

토양 수분 Stress에 따른 상추의 엽중 상대수분 함량과 아스코브산 관련 효소 활성도

강상재* · 박 만

경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부

Relationship Between Relative Water Content and Ascorbate Redox Enzymes Activity in Lettuce Leaves Subjected to Soil Water Stress

Sang-Jae Kang* and Man Park

School of Applied Life Sciences, Kyungpook National University, 702-701 Daegu, KOREA

The relationship between relative water contents of lettuce leaves and biochemical activities in lettuce was examined in this study to explore an adaptation response of lettuce to water stress from soils. Soil water contents and relative water contents of leaves were positively related to show $R^2=0.8728$. Hydrogen peroxide contents of leaves rapidly increased with reduction of soil water content, whereas soluble protein contents and dry matters rapidly decreased. And chlorophyll a and b contents of leaves decreased with increase in carotenoid content. Furthermore, the activities of ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), and dehydroascorbate reductase (DHAR) increased dramatically, and mRNA transcript levels of APX, MDHAR and DHAR also increased. Relationship of relative water content of lettuce leaves to hydrogen peroxide, to ascorbate peroxidase activity, to dehydroascorbate reductase activity, and to monodehydroascorbate reductase activity was shown to be positively correlated. It is highly plausible from this study that these enzyme activities could be developed as an indicator of water states in soils.

Key words: Ascorbate-related enzymes, Hydrogen peroxide, Water content, Soils, Lettuce.

서 언

식물체내 수분은 대사 및 생리과정에 직접 관여되어 수분이 조금만 감소하여도 생장과 발육에 큰 영향을 미치게 되며, 특히 잎 내의 상대함수량 (Relative Water Content)은 생육상태의 수분함량과 최대 함수량과의 비율로서 식물체 잎의 수분균형과 수분부족도를 나타내는 지표가 된다. 식물은 토양 내 수분의 함량이 감소하면 대사적으로나 생리적으로 이를 조절하는 기능을 가져야 하며, 이를 조절하지 못하면 심각한 손상을 얻게 된다 (Shigeoka et al., 2002; Tambussi et al., 2000; Yoshimura et al., 2000). 식물이 성장하는 동안 토양 중 수분이 부족해지는 조건이 되면 활성산소가 생성되는 속도가 증가하며 이를 제거하기 위한 환원작용 속도도 비례적으로 증가하게 되며 식물체 스스로 수분의 부족상태에 적응하는 생화학적 반응을 가지게 된다 (Yoshimura et al., 2000; Zlatev et al., 2006; Iturbe-Ormaetxe et al., 1998; Tambussi et al., 2000).

아스코브산 (ascorbic acid: vitamine C)은 식물에서 여러 가지 기능을 하는 물질로서 총 수용성 탄수화물의 약 10% 정도를 차지하며 식물체내에서 생합성은 식물체의 발육과 환경요인에 의해 달라진다 (Smirnoff and Wheeler, 2000). 아스코브산의 항산화제로서의 역할은 많은 관심을 집중시키고 있으며 많은 다른 주요 항산화효소의 보조효소로서의 역할도 많은 관심을 집중시키고 있다 (Conklin, 2001). Pastori et al., (2003)이 아스코브산의 합성이 결여된 아라비돕시스 변이주의 유전자 발현을 조사한 결과 방어와 생존의 조절은 물론 성장을 조절하는 식물호르몬과 같은 역할을 한다고 하였다. 식물체 잎 중의 아스코브산은 잎의 자유공간에서 주요 항산화제로서 역할을 담당하고 있으며 (Veljovic-Jovanovic et al., 2001) 아스코브산과 연관된 몇 가지 항산화효소의 활성도 변화에도 관련성이 있는 것으로 잘 알려져 있다. 아스코브산은 여러 가지 환경스트레스로 발생하는 활성산소를 효과적으로 제거하는 일련의 시스템 내에서 활성이 매우 높은 기질로 작용하여 세포의 손상을 방지하는 메카니즘에서 핵심적인 역할을 담당하는 항산화물질로 잘 알려져 있다 (Conklin, 2001; Tokugana, et al., 2005). 아스코브산의 산화환원에 관련된 효소는 아스코브산 과산화효소 [Ascorbate

접수 : 2013. 1. 25 수리 : 2013. 2. 12

*연락처 : Phone: +82539505715

E-mail: kangsj@knu.ac.kr

Peroxidase: APX (EC 1.11.1.11)], 모노디하이드로아스코브산 환원효소 [monodehydroascorbate reductase: MDHAR (EC 1.6.5.4)], 디하이드로아스코브산 환원효소 [Dehydroascobate Reductase: DHAR (EC 1.8.5.1) 등이며 각각 과산화수소를 환원시키는 일련의 과정에 관여하고 있다. 과산화수소를 물로 환원시키는 일련의 반응에서 APX는 특이적으로 아스코브산을 모노디하이드로아스코브산 (monodehydroascorbate: MDHA)으로 환원시키는 반응을 촉매하는 효소이며, MDHA 환원효소 (monodehydroascorbate reductase: MDHAR)는 아스코브산의 재생을 촉매하는 효소로서 식물체내의 아스코브산의 수준을 유지하는데 매우 중요한 역할을 한다 (Foyer and Halliwell, 1976; Foyer et al., 1983; Hossain and Asada, 1984; Shigeoka et al., 2002). 한편 디하이드로아스코브산 (Dehydroascobate : DHA)은 글루타싸이온 (glutathione: GSH)을 기질로 사용하는 디하이드로아스코브산 환원효소의 작용으로 아스코브산을 재생하는 다른 경로를 가진다. 이 효소들은 식물체 내 아스코브산의 수준을 조절하는 중요한 항산화효소이며 효소의 활성과 mRNA의 수준 변화에 관한 특성이 보고되어 있다 (Shigeoka et al., 2002; Shimaoka et al., 2000; Urano et al., 2000; Yoshimura et al., 2000). 이들 효소의 활성변화에 영향을 주는 인자로는 오존처리 (Kang et al., 1999), 관수온도 (Kang et al., 2001), 수분부족 (Kang, 2008) 등이 있으며, 시금치 (Morell et al., 1997), 완두콩 (Leterrier et al., 2005), 토마토 (Grantz et al., 1995), 대두 (Kim et al., 1999), 상추 (Kang, 2008) 등 식물의 종류에 따라 다르게 나타나고 있다.

