

The Effects of Calcium Nutrition on the Activities of Lactate Dehydrogenase, Alcohol Dehydrogenase and Other Enzymes in Melon (*Cucumis melo* L.) Seedlings Subjected to Flooding

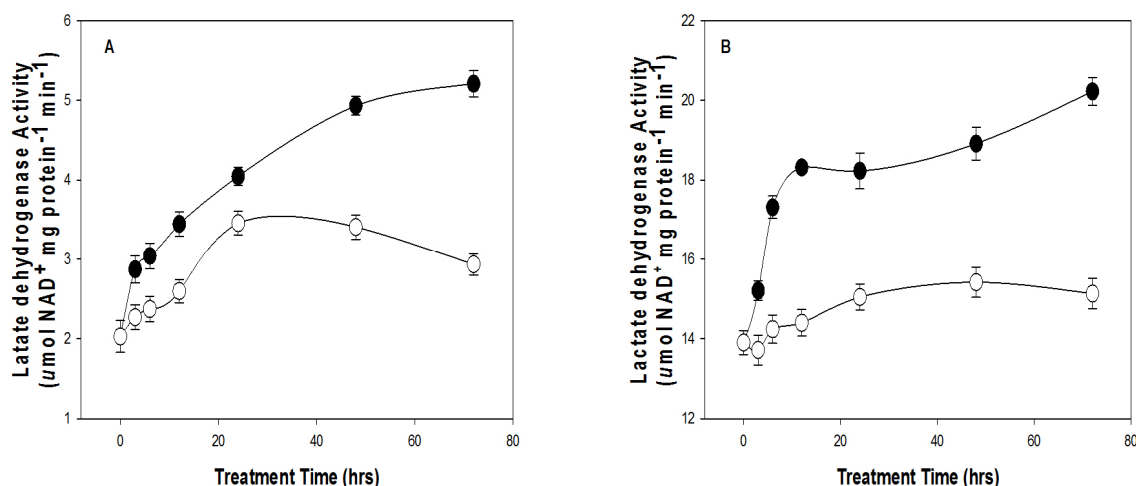
Chang-Hee Lee, Man Park, and Sang-Jae Kang*

School of Applied of Life Science, Kyungpook National University, Daegu, 41566, Korea

(Received: November 24 2015, Revised: January 20 2016, Accepted: February 25 2016)

With transient flooding followed by poor or slow drainage plant roots may become reduction conditions because the root zone was fully filled with water. This study was examined the effects of calcium treatment in the early growth stage on biochemical changes in leaves and roots of melon (*Cucumis melo* L.) seedlings kept under flooding condition for 72 h. The activities of lactate dehydrogenase more gradually enhanced in the roots than those of leaves of melon seedlings treated with calcium. The activities of alcohol dehydrogenase associated with alcohol fermentation under low oxygen conditions continuously increased in the leaves and roots of seedlings untreated with calcium under flooding at least 72 h but those was constant within at least 12 h in treated with calcium. These results showed that calcium supplying in the early growth stage mitigated alcohol fermentation of melon seedlings kept under flooding condition for 72 h. Activities of nitrate reductase and acid phosphatase in the leaves and roots of seedlings in treated with calcium somewhat higher than those of non-treated with calcium. The activities of sucrose phosphate synthase and fructose-1,6-bisphosphatase of leaves of seedlings in treated with calcium more higher than those of non-treated with calcium. These results indicated that calcium nutrition mitigate the reduction of activities of some enzymes of melon seedling kept under flooding condition for 72 h.

Key words: Alcohol dehydrogenase, Calcium nutrition, Flooding, Lactate dehydrogenase, Melon seedling



Lactate dehydrogenase activity in the leaves and roots of melon seedlings subjected to flooding conditions according to treated (●) or non-treated (○) with calcium.

*Corresponding author: Phone: +82539505715, Fax: +82539537233, E-mail: kangsj@knu.ac.kr

§Acknowledgement: This research was supported by Kyungpook National University Research Fund, 2014.

Introduction

식물체의 지하부가 환원상태에 노출되면 몇 시간 이내에 근권에서 산소의 농도가 감소되어 토양의 산화환원 전위는 감소하게 되고 식물체의 뿌리와 토양미생물이 더 이상 호흡을 할 수 없는 상태로 진행된다. 산소부족 조건에 노출된 식물세포는 자당으로부터 생성된 피루브산 (Pyruvic acid) 이 TCA회로를 통해 에너지를 생성하는 대사하는 과정이 저해를 받게 되며, 식물세포는 에너지를 얻기 위하여 피루브산이 젖산 (Lactic acid)으로 전환되는 대사과정이 우회적으로 일어나게 된다 (Epstein and Bloom, 2005). 젖산발효 과정이 오래 지속되어 젖산이 축적되어 세포 내의 pH가 산성이 되면 젖산발효가 다시 저해를 받게 되며, 또 다른 대사과정인 알코올발효 과정으로 전환되어 에너지를 생성하게 된다. 이러한 대사과정의 변화로 에너지 생성량이 부족해지면 결국 양분흡수와 지상부 전이가 제한을 받게 되어 생육이 저해된다. 또한 침수 환경조건에 노출되면 식물은 이미 존재하는 단백질의 합성은 저해되지만, 주로 해당과정과 발효과정에 효소들인 새로운 단백질의 합성이 동시에 증가하기도 한다 (Sach et al., 1996; Chang et al., 2000). 침수상태에서 이러한 단백질의 합성을 조절하는 유전자의 전사조절, 전사 후 조절, 번역조절 등 유전자적인 변환이 아라비돕시스와 옥수수 등에서 알코올 가수분해효소와 같은 여러 가지 단백질의 유전자가 유도됨을 확인한 바 있다 (Ferl and Laughner, 1989; Kyozyuka et al., 1994). 침수 상태에서 합성이 증가되는 단백질 중의 하나인 알코올 가수분해효소 (ADH: Alcohol dehydrogenase, EC 1.1.1.1)는 혐기적 조건에서 식물이 적응하거나 생명을 유지하는데 필수적이며, 이 효소의 유전자 (*Adh*)의 전사는 침수 또는 산소 부족에 대한 특징적인 반응이 될 수 있다고 알려져 있다 (Sach et al., 1980; Johnson et al., 1994). 알코올 가수분해효소 활성도 변화는 토마토 (Genez et al, 1993), 아라비돕시스 (Chung and Ferl, 1999), 귀리 (Biemelt et al., 1998), 보리 (Mayne and Lea, 1984), 옥수수 (Andrew et al., 1994), 벼 (Ismail et al., 2009), 두과작물 (Fukuda et al., 2005), 감자 (Matton et al., 1990) 등 여러 작물에서 확인되어 있다. 알코올 가수분해효소의 활성도 증가는 혐기적 조건 하에서 식물이 살아남기 위한 필수적인 대사경로이며, *Adh* 유전자의 발현은 식물이 산소부족의 조건에 직면하였음을 판단하는 근거가 되기도 한다.

