

염 스트레스에 대한 배추의 생리학적 반응

김주성¹ · 심이성² · 김명조^{1,3*}

¹강원대학교 한방Bio연구소, ²서울시립대학교 환경원예학과, ³강원대학교 식물자원응용공학과

Physiological Response of Chinese Cabbage to Salt Stress

Ju-Sung Kim¹, Ie-Sung Shim², and Myong-Jo Kim^{1,3*}

¹Oriental Bio-herb Research Institute, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Department of Environmental Horticulture, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

³Department of Applied Plant Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract. In order to understand the plant responses to salt stress (0, 50, and 100 mM NaCl), Chinese cabbage seedlings grown up to two leaf stages by hydroponic culture were used. Fresh and dry weight, chlorophyll (Chl), antioxidant materials, polyamine content, antioxidant enzyme activities, and inorganic ion level were evaluated. Fresh and dry weights of Chinese cabbage increased with the increase in salinity while the optimal growth occurred at 50 mM NaCl. The Chl a, total Chl, carotenoid content, and Chl a/b ratio increased by the 6 days after treatment with 100 mM NaCl; however, the Chl b content decreased. Glutathione increased in the root of Chinese cabbage for 6 days. Dehydroascorbate increased remarkably by day 6 caused by the salt stress in both leaf and the root. While ascorbate peroxidase increased, the activity of catalase and glutathione reductase decreased gradually in the first leaf for 6 days. The Na⁺ content increased by 12.5-fold in the 3 days after treatment with 100 mM NaCl in the shoot, whereas the Ca²⁺, K⁺, and Mg²⁺ content measured in the same treatment decreased by 43 to 57%. Spermidine content decreased as salinity increased, but spermine content increased. The growth promotion, glutathione and ascorbic acid content in Chinese cabbage were increased by low salt stress, and shortening of the cultivation period for growth increase of Chinese cabbage is expected.

Additional key words: antioxidant enzymes, ascorbic acid, dehydroascorbate, glutathione, polyamine

서 언

일반적으로 토양 중에 Na⁺과 Cl⁻가 고농도로 존재하면 식물은 염 스트레스를 받는다. 염 스트레스는 이온의 독성(주로 Na⁺와 Cl⁻), 수분포텐셜의 저하, 이온의 흡수 및 수송의 억제에 의한 영양불균형을 일으키며(Munns와 Termaat, 1986), 식물의 생산성 억제와 초기생장 감소를 가져온다. 따라서, 생장억제는 토양수분의 삼투압포텐셜 또는 가용성 염의 전체 농도에 직접 관계한다. 염 스트레스는 생장, 광합성, 단백질 합성, 에너지나 지방질대사 등 모든 주요한 과정에 영향을 주어 생장억제는 모든 식물에서 일어나지만, 치사농도의 염에 대한 생장감소율과 내성 레벨은 여러 식물 종간에 따라 크게 다르다(Parida와 Das, 2005). 또한, 강광, 건조, 염 등의 환경 스트레스는 스트레스의 지속시간, 강도 및 식물의

연령 등에 따라 활성 산소를 증가시키지만, 식물은 활성 산소종을 제거하는 superoxide dismutases(SOD), peroxidase(POX), catalase(CAT) 및 glutathione reductase(GR) 등의 항산화 효소의 활성 유도에 의해 활성산소종으로부터 방어되고 있다(Bowler 등, 1992).

스트레스나 화학물질이 식물의 체내 글루타치온 함량을 증가시키기도 한다(Kopriva와 Rennenberg, 2004). 예로, 중금속, 고농도 포도당 및 열에 의한 스트레스들이 세포 내 글루타치온 농도를 바꾸는 것으로 알려져 있다. 글루타치온의 세포 내포량은, 이용과 합성 동안의 밸런스 기능으로 정해진다. 글루타치온의 감소는 glutathione S-transferase(GST)를 개입시킨 화학물질과의 결합 반응, 또는 H₂O₂ 생산과 glutathione peroxidase(GPX) 활성의 증가에 의한 oxidized glutathione(GSSG) 형성에 의해 일어난다. 형성된 GSSG는 글루타치온의 산화가 계속된다고 해도 NADPH를 개입시켜 GR에 의해 환원되어 글루타치온을 생성할 수 있다.

*Corresponding author: kimmjo@kangwon.ac.kr

※ Received 23 October 2009; Accepted 19 December 2009.

본 연구는 배추의 염 스트레스에 의한 생리학 및 생화학적 메커니즘을 이해하기 위하여, 수경재배에서 2엽기까지 기른 유식물체를 이용하였다. 염 스트레스에 대한 파라미터로서 생장, 항산화 물질(아스코르빈산과 글루타치온), 항산화 효소(APX, CAT, GR), 클로로필, 폴리아민, 무기이온 등의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 생육조건

Trichloroacetic acid(TCA), ascorbic acid(AsA), dehydroascorbic acid(DHA)은 (주)화광순약공업(Osaka, Japan)의 제품을, DTNB, dithiothreitol(DTT), catalase(CAT), ascorbate peroxidase(APX), glutathione reductase(GR), oxidized glutathione(GSSG)와 reduced glutathione(GSH)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. N-ethylmaleimide (NEM)는 Fluka(Buchs, Switzerland)에서 구입하였다.

버미컬라이트를 충전시킨 포트에 배추 종자(*Brassica campestris* L. cv. Taibyourokujunichi)를 발아시켜, 자엽이 완전하게 나왔을 때, 수경액이 담긴 포트(3cm×3cm×10cm)로 이식하였다. 생육상의 환경 조건은 광 강도 270 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Photosynthetically Active Radiation(PAR), 온도 25 $^{\circ}\text{C}$ /15 $^{\circ}\text{C}$ (주간/야간), 일장 16시간, 상대습도 60-80%로 유지하였다. 배양액은 2일마다 교환하였으며, 연속적으로 공기를 주입하였다. 제 2엽이 완전히 전개된 시기에 NaCl를 이용해 0, 50 및 100mM이 되도록 1/2강도의 배양액을 조정하였다. 시험구 크기는 15cm×25cm(40 개체)이며, 3반복 완전임의배치법으로 실시하였다. 처리 개시일로부터 6일간 생육시켰으며, 제 1엽과 뿌리를 이용하여 생장, 항산화 물질(아스코르빈산과 글루타치온), 항산화 효소(APX, CAT 및 GR), 클로로필, 폴리아민, 무기 이온 등의 변화를 측정하였다.

생육시험

NaCl 처리 후 3일과 6일째, 지상부와 지하부로 나누어 생체중과 건물중을 각 시험구당 3개체씩 선발하여 4반복 측정하였다.