식물체에서 수분의 부족도는 생육과 대사활동에 매우 중요한 인자로서 본 연구는 토양 내 수분의 부족 정도에 따라 식물이 적응하는 효소적반응이 아스코브산의 산화환원작용과 관련된 반응에 미치는 영향을 예측하기 위하여 상추를 공시작물로하여 수행되었다. 특히, 아스코브산의 산화환원에 관련된 효소들의 활성이 토양 내 수분의 부족도를 판단하는 지표로서 활용될 수 있는 가능성의 평가에 주안을 두었다.

재료 및 방법

공시작물의 생육과 수분 스트레스 처리 공시작물 상추 (*Lactuca sativa* L, cv. Baronet, Journey Co.)를 육묘용 상토 (Metro-Mix 350[®])와 10% (v/v)의 모래를 섞어 채운 포트 (8×8×7 cm)에 3립씩 파종하였다. 발아한 유식물 중 건전한 1주를 생육상 (주/야 20°C/18°C, 200 μmol·m⁻²·s⁻¹)에서 포장용수량이 유지되도록 저면관수 방식으로 수분을 공급하면서 4주간 생육시켰다. 생육 기간 중 영양용액 [N-P-K (20-10-20), Peat Lite[®]]의 질소 농도를 250 ppm으로 조정하여 주 1회 공급하였다. 생육이 균일한 공시작물을 선정하

여 대조구 (W₀)는 포장용수량의 수분상태를 유지하였고, 처리구 (W₁, W₂)는 수분의 공급을 일정 기간 제한하였다. 3 수준으로 처리한 공시식물의 잎 시료를 일정한 시간에 채취하여 액체질소에서 동결시켜 -70°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 토양과 잎 내 상대 수분함량 (relative water content : RWC)을 측정하였으며 (Tambussi et al., 2000), 잎의 수분포텐셜은 Psychrometer (Decagon Co, USA)를 사용하여 측정하였다.

조효소액의 조제 및 활성도 측정 효소의 활성도 측정을 위한 조효소액의 조제는 약 3 g의 잎 시료를 액체질소에서 마쇄한 후 3배 부피의 추출액[100 mM K-Pi 완충액 (pH 7.2), 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% (w/v) BSA]에서 추출하였다. 현탁액을 원심분리 (15,000 rpm, 4°C, 15분)한 후 상정액은 1 mL씩 분주하여 -70°C에서 보관하였다. 아스코브산 과산화효소 (APX)의 활성도 측정을 위한 조효소액은 효소의 자동산화를 방지하기 위하여 1 mM의 ascorbate를 추가로 첨가한 동일한 추출완충액에서 별도로 조제하였다 (Amako et al., 1994). 조효소액 중의 단백질 함량은 BSA를 표준단백질로 하여 Bradford의 방법 (1976)으로 측정하였다.

APX의 활성도는 5 mM 아스코브산, 10 mM 과산화수소와 조효소액이 들어있는 50 mM K-Pi 완충액 (pH 7.0, 총부피 1 mL)에서 아스코브산 ($\epsilon=2.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)의 산화정도 (ΔA)를 측정하여 계산하였다 (Nakano and Asada, 1981). MDHAR의 활성도는 340nm에서 흡광도의 변화를 이용한 NADH의 산화 정도로 측정되었다. 즉, 30~50 μL의 조효소액을 50 mM 인산완충액 (pH 7.6), 0.3 mM NADH 및 2.5 mM 아스코브산이 들어있는 반응용액 (최종부피 1 mL)에 넣고 0.5 unit 아스코브산 산화효소 (ascorbate oxidase)를 첨가하여 NADH의 산화 정도 ($\epsilon=6.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 측정하였다 (Hossain et al., 1984). DHAR (EC 1.8.5.1)의 활성도는 10 mM GSH, 5 mM DHA와 조효소액을 첨가한 50 mM K-Pi 완충액 (pH 7.0, 총부피 1 mL)에서 아스코브산 ($\epsilon=2.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)의 생성량으로 측정하였다 (Hossain and Asada, 1984).

엽록소와 카로티노이드 함량 엽록소 a와 b, 카로티노이드의 함량은 시료 0.2 g을 액체질소에서 마쇄한 후 10배 부피의 인산완충액 [100mM K-Pi, pH 7.0, 20% (w/v) sorbitol, 1 mM EDTA와 0.1% (w/v) PMSF]으로 현탁하였다. 이 현탁액 100 μL에 10배 부피의 95% (v/v) 에탄올을 넣어 혼합하면서 추출하고 -20°C에서 하룻밤 방치하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 각각 664 nm과 648 nm, 470 nm에서 흡광도를 측정하여 환산하여 나타내었다 (Arnon, 1949; Lichtenthaler, 1987).

