

양액내 염류농도 증가에 의한 상추뿌리의 마이크로솜 ATPase 활성증가

이경자* · 강보구 · 김영기¹⁾

충북농업기술원 농업환경과, ¹⁾충북대학교 농화학과
(2002년 2월 28일 접수, 2002년 5월 27일 수리)

Increases in the Activities of Microsomal ATPases Prepared from the Roots of Lettuce Cultured in Salt-enhanced Nutrient Solutions

Gyeong-Ja Lee, Bo-Koo Kang, and Young-Kee Kim¹⁾ (Chungbuk Agricultural Research and Extension Services, Cheongweon 363-883, Korea, ¹⁾Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea)

ABSTRACT: In order to investigate the mechanism of growth inhibition by salt stress, lettuces were grown hydroponically in three different nutrient solutions, normal and 30 mM or 50 mM KNO₃-added nutrient solutions, and the electrical conductivities of these solutions were 1.0, 4.5, and 6.5 dS/m, respectively. The activities of plasma and vacuolar H⁺-ATPases in the root tissue of lettuce were measured by specific inhibitors, 100 μM vanadate and 50 mM NO₃⁻, respectively. Microsomal ATPase activity of lettuce grown in the normal nutrient solution was 356±1.5 nmol/min/mg protein. When lettuces were grown in 30 mM and 50 mM KNO₃-added nutrient solutions, total activities of microsomal ATPases were increased by 1.6 and 1.9 times, respectively, and the increases were mainly mediated by vacuolar H⁺-ATPase. These results show that lettuces adapt themselves to salt-stressed condition by increasing the activities of H⁺-ATPases. Effects of various heavy metal ions were investigated on the microsomal ATPases and various metal ions at 100 μM inhibited the activities by 10~25%. Cu²⁺ showed the highest inhibitory effect on the vacuolar H⁺-ATPase. These results suggest that lettuce increases the activities of root ATPases, specially that of vacuolar H⁺-ATPase, in salt-stressed growth conditions and Cu²⁺ could be a useful tool to control the activity of vacuolar H⁺-ATPase.

Key words: proton pump, ATPase activity, salt stress, heavy metal ion

서 론

최근 환경오염 문제가 심각하게 대두되면서 환경보호나 보전의 중요성이 높아지고 있다. 환경오염은 크게 대기오염, 수질오염, 토양오염 등¹⁾으로 구분 할 수 있는데, 그 중 토양 오염은 오염물질이 토양에 축적됨으로써 동식물의 생육에 중요한 생태계를 파괴할 수 있다. 따라서, 오염물질이 일단 토양에 유입되면 사람을 포함한 모든 형태의 생명체에 영향을 미치게 된다. 현재 시설재배 농업에서 가장 문제가 되는 것은 과다시비에 의한 토양내 염류집적과 여러 가지 산업폐기물의 비료화에 따른 폐기물내 중금속 성분 등에 의한 토양오염이다.

토양의 염류집적은 작물이 흡수할 수 있는 양보다 많은

양의 비료가 토양에 투입되어 나타나는 것으로서, 적정 시비량의 비료사용으로 사전에 방지가 가능하다^{2,4)}. 또한 이미 집적된 과다염류는 하우스를 제거하여 충분히 관수하거나^{5,6)} 혹은 신선한 외부토양으로 대체⁷⁾함으로써 어느 정도 제거할 수 있다. 그러나 일단 토양중에 염류가 과다하게 집적되면 작물의 생장과정에 스트레스로 작용하여 생육을 저해하고 품질을 저하시킨다.

중금속에 의한 농경지 오염은 중금속을 함유한 폐기물 또는 폐수를 통하여 농경지에 유입되거나 대기분진 등에 의해서 발생하는데^{8,9)} 토양내에 유입된 중금속은 이동성이 다른 무기염보다 상대적으로 적어 토양에 쉽게 축적된다. 토양에 축적되어 있는 중금속은 식물에게 생육피해를 줄뿐만 아니라, 먹이 연쇄를 통하여 직·간접적으로 인·축에 피해¹⁰⁻¹²⁾를 줄 수 있으므로 최근에는 토양중 중금속을 제거하기 위해 식물을 이용하는 Phytoremediation에 관심이 커지고 있다¹³⁻¹⁶⁾.

토양에 축적된 염류 및 중금속은 식물 뿌리로 흡수되어

*연락처:

Tel: +82-43-219-2670 Fax: +82-43-219-2679

E-mail: gyeongja@cbares.net

세포내 생리활성 변화를 일으킨다. 이 등¹⁷⁾은 KNO_3 를 첨가하여 EC를 높여준 양액에서 재배한 상추뿌리의 마이크로솜 ATPase가 대조구에서 자란 상추뿌리의 마이크로솜 ATPase보다 더 높은 활성을 나타냄을 보였다. 중금속은 식물의 뿌리로 흡수되거나, 뿌리 주변의 토양에 흡착되어 뿌리 조직에 의한 다른 양분의 흡수를 방해하며¹⁸⁾, 뿌리를 통해 흡수된 중금속은 생육지연¹⁹⁾, 생체막의 유동성변화²⁰⁾, 원형질막 H^+ -ATPase의 활성을 저해²⁰⁾한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 염류장애에 의한 작물의 생육저해의 원인 및 마이크로솜 ATPase에 대한 중금속의 영향을 알아보고자 토양내 염류집적에 가장 큰 원인이 되는 KNO_3 ^{21,22)}로 염류농도를 조절한 양액에서 상추를 재배하여 마이크로솜 ATPase의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