칼슘은 식물체가 일차적인 환경스트레스의 자극을 감지하고 생물학적 반응을 매개해 주는 2차 전령의 역할을 수행한다 (Rudd and Franklin-Tong, 2001). 세포질 내 칼슘의 농도는 대략 0.1내지 0.2 μM 정도로 세포벽이나 액포 등 다른 기관에서 보다 훨씬 더 낮은 수준을 유지한다. 침수 조건 하에 있는 식물의 세포 내 칼슘은 에틸렌 생성을 저해하는

작용을 하며, 또한 알코올분해효소와 해당과정 효소의 유전자의 활성화를 촉진하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 침수의 초기에 세포질 내 일시적인 농도가 증가하고, 칼슘 농도가 증가되지 않으면 알코올 가수분해효소 유전자 유도작용을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Sedbrook et al., 1996; Chung and Ferl, 1999; Peng et al., 2001). 식물체가 생육하고 있는 상태에서 산소가 부족해지면 세포질 내 칼슘의 농도가 빠르게 증가하는 경향이 있으며 이러한 조건에서는 액포 등에 저장된 칼슘이 세포질로 유리되는 것으로 추정하고 있다 (Subbaiah et al., 1998). 산소가 부족한 상태에서 칼슘의 방출은 식물체의 유모나 세포가 살아남거나 적응관련 유전자의 활성화에 매우 유리한 조건을 유지하게 된다. 침수상태에서 세포질 내 칼슘의 농도 증가는 식물의 종류에 따라 달라지며 또한 외부에서 공급한 칼슘에 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있다 (Subbaiah et al., 1994; Bush, 1996; Sedbrook et al., 1996). 따라서 참외 유묘에서 생육초기에 칼슘의 공급은 식물이 산소부족 상태의 적응에 더 유리할 것이라 생각된다. 본 연구에서는 유묘기 칼슘의 공급이 갑작스런 호우나 홍수 등과 같은 환경변화에 의해 일시적으로 근권이 산소 부족 상태에 노출되었을 경우 참외 유묘에서 몇 가지 효소의 활성의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 수행하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 처리 본 연구의 공시작물은 참외 (*Cucumis melo* L.)를 사용 하였으며, 원예용 상토를 채운 사각 포트 (8×8×7cm)에 파종하여 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광량과 28°C/20°C (주, 14 hrs/야, 10 hrs)로 조절된 생육상에서 육묘하였다. 생육초기인 2엽기까지는 1/2 Hoagland 배양액을 공급하여 생육시켰으며, 3엽기에 한국 원예시험장 표준배양액과 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 대신에 동량의 KNO_3 로 대체한 배양액의 일정량을 각각 저면관수하고 3엽이 완전히 팽창할 때까지 생육시켰다. 생육이 균일한 유묘를 선정하여 근권의 산화환원 전위가 260.0~265.0 mV가 유지되도록 담수 처리하고 처리 시간별 유묘를 5주씩 굴취하여 잎과 뿌리의 시료를 채취하여 즉시 -80°C에 보관하였다.

조효소액의 조제 젖산 가수분해효소 (LDH: Lactate dehydrogenase, EC 1.1.1.27)의 활성도를 측정하기 위한 조효소액은 잎 시료 일정량 (약 1 g)을 액체질소를 넣고 마쇄한 후, 10배 부피의 추출 완충액 [10 mM DTT (dithiothreitol), 2.5%(w/v) glycerol이 들어 있는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)]을 사용하여 추출하였다 (Kato-Noguchi and Morokuma, 2007). 설탕인산 생성효소 (SPS : Sucrose phosphate synthase, EC 2.4.1.14), 과당-1,6-이인산가수분해효소 (FBPase : Fructose-

1,6--bisphosphatase, EC 3.1. 3.11), 질산 환원효소 (NR : Nitrate Reductase, EC 1.6.6.1), 산성 인산가수분해효소 (AP : Acid phosphatase, EC 3.1.3.2) 등의 조효소액은 10 배 부피의 추출완충액 [5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM PMSF가 함유된 HEPES 완충액 (pH 7.5)]을 사용하여 추출하였다 (Kerr et al., 1984). 모든 조효소액의 현탁액은 원심 분리 (13,000 rpm, 4°C, 10 min)한 후 상징액의 일정량으로 나누어 -80°C 저온고에 보관하면서 각 실험에 사용하였으며 단백질 함량은 Bradford (1976)법으로 측정하였다.