과산화수소 함량 과산화수소의 함량은 시료 0.2 g을 액체질소에서 마쇄하고 10배 부피의 0.1% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)로 추출하였다. 현탁액을 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 수집한 상징액 500 µL를 10 mM 인산완충액 (pH 7.0)과 1 mL의 1 M KI를 첨가하여 발색시킨 후 390nm에서 흡광도를 측정하였다 (Alexieva et al., 2001; Foyer et al., 1997). 과산화수소 표준곡선으로부터 과산화수소의 함량을 계산하였으며 생체중량 당 µM로 나타내었다.

아스코브산의 함량 아스코브산과 디하이드로아스코브산의 함량은 시료 0.5 g을 액체질소에서 마쇄하고 10배 부피의 6% (v/v) HClO₄로 현탁하여 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 측정하였다. 아스코브산의 함량은 상징액 100 µL와 900 µL의 인산완충액 (pH 12.7)을 넣은 직후 265 nm에서 측정된 흡광도와 5 unit의 아스코브산 산화효소를 넣은 후 측정된 흡광도차이를 표준곡선에 의하여 계산하였다. 총 아스코브산의 함량은 1 mL의 추출액에 400 µL의 1.2 M K₂CO₃첨가하여 최종 pH를 6.0으로 조정된 후 원심 분리한 상징액에 10 mM의 dithiothreitol (DTT)를 넣고 25°C에서 10분간 반응시켜 아스코브산의 함량 측정과 동일한 방법으로 측정하였다 (Foyer et al., 1983; Yoshimura et al., 2000). 디하이드로아스코브산의 함량은 총 아스코브산의 함량에서 아스코브산을 뺀 값으로 나타내었다.

효소의 cDNA 증폭 및 Northern Blot 분석 APX (Genbank accession No. D85864), DHAR (Genbank accession No. AF195783)와 MDHAR (accession. No. AB063289)의 mRNA로부터 프라이머 [APX: 5'-CTGATGGGTGA GAAAGAAGG-3'

(F), 5'-ATGTTGCTTGCTTTGGTAAT-3' (R); DHAR: 5'-AGTCGCGTATTCAC TTTCAT-3' (F), 5'-AGATTGCATTGGGACATTAC-3' (R); MDHAR: 5'-TAAATCAGCTCAG CATTGTG-3 (F), 5'-AGAACTCCTTTCAGTCTCCC-3' (R)]를 제작 프로그램 (Primer3, Whitehead Institute, USA)을 사용하여 제작하고 PCR의 방법으로 증폭하였다.

Northern Blot분석을 위한 RNA의 추출은 Chang et al. (1993)의 방법을 약간 변형하여 수행하였으며 추출한 총 RNA (11.7 µg each)는 10% (v/v) formaldehyde가 함유된 1.2% (w/v) 아가로스 젤 전기영동을 한 후 nylon membrane (Sigma, Co., USA)에 전이시켰다. 전이시킨 membrane은 55°C의 prehybridization 완충액 [6× SSC, 5× Denhardt's 용액, 1% (w/v) SDS, denatured salmon sperm DNA 100 µg mL⁻¹]에서 3시간 동안 반응시켰으며 (Sambrook et al., 1989), 각 효소의 ³²P-random primed cDNA가 들어있는 hybridization 완충액에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응액을 60°C의 세척 완충액 (2× SSC, 0.1% SDS)에서 10분간, 0.1× SSC, 0.1% SDS가 들어있는 세척완충액에서 1시간 세척한 후 24시간 동안 노출시키고 Blot 분석시스템 (Storm, GE healthcare, USA)에서 스캔하였다.

결과 및 고찰

잎내 상대수분함량과 수분포텐셜 공시작물이 생육하고 있는 토양의 수분함량, 잎 내 상대 수분함량 (RWC), 잎의 수분포텐셜 및 토양 내 수분함량과 잎의 상대 수분함량과의 연관성을 나타낸 결과는 Fig. 1과 같다. 대조구 토양의 수분함량은 67.64% (포장용수량: 70.94%)로 유지되었으

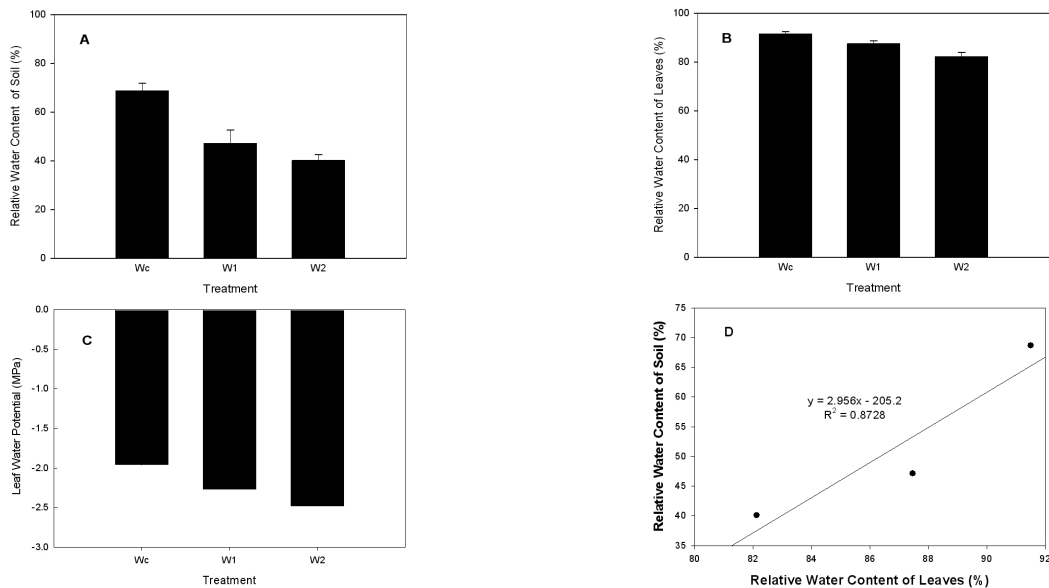


Fig. 1. Relative water contents of soils (A), lettuce leaves (B), leaf water potentials (C), according to soil water status and a relationship between relative water contents of soils and lettuce leaves (D).