상추재배

상추 종자는 똑집 적축면 상추를 사용하였다. 종자는 충분히 습윤된 발아용 스폰지에서 빛을 주지 않은 상태로 28°C를 유지하여 1주일간 발아시켰다. 발아된 모는 온도 30°C, 습도 55%, 16시간 광조사 조건으로 조절된 growth chamber로 옮겨 약 2주간 경화시킨 다음, 정상의 양액과 KNO_3 로 염류농도를 조절한 양액이 담긴 3 L짜리 플라스틱 용기에 8주씩 이식하여 유리온실로 옮겼다. 이식된 상추는 온실에서 약 4주간 재배한 후 뿌리를 채취하여 마이크로솜을 분리하고 ATPase 활성을 측정하였다. 대조구의 양액은 아마자키액²³⁾으로 1 mM $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 4 mM KNO_3 , 0.5 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.35 mM $NH_4H_2PO_4$, 35.6 μM Fe-EDTA, 32.3 μM H_3BO_3 , 8.3 μM $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.083 μM $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.77 μM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 함유한 것으로 재배기간 동안의 EC를 0.97 ± 0.09 dS/m로 유지하였다. 양액의 염류농도 처리는 대조구 양액에 30과 50 mM의 KNO_3 를 첨가하여 재배기간동안 EC를 각각 4.33 ± 0.22 와 6.39 ± 0.37 dS/m로 유지시켰다.

뿌리조직에서의 마이크로솜 분리

상추 뿌리조직으로부터 마이크로솜 분리는 Cho 등²⁴⁾의 방법에 따라 초고속 원심분리법으로 이루어졌다. 마이크로솜 분획은 액체질소로 급냉시킨 후, 사용할 때까지 -70°C의 deep freezer에 보관하였다. 모든 과정은 4°C에서 수행하였으며, 마이크로솜 분획의 단백질농도는 Lowry 방법²⁵⁾으로 결정하였다.

마이크로솜 ATPase의 활성 측정

상추뿌리로부터 분리한 마이크로솜의 ATPase활성은 Niggli 등²⁶⁾의 enzyme-coupled assay 방법을 변형한 Cho 등²⁴⁾ 방법을 이용하여 측정하였다. 반응용액에 마이크로솜을 가한 후, 1 IU pyruvate kinase와 1 IU lactate dehydrogenase를 혼합하고, ATP를 0.5 mM되도록 가하여 340 nm에서 흡광도 감소율을 측정하였다. 반응용액의 조성은 120 mM KCl, 2 mM phos-

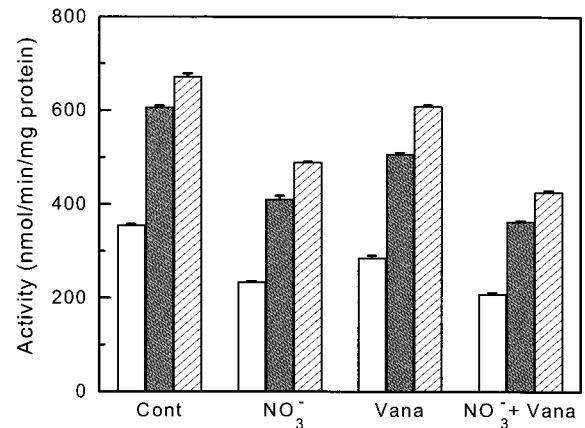


Fig. 1. Effects of vanadate and NO_3^- on the microsome ATPase activity. The activity of microsome ATPase was measured in the presence of 0.1 mM vanadate(Vana) or 50 mM NO_3^- (NO_3^-). Lettuce plants were grown in the nutrient solution (□), the nutrient solution plus 30 mM KNO_3 (■), and the nutrient solution plus 50 mM KNO_3 (▨).

phenolpyruvate, 10 mM KCN, 50 μM $CaCl_2$, 0.4 mM NADH, 1 mM $MgCl_2$, 30 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM KCN이었다.

결과 및 고찰

Vanadate와 NO_3^- 의 효과

염류집적에 의한 생육장애 현상의 원인을 밝혀내기 위하여, 상추를 대조양액과 과량의 염류를 인위적으로 가한 양액에서 재배하고 뿌리조직에서 H^+ -ATPase 활성을 조사하였다. 재배에 사용한 양액은 대조양액과 현재 국내 토양의 염류집적에 주된 원인이 되는 KNO_3 를 30 mM과 50 mM로 첨가한 양액이 이용되었으며, 이들 양액의 EC는 각각 1.0, 4.5, 6.5 dS/m이었다. 재배한 뿌리조직으로부터 생체막 효소를 포함한 마이크로솜을 분리하였으며, 분리한 마이크로솜에서 원형질막과 액포막에 위치한 H^+ -ATPase들의 활성 측정은 각각에 특이적 저해제²⁷⁻³²⁾인 vanadate와 NO_3^- 의 활성저해 효과를 측정함으로써 이루어졌다. 즉, 마이크로솜 ATPase의 총 활성에 대한 원형질막과 액포막에 위치한 H^+ -ATPase들의 활성은 100 μM vanadate와 50 mM NO_3^- 를 처리한 후, 활성저해 정도를 분석함으로써 평가하였다 (Fig. 1).

