

## *Atriplex gmelini*(가는갯능쟁이)의 내염성과 항산화 효소 반응<sup>†</sup>

배정진\* · 윤호성 · 추연식 · 송승달

경북대학교 생물학과

**적 요:** 해안에 주로 분포하는 *Atriplex gmelini*(가는갯능쟁이)의 염 내성이 항산화 효소의 활성증가에 의한 것인가를 조사하기 위해 다양한 농도의 염 처리에 의한 광계 II 양자효율 및 항산화 효소의 활성 변화를 조사하였다. *A. gmelini*는 100 mM NaCl처리구에서 가장 높은 지상부 건물함량(대조구의 116%) 및 최적의 생장을 보였으며, 300 mM NaCl처리에 의해서도 체내 수분함량과 건물량의 감소를 보이지 않아 염에 대한 높은 내성을 보였다. 단기간(2, 4일)의 염 처리시 외부 염 농도 구배에 따른 Fv/Fm값(양자효율)의 증가, Fo/Fm값(스트레스지표)의 감소 및 SOD, APX, GR과 같은 항산화 효소의 활성 증가를 나타내어 광화학적 스트레스 혹은 항산화 방어 시스템의 손상을 보이지 않았다. 그러나 400 mM NaCl을 처리한 식물의 경우, 비록 대조구(0 mM NaCl)에 비해 높은 항산화 효소 활성값(SOD 171%, APX 114%, GR 134%)을 보였지만 성장감소(잎, 줄기 각각 30%, 16%) 및 고농도 염에 의한 활성의 감소양상을 나타내었다. 흥미롭게도, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>제거에 중요한 역할을 하는 또 다른 효소인 CAT의 활성이 염에 의한 빠른 감소(200, 300, 400 mM NaCl 처리구의 경우 각각 대조구의 38%, 22%, 15%)를 보여, *A. gmelini*는 염에 의해 생성된 활성산소 제거와 염분 내성에 ascorbate-glutathione cycle의 APX, GR이 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다. 그러나, 염 처리 6일 후, Fv/Fm값의 감소, Fo/Fm값의 증가 및 항산화 효소의 활성감소를 보여 광화학적 저해 및 항산화 방어시스템의 손상을 나타내었다. *A. gmelini*는 단기간의 염 처리(염 처리 2, 4일)시, 염에 의해 유도된 ROS증가에 대해 항산화 시스템의 활성 강화를 통해 균형을 이루지만, 6일 이상의 지속적인 염에 의해서는 항산화 효소의 활성감소와 광화학적 손상으로 인한 ROS증가로 산화적 스트레스가 유발되는 것으로 여겨진다.

**검색어:** 염분스트레스, 항산화, 형광, *Atriplex gmelini*, APX, CAT, GR, ROS, SOD

### 서 론

식물은 변화하는 다양한 환경조건에 의해서 항상 생존의 위협에 직면해 있다. 최근 다양한 환경스트레스 하에서의 식물의 생리적 특성 및 환경내성의 기구에 관한 관심이 증가하고 있으며(Shalata and Tal 1998), 환경스트레스에 의한 생리적 장애가 활성산소종의 생성과 이들을 제거하는 항산화 기작의 억제와 연관성을 가지는 것으로 알려지고 있다(Alscher *et al.* 1997, Asada 1997).

염분 스트레스는 식물체 내 고농도의 Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> 이온에 의한 독성 작용, 미네랄 및 수분상태의 불균형 그리고 팽압을 감소함으로써 생장을 억제하고, 기공폐쇄를 유도하여 잎에서의 O<sub>2</sub>에 대한 CO<sub>2</sub>의 비율을 감소시키며, CO<sub>2</sub>고정을 억제하는 것으로 알려져 있다(Greenway and Munns 1980, Marschner 1995). 이러한 조건은 전자전달계에서 산소로의 전자유출을 강화함으로써 활성산소종(ROS; reactive oxygen species)을 생성하는데, 식물조직에서 생성되는 주요 활성산소종은 superoxide radical, hydrogen

peroxide, hydroxyl radical, singlet oxygen 등이 있다(Smirnoff 1993, Gossett *et al.* 1994).

식물체 내 엽록체와 미토콘드리아는 활성산소종을 생성하는 주요 세포소기관이며, 생성된 활성산소종은 광합성적 전자수송 및 광계 II의 효율(Fv/Fm)을 감소시키고, 세포원형질막을 과산화하며, endonuclease 및 endopeptidase를 활성화시킴으로써 유전자(DNA)와 단백질을 파괴하는 것으로 알려져 있다(Casano *et al.* 1994, Foyer *et al.* 1994, Hagar *et al.* 1996).

따라서 식물들은 체내 활성산소종에 의한 산화적 손상을 막기 위해 효소적 항산화 방어기작(SOD, Superoxide dismutase; APX, Ascorbate peroxidase; GR, Glutathione reductase) 및 저분자의 항산화 물질(ascorbic acid, glutathione,  $\alpha$ -tocopherol)을 함유하고 있다(Nakano and Asada 1981).

일반적으로 염 내성종은 이온과 수분조절에 있어 효율성을 가질 뿐만 아니라 효과적으로 ROS를 제거하는 더 나은 항산화 시스템을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Rout and Shaw 2001).