며, 수분의 공급을 제한한 처리구의 토양 내 수분의 함량은 45.31% (W_1)와 25.76% (W_2)를 각각 나타냈다 (Fig 1A). 토양 내 수분함량의 차이에 따른 공시식물 잎 내 상대 수분함량은 대조구에서는 91.50%이었으며, 잎 내 수분포텐셜은 -1.96 MPa를 나타냈다. 수분 제한 처리구에서는 87.46%와 82.12%를 각각 나타냈으며 (Fig. 1B) 잎 내 수분포텐셜은 각각 -2.27 MPa와 -2.48 MPa를 나타냈다 (Fig. 1C). 토양 내 수분함량과 공시식물의 잎 내 수분함량과는 정의 상관 ($R^2=0.8728$)을 보였으며 (Fig. 1D), 토양 내 상대수분함량이 감소되면 잎에서 산화적 손상을 유발 할 수 있기 때문에 아스코브산 산화환원 관련 효소의 활성도가 잎 내 상대수분 함량과 깊은 연관성을 있을 것으로 판단된다.

과산화수소, 단백질 및 식물생육 잎 내의 상대수분 함량이 감소함에 따라 과산화수소의 함량이 증가 ($R^2=0.9995$) 하는 경향을 보였다 (Fig. 2 A와 B). 토양 내 수분의 감소는 잎 내 상대수분 함량과 밀접하게 연관되어 있으며 토양 내 수분의 감소는 산화적 손상을 받게 되고 일차적으로 catalase와 superoxide dismutase의 영향으로 식물의 잎 세포내 과산화수소의 농도가 일시적인 증가가 유발된다는 보고 (Mittler, 2002)와 같이, 상추 식물에서도 토양 수분의 감소는 산화적 스트레스의 일종임을 확인 할 수 있었다. 또한, 토양 내 수분의 감소로 단백질의 함량이 감소하는 경향을 보여 수분의 공급부족이 잎 내 단백질의 생성량과 밀접한 관련성이 있음을 확인 할 수 있었다.

토양 내 수분이 감소되면 식물의 광합성작용이 감소되어 식물의 생육이 불량해지며 항산화제인 아스코브산의 함량이 변화되거나 이 물질과 관련된 효소들의 활성도 변화된다는 보고 (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998; Levin et al., 1994)로 보아, 수분부족은 식물의 성장과 밀접한 관련이 있다고 생각되며, 적절한 수분의 감소는 아스코브산의 함량을 증가시킬 수 있는 요인임을 추정할 수 있다 (Fig. 2). 산화적 스트레스로 생성되는 과산화수소를 식물세포에 인위적으로 처리하였을 때 아스코브산 과산화효소의 cDNA의 발현이 유도되며, 이 효소의 활성도가 증가하는 것으로 보고되어 있다 (Yabuta et al., 2004). APX와 관련된 일련의 몇 가지 효소의 활성도 변화에 대한 연구가 많이 수행되어 있으며 (Chang et al., 2004; Shigeoka et al., 2002), 아스코브산의 재생과 관련된 DHAR과 MDHAR의 활성도 변화는 식물체내 아스코브산의 함량 증가와 상관이 있을 것으로 추정된다 (Sano et al., 2005; Grantz et al., 1995).

엽록소 함량의 변화 잎 내 상대수분함량이 감소함에 따라 엽록소 a와 b의 함량이 다소 감소하는 경향을 보였으며 (Fig. 3 A), 반면에 카로티노이드 함량은 비교적 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 3 B). 총 엽록소의 함량은 잎 내 상대수분의 함량이 감소하는 경향에 따라 비슷한 경향으로 감소하였으며 이는 정상적으로 생육한 식물체보다 수분 스트레스에 노출된 식물에서 초기에는 증가하는 경향을 보이지만 수분함량이 감소해 감에 따라 대체적으로 감소되었

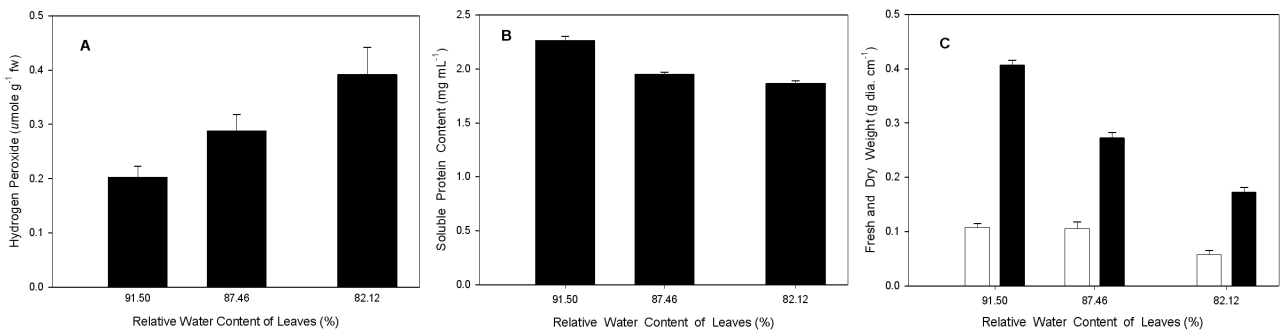


Fig. 2. Hydrogen peroxide (A) and soluble protein (B), and fresh and dry weight (C) of lettuce leaves according to soil water status.