대조양액과 30 mM KNO_3 , 50 mM KNO_3 를 첨가한 양액에서 재배한 상추의 마이크로솜 ATPase 활성은 각각 356 ± 1.5 , 607 ± 2.8 , 673 ± 5.8 nmol/min/mg protein으로 측정되어, 양액에 KNO_3 가 30 mM, 50 mM로 증가하였을 때, 활성은 대조활성에 비하여 각각 170%, 190% 증가하였다. 이것은 양액내 염류농도 증가에 의해 ATPase의 활성이 증가함을 의미한다. 이러한 염류농도별 생육조건에서 각각의 원형질막 H^+ -ATPase 활성변화 여부를 측정하기 위하여 반응완충액에 특이적 저해

제인 100 μM vanadate를 첨가하였을 때, 대조양액과 30 mM KNO_3 , 50 mM KNO_3 를 가한 조건에서 재배한 뿌리의 마이크로솜 ATPase 활성은 각각 286 ± 5.0 , 507 ± 2.3 , 및 609 ± 1.8 nmol/min/mg protein으로, 각 재배조건에 대한 대조활성에 비하여 70, 100, 64 nmol/min/mg protein의 활성이 감소하였고, 이것은 vanadate에 의하여 활성이 20%, 16% 및 10% 감소함을 보였다. 따라서, 재배양액에 염류 농도를 높였을 때, 전체 활성 증가에 따라 vanadate에 의한 활성저해 비율은 감소하나 저해되는 활성의 크기는 큰 차이가 없어, 염류농도 증가에 따른 원형질막 H^+ -ATPase의 활성변화는 크지 않음을 확인하였다.

액포막 H^+ -ATPase의 특이적 저해제인 50 mM NO_3^- 를 처리한 반응완충용액에서 각 마이크로솜 ATPase 활성은 234 ± 2.0 , 411 ± 7.3 및 489 ± 1.2 nmol/min/mg protein으로 측정되었다. 즉, NO_3^- 에 의해 저해되는 액포막 H^+ -ATPase의 활성은 대조양액 및 30 mM, 50 mM KNO_3 첨가양액에서 재배시 각각 122, 196, 184 nmol/min/mg protein으로 증가하였고, 저해된 비율은 각각 34%, 32% 및 27%로 측정되었다. 재배양액의 염류농도 증가에 따라 전체 활성에 대한 액포막 H^+ -ATPase 활성은 증가하였으나, 대조활성 증가로 전체활성에 대한 NO_3^- 의 활성저해 비율은 약간의 감소 경향을 보였다. 염류농도를 높여준 조건에서 NO_3^- 에 의해 저해되는 활성이 증가한 것은 염류조건에서 액포막 H^+ -ATPase의 활성이 증가함을 보이며, 다만 활성비율이 감소한 것은 원형질막과 액포막 효소를 제외한 다른 ATPase 활성 증가에 기인한다.

재배조건에 따른 뿌리조직의 마이크로솜 ATPase 활성 특성을 조사하기 위하여 반응완충액에 vanadate와 NO_3^- 의 농도를 변화시키면서 활성을 측정하였다. 먼저, vanadate의 농도를 10 nM, 100 nM 및 1, 10, 50, 100, 200, 300, 500, 800 μM 그리고 1 mM, 1.5 mM, 2 mM로 증가시키면서 ATPase의 활성을 측정한 결과, vanadate의 농도가 증가할수록 마이크로솜 ATPase의 활성이 Fig. 2A에서와 같이 저해되었다. 즉, 대조양액에서 재배한 상추의 마이크로솜 ATPase 활성은 vanadate의 농도가 10 μM 까지 증가할 때는 거의 저해효과가 나타나지 않아 일정한 활성을 보이다가 50 μM 이상에서는 급격한 활성의 감소를 보였다. 대조양액에 KNO_3 를 첨가하여 염류농도를 높인 재배조건에서도 ATPase 활성은 대조양액에서와 같이 vanadate에 의하여 유사한 저해를 보였다. Fig. 2B에서는 각 재배조건에서 vanadate의 농도증가에 따라 저해된 활성을 나타내었다. Vanadate의 농도증가에 따라 저해된 활성은 대조양액에서의 활성이 KNO_3 를 첨가한 양액에서 재배한 ATPase 활성에 비하여 약간 작게 나타났으나, 저해경향에서 큰 차이를 보이지 않았다. Vanadate에 의해 저해된 활성은 100 μM 이상에서 급격히 증가하였다. 이러한 결과는 양액에 KNO_3 를 첨가한 양액에서 재배한 뿌리의 마이크로솜 ATPase가 대조양액에서 그것에 비하여 vanadate에 대한 민감성이 크게 다르지 않음을 나타낸다.