클로로필 분석

클로로필 추출 및 측정은 Chappelle 등(1992)의 방법에 준하였다. 시료 0.5g을 dimethyl sulfoxide(DMSO) 10mL에 침지하여, 30 $^{\circ}\text{C}$ 의 암조건에서 48시간동안 색소를 추출한 후, 분광 광도계(UV-2450, Shimadzu, Japan)를 이용하여 664, 648 및 470nm에서 흡광도를 측정하였다.

추출된 클로로필 함량은 다음 식을 이용하여 계산하였다:

$$\text{Chlorophyll a} = 12.25A_{644\text{nm}} - 2.79A_{648\text{nm}}$$

$$\text{Chlorophyll b} = 21.50A_{648\text{nm}} - 5.10A_{664\text{nm}}$$

$$\text{Total chlorophyll} = \text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b}$$

$$\text{Carotenoids} = (1000A_{470\text{nm}} - 1.82\text{chl a} - 85.02\text{chl b}) / 198$$

(A, absorbance; pigment concentration calculated as $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of extract)

Malondialdehyde 분석

Malondialdehyde(MDA) 분석은 Heath와 Packer(1968)의 thiobarbituric acid(TBA) 반응을 이용하였다. 채취한 시료 0.5g을 액체질소로 동결 마쇄한 후 0.1% TCA 5mL를 더해 homogenizer로 30초 교반하였다. 10,000 × g로 10분간, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 원심분리하여 얻어진 상청액 1mL에 0.5% TBA를 포함한 20% TCA 5mL를 더하여, vortex mixer로 교반하였다. 그 후 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후 병랭시켰다. 10,000×g로 10분간 원심분리하여, 532nm에서 흡광도를 측정했다.

과산화수소 측정

과산화수소 함량은 Alexieva 등(2001)의 방법에 준하여 측정하였다. 샘플 0.5g을 액체질소로 동결 마쇄해, 0.1% TCA 5mL를 더해 약 30초간 균질화한 후, 12,000 × g로 15분간 원심분리하였다. 상청액 0.5mL에 1M KI 2mL와 10mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 0.5mL를 넣어 vortex mixer로 잘 혼합하여 암소에서 1시간 동안 반응 후 390nm에서 흡광도를 측정했다.

글루타치온 추출 및 정량

글루타치온의 추출은 Gronwald 등(1987)의 방법에 준하여 실시하였다. 0.5g의 샘플을 막자 사발을 이용하여 분쇄하고, 5% TCA(w/v)를 5mL 첨가한 후, homogenizer로 균질화하였다. 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 8,000 × g로 10분간 원심분리한 후 상청액을 2매의 미라크로스(miracloth)를 이용하여 여과시키고 여액을 2mL씩 나누어 총글루타치온(GSH + GSSG)과 산화형 글루타치온(GSSG) 함량을 측정하였다.

총글루타치온 정량용 추출액은 동량의 diethyl ether를 첨가하여 TCA를 제거하는 작업을 3회 반복하였다. 남은 분획물은 질소가스를 이용하여 여분의 diethyl ether를 제거하였다. 산화형 글루타치온 함량측정은 추출액에 동량의 NEM 용액(5mM EDTA·2Na을 포함한 0.1M potassium phosphate buffer, pH 7.5로 용해)을 첨가하여 환원형 글루타치온(GSH)을 제거한 후, 동량의 diethyl ether를 첨가하여 TCA와 NEM을 제거하는 작업을 3회 반복하였다.

측정은 항온수 순환 셀홀더를 부착한 분광광도계를 이용하여, NADPH와 GR 존재 하에서 GSH와 GSSG의 리사이클링법에 의해 DTNB로부터 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid (TNB)의 생성속도를 37°C에서 단위 시간내 흡광도 변화(412nm)로 측정하였다. DTNB액을 제외한 반응액을 37°C에서 5분간 배양시킨 후 DTNB액을 첨가하여 반응시켰다. 글루타치온 함량은 표준물질을 이용하여 검량선으로부터 산출하였으며, GSH는 총글루타치온으로부터 GSSG량을 빼어 산출하였다.

Ascorbate(AsA)와 Dehydroascorbate(DHA) 분석

환원형 아스코르빈산(AsA)와 산화형 아스코르빈산(DHA) 측정은 Wang 등(1991)의 방법에 준하였다. 시료 0.5g을 액체질소로 동결 마쇄하여, 5% TCA 5mL를 첨가하여 homogenizer로 30초간 교반하였다. 4°C에서 16,000×g로 10분간 원심분리하고, 얻어진 상청액을 여과 후, 분석용 시료로 이용하였다.

환원형 아스코르빈산의 측정은 시료 추출액 0.3mL에, 5% TCA 0.3mL와 에탄올 0.3mL를 넣어 섞은 다음, 에탄올에 녹인 0.4% H₃PO₄(v/v) 0.15mL, 12mM bathophenanthroline(diphenyl-1,10-phenanthroline) 0.3mL와 1.5mM FeCl₃ 0.15mL를 넣어서 잘 혼합하고 나서 30°C에서 90분간 정치 후, 534nm에서 흡광도를 측정했다.

총아스코르빈산의 측정 방법을 위하여 시료 추출액 0.3mL에, 3.1mM DTT(pH 7.8) 0.15mL와 에탄올 0.3mL를 넣어 혼합한 후, 실온에서 10분간 정치한다. 그 후, 혼합물에 에탄올에 녹인 15.2mM NEM 0.15mL와 20% TCA 0.15mL를 넣어 섞은 후, 0.4% H₃PO₄ 0.15mL, 12mM bathophenanthroline 0.3mL와 1.5mM FeCl₃ 0.15mL를 넣어서 잘 혼합하고 나서 30°C에서 90분간 정치 후, 534nm에서 흡광도를 측정했다.

아스코르빈산은 표준 물질을 이용한 검량선으로부터 산출했다. 산화형 아스코르빈산은 총아스코르빈산량으로부터 환원형 아스코르빈산량을 빼어 계산하였다.

효소 추출 및 분석

샘플 0.5g을 마쇄하여 분말상태의 시료를 얻은 후, 0.4mM EDTA-4H, 1mM ascorbate, 2% polyvinylpyrrolidone(w/v)를 포함한 25mM potassium phosphate buffer(pH 7.8)를 5mL 첨가하여 homogenizer로 약 30초간 균일하게 혼합하였다. 혼합액을 원심분리(4°C, 15,000×g, 20분간)하여, 상청액을 여과하여 조효소액으로 사용하였다. 효소 활성 측정은 분광 광도계를 이용하여 30°C에서 단위 시간내 흡광도의

변화를 추적하는 방법으로 측정하였다.