*Atriplex gmelini*(가는갯능쟁이)는 명아주과의 일종으로, *Atri-*

<sup>†</sup> 이 논문은 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-000-000660)지원으로 수행되었음.

\* Corresponding author; Tel: 82-53-950-5348, e-mail: jinibae@hanmail.net

plex속에 속하는 대부분의 종들은 건조 및 염 환경에 잘 적응하는 식물들로 건조지, 해안사구 및 염습지를 포함한 생태적으로 불리한 환경에 주로 분포한다. 염분 저항기작으로는 잎의 바깥 표면에 있는 염모(salt-hairs)에 고농도 염을 축적하여 배출하는 기작과 삼투조절물질로 glycinebetaine을 이용하는 생리적 특징을 갖는 등 대부분이 고농도의 염에 의해서도 생장이 저해되지 않는 호염생종(halophytic species)으로 알려져 있다(Wyn Jones and Storey 1981, Reiman and Breckle 1988). 대표적인 예로 *A. halimus*의 경우, 600 mM NaCl의 농도에서도 생존하는 것으로 알려져 있다(Bajji *et al.* 1998).

따라서 본 연구는 한국의 해안사구 및 염습지에 주로 분포하는 *A. gmelini*가 어느 정도의 염분 농도에서 산화적 스트레스가 유발되는가를 조사하며, 또 염분 농도에 따른 광계II형광 및 SOD, APX, GR과 같은 주요 항산화 효소의 활성변화를 조사함으로써 *A. gmelini*의 염 내성과 항산화 시스템 간의 상관관계를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험의 재료는 명아주과에 속하며 해안가를 비롯한 염수의 영향을 받는 지대에 주로 분포하는 *Atriplex gmelini* C.A. Meyer(가는갯능쟁이)를 이용하였다.

### 생육조건 및 처리

균일한 상태의 종자를 선별하여, 증류수에 72시간 담구어 침윤시킨 후 생육상(light/dark of 12/12 h at 30/20 °C, relative humidity 60~70%, 280  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )에서 발아시켜 질석토를 채운 플라스틱포트(직경10cm×높이15cm)에 이식하였으며, 60일간 Hoagland 완전배지로 생육한 다음 균일한 개체를 선별하여 0, 100, 200, 300 및 400 mM NaCl을 각 처리구별로 100 ml/pot·day 6일간 공급하였다. 모든 처리는 5반복으로 하였다.

### 수확 및 생장분석

염 처리 2, 4, 6일 후 각 처리 구배당 5개체의 잎을 수확한 다음 효소활성분석을 위해 약 0.5 g을 액체질소로 냉동건조하여 -70°C의 냉동고에 보관하였으며, 생장분석을 위해 식물체를 각 기관별로 분리하여, 생량을 측정 후 70°C에서 3일간 건조하여 건량을 측정하여 다음의 식에 의해 수분함량을 산출하였다.

$$\text{대생량함수량(\%)} = (\text{fresh weight} - \text{dry weight}) / \text{fresh weight} \times 100$$

### 형광측정

광화학계 II의 양자수율을 측정하기 위해 PEA(Hansatech)를 이용하여 실온에서 20분간 암 처리한 후 기본형광(Fo)을 구하고, 포화광을 조사하여 최대 형광(Fm)을 구한 후 광계 II

의 양자효율인 Fv/Fm값과 스트레스 지표인 Fo/Fm값을 산출하였다.

### 효소추출 및 단백질정량

식물잎 시료를 0.5 g씩 정량하여 액체질소에 의해 미세 분말로 분쇄한 후 추출완충용액(Superoxide dismutase(SOD); 0.1 M K-phosphate (pH 7.8), 0.1 M EDTA, 1% PVP (w/v), 0.5% Triton X-100; APX(Ascorbate peroxidase), GR(Glutathione reductase), CAT(Catalase); 0.1 M Na-phosphate, 5 mM ascorbate, 1 mM EDTA) 700  $\mu\text{l}$ 을 넣어 고루 섞어 4°C에서 12,000 rpm으로 20분간 2회 원심분리하였으며, 상등액을 이용하여 효소활성과 전기영동 및 단백질을 정량하였다

Total soluble protein의 정량은 Lowry 등(1951)에 의한 BSA (Bovine Serum Albumin)를 이용한 표준식에 준하여 계산하였다.

### 효소활성측정 및 전기영동

SOD 활성측정은 Beyer와 Fridovich(1987)에 의한 NBT(Nitro-BlueTetrazolium) 환원방법을 이용하였고, SOD one unit는 560 nm에서 NBT환원에 의해 유도되는 SOD활성의 50% 감소량으로 나타내었다.

SOD의 isozymes의 분리는 30% polyacrylamide gel상에서 각 lane마다 효소추출액을 정량하여 넣은 후 120 V에서 30분간 loading한 후 150 V에서 10시간 running하였으며, 모든 실험조건은 4°C를 유지하였다. SOD isozymes를 동정하기 위해 pre-staining solution (50 mM K-phosphate buffer (pH 7.8), 28  $\mu\text{M}$  riboflavine, 28 mM TEMED)에 3 mM KCN (CuZn-isoform발현억제) 또는 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CuZn-isoform과 Fe-form의 발현억제)를 넣어 25°C를 유지하면서 30분간 암 조건에서 배양한 후 pre-staining solution에 2.45 mM의 NBT를 넣고 강한 빛에서 20분간 발색시킨 후 증류수로 세척하였다(Beauchamp and Fridovich 1971).