액포막 H^+ -ATPase의 활성을 저해하는 NO_3^- 의 효과를 알아

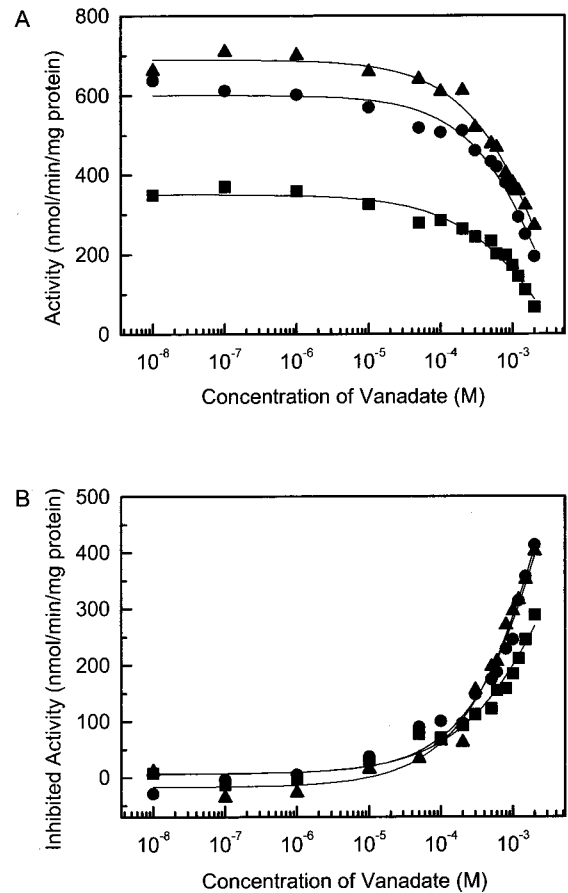


Fig. 2. Dose-dependent inhibitory effect of vanadate on the activity of microsomal ATPase. Microsomes were prepared from the root tissue grown in the nutrient solution (■), the nutrient solution plus 30 mM KNO_3 (●), and the nutrient solution plus 50 mM KNO_3 (▲). (B) Vanadate-induced inhibited activities of microsomal ATPases. The inhibited activities were calculated by subtracting the activities shown in Fig. 2A from the corresponding control activities shown in Fig. 1.

보기 위하여 NO_3^- 의 농도를 100 μM 에서 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100 mM로 증가시키면서 ATPase의 활성을 측정한 결과, NO_3^- 의 농도가 증가할수록 ATPase의 활성은 감소하였다. 즉, 양액과 30, 50 mM KNO_3 를 첨가하여 재배한 모든 처리구에서 마이크로솜 ATPase의 활성은 NO_3^- 의 농도가 증가함에 따라 저해되었다 (Fig. 3A). Fig. 3B는 각 재배조건에서 NO_3^- 에 의해 저해된 마이크로솜 ATPase의 활성을 나타낸 것인데, KNO_3 를 첨가한 양액에서 자란 상추의 경우 NO_3^- 의 농도 증가에 따른 활성 감소율이 크게 증가하였다. 이것은 Fig. 1에서와 같이 KNO_3 를 첨가한 양액에서 액포막의 ATPase 활성이 증가하였음을 보인다. 이상의 결과는 상추가 생육중 과다염류 환경에 적응하기 위해서 생체막 H^+ -ATPase의 총활성을 2배 가까이 높임을 보여주며, 이러한 활성 증가는 원형질막 H^+ -ATPase 보다는 액포막 H^+ -ATPase의 활성 증가를 통하여 이

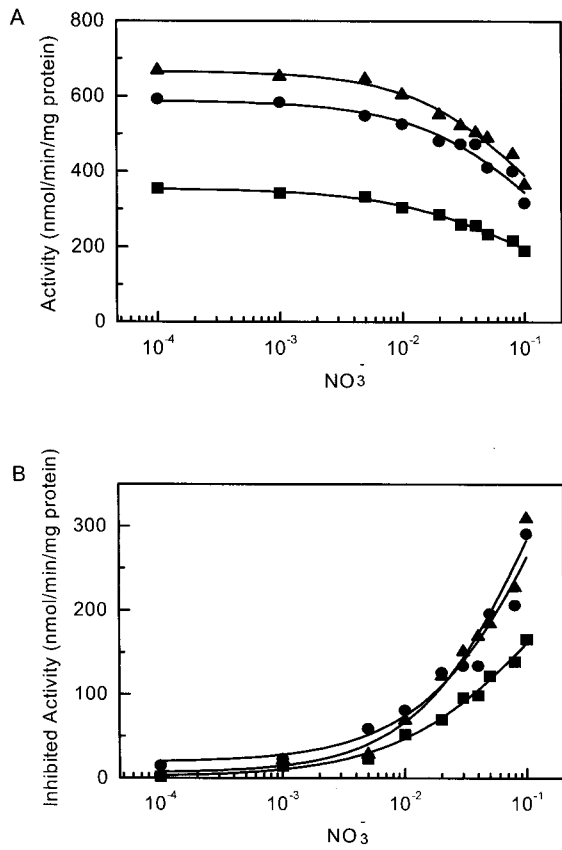


Fig. 3. Dose-dependent effect of NO_3^- on the activity of microsomal ATPase. The growth conditions were the nutrient solution(■), the nutrient solution plus 30 mM KNO_3 (●), and the nutrient solution plus 50 mM KNO_3 (▲). (B) NO_3^- -induced inhibited activities of microsomal ATPases. The inhibited activities were calculated by subtracting the activities shown in Fig. 3A from the corresponding control activities shown in Fig. 1.