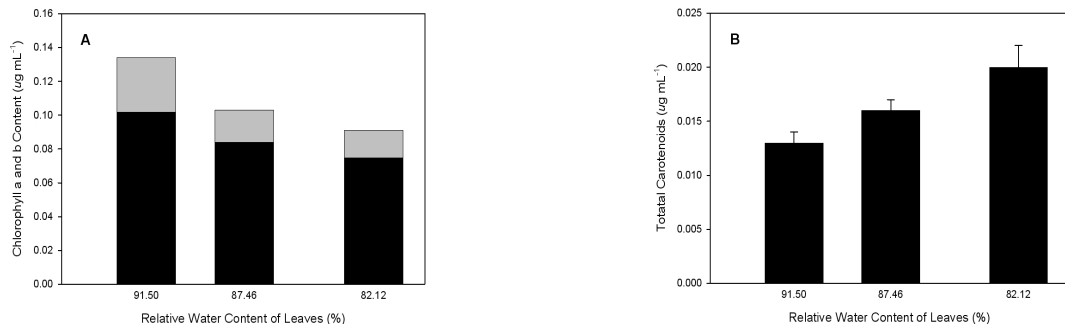


Fig. 3. Chlorophyll a and b contents (A) and total carotenoids content (B) according to relative water content of lettuce leaves.

다는 결과 (Kang, 2008)와 같이 상대수분함량의 감소 (87%, 82%)로 엽록소의 함량이 감소되는 것으로 보인다. 반면 카로티노이드의 함량의 증가는 식물이 스트레스에 노출되었을 때 항산화작용을 보이는 것으로 볼 수 있다. 잎의 수분포텐셜이 -1.3 MPa일 때 잎의 수분, 광합성작용, 엽록소 a와 b, 카로티노이드 등의 함량이 감소되었으며, -1.9 MPa 정도로 더 심한 수분스트레스를 받았을 때 엽록소 a의 함량이 약 30%, 엽록소 b는 약 20.7% 정도 감소하며 카로티노이드의 함량도 약 37.9% 정도로 더 크게 감소하였다는 보고 (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998)가 있다. 따라서, 잎 내 상대수분의 감소는 엽록소의 생성에 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다.

아스코브산의 함량 아스코브산은 세포 내에서 생성된 과산화수소를 제거하는 반응에서 특이적으로 전자공여체로 작용하며 아스코브산 과산화효소와 관련된 항산화작용을 한다. 식물체 잎 내 아스코브산의 함량의 수준 유지는 식물이 스트레스 환경에 적응할 수 있도록 해 준다. 상추의 경우, 잎 내 상대수분의 함량이 감소함에 따라 아스코브산의 함량 변화는 상대수분함량이 87.46%일 때 약간의 증가를 보이나 상대수분함량이 더 감소하면 오히려 감소되는 경향을 나타내었다 (Fig. 4 A). 반면에 디하이드로아스코브산의 함량은 87.46%일 때 약간 감소되는 경향을 보여 전체적으로 아스코브산의 수준을 일정하게 유지하는 것으로 생각된다. 이상의 결과에서 아스코브산은 식물체에서 수분 부족스트레스에 적응하기 위한 체내 일련의 반응에 직접 관여한다는 사실을 예측할 수 있다. 이전의 보고 (Kang, 2008)에서도 수분스트레스가 증가함에 따라 지속적으로 증가하는 경향을 보이다가 일정기간 이후에는 급격하게 감소하는 경향을 보였기 때문에 아스코브산 함량의 평가로 수분 스트레스의 양을 추정할 수 있을 것으로 생각된다.

수분 부족 스트레스 시 아스코브산의 생합성과 관련된 효소인 L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH)의 활성도와 이 효소의 유전자 발현 정도가 더 증가되는 것으로 보고 (Tokunaga et al., 2005)되었으며, 또한 상추에서도 고온, 저온 및 고광도가 L-galactose dehydrogenase

(L-GalDH)의 유전자 발현을 촉진하는 것으로 보고되었다 (Oh et al., 2009). 따라서, 수분 부족스트레스뿐만 아니라 다른 환경스트레스에 의하여 총 아스코브산의 함량이 증가하는 것으로 사료되기 때문에 아스코브산의 함량을 높일 수 있는 스트레스 처리량에 관한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

효소활성도 변화 및 유전자 발현 토양 내 수분 함량의 감소로 잎 내 상대수분함량이 감소하면 APX의 활성도가 급격하게 증가하는 경향을 나타내며 (Fig. 5 A), DHAR의 활성도가 더 큰 증가를 나타내었다 (Fig. 5 B). 토양 내 수분의 함량이 감소하면 과산화수소 양의 증가로 (Fig. 1 A) 산화적 손상을 유발할 수 있으므로 이를 무독화하는 효소적 작용이 연속적으로 일어나게 된다. 이때 아스코브산은 전자공여체로 작용하여 모노디하이드로아스코브산으로 환원된다. 한편 아스코브산으로 재생에 관여된 효소는 모노디하이드로아스코브산 환원효소 (MDHAR)이다. 식물이 항산화력을 가지기 위해서는 아스코브산 수준의 항상성이 필요하므로 환원형인 모노디하이드로아스코브산을 산화형인 아스코브산으로 재생하는 반응을 촉매하는 효소인 MDHAR의 활성도 변화로 식물이 수분스트레스 환경에 적응하는 기작을 설명할 수 있게 된다. 토양 내 수분의 함량이 감소함에 따라 MDHAR의 활성도도 크게 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 5 C). 전체적으로 이들 효소 활성도는 토양 내 수분함량이 낮은 식물체의 잎에서 더 높게 나타났으므로 수분 부족스트레스가 산화적 손상을 유발함에 따라 적응하거나 내성을 유지하기 위하여 효소적 반응을 나타낸다는 보고 (Kang, 2008)와 같은 결과가 상추에서도 나타났다.