CAT의 활성은 조효소액 0.05mL를 10mM H₂O₂를 포함한 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 0.95mL에 첨가해, H₂O₂의 분해를 240nm에서 흡광도 감소로 측정하였다. APX 활성의 측정은 조효소액 0.05mL에 100mM ascorbate 0.25mL, 0.4mM EDTA-4H 0.25mL, 10mM H₂O₂ 0.01mL, 100mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 0.25mL, 증류수를 0.19mL에 첨가해, ascorbate의 분해를 290nm에서 흡광도 감소로 측정하였다. GR 활성의 측정은 조효소액 0.1mL에 1mM NADPH를 0.12mL, 증류수 0.48mL를 첨가했다. 반응은 GSSG의 첨가에 의해 시작되며, NADPH의 분해를 340nm에서 흡광도 감소로 측정하였다.

단백질 분석

추출한 조효소의 단백질 함유량은, Bradford(1976)의 방법에 준하여 실시하였다. 추출한 조효소액 0.1mL에, 증류수에 용해시킨 0.01% Coomassie Brilliant Blue(w/v), 4.7% 에탄올(v/v), 8.5% phosphoric acid(v/v)를 5mL 더하여 잘 섞었다. 실온에서 10분간 정치 한 후, 595nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질 bovine serum albumin(BSA)을 이용하여 검량선을 작성하고, 단백질 함량을 산출했다.

무기성분 분석

무기 이온의 측정은 식물체를 지상부와 지하부로 나누어 80°C에서 48시간 건조한 후 Kim 등(1999)의 방법에 준하여 분석했다. 건조된 시료 약 0.1g을 50mL 삼각플라스크에 넣고, 1.4N HNO₃를 10mL 넣고 핫플레이트를 이용하여 100°C에서 분해하였다. 약 3시간 후 식물체가 완전히 분해되면, HNO₃가 증발할 때까지 가열하였다. 증류수 50mL를 첨가하여 잘 흔들어 여과한 후 분석에 이용하였다. 무기 성분으로 Na⁺, K⁺, Ca²⁺ 및 Mg²⁺를 측정하였다. ICP 플라즈마 발광 분광 분석 장치(ICAP-737V, NipponJarrel-Ash, Japan)를 이용하였으며, 건물질 1g당 Na⁺, K⁺, Ca²⁺ 및 Mg²⁺양으로 계산하였다.

폴리아민 추출 및 분석

폴리아민의 추출과 분석은 Yamamoto 등(2004)의 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 시료 0.5g을 액체 질소에 동결 마쇄후, 500mM HClO₄ 3mL를 더해 추출하고, 10,000×g로 10분간 원심분리하여, 상청액을 이용하였다. HClO₄ 추출액 0.5mL에 내부 표준물질로 1,6-hexane-diamine를 첨가하고 2N NaOH 1mL로 알칼리화한 후, benzoylchloride 10μL를 첨가해 폴리아민을 벤조일 유도체화시켰다. 실온에서 40분

결 과

간 방치 후, 포화 NaCl 수용액 2mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그후, diethyl ether 2mL를 첨가하여 혼합하고, 1,000 × g로 5분간 원심분리했다. 상층의 diethyl ether 1mL를 회수한 후, 질소 가스를 이용하여 농축 건조하였다. HPLC 용 메탄올 0.3mL로 재용해하여, 0.45µm필터로 여과하여 분석하였다. HPLC 측정 조건은 Table 1에 나타내었다. Benzoyl polyamine은 UV-VIS 검출기(254nm)로 검출하였다. 폴리 아민량은 내부 표준물질과의 면적비로부터 계산하였다.

Table 1. The analytical HPLC conditions and mobile phase composition.

Analytical HPLC conditions	
Items	Condition
Instrument	Shimadzu
Detector	SPD-10A _{VP}
Pump	LC-10AD _{VP}
Column oven	CTO-10AC _{VP}
Column	COSMOSIL 5C18-AR II packed column, 5 µm, 250×4.6 mm I.D.
Column temp.	35°C
Wave length	254 nm
Mobile phase	A; H ₂ O, B; MeOH (A% = 100%-B%)
Flow rate	0.8 mL·min ⁻¹
Injection volume	10 µL
Retention time	Putrescine; 10 min
	1,6-Hexane-diamine; 15 min
	Spermidine; 18.8 min
	Spermine; 32 min

Solvent gradient program of HPLC analysis		
Time (min)	A; Water (%)	B; MeOH (%)
0	45	55
20	45	55
40	10	90
50	45	55
60	45	55

배추의 생육에 미치는 염 스트레스의 영향을 분석하기 위하여, 2엽기의 유식물체를 6일간, 0(대조구), 50 및 100mM NaCl을 처리하였다. 염 처리 후 3일째, 대조구(3.96g/plant)에 비해 50mM NaCl 처리구(4.62g/plant)에서 17% 생육이 증가했지만, 100mM NaCl 처리구(3.31g/plant)에서는 16% 생육 저해를 보였다. 처리 후 6일째에는, 대조구(6.48g/plant)에 비해 50mM NaCl 처리(9.21g/plant)에서 43% 생육이 증가했지만, 100mM NaCl 처리(5.56g/plant)에서는 14% 생육 저해를 볼 수 있었다. 염 처리에 의한 건물중은 대조구에 비해 50, 100mM NaCl 처리에서 3일째와 6일째 모두 증가했다. 특히, 뿌리에서 크게 증가했다(Table 2).

서로 다른 농도의 염 처리하에서 생육시킨 배추의 클로로필 함량을 조사하였다. 클로로필 a, 클로로필 b, 총클로로필 및 카로티노이드 함량은 염 처리에 의해 감소했지만, 클로로필 a/b는 증가했다(Table 3). 또한, 염 처리후 3일째가 6일째보다 감소율이 높았다.

막지질 과산화의 지표가 되는 MDA 함량이 염 처리에 의해서 어떠한 영향을 받는지를 측정했다. 염 처리에 의해 잎의 MDA 함량은, 50mM, 100mM NaCl 처리 후, 3일째 각각 13%, 91% 증가했다. 또, 6일째에는 각각 15%, 75% 증가했다(Fig. 1A). H₂O₂ 함량의 변화는 산화 스트레스에 있어서의 식물의 ROS 제거 능력 상태의 좋은 인디케이터이다. 서로 다른 레벨의 염 처리에 의해 H₂O₂의 함량을 추측함으로써 배추의 ROS 제거효율을 구하였다. 수경액에 50mM, 100mM NaCl 처리 후, 3일째에 H₂O₂ 함량이 각각 27%, 45% 증가했지만, 6일째에는 변화가 없었다(Fig. 1B).

식물에 있어서 환원형 글루타치온과 아스코르빈산은 ROS 레벨을 생체내에서 감소시키는 일반적인 항산화 물질로 사용된다. 그래서, 서로 다른 염스트레스하에서 유발되는 산화 스트레스에 대응하는 항산화 물질의 함량변화를 조사하였다. 잎의 총글루타치온과 환원형 글루타치온 함량은 3일

Table 2. Growth of Chinese cabbage after 3 and 6 days in hydroponic culture solution containing different NaCl contents.