APX와 GR의 활성측정은 Jimenez *et al.*(1997)의 방법을 이용하여, APX활성( $\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>첨가로 인한 10 mM ascorbate의 monodehydroascorbate으로의 산화에 의한 290 nm에서의 흡광수치의 변화량과 GR활성( $\epsilon = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )은 GSSG (50 mM oxi-glutathione)존재 하에서 NADPH의 NADP로의 산화에 의한 340 nm에서의 흡광수치의 감소량을 흡광광도계(Shimadzu UV-VIS spectrophotometer 1240)를 이용하여 2분간 측정하여, 각 효소의 활성을 단백질함량(mg protein)에 대해 표현하였다.

APX one unit는 1분간 1  $\mu\text{M}$ 의 ascorbate을 산화시키는 효소의 양, GR one unit는 1분간 1  $\mu\text{M}$ 의 NADPH를 산화시키는 효소의 양으로 정의하였다.

Native gels에 의한 APX의 isoforms의 동정은 SOD와 동일한 조성의 30% polyacrylamide gel로 전기영동하였다. 50 mM Na-phosphate buffer(pH 7.0)와 2 mM ascorbate을 넣어 30분간 배양한 후 증류수로 세척하여 50 mM Na-phosphate, 4 mM ascorbate 및

2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣고 20분간 배양한 후 증류수로 깨끗이 세척하고, 50 mM Na-phosphate, 28 mM TEMED와 2.45 mM NBT를 넣어 5분간 강한 빛에서 발색하여 증류수로 여러 번 세척하였다.

CAT(catalase)활성측정( $\epsilon = 0.04 \text{ mM cm}^{-1}$ )은 50 mM K-phosphate buffer(pH 7.0)에 효소추출액 80  $\mu$ l을 넣은 후 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 혼합하여, 240 nm에서 2분간 CAT에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 감소로 인한 흡광수치의 변화량을 측정하여 단백질함량(mg protein)에 대해 계산하였다(Aebi 1974).

**결과 및 고찰**

*A. gmelini*(가는갯능쟁이)의 건물량은 300 mM NaCl까지의 처리구에서는 대조구에 비해 생장의 증가를 보였으며, 100 mM NaCl처리에서 가장 높은 지상부 건물량(약 116%)을 나타내었다. 400 mM NaCl의 고농도 염처리에 의해서도 단지 잎, 줄기의 건물량이 대조구에 비해 각각 30%, 16%의 감소를 보여 염에 대한 높은 내성을 보였다(Fig. 1).

*A. gmelini*를 포함하여 *Atriplex*속에 속하는 많은 종들은 건조 및 염 환경에 잘 적응하는 식물로 대부분이 잎의 바깥 표면에 있는 염모(salt-hairs)에 고농도로 염을 축적하며, glycinebetaine을 이용하는 삼투조절 등이 알려져 있으며, 대부분이 고농도의 염에 의해서도 생장이 저해되지 않는 호염생종(halophytic species)의 특성을 보여준다. 본 실험의 *A. gmelini*의 경우도 400 mM NaCl이하의 염 농도에서는 성장감소를 보이지 않는 염분 내성의 생리적 특성을 보여주었다(Wyn Jones and Storey 1981, Reiman and Breckle 1988).

*A. gmelini*는 외부 염 농도에 따른 수분함량의 차이를 보이지

않았으며, 건물량의 감소를 보였던 400 mM NaCl처리구에서도 지상부 수분함량의 감소를 보이지 않아 외부 염 농도구배에 대해 체내 일정한 수분함량을 유지하였다(Fig. 2). 건조와 염 스트레스는 유사한 방식으로 산화적 스트레스를 야기하는 것으로 알려져 있는데, 이들은 모두 수분결핍을 유도하여 기공폐쇄 및 CO<sub>2</sub>이용과 광합성을 감소시키며, 엽록체에서의 ROS 축적을 촉진함으로써 결과적으로 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있다(Bowler *et al.* 1992, Smimoff 1993). 그러나 본 실험의 경우, *A. gmelini*는 염 처리에 의해 체내 수분함량의 감소를 보이지 않아 400 mM NaCl의 고농도 염 처리구에서 보여주었던 건물량의 감소는 수분결핍에 의한 삼투적 결과는 아닌 것으로 판단된다.

식물은 스트레스를 받을 때 광계II의 광화학적 활성이 저해되고, 엽록소a의 형광 kinetics가 변화하므로, Fo/Fm값은 스트레스의 지표로 이용될 수 있다(Genty *et al.* 1989).

*A. gmelini*의 경우, 염 처리 후 4일까지는 광계II의 양자효율(Fv/Fm)의 증가 및 Fo/Fm값의 감소를 보여 광합성적 능력의 저해 및 염분 스트레스 양상을 보이지 않았으나, 4일 이후 Fv/Fm값의 감소 및 Fo/Fm값의 증가를 보여, 염에 의한 광계II복합체 및 안테나 색소의 손상 가능성을 보여주었으며, 이로 인해 스트레스에 의한 여기된 에너지의 처리능력이 저해됨으로써 산화적 스트레스가 유발되었을 것으로 생각된다(Fig. 3).