세 종류의 효소활성도가 증가함에 따라 해당 효소단백질의 mRNA수준의 발현도 동일한 경향을 보였다 (Fig. 5 D). 수분 부족 스트레스가 진행됨에 따라 MDHAR의 cDNA의 발현이 증가한다는 보고 (Leterrier 등, 2005)와 바와 같이 상추의 잎에서 MDHAR의 cDNA발현은 수분 부족 스트레스가 증가할수록 증가하였으며 APX와 DHAR의 mRNA수준이 동시에 증가되었음을 알 수 있었다 (Fig. 5 D). 시금치에서 고광도에 의해 APX의 mRNA수준이 크게 증가한다는 보고

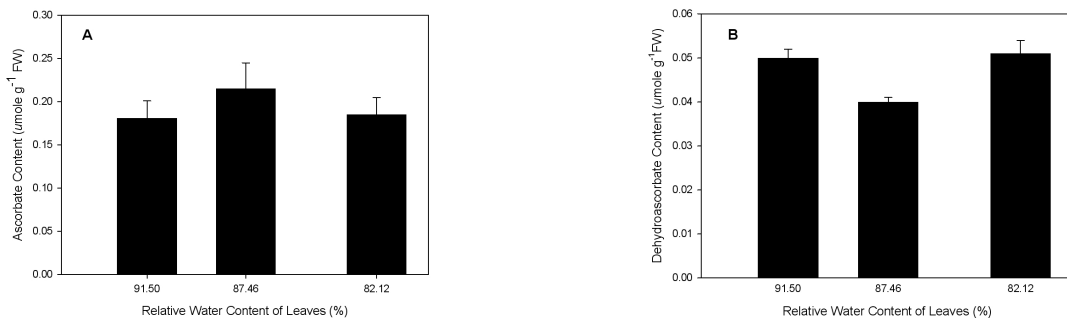


Fig. 4. Ascorbate content (A) and dehydroascorbate content (B) according to relative water content of lettuce leaves.

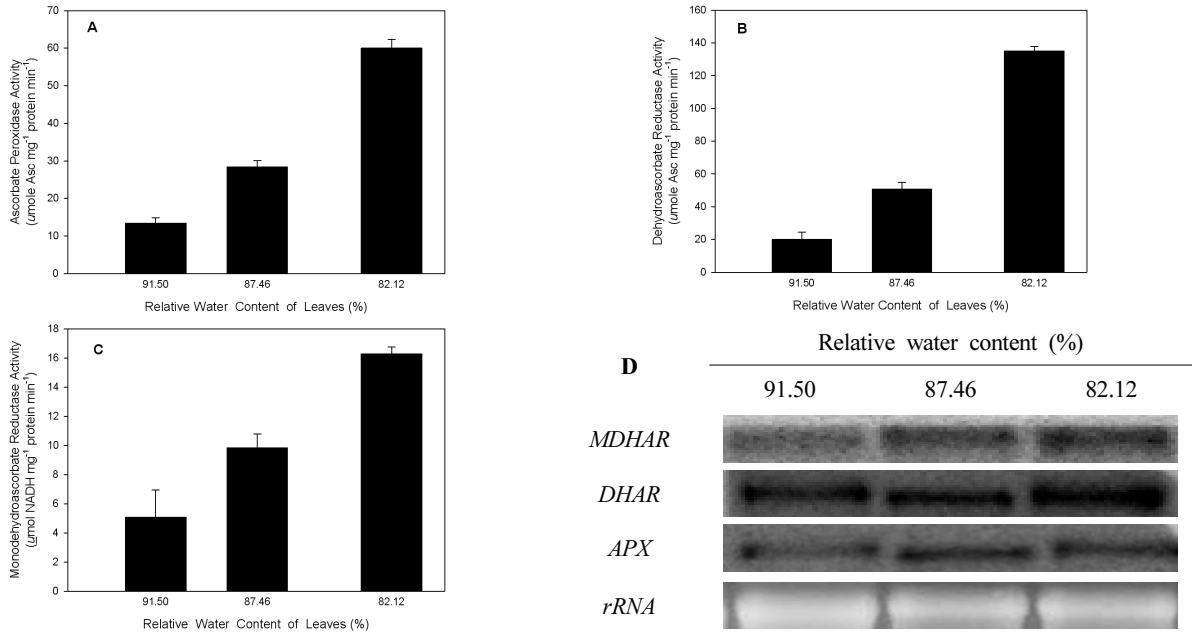


Fig. 5. Effects of relative water content of lettuce leaves on ascorbate related enzymes activities. **A**, ascorbate peroxidase activity, **B**, dehydroascorbate reductase activity **C**, monodehydroascorbate reductase, **D**, Northern analysis of total RNA from APX, DHAR, and MDHAR with different soil water status. 11.7 μg of total RNA was electrophoretically separated on denaturing formaldehyde agarose gels and blotted onto nylon membranes. The membranes were probed with ³²P-labeled APX, DHAR and MDHAR cDNA. The EtBr stained gel picture shows uniform loading of RNA samples.

