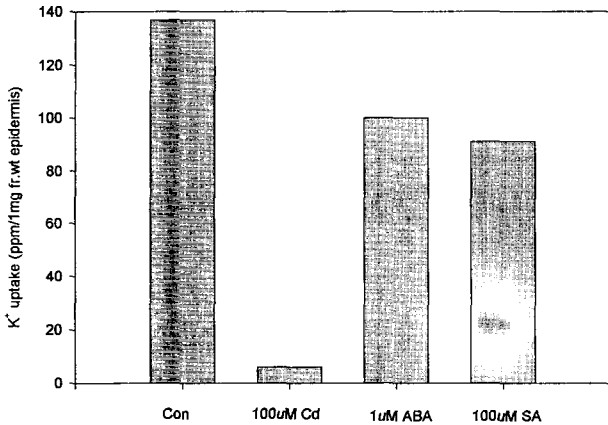


Fig. 4. The effect of Cd²⁺, SA, and ABA on K⁺ influx in epidermal strips of *Commelina communis* L.. Each point is the mean of 2 measurements.

는 ABA와 SA에 의한 기공열림 억제기작과 일치한다. 반면에, Cd²⁺은 K⁺의 흡수를 거의 완전히 차단했다. 이는 Figs. 1, 2, 3에서 관찰된 Cd²⁺에 의한 기공열림이 복잡한 원리에 의해 일어남을 의미한다. 기공열림은 공변세포 내로 K⁺이 유입되어 일어난다(Lee 1992). 그러나, Cd²⁺에 의한 K⁺ 흡수의 억제는 설명하기 어려운 부분이다. 다만, Cd²⁺이 K⁺ 흡수를 억제하고 대신 Cd²⁺ 자신이 공변세포 내로 유입되어 K⁺과 같이 삼투압을 증가시켜 기공열림을 촉진한 것으로 추측된다.

Cd²⁺이 온전한 잎에 미치는 기공개폐의 영향을 조사하기 위해 3주간 성장한 닭의장풀을 Hoagland 용액(0, 5 mM Cd²⁺, 10 mM Cd²⁺)에서 수경 배양한 후 기공전도도를 측정하였다(Fig. 5). 그 결과, 기공전도도는 대조구에 비해 5 mM Cd²⁺과 10 mM Cd²⁺에서 각각 51%, 70% 감소되었다. 따라서, Cd²⁺은 닭의장풀의 분리표피와 온전한 잎의 기공개폐에 상반된 반응을 보였다. 기공개폐의 연구는 분리표피, 공변세포 원형질체, 그리고 온전한 잎을 가지고 연구해 왔다. 이온의 흡수와 방출의 연구는 온전한 잎으로는 불가능하여 분리표피와 공변세포 원형질체를 재료로 집중되어 왔다. 많은 논문들이 온전한 잎의 기공과 분리표피 및 공변세포 원형질체는 환경적인 신호에 다르게 반응한다는 것을 발표되었다. 온전한 잎은 환경적인 신호인, 빛, CO₂와 삼투압적 스트레스에 매우 민감하게 반응하였으나, 분리표피 및 공변세포 원형질체는 이들 신호들에 매우 둔감하게 반응한다고 보고되었다(Travis & Mansfield 1979; Cheesman *et al.* 1982; Grantz & Schwartz 1988; Fricker *et al.* 1991; Lee & Bowling 1992, 1993; Talbot & Zeiger 1998). Fig. 5의 결과는 분리표피가 온전한 잎에 비해 Cd²⁺에 덜 민감한

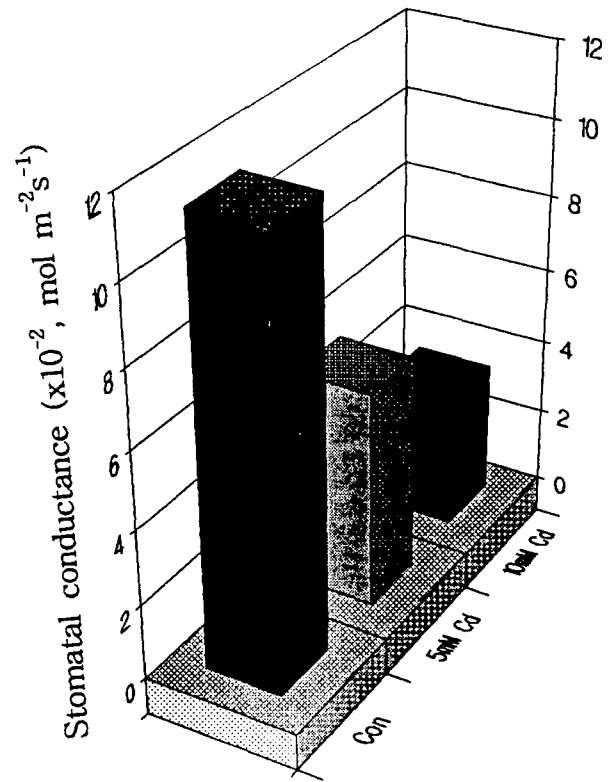


Fig. 5. Stomatal conductance as a function of Cd²⁺ concentrations in *Commelina communis* L.. 3-weeks old *Commelina* was transferred to and grown in Hoagland solution (0, 5 mM Cd²⁺, 10 mM Cd²⁺) for 4 days and measured stomatal conductance. Each point is the mean of 2 measurements.