Lactate dehydrogenase와 Alcohol Dehydrogenase 활성도 측정 ADH와 LDH의 활성도 측정은 Hoffman et al. (1986)과 Chung and Ferl (1999)의 방법을 혼용하여 다음과 같이 측정하였다. LDH 활성도 측정은 1 mM NADH, 10 mM Na-pyruvate가 함유된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에서 조효소액을 포함하여 최종부피가 1 mL가 되도록 첨가한 후 340 nm (NADH, $\epsilon = 2,790 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)에서 1분간의 흡광도 변화를 측정하여 비활성도로 나타내었다. ADH 활성도는 반응용액은 1 mM NAD⁺, 2 M ethanol이 함유된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에서 조효소액을 포함하여 최종부피가 1 mL가 되도록 첨가한 후 340 nm에서 1분간의 흡광도 변화 (NADH, $\epsilon = 2,790 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 측정하여 비활성도로 나타내었다.

Sucrose phosphate synthase와 Fructose-1,6-bisphosphatase 활성도 측정 Sucrose phosphate synthase의 활성도 측정용 반응용액 (1 mL)은 7.5 mM Fructose-6-P, 7.5 mM UDP-glucose, 15 mM MgCl₂가 포함된 50 mM HEPES 완충액(pH 7.5)에 일정량의 조효소액을 넣고 30°C에서 10분간 반응시켰다. 반응을 종결하기 위하여 1 N NaOH용액을 첨가한 후 100°C에서 10분간 끓인 후 급냉하였다. 이 반응용액에 0.25 mL의 0.1%(w/v) Resorcinol 용액과 0.75 mL 30%(v/v)의 HCl용액을 첨가하고 80°C에서 10분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 설탕인산 (sucrose-P)의 양을 측정하고 비활성도로 나타내었다 (Kerr et al., 1984; Rufty et al., 1983). Fructose-1,6-bisphosphatase의 활성도 측정용 반응용액 (1 mL)은 15 mM MgCl₂, 2 mM FBP가 포함된 50 mM HEPES 완충액(pH 7.5)에 일정량의 조효소액을 넣고 30°C에서 20분간 반응시킨 후 반응의 종결시키기 위하여 동량의 30%(v/v) TCA 용액을 첨가하였다. 유리된 무기인산의 함량을 구하고 비활성도로 나타내었다 (Drueckes et al., 1995).

Nitrate reductase 및 Acid phosphatase의 활성도 측정 Nitrate Reductase의 활성도 측정용 반응용액 (1 mL)은 10 mM KNO₃, 1 mM EDTA, 0.2 mM NADH가 들어 있는 25 mM

인산완충액 (pH 7.0)을 30°C를 유지한 후 0.05 mL의 조효소액을 넣고 정확히 20분간 반응시켰다. 58 mM sulfanilamide와 0.77 mM *N*-(naphthyl)ethylenediamine hydrochloride (NEDC)를 넣고 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 아질산의 함량을 구하고 비활성도로 나타내었다 (Mann et al., 1979). Acid Phosphatase 활성도 측정용 반응용액 (1 mL)은 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM *p*-nitrophenol phosphate (PNPP)가 함유된 50 mM Na-acetate buffer (pH 5.1)에 일정량의 조효소액을 넣고 37°C에서 6분간 반응시킨 후 3 N NaOH 0.2 mL를 넣어 반응을 종결시켰다. 반응이 종결된 용액을 405 nm에서 흡광도를 측정하고 생성된 *p*-nitrophenol ($\epsilon = 18,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)의 함량을 구하여 비활성도로 나타내었다 (Bozzo et al., 2004; Robinson et al., 2012).

Results and Discussion

젓산 가수분해효소와 알코올 가수분해효소의 활성도 칼슘은 생물적 또는 비생물적 스트레스에 대한 신호전달을 매개하는 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 주로 시설 내에서 재배되는 참외 식물체는 재배 특성에 따라 근권이 환원상태에 종종 노출되는 경우가 발생하게 되어 근권이 환원상태에 노출되면 식물체는 젓산 발효과정과 알코올 발효 등의 대사과정의 변화를 통해 에너지를 얻게 된다. 참외 유묘의 초기 생육기에 칼슘 영양을 공급하였을 경우 젓산 가수분해효소와 알코올 가수분해효소의 활성도 변화를 확인한 결과는 Fig. 1, Fig. 2와 같다.

참외 유묘 근권의 환원상태가 지속될수록 젓산 가수분해효소의 활성도는 지상부보다 뿌리에서 훨씬 더 큰 영향을 받음을 알 수 있었다. 담수상태가 진행됨에 따라 칼슘 영양을 공급한 처리구 유묘의 지상부에서는 젓산 발효의 과정이 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었으나, 칼슘을 공급하지 않은 무처리구에서는 24시간 정도까지는 증가를 보이다가 그 이후에는 점차 감소하는 경향을 보였다. 또한 참외 유묘의 뿌리에서는 칼슘 영양을 공급한 처리구에서는 12시간까지는 급격하게 증가하다 그 속도가 점차 둔화되는 결과를 보였으며, 칼슘 영양을 공급하지 않은 무처리구에서는 젓산 가수분해효소의 활성도가 거의 일정한 결과를 보였다. 이 결과는 식물체가 혐기적 조건에 노출되면 파이루브 산이 젓산 발효과정을 통해 에너지를 생성하는 우회 대사과정을 가지며 이때 생육초기의 칼슘영양의 공급이 젓산 발효과정을 지속할 수 있도록 조절하는 작용을 가짐을 추측할 수 있었다.

