

Effect of Benzyladenine on the IAA-Induced Ethylene Production in the Primary Roots of Maize

Seong Hee Song[§], Ji Hye Park and Soon Young Kim*

Department of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Received February 22, 2010 / Accepted April 7, 2010

This study was conducted to examine the effect of cytokinin (N^6 -benzyladenine; BA) and/or an IAA on ethylene production of maize (*Zea mays*) primary roots. When the two hormones were applied exogenously, both hormones synergistically increased ethylene production, which was greater than the sum of the level of each hormone's effect. For example, the ethylene production was stimulated between about 87% and 170% of the control by 10^{-4} M BA with 10^{-4} M IAA for 8 hours respectively, whereas the ethylene production was increased by about 480% of the control when the two hormones were treated simultaneously. Such a synergistic effect was also found in changes in the activity and gene expression level of ACC synthase. However, in the case of ACC oxidase did not show any observable effects. Based on our results, it is possible to conclude that BA and IAA stimulated the ethylene production synergistically by affecting the ACC synthase in maize roots.

Key words : Cytokinin, IAA, ethylene production, maize roots

서 론

Ethylene은 가장 간단한 구조를 가진 식물호르몬이며, 기체 상태로 존재하고, 식물의 종자 발아부터 기관의 노화까지 다양한 식물 발달 과정을 조절한다[1]. 다른 식물호르몬이나 스트레스 등은 ethylene 생합성 효소에 작용하여 ethylene 생성을 조절한다[14]. 특히 auxin이 ethylene 생성을 촉진하며, auxin의 많은 작용이 ethylene의 작용에 기인한다고 알려져 있다[4].

Auxin은 줄기 성장을 촉진하는 반면 뿌리 생장은 억제하고 농도 기율기에 의한 차등생장으로 중력이나 빛에 대한 반응을 조절한다[1]. 이러한 auxin의 생리적인 작용은 ethylene 생성과도 밀접한 관계가 있다[11]. 즉, auxin은 ethylene 합성 효소인 ACC synthase 유전자의 발현을 증가시킴으로써 ethylene 생성을 촉진하며[1,19], 뿌리 생장을 억제하는 것은 auxin에 의해 유도된 ethylene 생합성이 증가한 결과로 알려져 있다[11].

Cytokinin은 세포분열, 잎의 노화, 줄기 형성 그리고 광형태형성과 같은 식물의 성장과 발달의 많은 부분에 영향을 주는 퓨린 유도체이다[5]. Cytokinin을 처리하거나 형질전환식물의 내생 cytokinin 수준을 변화시키는 연구를 통해 cytokinin도 ethylene 생성을 조절한다고 알려져 있다[5,8].

식물의 발생은 다양한 호르몬들 사이의 상호작용으로 조절

된다. Cytokinin은 auxin과 함께 식물 형태 형성에 필수적인 역할을 하고, 뿌리와 줄기의 형성, 그리고 그들의 상대적인 성장에 영향을 주고, cytokinin과 auxin은 세포 내에서 세포 분열을 촉진하기 위해 상호의존적으로 작용한다[12,16].

Kim 등[10]의 연구에 의하면 녹두의 하배축에서 cytokinin의 일종인 N^6 -benzyladenine (BA)과 IAA는 ethylene에 의해 조절되는 ACC synthase와 ACC oxidase gene의 발현을 억제하였다. 이 결과는 BA와 IAA 사이의 상호작용이 ethylene의 생성을 조절 할 가능성을 제시하고 있다. 이와 같이 하배축에서 cytokinin과 auxin의 상호작용이 연구되고 있으나, 뿌리에서는 cytokinin이 ethylene 생성에 관여를 하는지는 잘 알려져 있지 않으며, 또한 cytokinin과 auxin의 상호작용이 ethylene의 생성에 어떻게 작용하는지 등은 규명되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 cytokinin의 일종인 N^6 -benzyladenine (BA)과 IAA가 ethylene 생성에 어떻게 작용하는지 알아보고자 하였다. 이를 위하여 auxin이 존재할 때 BA가 ethylene 생합성을 조절하는 양상과 이러한 조절 단계를 이해하기 위하여 ACC synthase와 ACC oxidase의 활성 수준을 조사하였다.