반응을 보이는 것이 아니라, 완전히 다른 반응을 보여주었다. 이는 분리표피에서 얻은 결과를 직접 온전한 잎에 적용하여 기공 기작을 설명하는 것은 무리임을 입증하는 매우 중요한 결과이다.

따라서, 기공은 분리표피와 온전한 잎에서 다르게 반응하며, 분리한 표피에서 Cd²⁺에 의한 기공열림은 Cd²⁺이 K⁺ 흡수를 방해하고, 자신이 공변세포로 들어가 팽압을 유도한 결과로 사료된다.

참고 문헌

- Chaudri AM, FJ Zhao, SP McGrath & AR Crosland (1995) The cadmium content of British wheat grain. *J. Environ. Qual.* **24**: 850-855.
- Cheesman JM, M Edwards & H Meidner (1982) Cell potentials and turgor pressures in epidermal cells of *Tradescantia* and *Commelina*. *J. of Exp. Bot.* **33**: 761-770.
- Fricker MD, DA Grantz & CM Willmer (1991) Stomatal responses measured using a viscous flow (liquid) poro-

- meter. *J. of Exp. Bot.* **42**: 735-747.
- Grantz DA & A Schwartz (1988) Guard cells of *Commelina communis* L. do not respond metabolically to osmotic stress in isolated epidermis: implications for stomatal responses to drought and humidity. *Planta* **174**: 166-173.
- Kim BW (1982) Studies on the effect of heavy metal on the growth of various plants. *Korean J. Ecology* **5**(4): 176-186.
- Kim BW & JS Park (1992) Study on the resistance of various herbaceous plants to the effects of heavy metals- Responses of plants to soil treated with cadmium and lead. *Korean J. Ecology* **15**(4): 433-449.
- Kim BW (1992) Ecological study on the effect of heavy metals to the vascular plants. *상지대학교 자연과학 논총*: 1-8.
- Lee JS (1992) Influence of the mesophyll on stomatal opening. Ph. D Thesis. Aberdeen Univ. Aberdeen, 141 pp.
- Lee JS & DJF Bowling (1992) Effect of the mesophyll on stomatal opening in *Commelina communis*. *J of Exp. Bot.* **43**: 951-957.
- Lee JS & DJF Bowling (1993) The effect of a mesophyll factor on the swelling of guard cell protoplasts of *Commelina communis* L. *J. of Plant Physiol.* **142**: 203-207.
- Lee JS (2000) 닭의장풀 내 Cd²⁺의 분포와 생리적 독성. *환경생물학회지* **18**(1): 63-67.
- Manthe B, M Schulz & H Schnable (1992) Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L.: Evidence for salicylic acid metabolism. *J. Chem. Ecol.* **18**: 1525-1539.
- McAinsh MR, C Brownlee & AM Hetherington (1990) Abscisic acid induced elevation of cytoplasmic calcium precedes stomatal closure in *Commelina communis*. *Nature (London)* **343**: 186-188.
- Ral VK, SS Sharma & S Sharma (1986) Reversal of ABA-induced stomatal closure by phenolic compounds. *J. Exp. Bot.* **37**: 129-134.
- Rausser WE (1990) Phytochyletins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 61-86.
- Salt DE & GJ Wagner (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiport activity. *J. Biol. Chem.* **268**: 12297-12302.
- Talbott LD & E Zeiger (1988) The role of sucrose in guard cell osmoregulation. *J. Exp. Bot.* **49**: 329-337.
- Travis AJ & TA Mansfield (1979) Stomatal responses to light and CO₂ are dependent on KCl concentration. *Plant, Cell and Environ.* **2**: 319-323.
- Willmer CM (1983) *Stomata*. Longman Inc., New York.

The Effect of Cd^{2+} on Stomatal Apertures of Epidermal Strips in *Commelina communis* L.

Joon Sang Lee

(Department of Life Science, Sangji University, Wonju 220-702, Korea)

Abstract - The effect of Cd^{2+} on stomatal apertures of epidermal strips and intact leaves in *Commelina communis* L. was investigated. Cadmium stimulated stomatal opening. The stomata, treated with $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ opened to a degree of about $8.38 \mu\text{m}$, but the stomata, treated with no cadmium opened to $3.74 \mu\text{m}$. In order to show that there was no mechanical or osmotic impediment preventing the stomata in the epidermal strips, salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) were used. The treatment of $100 \mu\text{M SA}$ and $1 \mu\text{M ABA}$ inhibited 14% and 28% of stomatal opening, respectively. Other heavy metals such as Al^{3+} and Ag^{2+} were also used to investigate the effect of the stomatal apertures. The treatment of Al^{3+} and Ag^{2+} also stimulated 19% and 41% of stomatal opening. To understand how cadmium open stomata, the effect of cadmium on the K^+ influx into the epidermal strips was investigated. Cd^{2+} , SA, ABA inhibited 98%, 28%, 34% of K^+ uptake respectively. 3-weeks old *Commelina* was transferred to and grown in Hoagland solution (0, 5 mM Cd^{2+} , 10 mM Cd^{2+}) for 4 days and stomatal conductance were measured. The treatment of 5 mM Cd^{2+} and 10 mM Cd^{2+} showed about 51% and 70% inhibition of stomatal conductance, respectively. Therefore, it could be concluded that stomata in epidermal strips and intact leaves behaved differently and cadmium-stimulated stomatal opening was due to the result of cadmium uptake into the epidermal strips instead of K^+ . [cadmium, stomata, stomatal conductance]