루어짐을 확인하였다. 따라서 염류장에서 상추는 세포질내 염류를 적정으로 조절하기 위하여 액포막의 H^+ -ATPase 활성을 높임으로써 액포내로의 염류저장을 촉진함을 알 수 있다.

중금속에 의한 마이크로솜 ATPase의 활성저해

많은 중금속들은 미량원소로 식물생육에 필수로 요구되나, Fe, Co, Ni, Zn, Cd, Cu 등과 같은 중금속들은 과량으로 존재했을 경우에는 식물의 생육을 저해하는 것으로 알려져 있다. 이들에 의한 식물생육의 저해기작은 자세히 밝혀지지 않았으나, 기존의 보고에서 중금속은 이온펌프와 채널 단백질의 활성을 저해할 수 있음이 밝혀졌으며, 실제 Cd^{2+} , La^{3+} , Gd^{3+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} 등은 ion transporter의 활성을 저해하는 것으로 보고되었다³³⁾. 본 실험에서는 염류농도를 달리한 양액에서 상추를 재배하여 뿌리조직의 생체막으로부터 유래된 마이크로솜을 분리하였고, 마이크로솜 ATPase의 활성

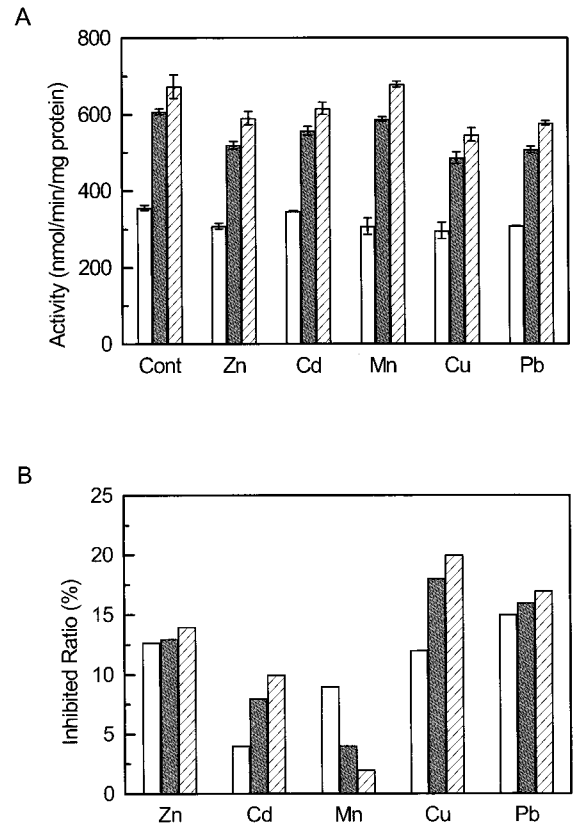


Fig. 4. Effects of various heavy metal ions on the microsomal ATPase activity. Microsomes were prepared from the roots of tomato plant. The activity of microsomal ATPase was measured in the presence of 100 μM metal ion. (A), Activity of microsomal ATPase in the presence of indicated metal ion; (B), The ratio of inhibited activity by the heavy metal ion. The growth conditions were the nutrient solution(□), the nutrient solution plus 30 mM KNO_3 (■), and the nutrient solution plus 50 mM KNO_3 (▨).

에 미치는 중금속 이온의 영향을 알아보기 위하여 Cd과 Pb, Cu, Mn Zn를 선택하여 실험에 사용하였다. 염농도를 달리하여 재배한 상추뿌리 마이크로솜 ATPase의 대조활성과 중금속을 반응완충액에 가하여 측정된 활성은 Fig. 4에 보였다. 반응완충액에 100 μM 농도로 중금속 Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} 를 첨가하였을 때, 대조양액에서 재배한 상추뿌리의 마이크로솜 ATPase 활성은 각각 308 ± 7.6 , 347 ± 1.0 , 307 ± 21 , 296 ± 21 , 309 ± 0.5 nmol/min/mg protein으로 측정되었고, 양액에 30 mM KNO_3 를 첨가한 조건에서 재배한 경우의 활성은 각각 519 ± 10 , 556 ± 11 , 587 ± 5.6 , 485.5 ± 15 , 507 ± 8.9 nmol/min/mg protein으로 측정되었으며, 양액에 50 mM KNO_3 를 첨가한 경우는 각각 590 ± 17 , 616 ± 16 , 678 ± 7.9 , 546 ± 17 및 578 ± 5.7 nmol/min/mg protein으로 측정되었다. 이러한 결과를 통하여 위에 사용한 모든 중금속 이온은 재배양액의 종류에 상관없이 상추뿌리의 ATPase 활성을 감소시킴을 확인하였다 (Fig. 4A).