식물의 근권이 혐기상태가 지속되면 삼탄당 회로를 통한 에너지의 생성이 정지하고 에너지를 얻기 위해 파이루브산이 젓산으로 변하는 대사를 하지만 세포 내에 젓산이 축적되어 pH가 낮아지면 젓산 발효과정이 중지되고, 파이루브

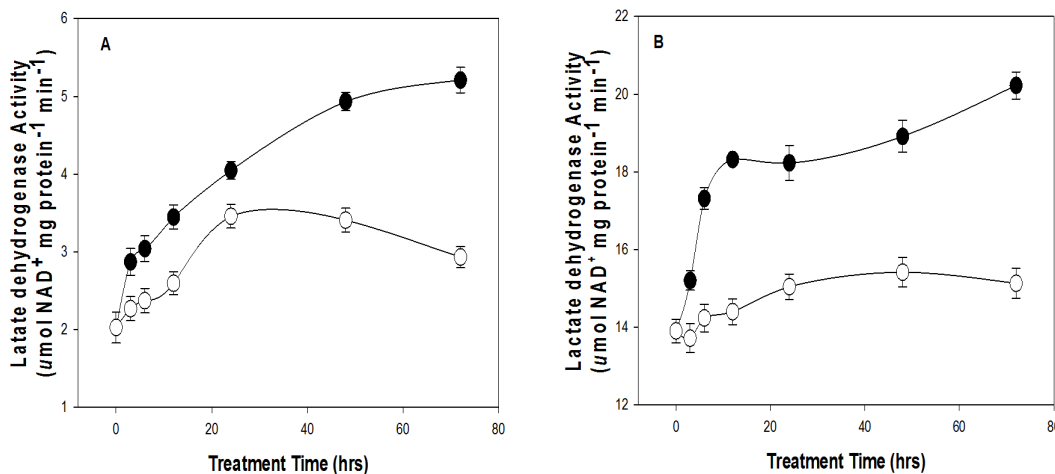


Fig. 1. Lactate dehydrogenase activity in the leaves (A) and roots (B) of melon seedlings subjected to flooding conditions for 72 h according to treated (●) or non-treated (○) with calcium. The vertical bars represent standard error (n=5).

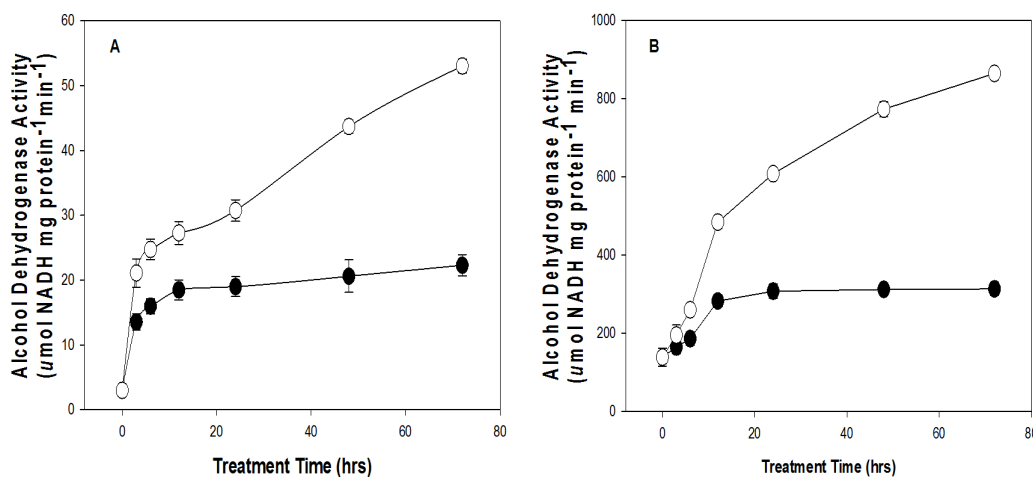


Fig. 2. Alcohol dehydrogenase activity in the leaves (A) and roots (B) of melon seedlings subjected to flooding conditions for 72 h according to treated (●) or non-treated (○) with calcium. The vertical bars represent standard error (n=5).

산이 알코올로 변하는 알코올 발효과정으로 전환되어 에너지를 생성한다 (Epstein and Bloom, 2005). 그러나 칼슘을 생육 초기에 공급한 처리구에서는 젖산 발효과정에서 젖산에 의한 세포의 pH 감소를 상쇄시켜 젖산 발효과정이 알코올 발효과정으로 전환되는 대사를 상당히 지연시키는 것을 알 수 있었다. 근권이 환원상태에 노출되는 담수 스트레스에서 식물의 뿌리는 통상적으로 지상부보다 더 빠른 속도로 호흡을 하며, 이에 적응하여 최소한의 에너지를 얻기 위한 대사과정의 변화가 일어나고 있다. 근권의 산소 함량이 부족해지면 미토콘드리아의 전자전달과 산화적인산화 반응, 삼탄산회로 (TCA) 등의 대사과정이 감소된다. 따라서 해당과정의 최종 산물인 피루브산이 젖산으로 발효되는 과정이 우선적으로 일어난다는 보고와 유사한 결과를 보이고 있다 (Drew, 1997).