이에 반해 염분 처리 후 24시간 이내의 반응에 있어서는 고농도 염(1,000 mM NaCl)에도 불구하고 Fv/Fm값과 Fo/Fm값이 광화학적 스트레스 양상을 보이지 않아 단기간의 염 공급에 대해 광계II의 광화학적 효율이 높은 안정성을 보였다(data not shown).

다양한 농도의 염 처리에 따른 SOD의 상대적 활성변화 및 처리 2일 후의 각 isoforms의 활성은 Fig. 4와 Table 1에 나타나 있다.

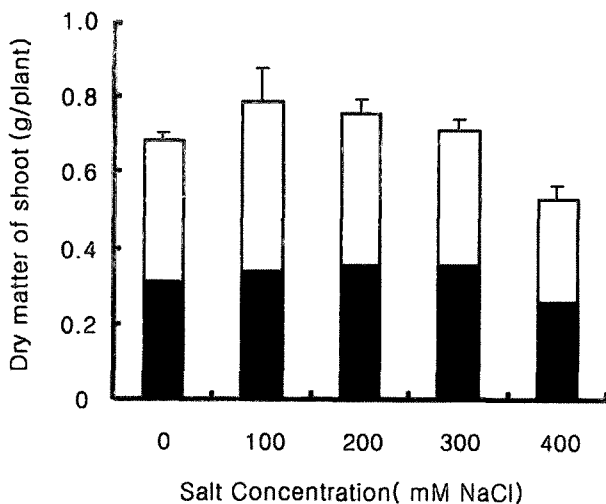


Fig. 1. The effect of NaCl concentration on the dry matter(g/plant) of shoot(□, stems; ■, leaves) in *A. gmelini* after 4 days of salt treatment. Vertical bars represent  $\pm$ S.D. of means (n=5).

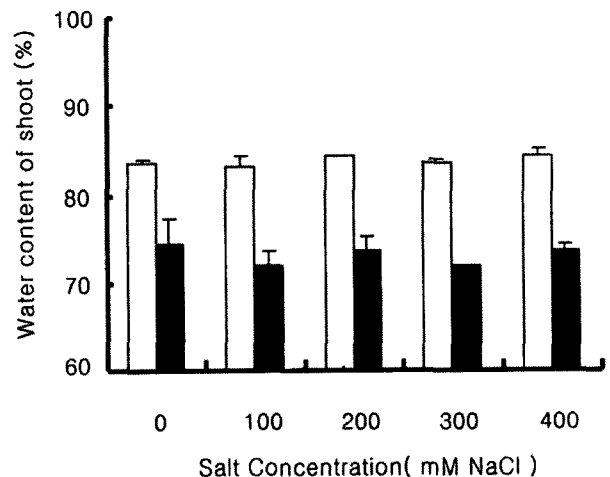


Fig. 2. The effect of NaCl concentration on the water content(%) of shoot(□, leaves; ■, stems) in *A. gmelini* after 4 days of salt treatment. Vertical bars represent  $\pm$ S.D. of means (n=5).

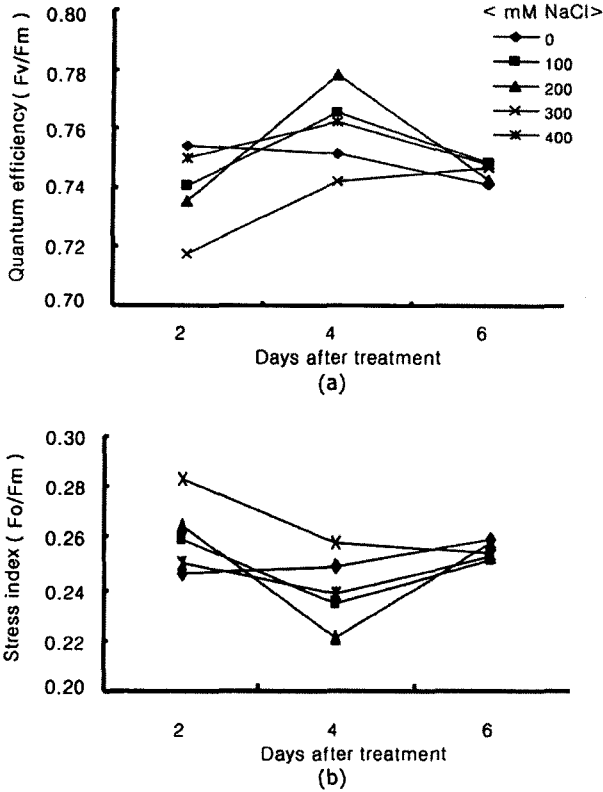


Fig. 3. The changes in a) quantum efficiency(Fv/Fm) and b) stress index(Fo/Fm) of PS II of *A. gmelini* in a various salt levels.