Treatment date	NaCl (mM)	Fresh weight (g/plant)			Dry weight (g/plant)	
		Total	Aerial part	Root	Aerial part	Root
3rd Day	0	3.96 ± 0.20	3.45 ± 0.14	0.52 ± 0.08	0.252	0.052
	50	4.62 ± 0.23	3.97 ± 0.10	0.65 ± 0.02	0.323	0.072
	100	3.31 ± 0.12	2.99 ± 0.13	0.32 ± 0.02	0.261	0.06
6th Day	0	6.48 ± 0.08	5.76 ± 0.04	0.72 ± 0.04	0.453	0.111
	50	9.21 ± 0.18	7.93 ± 0.18	1.28 ± 0.13	0.717	0.151
	100	5.56 ± 0.16	5.00 ± 0.13	0.56 ± 0.07	0.47	0.14

Values are means ± SD (n=4).

Table 3. Effects of salt stress on photosynthetic pigments in the first leaf of Chinese cabbage.

Treatment date	NaCl (mM)	Chl a	Chl b	Total Chl	carotenoids	Chl a/b
		mg·g ⁻¹ fresh weight				
3rd Day	0	7.47 ± 0.15	2.25 ± 0.02	9.71 ± 0.13	1.77 ± 0.01	3.32
	50	6.83 ± 0.57	2.04 ± 0.20	8.87 ± 0.77	1.63 ± 0.10	3.34
	100	6.04 ± 0.14	1.93 ± 0.05	8.01 ± 0.05	1.35 ± 0.06	3.13
6th Day	0	7.13 ± 0.14	2.10 ± 0.09	8.92 ± 0.03	1.73 ± 0.04	3.39
	50	5.29 ± 0.25	1.53 ± 0.04	6.53 ± 0.07	1.19 ± 0.07	3.45
	100	6.58 ± 0.14	1.90 ± 0.07	8.55 ± 0.05	1.41 ± 0.03	3.46

Values are means ± SD (n=4).

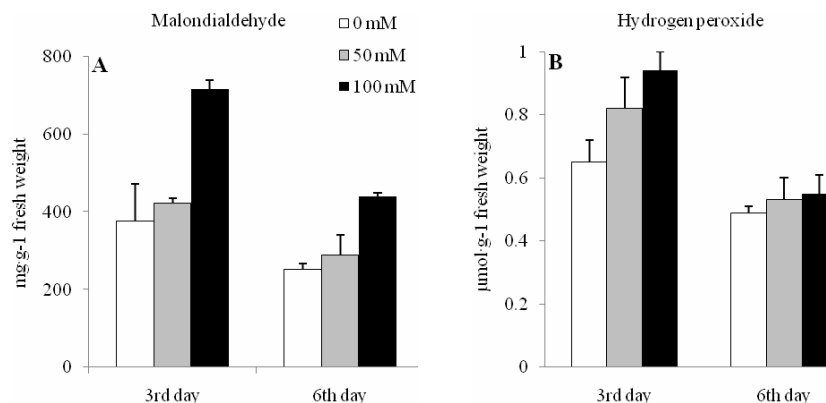


Fig. 1. Effects of salt stress on malondialdehyde and hydrogen peroxide content in the first leaf of Chinese cabbage. Values are means ± SD (n=4).

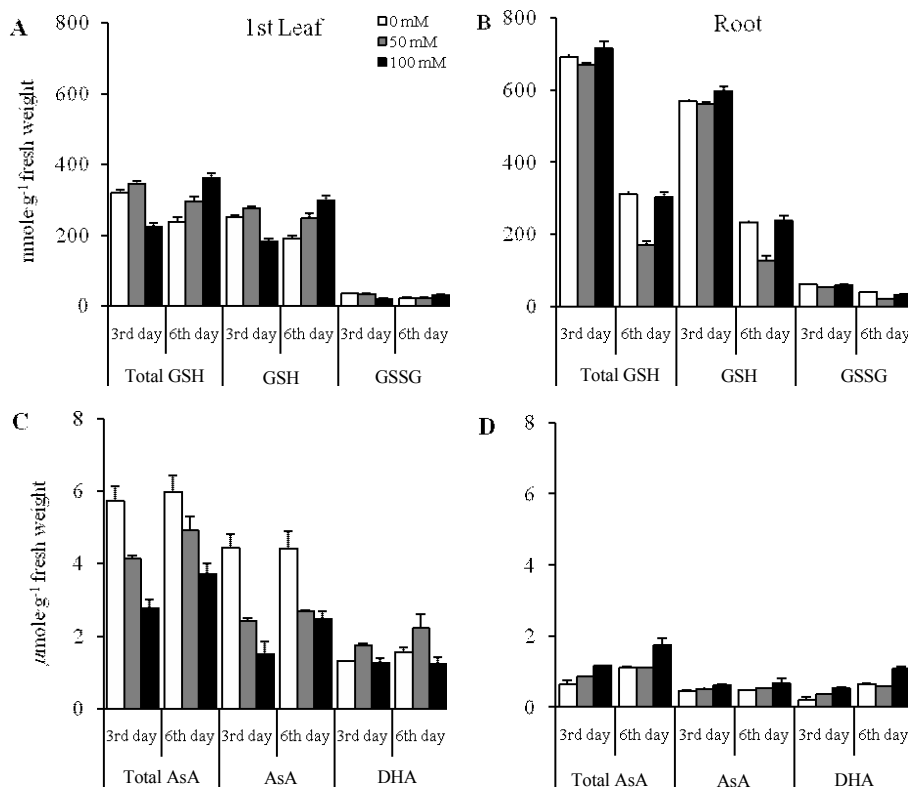


Fig. 2. Antioxidant material contents in the first leaf and root of the Chinese cabbage grown with the different salt concentrations (0, 50, and 100 mM) in the hydroponic culture solutions. A, B; total glutathione (GSH+GSSG), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) content of leaf and root, respectively. C, D; total ascorbate (AsA+DHA), ascorbate (AsA) and dehydroascorbate (DHA) content of leaf and root. Values are means ± SD (n=4).

째 50mM NaCl 처리에서 증가했지만, 100mM NaCl 처리에서는 감소했다. 6일째는 대조구보다 각각 53%, 57% 증가했다(Fig. 2A). 뿌리에서는, 3일째(716nmole·g⁻¹ fresh weight)의 함량이 6일째(303nmole·g⁻¹ fresh weight)보다 57%나 감소했다. 또한, 6일째 50mM NaCl 처리(128nmole·g⁻¹ fresh weight)에서는 대조구(234nmole·g⁻¹ fresh weight)보다 45% 감소했다(Fig. 2B). 염 처리에 의한 잎의 총아스코르빈산이나 환원형 아스코르빈산은 감소했다. 뿌리에서는, 총아스코

르빈산, 환원형 및 산화형 아스코르빈산 함량은 대조구보다 증가했다(Fig. 2C, 2D).