중금속 이온에 의한 뿌리 마이크로솜 ATPase의 활성저해 효과는 상추를 재배한 양액에 따라 다른 양상으로 관측되었다. 대조양액 및 양액에 KNO_3 를 첨가하여 염류농도를 높인 양액에서 재배한 상추뿌리의 마이크로솜 ATPase는 Cu^{2+} 에 의해 가장 많은 저해를 받았고, Mn^{2+} 을 제외한 다른 중금속의 저해효과는 재배양액에 KNO_3 를 많이 첨가할수록 크게 나타났다. 그러므로 본 실험에서는 대조양액 및 KNO_3 로 염류농도를 높여준 양액에서 자란 상추뿌리의 마이크로솜 ATPase에 가장 큰 영향을 미친 Cu^{2+} 를 선택하여 마이크로솜 ATPase 활성의 주된 부분을 차지하는 원형질막과 액포막의 H^+ -ATPase 활성저해 효과를 조사하였다.

ATPase에 대한 Cu^{2+} 의 효과

마이크로솜 ATPase 활성중 Cu^{2+} 에 의해 저해되는 활성은 원형질막과 액포막의 H^+ -ATPase와 어떠한 관계가 있는지 조사하였다. Fig. 5에서는 대조양액과 50 mM KNO_3 를 첨가한 양액에서 재배한 상추뿌리의 H^+ -ATPase 활성에 대한 vanadate와 NO_3^- 의 효과를 측정하였으며, 이때 Cu^{2+} 가 있는 조건(■)과 없는 조건(□)에서 활성을 측정하였고, Cu^{2+} 에 의해 저해된 활성(▨)을 나타내었다. 먼저, Cu^{2+} 를 100 μM 농도로 처리하였을 때, 대조양액에서 재배한 상추뿌리의 마이크로솜 ATPase활성은 296 ± 21 nmol/min/mg protein으로 대조활성에 비하여 17%정도 저해되었고, 50 mM KNO_3 를 첨가한 양액에서 재배한 ATPase 활성은 546 ± 17 nmol/min/mg protein으로 19% 저해되었다.

Cu^{2+} 에 의한 원형질막 및 액포막 H^+ -ATPase들의 활성저해 여부를 확인하기 위하여, vanadate를 처리하여 원형질막 H^+ -ATPase의 활성을 저제한 후에 Cu^{2+} 에 의한 추가적인 저해효과를 측정하였다. 먼저, 대조양액에서 재배한 뿌리의 마이크로솜 ATPase활성은 vanadate의 처리로 291 ± 12 nmol/min/mg protein의 활성을 보였으며, 여기에 Cu^{2+} 를 첨가하였을 때, 활성은 244 ± 15 nmol/min/mg protein으로 Cu^{2+} 에 의해 16%의 활성이 저해되었다. 한편, 50 mM KNO_3 를 첨가한 양액에서 재배한 상추뿌리의 마이크로솜 ATPase는 vanadate의 처리시 611 ± 11 nmol/min/mg protein의 활성을 보였고, Cu^{2+} 의 첨가로 408 ± 8 nmol/min/mg protein의 활성을 보여 33%의 활성이 저해됨을 확인하였다. 이러한 결과는 재배양액의 염류농도를 증가시켰을 때, 원형질막 H^+ -ATPase 활성 저해 후에도 Cu^{2+} 에 의해 저해되는 활성이 상당량 존재함을 의미한다.

Cu^{2+} 가 액포막 H^+ -ATPase 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, NO_3^- 를 처리하여 액포막의 H^+ -ATPase 활성을 저제한 후에 Cu^{2+} 의 효과를 조사하였다. 대조양액에서 재배한 상추뿌리의 ATPase 활성은 NO_3^- 처리에 의하여 239 ± 17 nmol/min/mg protein으로 측정되었고 여기에 Cu^{2+} 의 처리는 220 ± 6 nmol/min/mg protein의 활성을 보여 약 8%의 활성이 추가적으로 저해되었다. 또한, 50 mM KNO_3 를 첨가한 양액의 상추뿌리 마이크로솜 ATPase의 활성은 NO_3^- 처리에 의하여

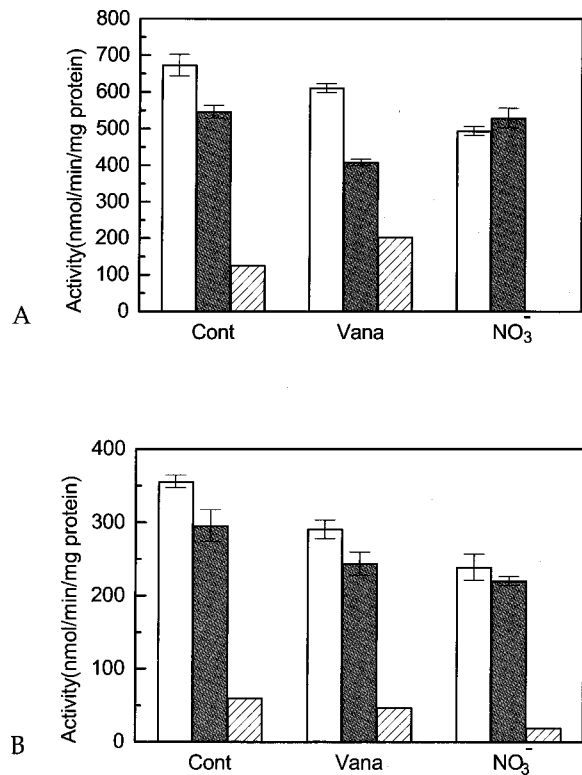


Fig. 5. Cu^{2+} -induced inhibition of microsomal ATPase activity. ATPase activities were measured from the root microsomes of lettuces cultivated in the nutrient solution (A), and the nutrient solution plus 50 mM KNO_3 ; (B). The concentrations of vanadate (Vana) and NO_3^- were 0.1 mM and 50 mM, respectively. The Cu^{2+} -sensitive activity(▨) was calculated by subtraction of Cu^{2+} -insensitive activity(■) from the control activity(□).