재료 및 방법

식물 재료

옥수수 종자(*Zea mays* L., Golden cross bantum 70)를 흐르는 물에 충분히 세척하고 27°C 암 상태에서 15시간 동안 물에 침지 후, 플라스틱 쟁반에 젖은 종이 타월을 깔고 종자의 배(embryo) 부분이 쟁반 바닥에 닿도록 일렬로 배열한 다음 그 위에 종이 타월을 덮고 적셨다. 쟁반을 포개어 물이 들어 있는 통 안에 수직 방향으로 세우고 27°C 암실에서 42시간 동안

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5647, Fax : +82-54-823-1627

E-mail : kimsy@andong.ac.kr

§present address:

Department of Anatomy, School of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 301-747, Korea

발아시켰다. 옥수수 뿌리는 15-20 mm 정도인 것을 선택하여 실험 재료로 사용하였다.

실험 방법

에틸렌 생성량 측정

완충용액(0.5 ml potassium - phosphate buffer, 50 mM, pH 6.8, 50 µg/ml chloramphenicol)에 test chemical을 처리한 후, 옥수수 일차뿌리 조직절편(1 cm; root cap 포함) 40개를 넣어 vial을 실리콘 마개로 막고 27°C, 암소에서 진탕 배양하였다. 2시간 간격으로 기체 1 ml씩을 채취하여 gas chromatography (Hewlett Packard, 5890 series II, USA)를 이용하여 측정하였다.

In vitro ACC synthase (ACS) activity 측정

In vitro에서 ACC synthase activity가 AdoMet에서 ACC로 전환되는 단계에 관여하는 것을 근거로 하여 Woeste 등의 방법[17]을 일부 수정하여 수행하였다. 뿌리 조직 절편 80개를 extraction buffer (250 mM, pH 8.0, potassium phosphate buffer, 10 µM pyridoxal phosphate, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF, 5 mM DTT)로 분쇄하고 원심분리하여 상등액 1 ml에 5 mM AdoMet 0.1 ml를 첨가한 다음, 1시간 동안 진탕 배양 (dark, 22°C, 170 rpm)하였다. 배양 후 20 mM HgCl₂ 용액과 냉각된 NaOH/NaOCl (포화된 NaOH:5% NaOCl=1:1 [v/v]) 용액으로 ethylene 생성을 유도한 뒤 GC를 이용하여 ACC synthase 활성을 측정하였다.

In vivo ACC oxidase (ACO) activity 측정

ACC가 ethylene으로 전환하는 단계에 ACC oxidase activity가 작용함을 근거로 하여 Wang과 Woodson의 방법 [15]을 일부 수정하여 사용하였다. 뿌리조직 절편 40개와 0.1 mM AVG (L-(2-aminoethoxyvinyl)-glycine)를 첨가하여 조직 내의 ACC synthase의 활성을 억제시켰다. 배양이 끝난 후 뿌리조직 절편을 수거하여 증류수로 세척한 후 1 mM ACC를 처리한 완충용액(0.5 ml potassium phosphate buffer, 50 mM, pH 6.8)에 1시간 동안 배양하였다. 조직 절편을 다시 증류수로 세척하여 potassium phosphate buffer에 1시간 동안 배양한 후 기체 1 ml를 채취하여 GC를 이용하여 측정하였다.

Total RNA 추출과 RT-PCR

뿌리 절편을 RNA extraction buffer (0.1 M, pH 9.0, Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 1% [w/v] SDS, 0.1% [v/v] 2-mercaptoethanol)를 첨가하여 갈아준 다음, 동일부피의 PCI를 첨가하여 잘 섞은 후 50°C에서 10분 동안 반응시켰다. 30분간 원심분리(4°C, 13,000 rpm)하여 상등액을 취하고 여기에

동일부피의 CI를 첨가한 후 다시 30분간 원심분리(4°C, 13,000 rpm)하였다. 2.5 M LiCl를 첨가하여 -20°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 15분간 원심분리 하여 침전물을 수거하고 70% 에탄올로 세척 후 다시 15분간 원심분리 하였다. 침전물을 잘 건조시킨 후 0.1% DEPC (Diethyl pyrocarbonate)-treated water 30 µl에 녹여 total RNA를 획득 하였다. 추출한 total RNA는 Microplate Reader infinite® 200 (TECAN, USA)를 이용하여 정량하였다.