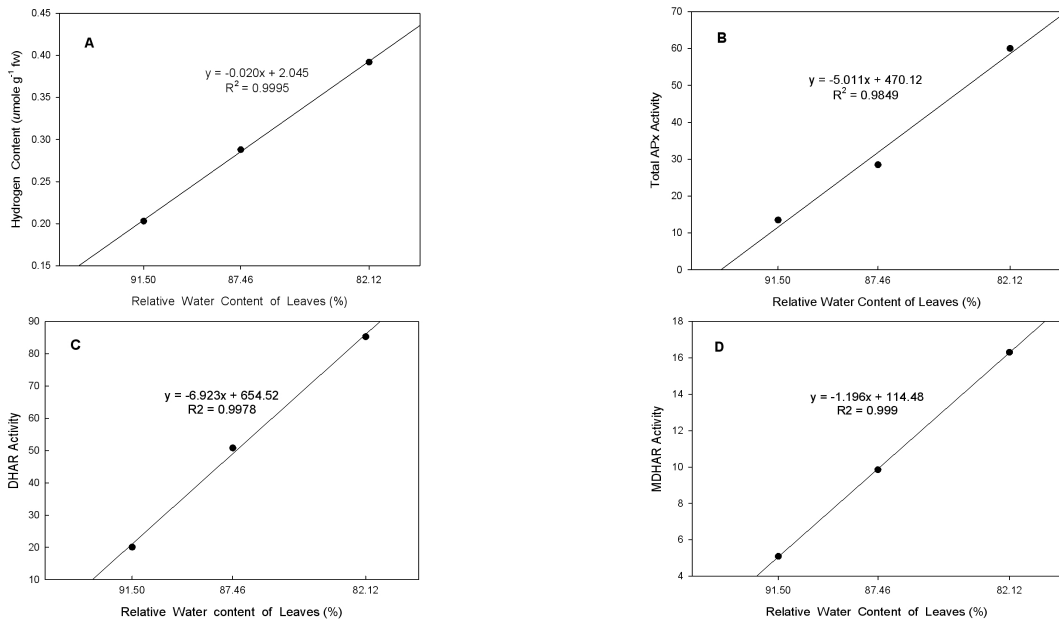


Fig. 6. Relationship of relative water content of leaves to hydrogen peroxide (**A**), ascorbate peroxidase activity (**B**), dehydroascorbate reductase activity(**C**) and monodehydro ascorbate reductase activity (**D**).

(Yoshimura et al., 2000)와 같이 토양 내 수분의 감소가 환경스트레스 요인으로 작용한다는 것을 알 수 있었다. 따라서, 적절한 수분 수준의 유지는 상추내 아스코브산의 함량을 증가시킬 수 있는 요인이 될 수 있을 것으로 판단된다.

잎 내 상대수분함량과 효소활성도 잎의 상대수분함

량과 스코브산 산화환원작용에 관련된 세 가지 효소의 활성과의 상관관계를 나타낸 결과는 Fig. 6과 같다. 잎의 상대수분함량에 따른 총 APX 활성도와는 정의 상관 ($R^2=0.9849$)을 나타내었으며, 상대수분함량과 DHAR 활성도와 MDHAR 활성도 각각 정의 상관 ($R^2=0.9978$, $R^2=0.9990$)을 나타내었다. 수분스트레스가 증가함에 따라 APX와 DHAR의 활성도

와 정의 상관관계를 보였다. 이 결과는 MDHAR 활성도와 정의 상관관계 ($R^2=0.8645$)를 보인 보고 (Kang, 2008)와 비슷한 경향을 나타내었다.

결 론

토양의 수분상태에 따른 상추의 엽 내 상대수분함량 (Relative Water content)과 항산화 관련 효소의 활성도와와의 연관성을 확인하여 수분부족에 적응하는 상추의 생화학적 반응이 본 연구에서 확인되었다. 토양 중 수분의 함량과 잎 내 수분함량은 정의 상관 ($R^2=0.8728$)을 보였으며 이때 잎의 수분포텐셜은 각각 -1.96 MPa과 -2.27 MPa, -2.48MPa을 나타내었다. 수분부족 조건에서 과산화수소의 생성량은 증가하는 경향이였으며 수용성 단백질과 생체중, 건물중은 각각 감소하는 경향을 나타내었다. 클로로필 a와 b의 생성량은 잎의 상대수분의 함량이 감소할수록 감소하였으나 카로티노이드의 생성량은 증가하는 경향을 보였다. 아스코브산 (ascorbate)의 함량의 변화는 잎의 상대수분의 함량이 감소할수록 증가하는 경향을 보였으나 수분부족도가 크게 증가할 경우 다시 감소하였으며, 디하이드로아스코브산 (dehydroascorbate)의 경우도 비슷한 경향을 나타내었다. 아스코브산 과산화효소 (ascorbate peroxidase:APX)의 활성도는 상대수분 함량이 감소할수록 급격한 증가를 보였으며 디하이드로아스코브산 환원효소 (dehydroascorbate reductase:DHAR)와 모노디하이드로아스코브산 환원효소(monodehydroascorbate reductase:MDHAR)의 활성변화도 비슷한 경향으로 증가하였으며 각 효소의 mRNA수준도 동시에 증가하였다. 특히, 잎의 상대수분함량과 과산화수소의 생성, 아스코브산 관련 효소의 활성도와는 경향이 명확한 정의 상관 (R^2 은 각각 0.9995, 0.9849, 0.9978, 0.999)을 보여 상대수분 함량의 감소는 상추 잎에서 산화적스트레스로 작용함을 알 수 있을 뿐만 아니라 아스코브산 관련 효소의 활성도는 토양 내 수분의 부족도를 판단하는 지표로서 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

인 용 문 헌

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 Environment*. 24:1337-1344.