염 처리에 의한 항산화 효소의 활성을 측정하였다. CAT 활성은 염 처리 후 3일째, 잎에서는 대조구에 비해 50mM와 100mM NaCl 처리구에서 각각 43%, 20% 증가했다. 6일째에는 각각 56%, 27% 증가했다(Fig. 3A). 뿌리에서는 50mM와 100mM NaCl 처리구에서 3일째 각각 13%, 29% 증가했다. 6일째에는 100mM NaCl 처리구에서 112% 증가했다

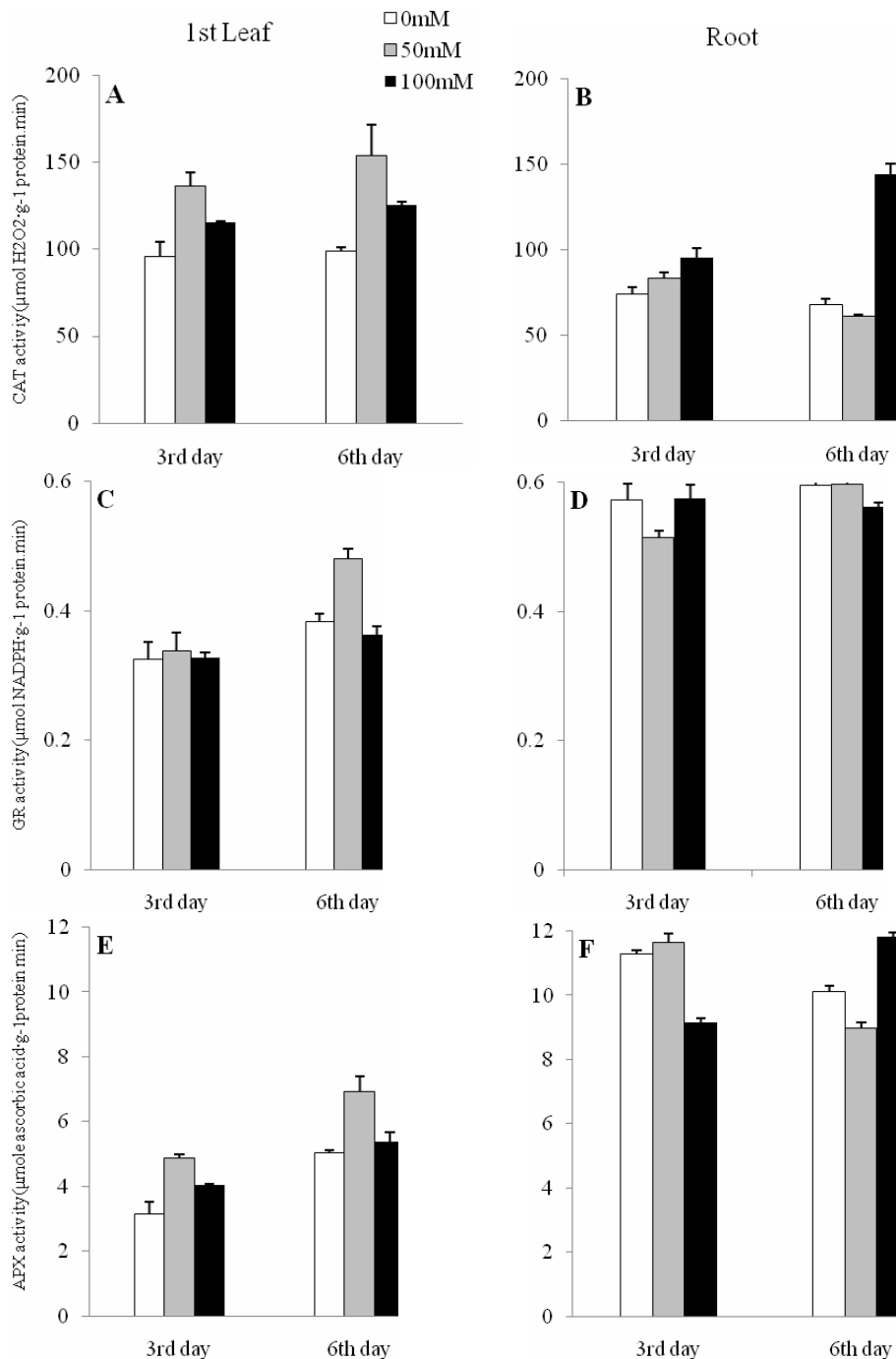


Fig. 3. Effects of different concentrations of NaCl on activities of antioxidant enzymes in the first leaf and root of Chinese cabbage. A, B; catalase, C, D; glutathione reductase, and E, F; ascorbate peroxidase, respectively. Values are means \pm SD ($n=4$).

Table 4. Effects of salt stress on ion levels in shoot and root of Chinese cabbage treated with different concentrations of NaCl for 6 days.

Parts	Treatment date	NaCl (mM)	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺ /K ⁺	Na ⁺ /Ca ²⁺	Na ⁺ /Mg ²⁺
Aerial part	3rd Day	0	3.0 ± 0.1	3.2 ± 0.0	14.6 ± 0.1	2.9 ± 0.0	0.94	0.21	1.03
		50	30.8 ± 2.1	2.3 ± 0.0	11.0 ± 0.5	2.3 ± 0.2	13.39	2.80	13.39
		100	34.8 ± 0.1	2.0 ± 0.0	8.9 ± 0.1	1.8 ± 0.0	17.40	3.91	19.33
	6th Day	0	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.0	11.8 ± 0.1	2.4 ± 0.0	0.96	0.21	1.04
		50	45.5 ± 0.4	2.0 ± 0.0	10.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	22.75	4.21	25.28
		100	46.9 ± 0.5	1.5 ± 0.0	6.7 ± 0.1	1.3 ± 0.0	31.27	7.00	36.08
Root	3rd Day	0	1.8 ± 0.2	2.1 ± 0.1	6.3 ± 0.3	1.8 ± 0.1	0.86	0.29	1.00
		50	17.5 ± 0.4	1.7 ± 0.1	4.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	10.29	4.07	12.50
		100	16.1 ± 2.7	1.7 ± 0.2	4.9 ± 0.4	1.1 ± 0.2	9.47	3.29	14.64
	6th Day	0	2.4 ± 0.3	1.6 ± 0.0	5.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.50	0.45	1.60
		50	16.4 ± 0.7	1.4 ± 0.0	4.1 ± 0.1	1.3 ± 0.0	11.71	4.00	12.62
		100	16.6 ± 2.4	1.4 ± 0.2	4.4 ± 0.7	1.1 ± 0.2	11.86	3.77	15.09

Na⁺, K⁺, Ca²⁺, and Mg²⁺ content are expressed as mg·g⁻¹ dry weight. Values are means ± SD (n=4).