추출한 total RNA를 주형으로 cDNA를 얻기 위해 역전사 과정은 AccuPower™ RT PreMix (Bioneer, USA and Korea)를 사용하였고, 합성된 first-strand cDNA를 사용하여 PCR 과정을 수행하였다. PCR에 사용된 primer set는 Table 1과 같다. PCR 증폭시키기 위하여 EmeraldAmp™ PCR Master MiX (Premix, TaKaRa, Japan)를 사용하였으며 모든 조건과 방법은 manual에 따라 실험을 하였다. PCR product는 1.8% agarose gel 상에서 분리하고 ethidium bromide 용액으로 염색한 후 gel image analysis system (CoreBio, i-MAX-D500, Korea)을 이용하여 촬영하였다.

통계 분석

모든 실험은 최소한 5회 이상 반복하였고, 각 실험 처리구당 40개의 뿌리 절편을 사용하였다. p<0.05 유의성을 검사하기 위하여 mean value는 Student t test에 따라 계산하였다.

결과 및 고찰

Ethylene 생합성 조절에 미치는 BA와 IAA의 작용

Cytokinin과 auxin은 세포 내에서 세포 분열을 촉진하기 위해 상호의존적으로 작용하며, 하배축이나 줄기에서 각각 다른 기작으로 ethylene 생합성을 조절한다고 알려져 있다[1,16]. 따라서 본 연구에서는 옥수수 뿌리에서 cytokinin과 auxin에 의한 ethylene 생합성의 조절 관계를 알아보기 위해 BA (10⁶ M and 10⁴ M)와 IAA (10⁷ M and 10⁴ M)를 각각 혹은 함께 처리하여 ethylene의 생합성량을 측정하였다.

8시간 배양 후, 10⁶ M BA는 대조구와 비교하여 ethylene 생성을 26% 촉진시켰으며, 10⁴ M BA는 87%를 촉진시켰다. 한편 ethylene 생성을 촉진한다고 알려진 IAA를 처리한 경우 10⁷ M IAA는 35%, 10⁴ M IAA는 173% 촉진시켰다(Fig. 1). 10⁷ M IAA와 10⁶ M BA를 함께 처리하면 ethylene 생성은 약 83% 정도 촉진되었으며, 10⁷ M IAA와 10⁴ M BA를 함께 처리하면 ethylene 생성은 153%가 촉진되었다. 이와 같이 함

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
ZmACS6 (AY359587)	AGTGCCTGCTAGCTTACTCATT	TGCGGGAATCACGCA
ZmActin (DQ492681)	CTACGACTGCTGAGCGAGAAATT	GCCACCACTGAGGACAACATT

계 두 호르몬을 함께 처리하면 각각 단독으로 처리하여 생성되는 ethylene 생성량을 합한 경우보다 더 증가하였다. 이러한 상승효과(synergistic effect)는 IAA의 농도가 높으면 더 급격하게 나타났다. Fig. 1에서 10^{-4} M IAA와 10^{-6} M BA 혹은 10^{-4} M BA를 함께 처리하면 400% 이상의 ethylene 생성량이 증가하였다. 이 결과는 BA에 의한 ethylene 생성은 IAA와 함께 처리하면 상승적으로 증가한다는 것을 나타낸다. 그리고 BA의 농도가 증가할수록 ethylene 생성량은 증가하였다.

ACC synthase (ACS)와 ACC oxidase (ACO) 활성에 미치는 BA와 IAA의 효과

식물체에서 ethylene은 methionine으로부터 S-adenosyl-L-methionine (AdoMet)으로 전환되고, 다시 1-aminocyclopropane-1-carboxyl acid (ACC)를 거쳐 생합성 된다[2]. AdoMet으로부터 ACC가 합성되는 단계는 pyridoxal 효소인 ACC synthase (ACS)에 의해 조절되고[9], ACC synthase는 ethylene의 생성을 조절하는 주요 효소로서 세포질에 존재하며 pyridoxal phosphate-mediated 효소 작용의 억제제로 알려진 AVG (*L*-α-(2-aminoethoxyvinyl)-glycine)에 의해 강하게 억제 된다[1].