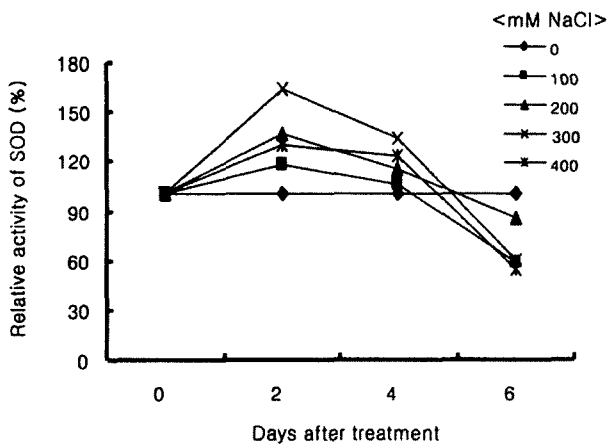


Fig. 4. The changes of relative SOD activities(%) on a soluble protein basis in leaves of *A. gmelini* on 2, 4, 6 days after NaCl treatment.

*A. gmelini*는 형광에서 보여준 양상과 유사하게 염 처리 후 모든 구배에서 SOD 활성의 증가를 보였으며, 300 mM NaCl에서 최고의 활성(대조구의 164%)을 보였다. 400 mM NaCl 처리구에서는 다소 감소하였으나 여전히 대조구 보다 높은 활성(131%)을 나타내었으며 이후 차츰 감소하다가 염 처리 6일 후에는 모

Table 1. SOD activities of total(mean±S.D.) and individual isoforms (Mn, CuZn-SOD) in leaves of *A. gmelini* in a various salt levels on 2 days after NaCl treatment

	Salt Conc. (mM NaCl)				
	0	100	200	300	400
Total SOD	58.33	68.58	79.40	95.78	76.12
(U per mg protein)	±4.05	±2.04	±4.74	±7.68	±5.32
MnSOD(%)	33.6	34.8	34.6	27.1	30.7
CuZnSOD(%)	66.4	65.2	65.4	72.9	69.3
CuZnSOD/MnSOD	1.98	1.87	1.89	2.69	2.26

든 염 처리구에서 대조구 이하의 활성(약 50%)을 나타내었다.

SOD는 산화적 스트레스에 대한 항산화 방어 기작에 있어 첫 번째 방어선에서 작용하는 효소로 초기 산화적 산물인 superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 oxygen molecule(O<sub>2</sub>)로 전환시킨다. 고등식물의 경우 3가지의 주요 isoforms가 알려져 있는데, CuZn-SOD의 경우 모든 진핵세포의 세포질에 주로 존재하고, Mn-SOD의 경우는 미토콘드리아에 그리고 Fe-SOD는 엽록체에 존재하는 것으로 알려져 있다(Bowler *et al.* 1994). 이들 isoforms는 세포내 위치를 달리할 뿐만 아니라 이들간의 상호작용의 중요성이 total-SOD 활성으로는 표현되지 않기 때문에 각 isoforms에 대한 활성의 연구가 중요한 의미를 가진다.

PAGE 분석결과 *A. gmelini*는 고등식물에서 알려진 3가지 isoforms 가운데 Fe-SOD를 제외한 CuZn-SOD(6 bands)와 Mn-SOD (1 band)를 함유하였으며, 주요 isoforms는 높은 활성 값을 보인 CuZn-SOD로 조사되었다. 특별히 300 mM NaCl 이상의 고농도 염분 조건에서는 Mn-SOD에 비해 CuZn-SOD의 활성강화를 통해 total-SOD 활성 값의 증가를 유도하였다(Table 1). 그러나 염 구배에 따른 활성의 차이가 gel상에서는 보이지 않았다(Fig. 5).

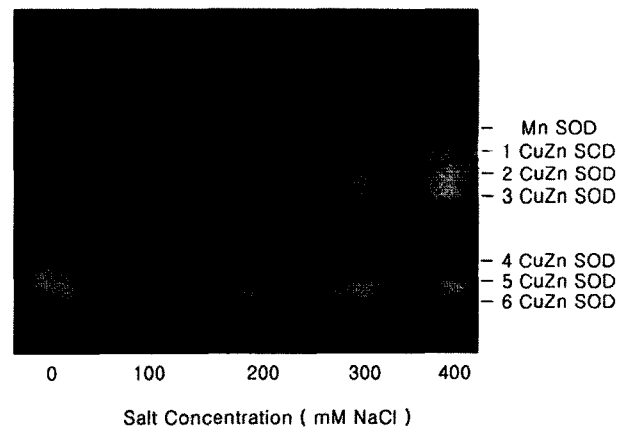


Fig. 5. Separation of SOD isoforms on nondenaturing activity gels from the leaves of *A. gmelini* during salt stress. In each case 200µg of protein per lane was loaded.

SOD에 의해 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 대단히 반응성이 높은 활성산소종으로 DNA의 파괴와 염록체의 스트로마에 있는 thiol-containing enzymes의 불활성화 및 단백질을 변형시켜 가수분해를 촉진하며, APX유전자 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다(Charles and Halliwell 1981, Levine *et al.* 1994, Hagar *et al.* 1996).

따라서 식물의 염 내성 획득에서 SOD강화와 동시에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거할 수 있는 APX 및 CAT의 활성 증가가 중요한 의미를 가진다(Scandalios 1993).