또한, 근권이 환원상태가 지속됨에 따라 참외 유묘의 지상부와 지하부에서 알코올 가수분해효소의 활성도가 급격하게 증가하였으며, 특히 뿌리에서의 활성도 변화가 앞에서

의 활성도보다 훨씬 더 큰 변화를 나타내었다 (Fig. 2). 식물 생육 초기에 칼슘 영양의 공급은 세포 내 pH를 높게 유지하게 되어 알코올 가수분해효소의 활성도 증가를 상당히 억제하는 것을 알 수 있었다 (Epstein and Bloom, 2005). 따라서 지속적인 칼슘영양 공급은 식물체가 환원상태에 노출되었을 때 알코올 발효과정을 억제 한다는 것을 확인할 수 있었다. 참외 유묘에서 이러한 결과는 밀의 유묘에서 침수 및 무산소 스트레스 처리 시 알코올 가수분해효소의 전사체 유도와 활성도의 일시적 증가가 있다고 보고 (Andrew et al., 1994)한 결과와 유사하였다. 산소가 부족한 상태에서 세포질 내 칼슘의 농도 유지는 관련 유전자의 발현과 생명유지에 매우 중요한 역할을 하며, 참외 유묘의 생육 초기에 칼슘영양 공급은 세포질 내 칼슘의 농도를 조절하여 여러 가지 생화학적 대사과정에 관여하는 것을 알 수 있었다 (Subbaiah et al., 1994). 보통 세포질 내 칼슘의 농도는 평균적으로 0.15 µM 정도로 유지되며 스트레스가 증가하면 세포질 내 유리 칼슘의 농도가 증가하게 되는데 세포질 내

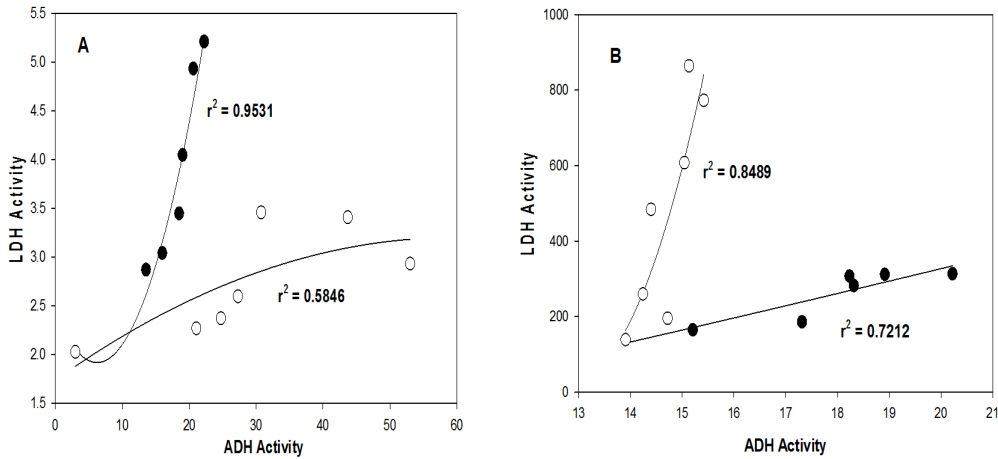


Fig. 3. Relationship between ADH activity and LDH activity in the leaves (A) and roots (B) of melon seedlings subjected to flooding conditions for 72 h according to treated (●) or non-treated (○) with calcium.

유리칼슘의 농도는 액포 내 칼슘의 함량과 평형상태를 이루고 있다. 참외 유묘의 생육초기에는 칼슘의 흡수가 비교적 빠르게 일어나 액포 내 많은 양이 저장되어야 환원스트레스 시 나타나는 알코올가수분해효소나 젖산 가수분해효소의 활성도 변화에 영향을 줄 수 있음을 알 수 있었다 (Sanders et al., 1999; Grierson, 1999).

알코올 가수분해효소와 젖산 가수분해효소와 상관

관계 생육 초기에 칼슘영양을 처리와 처리하지 않은 참외 유묘를 침수 상태를 72시간 동안 유지하여 칼슘의 영양공급이 알코올 가수분해효소와 젖산 가수분해효소 활성도와의 상관관계를 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. 칼슘영양을 처리한 유묘 잎과 뿌리에서의 알코올 가수분해효소와 젖산 가수분해효소와의 상관관계는 침수 상태가 진행됨에 따라 알코올 가수분해효소의 활성도가 증가하고 젖산 가수분해효소의 활성도가 급격하게 증가하나 이 두 효소의 상관관계는 상대적으로 높으며 잎에서보다 뿌리에서의 상관관계가 더 높았다. 칼슘을 처리하지 않은 유묘의 잎에서는 알코올 가수분해효소의 활성도가 증가함에 따라 젖산 가수분해효소의 증가량이 더 낮은 경향을 보였으며 상관계수도 상대적으로 낮았으나 뿌리에서는 상관계수가 상대적으로 더 높았다. 이 결과로 볼 때 이 두 효소는 활성도가 높을 뿐만 아니라 상관관계도 잎에서보다 뿌리에서 상대적으로 더 높은 경향을 보여 침수상태에서 참외 유묘는 지상부에서 보다 지하부에서 더 큰 영향을 받은 것을 알 수 있었다.