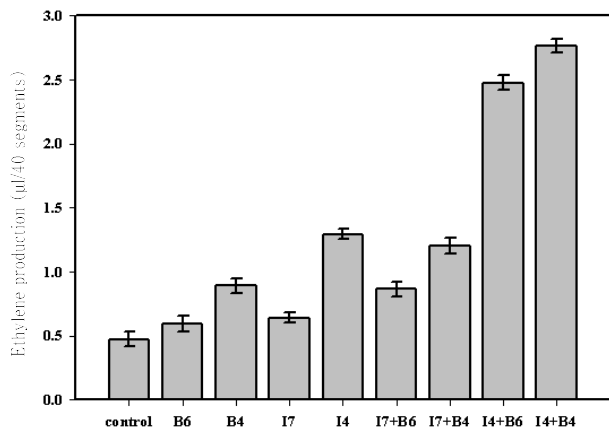


Fig. 1. Effect of BA and IAA on the ethylene production in the primary roots of maize. After incubation for 8 hr, one ml of air was withdrawn and subjected to measurement of ethylene content using a gas chromatograph. Bars in the graph denote S.E. of five independent experiments. B6: 10^{-6} M BA; B4: 10^{-4} M BA; I7: 10^{-7} M IAA; I4: 10^{-4} M IAA.

한편, auxin은 ACC synthase 유전자의 발현을 증가시킴으로써 ethylene 합성을 자극한다고 알려졌다[19]. ACC가 ethylene으로 전환되는 단계는 ACC oxidase (ACO)에 의해 조절 된다[18].

BA와 IAA를 함께 처리하였을 경우, 두 호르몬의 농도가 각각 증가할수록 ethylene의 생성량은 상승적으로 증가하였다(Fig. 1). 이러한 결과를 바탕으로 BA와 IAA가 ethylene 생합성 과정의 어느 단계를 조절하는지 알아보기 위해, ACS와 ACO 활성을 조사하였다.

Fig. 1에서와 같이, 두 가지 농도의 BA (10^{-6} M and 10^{-4} M)와 IAA (10^{-7} M and 10^{-4} M)를 각각 혹은 함께 처리한 후 *in vitro*에서 ACS 활성 수준을 측정하였다. 8시간 동안 배양한 후 ACS의 활성 수준을 측정하여 대조구와 비교한 결과 (Fig. 2), 10^{-6} M BA 처리 시에는 10% 정도의 활성 증가를 보였으나, 10^{-7} M IAA와 10^{-6} M BA를 함께 처리하였을 경우 약 38%의 활성 증가를 나타내었다. 그러나 옥신의 농도를 높여 10^{-4} M IAA를 10^{-6} M BA와 함께 처리하였을 경우 약 140% 정도의 활성 촉진을 나타내었다. 10^{-4} M BA를 처리하면 ACS의 활성은 18% 증가하며, 10^{-7} M IAA를 함께 처리하면 47% 증가하며 높은 농도인 10^{-4} M IAA를 함께 처리하면 ACS의 활성이 270% 정도

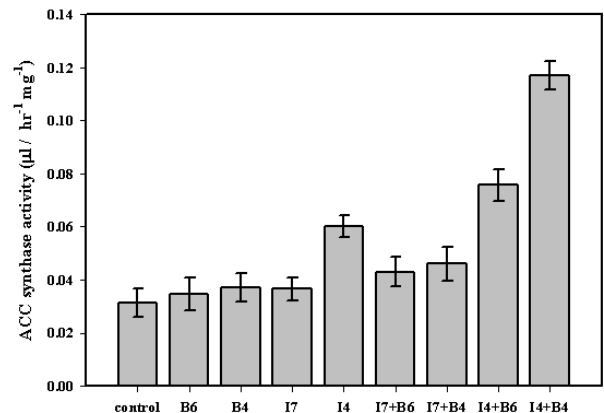


Fig. 2. Effect of BA and IAA on the *in vitro* ACC synthase activity in the primary roots of maize. After incubation for 8 hr, the ACS activity was measured as described in the "Material and Methods". Bars in the graph denote S.E. of five independent experiments. B6: 10^{-6} M BA; B4: 10^{-4} M BA; I7: 10^{-7} M IAA; I4: 10^{-4} M IAA.

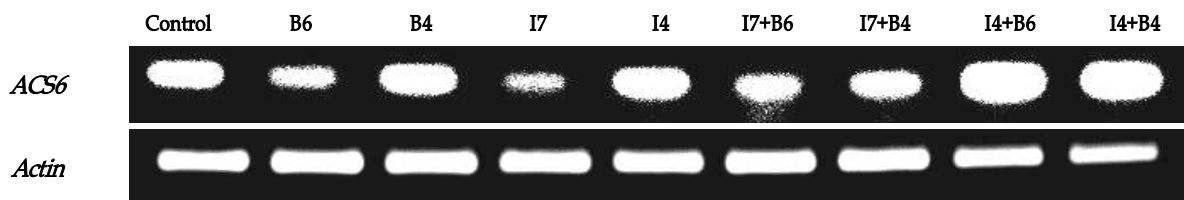


Fig. 3. Effect of BA and IAA on changes in gene expression levels of ACC synthase. After incubation for 8 hr, total RNAs were extracted from the root segments and were used for RT-PCR as described in the "Material and Methods". B6: 10^{-6} M BA; B4: 10^{-4} M BA; I7: 10^{-7} M IAA; I4: 10^{-4} M IAA.