Fig. 6과 7은 APX의 활성변화 및 PAGE에 의한 isoforms의 발현양상을 보여준다. SOD와 유사하게 염 처리에 의한 활성의 증가를 보이다가 차츰 감소하여 처리 6일 후에는 모든 처리구에서 대조구 이하의 활성을 나타내었으며, 처리 2일 후 활성의 증가는 gel 상에서 보여지는 2번과 7번 isoforms의 발현강화와 연관성을 가질 것으로 생각된다.

식물종에 따라 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 제거에 중요한 역할을 하는 효소의 종류

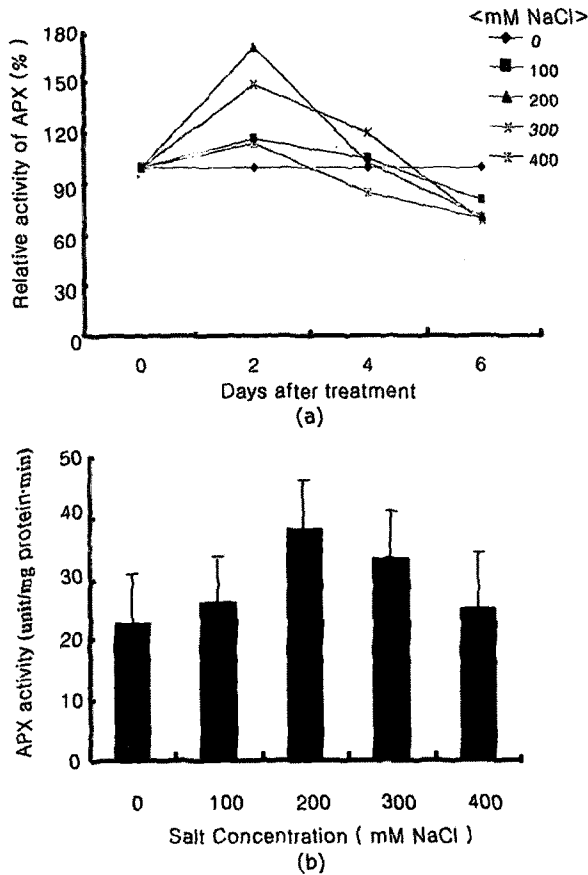


Fig. 6. a) The changes of relative APX activities(%) on a soluble protein basis in leaves of *A. gmelini* on 2, 4, 6 days after NaCl treatment. b) APX activities(unit/mg protein · min) in leaves of *A. gmelini* in a various salt levels on 2 days after NaCl treatment. Vertical bars represent ±S.D. of means (n=5).

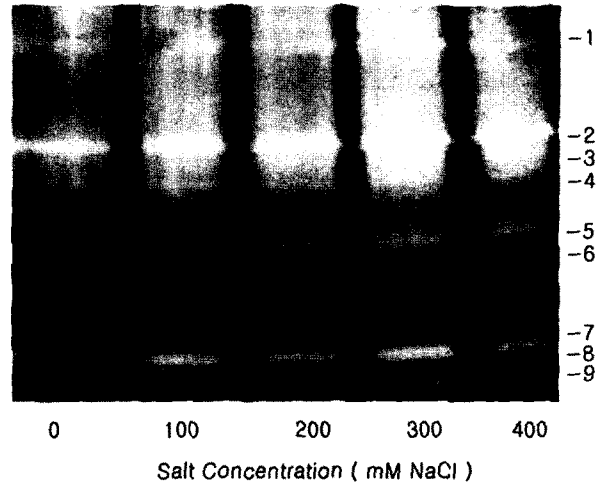


Fig. 7. Separation of APX isoforms on nondenaturing activity gels from the leaves of *A. gmelini* during salt stress. In each case 200μg of protein per lane was loaded.

에 차이를 보이는데, Scandalios(1993)는 SOD와 CAT를 가장 효과적인 항산화 효소로 보고하였다. 그러나 *A. gmelini*의 경우 200 mM NaCl 이상의 염에 의해 CAT 활성이 급격히 감소(200, 300, 400 mM NaCl 처리구의 경우 각각 대조구의 38%, 22%, 15%)하는데, 이것은 염 스트레스에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 방어기작에 CAT가 큰 역할을 하지 않는 것으로 생각된다 (Fig. 8). *A. gmelini*의 경우 CAT보다는 APX가 SOD와 조화를 이루어 효과적으로 작동함으로써 염 스트레스에 의해 생성된 O<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하여 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 것으로 생각된다. CAT 보다는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 독성의 제거에 APX가 중요한 역할을 한다는 유사한 연구가 있다(Benavides *et al.* 2000).