질산 환원효소와 산성 인산가수분해효소의 활성도

근권의 환원상태가 지속되면 뿌리의 질소 및 인산과 같은 양분흡수 및 지상부로의 양분 전이가 감소되어 생육에 영향을 미치게 된다. 생육초기에 칼슘영양을 처리한 유묘와 처리하지 않은 유묘 근권의 환원상태 유지 시 참외 유묘의 지

상부와 뿌리에서 질산 환원효소와 산성 인산가수분해효소의 활성도 변화는 Fig. 4, Fig. 5와 같다. 질소와 인산의 정상적인 영양공급에도 환원상태가 지속되면 참외 유묘의 지상부에서는 질산 환원효소의 활성도 감소가 매우 뚜렷하게 나타내었으며, 생육초기 칼슘영양은 질산 환원효소 활성도의 감소를 완화하는데 다소의 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 뿌리의 경우도 마찬가지로 칼슘 영양이 질산 환원효소의 활성도 감소를 다소 완화 유지하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4). 이 결과는 참외 유묘에서 담수로 인한 근권이 혐기상태가 되면 질소의 흡수작용에도 영향을 미치며 생육초기 칼슘 영양의 공급은 이를 다소 완화시킬 수 있음을 시사한다. 지상부와 지하부 내에서 질산태질소를 동화하는 효소의 작용은 대부분의 식물에서 일어나지만 식물의 종에 따라 광합성작용으로 생성된 환원제, 에너지, 탄소골격 등이 지상부에서 더 효과적이기 때문에 뿌리보다는 지상부에서 더 효과적으로 환원된다 (Solomon and Barber, 1990).

산성 인산가수분해효소 활성도의 경우, 담수처리 시간이 지속될수록 감소하는 경향을 나타내며 질산 환원효소와 마찬가지로 생육초기 칼슘영양이 활성도에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다 (Fig. 5). 일반적으로 지상부의 산성 인산가수분해 효소의 역할은 식물체에 인산영양이 부족하면 인산의 재분배를 위한 생화학적 기능을 하고 있으며, 뿌리에서는 토양 내 유기태 인산의 유효도를 높이기 위하여 토양으로 분비되는 효소로서 기능을 담당하고 있다 (Lefebvre et al., 1990; Jeschke et al., 1997). 참외 유묘에서 근권의 담수처리는 식물체의 인산의 재분배 및 유효도 증대에 중요한 역할을 하는 인산가수분해효소의 활성도를 크게 감소시켜 식물체의 인산영양 상태 유지에 큰 영향을 미침을 알 수 있으며, 생육초기 칼슘영양 공급이 이를 다소 완화시키는 것으로 보아 칼슘영양이 인산영양과 관련이 있음을 알 수 있었다.

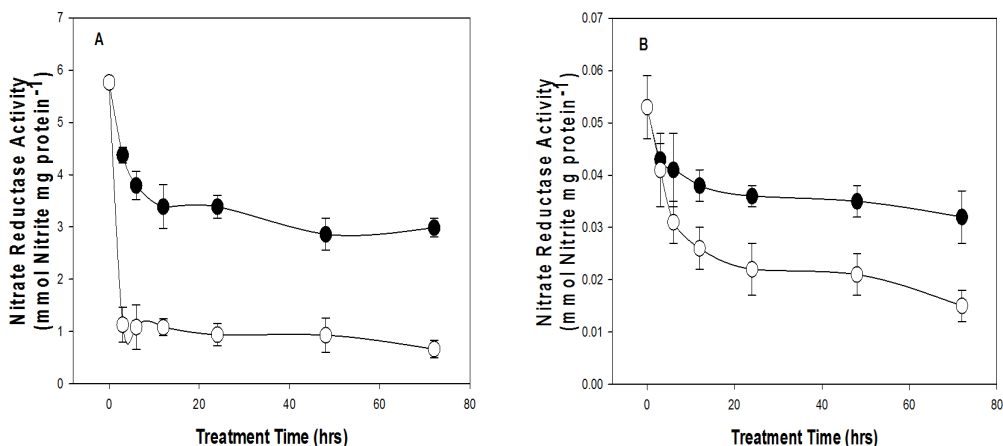


Fig. 4. Nitrate reductase activity in the leaves (A) and roots (B) of melon seedlings subjected to flooding conditions for 72 h according to treated (●) or non-treated (○) with calcium. The vertical bars represent standard error (n=5).

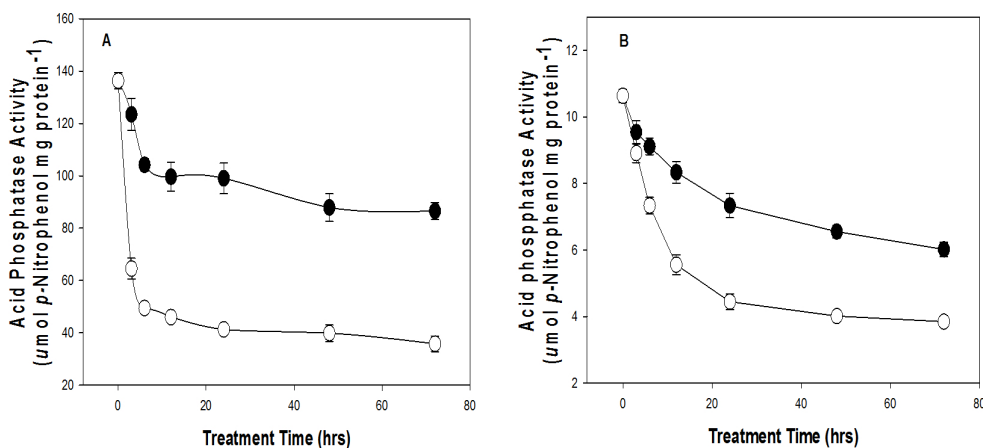


Fig. 5. Acid phosphatase activity in the leaves (A) and roots (B) of melon seedlings subjected to flooding conditions for 72 h according to treated (●) or non-treated (○) with calcium. The vertical bars represent standard error (n=5).