494 ± 12 nmol/min/mg protein으로 측정되었으며, 여기에 Cu^{2+} 의 처리는 529 ± 26 nmol/min/mg protein의 활성을 보여 Cu^{2+} 에 의한 추가적인 활성저해는 나타나지 않았다. 이것은 Cu^{2+} 에 의한 저해효과가 NO_3^- 에 의해 감소함을 보이며, 이들 두 저해제가 동일한 효소인 액포막 H^+ -ATPase를 저해함을 의미한다. 이러한 결론은 vanadate에 의한 원형질막 H^+ -ATPase의 저해 후에도 Cu^{2+} 에 의한 활성저해가 크게 나타나는 앞의 결과에서도 확인할 수 있다. Cu^{2+} 가 액포막 H^+ -ATPase의 활성을 선택적으로 저해하는 성질은 염류농도 증가에 따른 액포막 H^+ -ATPase 활성변화를 평가하는 데 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 이상의 결과로부터 재배양액의 염류농도가 증가하면 상추뿌리의 ATPase 활성이 증가하며, 특히 액포막에 위치한 H^+ -ATPase 활성이 주로 증가함을 확인하였다. 이것은 염류집적 토양에서 식물이 액포막이나 원형질막의 H^+ -ATPase 활성을 조절함으로써 근부의 고농도 환경에 적응함을 보여준다. 따라서, 생체막의 ion transport 단백질의 특성연구는 토양중 염류집적에 의한 작물의 생리장애의 기작을 이해하고, 염류장애의 대책수립에 기여할 것으로 사료된다.

요약

염류장애에 의한 작물의 생육저해 원인을 밝혀내기 위하여 상추를 대조양액과 대조양액에 30 mM 및 50 mM KNO_3 를 첨가하여 염류농도를 높인 양액 등 3가지 조건에서 재배하였으며, 이때 이들 양액의 EC는 각각 1.0, 4.5, 6.5 dS/m 이었다. 뿌리세포의 원형질막 및 액포막에 위치한 H^+ -ATPase 활성은 각각에 특이적 저해제인 vanadate와 NO_3^- 를 이용하여 측정하였다. 대조양액에서 재배한 상추 뿌리의 ATPase 활성은 356 ± 1.5 nmol/min/mg protein이었으며, 30 mM과 50 mM KNO_3 를 첨가한 양액에서는 활성이 대조활성에 비하여 각각 1.6배, 1.9배 증가하였다. 이것은 상추가 염류장애시 뿌리조직의 ATPase 활성증가를 통하여 적응함을 보여주는 것이며, 활성증가는 주로 액포막 H^+ -ATPase 활성증가에 의해 이루어짐을 확인하였다. 마이크로솜 ATPase 활성에 미치는 여러 가지 중금속 이온들의 효과를 측정하였으며, 중금속 이온은 100 μM 농도에서 종류에 따라 활성을 10~25% 저해하였다. 특히, Cu^{2+} 는 주로 액포막 H^+ -ATPase 활성을 저해함을 확인하였다. 본 연구의 결과로부터 상추는 염류집적 환경에서 뿌리의 ATPase 활성, 특히 액포막에 위치한 H^+ -ATPase 활성을 증가시켜 적응하며, Cu^{2+} 는 주로 액포막 H^+ -ATPase 활성을 저해하는 성분으로 뿌리의 ATPase 활성변화 연구에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