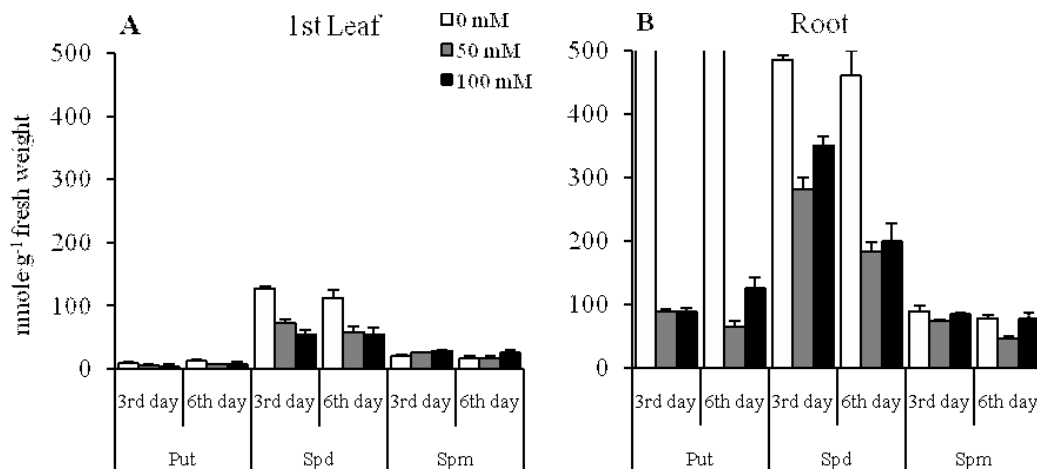


Fig. 4. Concentration of free putresine, spermidine and spermine in the first leaf and root of the Chinese cabbage seedlings. Values are means ± SD (n=4).

(Fig. 3B). GR 활성은 앞에서 6일째 대조구에 비해 50mM NaCl 처리구에서 27% 증가했다(Fig. 3C). 뿌리에서는 변화를 볼 수 없었다(Fig. 3D). APX 활성은, 염 처리 후 3일째 앞에서는 대조구에 비해, 50mM와 100mM NaCl 처리구에서 각각 55%, 29% 증가하였으며, 6일째에는 각각 37%, 7% 증가했다(Fig. 3E). 뿌리의 경우, 100mM NaCl 처리구에서 3일째 18% 감소했지만, 6일째에는 18% 증가했다(Fig. 3F).

염 처리가 식물내의 Na⁺, K⁺, Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 3일째 100mM NaCl 처리시 K⁺, Ca²⁺ 및 Mg²⁺의 농도는 대조구보다 40% 정도 감소하였다. 뿌리에서는 50mM NaCl 처리시 19-38% 감소하였다(Table 4). 100mM NaCl 처리한 배추 경부(Shoot)에서의 Na⁺ 축적 때문에, Na⁺/K⁺비와 Na⁺/Ca²⁺비는 각각 0.96에서 31.37까지, 0.21에서 6.98까지 상승했다. Na⁺/Mg²⁺비는 1.03에서 36.72

까지 상승했다.

폴리아민은 diamine putresine(Put), triamine spermidine (Spd)과 tetramine spermine(Spm)을 측정하였다. 앞에서는 Spd의 함량이 가장 높았으며, Put이 가장 적었다. 뿌리에서는 대조구에서 Put과 Spd 함량이 매우 높았으며, 염 처리구에서는 Spd의 함량이 Put이나 Spm 함량보다 높게 나타났다. 염 처리에 의해 앞에서는 Put과 Spd 함량은 감소했지만, Spm 함량은 증가했다. 뿌리에서는 Put, Spd 및 Spm 모두 대조구에서 가장 높았다(Fig. 4).

고 찰

염 스트레스는 식물의 명확한 성장 저해를 가져오며(Takemura 등, 2000), 식물의 잎, 줄기 및 뿌리의 생체중 및 건물중을

상당히 감소시킨다(Chartzoulakis와 Klapaki, 2000). *Salicornia rubra*에서 식물의 생체중 및 건물중은 염처리 농도의 증가와 함께 증가하였으며, 200mM NaCl 처리시 최적 생장을 보였으나, 그 이상의 농도에서는 생장이 감소하였다(Khan, 2001). Kurban 등(1999)은 *Alhagi pseudoalhagi*(콩과식물)에 저농도로(50mM NaCl) 처리하면 전체 무게는 증가하지만 고농도로(100mM 과 200mM NaCl) 처리하면 감소한다고 보고하였다. 본 실험에서 배추 수경재배시 50mM NaCl 처리는 식물 생장을 촉진하였으며, 그 이상의 염 농도 처리시에는 식물 생장을 억제하는 것으로 나타났다.

일반적으로, 잎의 클로로필과 총카로티노이드 농도는 염 스트레스에 의해 감소한다. 식물체의 가장 오래된 잎은 장기간 염 스트레스를 받게 되면 유향병이 발생하고 낙하를 시작한다(Agastian 등, 2000). 그렇지만, Wang과 Nil(2000)의 보고에 의하면, *Amaranthus*은 염 조건하에서 클로로필 함유량이 증가한다고 보고했다. 토마토의 잎에서는, 염 스트레스로 총클로로필의 농도(Chl a+b), 클로로필 a 및 β -카로틴이 감소하였다(Khavarinejad와 Mostofi, 1998). 염은 *Bruguiera parviflora*의 잎에서 클로로필 a, 클로로필 b 및 β -카로티노이드 함량의 상당한 감소를 일으키기도 하였다(Parida 등, 2002). 배추의 클로로필 a, 클로로필 b, 총클로로필 및 카로티노이드 함량은 염 처리에 의해 감소했지만, 클로로필 a/b는 증가했다(Table 3; Khavarinejad와 Mostofi, 1998; Parida 등, 2002).

스트레스 조건은 효소 및 비효소의 반응에 의해 식물세포의 다른 구획에서 H_2O_2 의 생산을 높인다(Asada, 1999; Foyer 등, 1997). 본 연구에서는, 배추의 잎에서 H_2O_2 의 증가는 완두콩(Hernandez 등, 2001), 토마토(Mittova 등, 2002) 및 보리(Kim 등, 2006)에서 관찰된 H_2O_2 의 증가와 유사하게 수경액에 50mM과 100mM NaCl 처리한 3일째에 각각 27%, 45% 증가하였다(Fig. 1). 게다가, H_2O_2 는 APX 활성의 증가를 일으키는 것이 확인되었다(Morita 등, 1999). 따라서, 염 조건하의 H_2O_2 의 증가는 스트레스에 대한 적응 반응의 신호일지도 모른다(Foyer 등, 1997; Van Breusegem 등, 2001).