급격하게 증가하였다. 그러므로 ACS의 활성은 IAA와 BA를 각각 처리하여 나타난 증가율을 합한 것 보다 함께 처리하여 나타난 증가율이 상승적으로 증가하였다.

이상의 결과에서 BA는 ethylene 생합성 경로에서 IAA와 마찬가지로 ACS의 활성을 촉진시켜 조직 내부의 ACC 양을 증가시키며 이로 인하여 ethylene 생성을 증가시킨다는 것을 제시한다. 또한, RT-PCR의 결과, BA와 IAA를 동시에 처리할 때 *ZmACS6*의 유전자 발현 수준이 증가하였다(Fig. 3). BA와 IAA를 처리할 때, Ethylene 생성의 상승효과, ACS 활성, ACS 유전자 발현이 모두 유사한 양상으로 증가하는 결과에 따라, IAA에 의한 BA의 상승작용이 ACS 활성 수준을 증가시키고, 증가된 ACS 활성으로 인하여 ethylene의 생합성이 크게 상승한다는 것을 제시하고 있다.

Ethylene 생합성 과정의 또 다른 효소인 ACC oxidase (ACO)의 활성을 측정하였다(Fig. 4). 8시간 배양 후 측정된 ACO 활성 수준을 대조구와 비교한 결과, 10^7 M, 10^4 M IAA와 10^6 M BA를 각각 함께 처리하였을 경우에는 별다른 효과가 나타나지 않았으며, 고농도의 10^4 M BA를 10^4 M IAA와 함께 처리하였을 경우 약 23% 정도의 활성 증가를 보였다. 이러한 결과로 보아 BA와 IAA는 ethylene 생합성 경로에서 ACO 활성에는 영향을 거의 미치지 않는 것을 확인하였다.

Aloni 등[3]은 아기장대(*Arabidopsis thaliana*)에 BA를 처리한 실험에서 BA가 뿌리 신장을 억제한다는 것을 확인하였으며, 또 다른 실험에서는 줄기와 뿌리의 형성 및 생장 저해, 잎의 복잡성 감소와 색소형성 증가, 자엽의 노화 감소, 정단우성 감소 등의 현상이 관찰되었다[7]. 한편 하배축의 신장도 억제하며, 이러한 억제 작용은 ethylene 생성의 조절과 관련이 있다고 보고되었다[1,6,13].

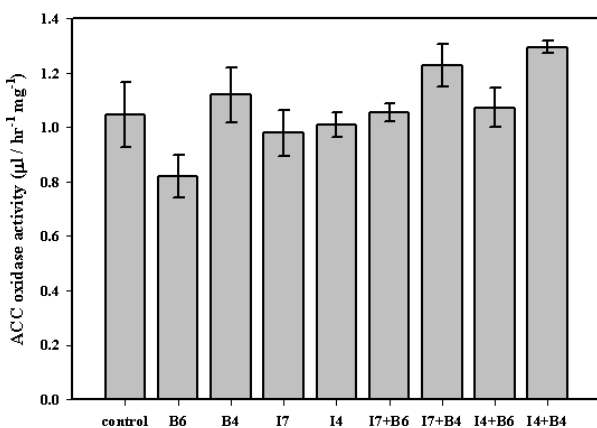


Fig. 4. Effect of BA and IAA on the *in vivo* ACC oxidase activity in the primary roots of maize. After incubation for 8 hr, the ACO activity was measured as described in the "Material and Methods". Bars in the graph denote S.E. of five independent experiments. B6: 10^6 M BA; B4: 10^4 M BA; I7: 10^7 M IAA; I4: 10^4 M IAA.