GR(glutathione reductase)은 전자수용체로 NADPH를 이용하여

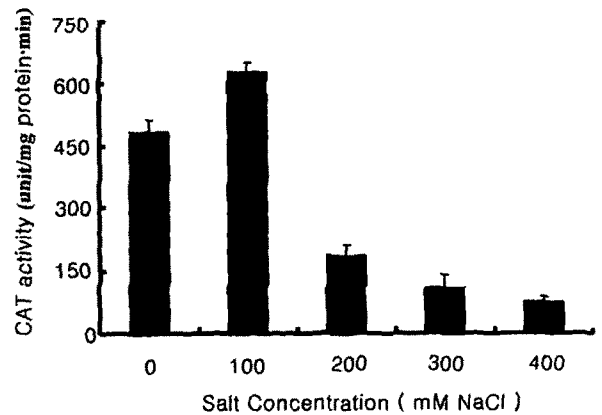


Fig. 8. CAT activities(unit/mg protein · min) in leaves of *A. gmelini* in a various salt levels on 2 days after NaCl treatment. Vertical bars represent ±S.D. of means (n=5).

GSSG를 GSH로 환원시키고, ascorbate-glutathione cycle에서 ascorbic acid의 환원에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, GR 활성 증가 또는 GSH의 증가가 산화적 스트레스에 대한 내성을 증가시킨다는 보고가 있다(Bray *et al.* 2000, Broadbent *et al.* 1995).

*A. gmelini*는 SOD, APX의 반응과 유사하게 GR 또한 염 처리에 의해 즉각적인 활성의 증가를 보인 후 점진적인 감소를 나타내었다(Fig. 9).

결론적으로, *A. gmelini*는 염에 의해 더 높은 SOD, APX, GR 활성과 높은 광계 II 양자효율을 보여 염 내성과 항산화 방어시스템(SOD, ascorbate-glutathione cycle의 APX, GR)간의 상호 연관성을 보여주었다. 그러나 4일 이상의 지속적인 염 처리에 의해 광계 II의 양자효율 (Fv/Fm) 감소 및 Fo/Fm 값의 증가와 같은 광화학적 저해가 유발되었으며, 항산화 효소의 활성감소 또는 방어능력 이상의 과도한 ROS 생성으로 인하여 항산화 기작이 효과적으로 수행되지 못해 산화적 손상이 뒤따르는 것으로 생각된다.

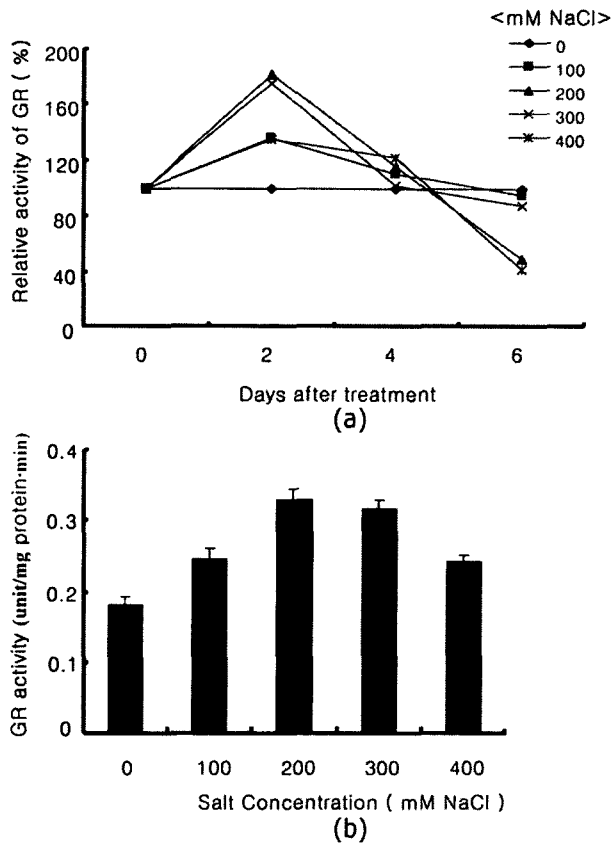


Fig. 9. a) The changes of relative GR activities(%) on a soluble protein basis in leaves of *A. gmelini* on 2, 4, 6 days after NaCl treatment.  
b) GR activities(unit/mg protein · min) in leaves of *A. gmelini* in a various salt levels on 2 days after NaCl treatment. Vertical bars represent  $\pm$ S.D. of means (n=5).

*A. gmelini*를 포함하는 명아주과 식물에는 건조지 및 염습지에 보편적으로 분포하는 종과 근대, 시금치를 비롯한 식용으로 이용되는 재배종이 있다. 이들은 유전적으로 서로 가까우나 염에 대한 내성의 범위를 달리하기 때문에 염에 대해 비교적 강한 내성을 갖는 야생종인 *A. gmelini*의 염분 내성에 관련된 연구는 염에 민감한 시금치와 같은 작물의 생리적 개선을 위한 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 생각한다.