산화 스트레스에 대한 방어에 있어서 글루타치온은 ascorbate-glutathione pathway 및 단백질 thiol의 산화 환원 상태에 관여하고 있으며(Alscher 등, 1997), 산화 환원 상태의 유지에 의해 염 스트레스에 대한 보호 역할을 한다(Shalata 등, 2001). Gossett 등(1994)은 목화의 염 스트레스에서 SOD 및 GR의 활성은 증가하지만, CAT와 APX의 활성은 감소한다고 보고하였다. 벼의 잎에서는, 염 스트레스가 CAT 활성을 감소시키지만(Shim 등, 1999), H_2O_2 의 함량, SOD, APX 및 GPX의 활성은 우선적으로 증가시킨다(Lee 등, 2001). Lechno

등(1997)은 염 처리가 항산화 효소(CAT와 GR)의 활성과 항산화 물질(아스코르빈산과 환원형 글루타치온)의 함량을 증가시킨다고 보고하였다. 또한 Kim 등(2006)은 보리에 염 스트레스 처리시 APX, CAT 및 GR의 활성이 증가한다고 보고하였으며, 이는 본 연구의 배추와 비슷한 경향을 보였다. 이상의 보고와 같이 각 식물의 염 스트레스에 대한 항산화 물질이나 항산화 효소의 활성은 다른 경향을 볼 수 있었다.

K^+ 는 염 스트레스하에서, 세포의 증식(Schachtman 등, 1997), 막의 완전성 유지(Rengel, 1992), 삼투스트레스 조절(Mansfield 등, 1990) 및 K^+/Na^+ 선택성에의 영향(Cramer 등, 1987) 등 중요한 역할을 하고 있다. 고농도의 염 흡수는 다른 영양 이온, 특히 K^+ 의 흡수와 경합하여 K^+ 결핍을 유도한다(Fox와 Guerinot, 1998). 염 처리는 많은 식물에 Na^+ , Cl^- 의 증가를 일으키고, Ca^{2+} , K^+ 및 Mg^{2+} 레벨을 감소시킨다(Khan 등, 2000; Khan, 2001). 염 처리 3일째 앞에서는 100mM NaCl 처리에서 K^+ , Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 의 농도는 대조구보다 약 40% 감소했다. 뿌리에서는 50mM NaCl 처리에서 19-38% 감소했다(Table 4). 이러한 결과는 Liu와 van Staden (2000) 및 Singh 등(2000)의 보고와 일치하였다. 배양액에 NaCl를 첨가하여 유발시킨 염 스트레스는, K^+ 와 Ca^{2+} 농도의 감소를 가져오며, 식물 생장에 부적절한 Na^+/K^+ 와 Na^+/Ca^{2+} 비를 가져왔으며 Na^+ 농도를 증가시켰다(Table 4; Lacerda 등, 2003). 또한, Na^+ 독성의 지표로 보는 Na^+/Mg^{2+} 비도 증가시켰다(Jeschke 등, 1987).

폴리아민은 여러가지 생리적인 과정에 관련되는 생물학적인 활성 화합물로서 스트레스 조건(염, 삼투압, 한발 및 산화스트레스 등)에서의 대사 변화가 식물 응답의 일부로 시사되고 있다(Flores, 1991). Spm 축적은 벼(Yamamoto 등, 2004)와 토마토(Santa-Cruz 등, 1997)의 장기간 스트레스 응답에 있어서의 일반적인 경향인 것처럼 보여진다(Fig. 4). *Lotus glaber* 유리 폴리아민 함량 실험에서, 염은 유리 Spd의 감소나 유리 Spm의 증가를 유도한다고 보고하였다(Fig. 4; Sanchez 등, 2005). 또, 다른 식물종에서도 염에 의한 영향으로 Spm 축적이 보고되었다(Maiale 등, 2004; Yamamoto 등, 2004).

배추의 염 스트레스에 의한 생리학·생화학적 반응을 이해하기 위하여 실시한 본 실험에서는, 50mM NaCl 처리시 식물 생장을 촉진하였으며, 그 이상의 염 농도는 식물 생장을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 건물중도 50mM NaCl 처리시 2배 증가하였다. 배추의 잎에서는 염처리 3일째 산화형·환원형 글루타치온 및 총글루타치온 함량이 증가하는 것이 확인되었다. 따라서, 배추에 50mM NaCl 처리시 생장 촉진 및 글루타치온 함량이 증가하기 때문에, 식물의 생육

증가에 의한 재배 기간의 단축 및 영양적인 가치를 높일 수 있으리라 생각한다.

초 록

염 스트레스(0, 50, 100mM NaCl)에 의한 식물 반응을 이해하기 위하여, 본 실험은 수경법으로 2엽기까지 기른 배추를 이용하였다. 신선중과 건물중, 엽록소, 항산화 물질, 폴리아민 함량, 항산화 효소 활성, 그리고 이온 레벨을 조사하였다. 배추의 생체중 및 건물중은 염의 증가에 따라 증가하였으며, 50mM NaCl 처리시 최적의 성장을 보였다. Chl a, total Chl, carotenoid 함량과 Chl a/b 비는 100mM NaCl 처리후 6일째 증가하였으나, Chl b 함량은 감소하였다. 글루타치온 함량은 염 처리후 6일째 뿌리에서 증가하였으며, dehydroascorbate는 6일째 잎과 뿌리에서 현저하게 증가하였다. 염처리후 6일째 잎에서, ascorbate peroxidase 활성은 증가하였으나, catalase와 glutathione reductase 활성은 감소하였다. 지상부에 100mM NaCl 처리후 3일째, Na⁺ 함량은 12.5배 증가하였으나, Ca²⁺, K⁺과 Mg²⁺ 함량은 43-57% 감소하였다. 또한 염 스트레스에 의한 스페르미딘 감소 현상과 스페르민 증가현상을 나타내었다. 50mM NaCl 처리에 의해 배추의 성장 촉진, 글루타치온 및 비타민 C 함량 증가 현상이 나타났으며, 또한 식물의 성장 촉진에 의한 재배 기간의 단축효과도 기대된다.