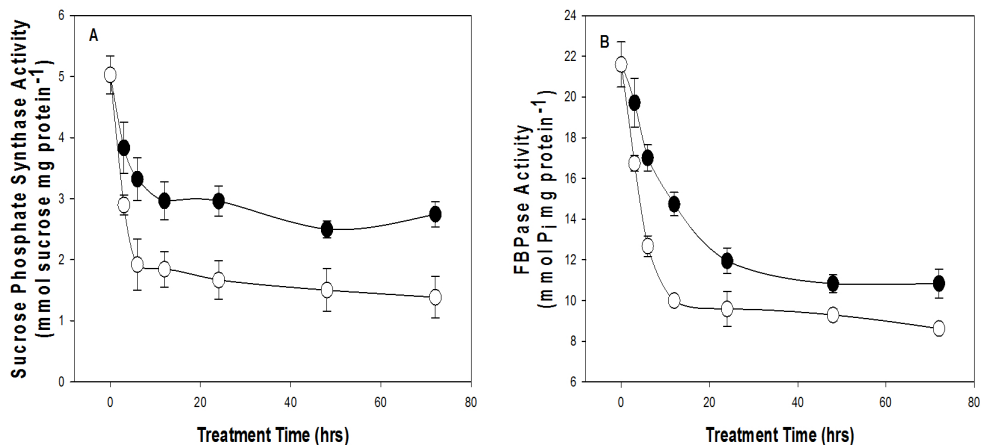


Fig. 6. Sucrose phosphate synthase activity (A) and fructose-1,6-bisphosphatase activity (B) in the leaves of melon seedlings subjected to flooding conditions for 72 h according to treated (●) or non-treated (○) with calcium. The vertical bars represent standard error (n=5).

설탕인산 생성효소와 과당-1,6-이인산 가수분해효소의 활성도 근권의 환원상태가 유지될 경우 참외 유묘의 지상부 잎 내 설탕인산 생성효소와 과당-1,6-이인산 가수분해효소의 활성도와 칼슘영양과의 관계를 확인한 결과는

Fig. 6과 같다. 설탕인산 생성효소는 담수처리 초기에 급격하게 감소하였으며 12시간 이후 일정한 수준을 유지하는 것을 알 수 있다. 생육초기에 칼슘 영양을 공급한 처리구에서 활성도는 칼슘 영양을 공급하지 않은 유묘에서의 활성도 변

화보다 상대적으로 더 적게 나타내었다 (Fig. 6A).

과당-1,6-이인산가수분해효소의 활성도 변화는 칼슘 영양을 공급하지 않은 유묘에서는 처리 12시간 까지 지속적으로 감소한 후 일정한 수준을 유지하였으나 생육초기에 칼슘 영양을 공급한 경우 24시간 이후에 일정한 수준을 유지하는 것으로 확인 되었다 (Fig. 6B). 설탕인산 생성효소와 과당-1,6-이인산 가수분해 효소의 활성도는 인산 영양과 깊은 연관성이 있는 효소이며, 인산영양 부족은 세포질 내에서 설탕의 생성보다는 엽록체 내에서 탄수화물의 생성에 더 큰 기여를 한다 (Beck and Ziegler, 1989; Taiz and Zeiger, 2002)고 보고된 바와 같이, 참외 유묘의 생육초기 칼슘영양의 공급은 지상부에서의 설탕인산 생성효소의 활성도 감소를 억제하여 생육 초기 칼슘영양 공급이 유묘의 설탕 생성 감소를 완화하는 것으로 생각된다.

Conclusion

일시적인 침수상태가 진행된 후 배수가 불량하거나 느리면 식물의 근권은 토양 중의 공극이 물로 채워지기 때문에 환원상태가 된다. 본 연구에서는 참외 유묘에서 칼슘영양의 유무에 따라 72시간 동안 침수상태가 진행되었을 때 잎과 뿌리에서 생화학적 대사과정의 변화가 어떻게 일어나는지를 알아보기 위하여 몇 가지 효소의 활성도 변화를 조사하였다. 생육초기 칼슘을 공급한 참외 유묘를 72시간 동안 침수시켰을 때 젖산발효와 연관된 효소인 젖산 가수분해효소의 활성도는 지상부에서보다 뿌리에서 더 높게 나타나므로 뿌리에서 영향을 더 많음을 알 수 있다. 그러나 알코올 가수분해효소의 활성도는 생육초기 칼슘의 공급한 경우 알코올 발효과정이 12시간 까지는 증가하지만 그 이후 일정해지므로 칼슘의 공급은 알코올 발효과정을 저해할 수 있음을 나타낸다. 이 결과는 생육초기 칼슘의 공급은 젖산발효에 의한 세포의 산성화를 막아 알코올 발효과정으로의 전환이 감소됨을 보여준다. 또한 생육초기 칼슘의 공급이 질소와 인산의 이용과 직접 관련이 있는 질산 환원효소와 인산 가수분해효소의 침수상태가 진행됨에 따라 활성도 감소되는 것을 둔화시켜 주며, 탄수화물의 동화작용과 연관된 설탕인산 생성효소와 과당-1,6-이인산 가수분해효소의 침수상태에 의한 활성도의 감소를 완화시켜 주는 역할을 하는 것으로 생각된다. 결론적으로, 참외 유묘의 생육초기 칼슘의 공급은 침수에 의해 증가되는 알코올 발효과정을 감소시킬 수 있으며, 질소와 인산, 탄수화물의 동화와 연관된 몇 가지 효소의 침수에 의한 활성도 감소를 완화해 줄 수 있음을 보여준다.