Amako, K. G.X. Chen, and K. Asada. 1994. Separate assay specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for chloroplastic and cytosolic isoenzymes of ascorbate in plants. *Plant Cell Physiol*. 35:497-504.

Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*. 24:1-15.

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*. 59:248-254.

Chang, S., J. Puryear, and J. Cairney. 1993. A simple method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep*. 11:113-116.

Chang, C.C., L. Ball, M.J. Fryer, N.R. Baker, S. Karpinski, and P.M. Mullineaux. 2004. Induction of ascorbate peroxidase 2 express in wounded *Arabidopsis* leaves does involve known wound signaling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant J*. 38:499~511.

Conklin, P.L. 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environment*. 24:383-394.

Foyer, C.H., and B. Halliwell. 1976. Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 133:21-25.

Foyer, C.H., J. Rowell, and D. Walker. 1983. Measurements of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta*. 157:239-244.

Foyer, C., H. Lopez-Delgado, J.F. Dat, and I.M. Scott. 1997. Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant*. 100:241-254.

Grantz, A.A., D.A. Brummell, and A.B. Bennett. 1995. Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. *Plant Physiol*. 108:411-418.

Hossain, M.A., Y. Nakasno, and K. Asada. 1984. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplast and its participation in generation of ascorbate for scavenging of hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol*. 25:385-395.

Hossain, M.A., and K. Asada. 1984. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme *Plant and Cell Physiol*. 25:85-92.

Iturbe-Ormaetxe, I., P.R. Escuredo, C. Arrese-Igor, and M. Becana. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol*. 116:173-181.

Kang, S.J. 2008. Response of monodehydroascorbate reductase (MDHAR) in lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaves subjected to water deficit stress. *J. Bio-Environ. Control*. 17:273-282.

Kang, S.J., J.Y. Oh, and J.D. Chung. 1999. Changes of antioxidant enzyme activities in leaves of lettuce exposed to ozone. *J. Kor. Soc. Hort. Sci*. 40:541-544.

Kang, S.J., J.Y. Oh, and J.H. Kim. 2001. Effect of temperature of irrigation water on the growth and activities of some enzymes in cucumber seedling (*Cucumis sativus* L.) *J. Kor. Soc. Hort. Sci*. 42:399~404.

Kim, T.S., S.J. Kang, and W.C. Park. 1999. Changes in antioxidant enzymes activities of soybean leaves subjected to water stress. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol*. 42:246-251.

- Leterrier, M., F.J. Corpas, J.B. Barosso, L.M. Sandalio, and L.A. del Rio. 2005. Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiol.* 138:2111-2123.
- Levin, A., R. Tenkaken, R. Dixon, and C. Lamb. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestra the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 350-382.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sci.* 7:405-410.
- Morell, S., H. Follmann, M.D. Tullio, and I. Haberlein. 1997. Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicator of oxidative stress in plants. *FEBS Letters.* 414: 567-570.
- Nakano, Y., and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22:867-880.
- Oh, M.-M., E.E. Carey, and C.B. Rajashekar. 2009. environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiol. and Biochem.* 47:578-583.
- Pastori, G.M., G. Kiddle, J. Antonie, S. Bernard, S. Veljovic-Jovanovic, P.J. Verrier, G. Noctor, and C.H. Foyer. 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell.* 15:939-951.
- Sambrook, J., E. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sano, S., S. Tao, Y. Endo, T. Inaba, M.A. Hossain, C. Miyake, M. Matsuo, H. Aoki, and K. Saito. 2005. Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:762-772.
- Shigeoka, S., T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyakawa, T. Takeda, Y. Yabuta, and K. Yoshimura. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. of Exp. Bot.* 53: 1305-1319.
- Shimaoka, T., A. Yokota, and C. Miyake. 2000. Purification and characterization of chloroplast dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* 41, 1110-1118.
- Smirnoff, N. and G.L. Wheeler. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 267-290.
- Tambussi, E.A., C.G. Bartoli, J. Beltrano, J.J. Guiamet, and J.L. Arous. 2000. Oxidative damage to thylakoid proteins in water stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum.* 108:398-404
- Tokunaga, T., K. Miyahara, K. Tabata, and M. Esaka. 2005. Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase. *Planta.* 220:845-863.
- Urano, J., T. Nakagawa, Y. Maki, T. Masumura, K. Tanaka, N. Murata, T. Ushimara. 2000. Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Letters.* 466:107-111.
- Veljovic-Jovanovic, S.D., C. Pignocchi, G. Noctor, and C.H. Foyer. 2001. Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intercellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol.* 127:426-435.
- Yabuta, Y., T. Maruta, K. Yshimura, T. Ishikawa, and S. Shigeoka. 2004. Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 45:1586-1594.
- Yoshimura, K., Y. Yabuta, T. Ishikawa, and S. Shigeoka. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* 123:223-233.
- Zlatev, Z.S., F.C. Lidom, J.C. Ramalho, and I.T. Yordanov. 2006. Comparison of resistance to drought of three bean cultivar. *Biologia Plantrum.* 50:389-394.