추가 주요어 : 항산화효소, 비타민 C, 산화형 비타민 C, 글루타치온, 폴리아민

인용문헌

- Agastian, P., S.J. Kingsley, and M. Vivekanandan. 2000. Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica* 38:287-290.
- Alexieva, V., I. Sergiev, S. Mapelli, and E. Karanov. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environ.* 24: 1337-1344.
- Alscher, R.G., J.L. Donahue, and C.L. Cramer. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol. Plant* 100:224-233.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:601-639.
- Bowler, C., M. van Montagu, and D. Inzé. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 43:83-116.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Chappele, E.W., M.S. Kim, and J.E. McMurtrey. 1992. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): an algorithm for remote estimation of the concentration of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids in soybean leaves. *Remote Sens. Environ.* 39:239-247.
- Chartzoulakis, K. and G. Klapaki. 2000. Response of two green house pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Sci. Hort.* 86:247-260.
- Cramer, G.R., J. Lynch, A. Lauchli, and V.S. Polito. 1987. Influx of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ into roots of salt-stressed cotton seedlings. effects of supplemental Ca²⁺. *Plant Physiol.* 83:510-516.
- Flores, H.E. 1991. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress, p. 213-228. In: R.M. Slocum and H.E. Flores (eds.). *Biochemistry and physiology of polyamines plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Fox, T.C. and M.L. Guerinot. 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:669-696.
- Foyer, C.H., H. Lopez-Delgado, J.F. Dat, and I.M. Scott. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant.* 100:241-254.
- 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.
- Gronwald, J.W., E.P. Fuerst, C.V. Eberlein, and M.A. Egli. 1987. Effect of herbicide antidotes on glutathione concentration and glutathione S-transferase activity of sorghum shoots. *Pestic. Biochem. Physiol.* 29:66-76.
- Heath, R. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198.
- Hernandez, J.A., M.A. Ferrer., A. Jimenez, A.R. Barcelo, and F. Sevilla. 2001. Antioxidant systems and O₂⁻/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves: its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* 127:817-831.
- Jeschke, W.D., J.S. Pate, and C.A. Atkins. 1987. Partitioning of K⁺, Na⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺ through xylem and phloem component organs and nodulated white lupin under mild salinity. *J. Plant Physiol.* 128:77-93.
- Khan, M.A. 2001. Experimental assessment of salinity tolerance of *Ceriops tagal* seedlings and saplings from the Indus delta, Pakistan. *Aquat. Bot.* 70:259-268.
- Khan, M.A., I.A. Ungar, and A.M. Showalter. 2000. Effects of sodium chloride treatments on growth and ion accumulation of the halophyte *Haloxylon recurvum*. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 31:2763-2774.
- Khavarinejad, R.A. and Y. Mostofi. 1998. Effects of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides, and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars. *Photosynthetica* 35: 151-154.
- Kim, D.W., H.Y. Heo, S.J. Suh, Y.H. Lee, and S.J. Kim. 2006. Differentiation of barley response to drought and salt stress in antioxidant enzyme activity and free amino acid content. *Korean J. Crop Sci.* 51:133-138.
- Kim, Y.H., I.S. Shim, K. Kobayashi, and K. Usui. 1999. Relationship between Na content or K/Na ratio in shoots and

- salt tolerance in several gramineous plants. *J. Weed Sci. Tech.* 44:293-299.
- Kopriva, S. and H. Rennenberg. 2004. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *J. Exp. Biol.* 404:1831-1842.
- Kurban, H., H. Saneoka, K. Nehira, R. Adilla, G.S. Premachandra, and K. Fujita. 1999. Effect of salinity on growth, photosynthesis and mineral composition in leguminous plant *Alhagi pseudoalhagi* (Bieb.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 45:851-862.
- Lacerda, C.F., J. Cambraia, M.A. Cano, H.A. Ruiz, and J.T. Prisco. 2003. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 49:107-120.
- Lechno, S., E. Zamski, and E. Tel-Or. 1997. Salt stress-induced responses in cucumber plants. *J. Plant Physiol.* 150:206-211.
- Lee, D.H., Y.S. Kim, and C.B. Lee. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 158:737-745.
- Liu, T. and J. van Staden. 2000. Selection and characterization of sodium chloride-resistant callus of *Glycine max* (L.) Merr. cv. Acme. *Plant Growth Regulat.* 31:195-207.
- Maiale, S., D.H. Sanchez, A. Guirado, A. Vidal, and O.A. Ruiz. 2004. Spermine accumulation under salt stress. *J. Plant Physiol.* 161:35-42.
- Mansfield, T.A., A.M. Hetherington, and C.J. Atkinson. 1990. Some aspects of stomatal physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:55-75.
- Mittova, V., M. Guy, M. Tal, and M. Volokita. 2002. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free Radic. Res.* 36:195-202.
- Morita, S., H. Kaminaka, T. Masumura, and K. Tanaka. 1999. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signaling. *Plant Cell Physiol.* 40:417-422.
- Munns, R. and A. Termaat. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13:143-160.
- Parida, A.K., A.B. Das, and P. Das. 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *J. Plant Biol.* 45:28-36.
- Parida, A.K. and A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60:324-349.
- Rengel, Z. 1992. The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environ.* 15:625-632.
- Sanchez, D.H., J.C. Cuevas, M.A. Chiesa, and O.A. Ruiz. 2005. Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Sci.* 168:541-546.
- Santa-Cruz, A., M. Acosta, F. Pérez-Alfocea, and M.C. Bolarin. 1997. Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiol. Plant* 101:341-346.
- Schachtman, D.P., R. Kumar, J.I. Schroeder, and E.L. Marsh. 1997. Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter LCTI in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:11079-11084.
- Shalata, A., V. Mittova, M. Volokita, M. Guy, and M. Tal. 2001. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. *Physiol. Plant.* 112:487-494.
- Shim, I.S., Y. Naruse, Y.H. Kim, K. Kobayashi, and K. Usui. 1999. Scavenging activity of NaCl-induced activated oxygen in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salt tolerance. *Jpn J. Tropical Agriculture* 43:32-41.
- Singh, S.K., H.C. Sharma, A.M. Goswami, S.P. Datta, and S.P. Singh. 2000. In vitro growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. *Biol. Plant.* 43:283-286.
- Takemura, T., N. Hanagata, K. Sugihara, S. Baba, I. Karube, and Z. Dubinsky. 2000. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*. *Aquat. Bot.* 68:15-28.
- Van Breusegem, F., E. Vranova, J.F. Dat, and D. Inze. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 161:405-414.
- Wang, S.Y., H.J. Jiao, and M. Faust. 1991. Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during thidiazuron-induced bud break of apple. *Physiol. Plant* 82:231-236.
- Wang, Y. and N. Nil. 2000. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 75:623-627.
- Yamamoto, A., I.S. Shim, S. Fujihara, T. Yoneyama, and K. Usui. 2004. Effect of difference in nitrogen media on salt-stress response and contents of nitrogen compounds in rice seedlings. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50:85-93.