본 연구를 통하여 BA는 옥수수 일차뿌리에서 IAA와 함께 작용하여 또 다른 식물호르몬인 ethylene의 생성을 촉진한다는 것을 알게 되었으며 이러한 결과는 BA가 옥수수 뿌리의 신장도 조절할 가능성을 제시하며, 더 나아가 굴중성 반응에도 영향을 미칠 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-521-C00269).

References

1. Abeles, F. B., P. W. Morgan, and M. E. Saltveit. 1992. *Ethylene in Plant Biology*. pp56-248, 2nd eds, Academic Press, San Diego, California.
2. Adams, D. O. and S. F. Yang. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 170-174.
3. Aloni, R., M. Langhans, E. Aloni, and C. I. Ullrich. 2004. Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism. *Planta* **220**, 177-182.
4. Arteca, J. M. and R. N. Arteca. 2001. Brassinosteroid-induced exaggerated growth in hydroponically grown *Arabidopsis* plants. *Physiol. Plant* **112**, 104-112.
5. Binns, A. N. and M. F. Thomashow. 1988. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 575-606.
6. Cary, A., W. Liu, and S. Howell. 1995. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **107**, 1075-1082.
7. Coenen, C. M. Christian, H. Lüthen, and T. L. Lomax. 2003. Cytokinin inhibits a subset of diageotropica-dependent primary auxin responses in tomato. *Plant Physiol.* **131**, 1692-1704.
8. Davies, P. J. 1995. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. pp. 340-353, 2nd eds., Kluwer Academic Publisher. Norwell, Massachusetts.
9. Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 283-307.
10. Kim, J. H., W. T. Kim, and B. G. Kang. 2001. IAA and N^6 -benzyladenine inhibit ethylene-regulated expression of ACC oxidase and ACC synthase genes in mungbean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* **10**, 1056-1061.
11. Kim, S. Y. and T. J. Mulkey. 1997. Effect of ethylene antagonists on auxin-induced inhibition of intact primary root elongation in maize (*Zea mays* L.). *J. Plant Biol.* **40**, 256-260.
12. Moubayidin, L., R. D. Mambro, and S. Sabatini. 2009. Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Science* **14**, 557-562.

13. Su, W. and S. Howell. 1995. The effects of cytokinin and light in hypocotyl elongation in *Arabidopsis* seedlings are independent and additive. *Plant Physiol.* **108**, 1423-1430.
14. Stepanova, A. N. and J. M. Alonso. 2005. Ethylene signaling and response pathway: unique signaling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiol. Plant* **123**, 195-206.
15. Wang, H. and W. R. Woodson. 1989. Reversible inhibition of ethylene action and interruption of petal senescence in carnation flowers by norbornadiene. *Plant Physiol.* **89**, 434-438.
16. Werner, T. and T. Schmülling. 2009. Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 527-538.
17. Woeste, K. E., C. Ye, and J. J. Kieber. 1999. Two arabidopsis mutants that overproduce ethylene are affected in the post-transcriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Plant Physiol.* **119**, 521-529.
18. Yip, W. K., X. Z. Jiao, and S. F. Yang. 1988. Dependence of in vivo ethylene production rate on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content and oxygen concentration. *Plant Physiol.* **88**, 553.
19. Zarembinski, T. I. and A. Theologis. 1994. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1579-1597.

초록 : 옥수수 일차뿌리에서 benzyladenine이 IAA에 의해 유도된 에틸렌 생성에 미치는 영향

송성희[§] · 박지혜 · 김순영*
(안동대학교 생명과학과)

본 연구는 옥수수 뿌리에서 cytokinin (N⁶-benzyladenine; BA)과 IAA를 각각 혹은 같이 처리하여 ethylene 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 두 호르몬을 외부에서 동시에 처리하면 ethylene 생성은 각각 처리하였을 때 보다 함께 처리하면 상승적으로 증가하였다. 예를 들면, 10⁻⁴ M BA와 10⁻⁴ M IAA를 처리하면 ethylene 생성량은 각각 대조구의 87%와 170% 증가되지만 함께 처리하면 대조구의 480%가 증가된다. 이러한 상승적 효과는 에틸렌 생성에 관여하는 효소인 ACC synthase의 활성화와 유전자 발현 수준에서도 볼 수가 있었다. 그러나 에틸렌 생성에 관여하는 다른 효소인 ACC oxidase의 활성화에서는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 cytokinin인 BA와 IAA가 옥수수 뿌리에서 ACC synthase에 영향을 미쳐 ethylene 생성을 상승적으로 촉진시킨다는 사실을 제시한다.