앞으로 *A. gmelini*를 이용하여 염 환경하에서의 이온양상과 항산화 효소의 세포내 분포와 활성에 관한 포괄적 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

## 인용문헌

- Aebi, H. 1974. Catalase. In Bergmeyer H.U. (ed.), Methods of enzymatic analysis. Academic Press, NY. 2: 673-684.
- Allen, R.D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 107: 1049-1054.
- Alscher, R.G., J.L. Donahoe and C.L. Cramer. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants; relationships in green cells. *Plant Physiol.* 100: 224-233.
- Asada, K. 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in plants. In Scandalios J.G. (ed.), Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 715-735.
- Bajji, M., J.M. Kinet and S. Lutts. 1998. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Science* 137: 131-142.
- Benavides, M.D., P.L. Marconi, S.M. Gallego, M.E. Cowba and M.L. Tomaro. 2000. Relationship between antioxidant defense systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 273-278.
- Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase; improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
- Beyer, W.F. and I. Fridovich. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity; some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.
- Bowler, C., M. Van Montagu and D. Inze. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.
- Bowler, C., W. Van Camp, M. Van Montagu and D. Inze. 1994. Superoxide dismutases in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 199-218.
- Bray, E.A., J. Bailey-Serres and E. Weretilnyk. 2000. Responses to abiotic stress. In Buchanan, B.B., W. Gruissem, R.L. Jones (eds.), Biochemistry and molecular biology of plants.

- American Society of Plant Biologists, Waldorf. pp. 1158-1203.
- Broadbent, P., G.P. Creissen, B. Kular, A.R. Wellburn and P. Mullineaux. 1995. Oxidative stress responses in transgenic tobacco containing altered levels of glutathione reductase activity. *Plant J.* 8: 247-255.
- Casano, L.M., H.R. Lascano and V.S. Trippi. 1994. Hydroxyl radicals and a thylakoid-bound endopeptidase are involved in light and oxygen-induced proteolysis in oat chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 35: 145-152.
- Charles, S.A. and B. Halliwell. 1981. Light activation of fructose biphosphate in isolated spinach chloroplasts and deactivation by hydrogen peroxide. *Planta* 151: 242-246.
- Foyer, C.H., M. Lelandais and K.J. Kunert. 1994. Photooxidative stress in plants. *Plant Physiol.* 92: 696-717.
- Genty, B., J. Briantais and N.R. Baker. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem. Biophys. Acta.* 990: 87-92.
- Gossett, D.R., E.P. Millhollon and M.C. Lucas. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci.* 34: 706-714.
- Greenway, H. and R. Munns. 1980. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190.
- Hagar, H., N. Ueda and S.V. Shah. 1996. Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol.* 271: F209-F215.
- Jimenez, A., J.A. Hernandez, L.A. del Rio and F. Sevilla. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114: 275-284.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Bio. Chem.* 193: 265-275.
- Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon and C. Lamb. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London. pp. 657-680.
- Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- Reimann, C. and S.W. Breckle. 1988. Salt secretion in some *Chenopodium* species. *Flora* 180: 289-296.
- Rout, N.P. and B.P. Shaw. 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. *Plant Sci.* 160: 415-423.
- Shalata, A. and M. Tal. 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Plant Physiol.* 104: 169-174.
- Scandalios, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101: 7-12.
- Smirnov, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125: 27-58.
- Wyn Jones, R.G. and R. Storey. 1981. Betains. In L.G. Paleg and D. Aspinall (eds.), *Plant and biochemistry of drought resistance in Plnat*. Academic Press, Sydney. pp. 121-136.

(2003년 8월 22일 접수; 2003년 9월 24일 채택)

---

## The Responses of Antioxidative Enzymes and Salt Tolerance of *Atriplex gmelini*

Bae, Jeong-Jin, Ho-Sung Yoon, Yeon-Sik Choo and Seung-Dal Song  
*Department of Biology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*

**ABSTRACT** : Saline conditions invoke oxidative stress attributed to the overproduction of reactive oxygen species (ROS). Changes in quantum efficiency and antioxidative enzyme activity upon salt treatment were examined in a salt-tolerant plant, *Atriplex gmelini*, to test the hypothesis that salt tolerance of *A. gmelini* is due to the increased activity of antioxidative enzymes. *A. gmelini* showed optimum growth at 100 mM NaCl producing 116% of the shoot dry weight over control plants in 0 mM NaCl treatment. Healthy growth persisted up to 300 mM NaCl treatment maintaining normal internal water content and dry weight. No photochemical stress or damages on antioxidative defense system was obvious in plants of 2 and 4 day salt treatment which was indicated by increased quantum efficiency (Fv/Fm value), decreased stress index (Fo/Fm value), and increased activity of antioxidative enzymes such as SOD, APX, GR. However, the plants treated with 400 mM NaCl showed decrease in growth and in antioxidative enzyme activity although the enzyme activity was still higher than that of the 0 mM NaCl treated plants (131%, 114%, and 134% of the SOD, APX, and GR activity, respectively). Interestingly, another important antioxidative enzyme that scavenges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plant cells, CAT, showed rapid decrease in its activity as salt concentration increased; 38%, 22%, 15% of the 0 mM NaCl treated plants at 200, 300, 400 mM NaCl treatments, respectively. It appears that the enzymes in ascorbate-glutathione cycle such as APX and GR play the major roles in scavenging ROS produced by salt stress in *A. gmelini*. After 6 days of salt treatment, the damage in photochemical and antioxidative defense system was indicated by decreased Fv/Fm value and increased Fo/Fm value. *A. gmelini* appears to cope with short term salt treatment by enhanced activity of the antioxidative defense system, whereas long term stress invoke oxidative stress by increased ROS due to the damages in photochemical and antioxidative system.

**Key words** : Antioxidative, APX, *Atriplex gmelini*, CAT, Fluorescence, GR, ROS, Salt, SOD

---