참고문헌

- 한기학, 박창규 (1989) 농업환경화학, 동화기술, p.31-45.
- Lee, C. S., Huh, B. L., Song, Y. S. and Kwak, H. K. (1994) Revised rates of NPK fertilizers based on soil testing for vegetable crops, *J. Kor. Soc. Soil Sci. Fert.* 27(2), 85-91.
- Lee, S. E. and Lee, C. S. (1994) Nutrient balance and application efficiency of nitrogen and potassium in salt-accumulated greenhouse soil, *J. Kor. Soc. Soil Sci. Fert.* 27(2), 78-84.
- Song, Y. S., Lee, C. S., Kwak, H. K. and Park, Y. D. (1993) Recommendation of NPK fertilizers for chinese cabbage and spinach based on soil testing, *J. Kor. Soc. Soil Sci. Fert.* 26(1), 25-30.
- Jung, Y. S. and Yoo, S. H. (1975) Effect of watering on eluviation of soluble salts in the vinyl house soils, *J. Kor. Soc. Soil Sci. Fert.* 8(2), 53-60.
- Shin, W. K. (1987) Excessive salt accumulation, its effect on plant growth and salt elimination by watering in plastic film house soils, Ph. D. Thesis, Seoul National University.
- Son, I. S., Jung, Y. T. and Yun, E. S. (1993) Status of vinyl house melon and watermelon cultivation and soil characteristics in yeongnam area, *RDA. J. Agri. Sci.* 35(1), 295-300.
- 김복영 (1993) 토양오염실태와 개선대책, 환경보전형 농업을 위한 토양 관리심포지엄, 한국토양비료학회, 별권, p.68-98.
- 김복영 (1993) 제련소 및 광산인근 논 토양중 중금속 함량 조사, 농작물 피해조사, 농업 기술연구소보고서, p.74-94.
- Holmgren, G. G. S., Meyer, M. W., Chaney, R. L. and Daniels, R. B. (1993) Cadmium, Lead, Zinc, copper, and Nickel in Agricultural soils of the United States of America, *J. Environ. Qual.* 22, 335~348.
- 김복영 (1990) 토양오염과 개량대책, *농공기술*, 7(2), 135-143.
- Vulava, V. M., James, B. R. and Torrents, A. (1997) Copper solubility in Myersville B Horizon soil in the Presence of DTPA, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 44-52.
- Jung, G. B., Kim, W. I. and Moon, K. H. (2000) Studies on the phytoextraction of cadmium and lead contaminated soils by plants cultivation, *Korean J of Environ. Agri.* 19(3), 213-217.
- Chaney, R. L., Malik, M., Li, Y. M., Brown, S. L., Angle, J. S. and Baker, J. M. (1997) Phytoremediation of soil metals, *Curr. Opinions Biotechnol.* 8, 279-284.
- Kim J. G. and Lee, S. H. (1999) Phytoremediation Proceedings of 30th Meeting & symposium on "Remediation-Technology and Prospect" of the Korean, *Society of Environmental Agriculture*, 57-88.
- Kim, J. G., Lim, S. K., Lee, S. H., Yoon, Y. M., Lee, C. H. and Jeong, C. Y. (1999) Evaluation of heavy metal pollution and plant survey around inactive and abandoned mining ares for phytoremediation of heavy metal contaminated soils, *Korean J. of Environ. Agric.* 18(1), 28-34.
- Lee, G. J., Kang, B. G., Kim, H. J., Min, K. B. and Kim, Y. K. (2001) Growth and microsomal ATPase activity of lettuce (*Lactuca sativa*, L.) cultured in the KNO_3 -added nutrient solution, *Korean J. of Environ. Agric.* 20(1), 28-33.
- Jonathan, R. C. and Tomsett, A. B. (1992) Biogeochemistry of trace metals, *Lewis Publishers*, p.329-364.
- Trivedi, S. and Erdei, L. (1992) Effects of cadmium and lead on the accumulation of Ca^{2+} and K^+ and on the influx and translocation of K^+ in wheat of low and high K^+ status, *Plant Physiol.* 84, 94-100.
- Fodor, E., Szabó-Nagy, A. and Erdei, L. (1995) The effects of cadmium on the fluidity and H^+ -ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots, *J. Plant Physiol.* 147, 87-92.
- Kowalenko, C. G. (1980) Transport and transformation

- of fertilizer-N in a sandy field plot using tracer technique, *Soil Sci.* 129(4), 218-221.
22. Pleysier, J. L. and Juo, A. S. R. (1982) Leaching of fertilizer ions in Ultisol from the high rainfall tropics: leaching through undisturbed soil column, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 754-760.
 23. 박상근, 김광용, 이응호 (1990) 양액재배기술. 표준영농교본-71, 농촌진흥청, p.55-56.
 24. Cho, K. H., Sakong, J. and Kim, Y. K. (1998) Characterization of microsomal ATPases prepared from tomato roots, *Agric. Chem. Biotechnol.* 41(2), 130-136.
 25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
 26. Niggli, V., Penniston, J. T. and Carafoli, E. (1979) Purification of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column, *J. Biol. Chem.* 254, 9955-9958.
 27. Briskin, D. P., Leonard, R. T. and Hodges, T. K. (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles, *Methods Enzymol.* 148, 542-546.
 28. Lew, R. R. and Spanswick, R. M. (1984) Proton-pumping activities of soybean (*Glycine max* L.) root microsomes: localization and sensitivity to nitrate and vanadate, *Plant Science Lett.* 36, 187-193.
 29. Poole, R. J., Briskin, D. P., Kratky, Z. and Johnstone, R. M. (1984) Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet, *Plant Physiol.* 74, 549-556.
 30. O'Neill, S. D. and Spanswick, R. M. (1984) Effect of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn, *Plant Physiol.* 75, 586-591.
 31. Sze, H. (1985) H⁺ translocating ATPases: advances using membrane vesicles, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 175-208.
 32. Ward, J. M. and Sze, H. (1992) Proton transport activity of the purified vacuolar H⁺-ATPase from oats, *Plant Physiol.* 99, 925-931.
 33. Kiss, T. and Osipenko, O. N. (1994) Toxic effects of heavy metals on ionic channels, *Pharmacol. Rev.* 46(3), 245-263.