References

- Andrew, D.L., M.C. Drew, J.R. Johnson, and B.G. Cobb. 1994. The response of maize seedlings of different ages to hypoxic and anoxic stress. *Plant Physiol.* 105:53-60.
- Beck, E. and P. Ziegler. 1989. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:95-118.
- Biemelt, S., U. Keetman, and G. Albrecht. 1998. Reaeration following hypoxia of anoxia lead to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol.* 116:651-658.
- Bozzo, G.G., K.G. Raghothama, and W.C. Plaxton. 2004. Structural and kinetic properties of a novel purple acid phosphatase from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell culture. *Biochem. J.* 377:419-428.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Bush, D.S. 1996. Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells. *Planta* 199:89-99.
- Chang, W.P., L. Hunag, M. Shen, C. Webster, A. Burlingame, and J.K.M. Roberts. 2000. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiol.* 122:295-318.
- Chung, H.-J., and R.J. Ferl. 1999. *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment. *Plant Physiol.* 121:429-436.
- Drueckes, P., R. Schinzel, and D. Palm. 1995. Photometric microtiter assay of inorganic phosphate in the presence of acid-labile organic phosphate. *Anal. Biochem.* 230:173-177.
- Drew, M.C. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 48:223-250.
- Epstein, E., and A.J. Bloom. 2005. *Ecology and Environmental Stress*. p. 328-330, *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspective*, 2nd edition, Sinauer Associate, MA. USA.
- Ferl, R., and B. Laughner. 1989. *In vivo* detection of the regulatory factor binding sites of *Arabidopsis thaliana Adh*. *Plant Mol. Biol.* 12:357-366.
- Fukuda, T., F. Yokoyama, T. Nakamura, I.-J. Song, T. Ito, T. Ochiai, A. Kanno, T. Kameya, and M. Maki. 2005. Molecular phylogeny and evolution of alcohol dehydrogenase (*Adh*) genes in legumes. *BMC Plant Biol.* 5:6-15.
- Grierson, W. 1999. Beneficial aspects of stress on plants. In: *Handbook of Plant and crop stress*, 2nd edition, Pessaraki, M., ed. Dekker, New York. pp 1185-1198.
- Hoffman, N.E., A.F. Bent, and A.D. Hanson. 1986. Induction of lactate dehydrogenase isozymes by oxygen deficit in barley root tissue. *Plant Physiol.* 82:658-663.
- Ismail, A.M., E.S. Ella, G.V. Vergara, and D.J. Mackill. 2009. Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*).

- Annal. Bot. 103:197-209.
- Jeschke, W.D., E.A. Kirkby, A.D. Peuke, J.S. Pate, and W. Hartung. 1997. Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). J. Exp. Bot. 48:75-91.
- Johnson, J.R., B.G. Cobb, and M.C. Drew. 1994. Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of *Adh* null *Zea mays* L. Plant Physiol. 105:61-67.
- Kato-Noguchi, H., K-N., and M. Morokuma. 2007. Ethanolic fermentation and anoxia tolerance in four rice cultivar. J Plant Physiol. 164:168-173.
- Kerr, P.S., S.C. Huber, and D.W. Israel. 1984. Effect of N-source on soybean leaf sucrose phosphate synthase, starch formation and whole plant growth. Plant Physiol. 75:483-488.
- Kyozuka, J. M. Olive, W. Peacock, E. Dennis, and K. Shimamoto. 1994. Promotor elements required for developmental expression of the maize *Adh1* gene in transgenic rice. Plant Cell 6:799-810.
- Lefebvre, D.D., S.M.G. Duff, C.A. Fife, C. Julien-Inalsingh, and W.C. Plaxton. 1990. response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. Plant Physiol. 93:504-511.
- Mann, A.F., D.P. Hucklesby, and E.J. Hewitt. 1979. Effect of aerobic and anaerobic conditions on the in vivo nitrate reductase assay in spinach leaves. Planta 146:83-89.
- Matton, D.P., P. Constabel, and N. Brisson. 1990. Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. Plant Mol. Biol. 14:775-783.
- Mayne, R.G. and P.J. Lea. 1984. Alcohol dehydrogenase in *Hordeum vulgare*: Changes in isoenzyme levels under hypoxia. Plant Sci. Lett. 37:73-78.
- Peng, H-P., C-S. Chan, M-C. Shih, and S.F. Yang. 2001. Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 126:742-749.
- Robinson, W.D., J.Park, H.T. Tran, H.A. Del Vecchio, S. Ying, J.L. Zins, K. Patel, T.D. McKnight, and W.C. Plaxton. 2012. The secreted purple acid phosphatase isozymes *AtPAP12* and *AtPAP26* play a pivotal role in extracellular phosphate scavenging by *Arabidopsis thaliana*. J. Exp. Bot 63:6531-6542.
- Rudd, J.J., and V.E. Franklin-Tong. 2001. Unravelling response-specificity in Ca^{+2} signalling pathways in plant cells. New Phytologist. 151:7-33.
- Rufty, T.W., P.S. Kerr, and S.C. Huber. 1983. Characterization of diurnal changes in activities of enzymes involved in sucrose biosynthesis. Plant Physiol. 73:428-433.
- Sach, M.M., M. Freeling, and R. Okimoto. 1980. The anaerobic proteins of maize. Cell 20:761-767.
- Sander, D., C. Brownlee, J.F. Harper. 1999. Communicating with calcium. The Plant Cell 11:691-706.
- Sedbrook, J.C., P.J. Kronebusch, G.G. Borisy, A.J. Trewavas, and P.H. Masson. 1996. Transgenic aequorin reveals organ-specific cytosolic Ca^{+2} responses to anoxia in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Plant Physiol. 111:243-257.
- Solomon, L.P. and M.J. Barber. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. Annu. Rev. Plant Biol. 41:224-253.
- Subbaiah, C.C., J. Zhang, and M.M. Sach. 1994. Involvement of intercellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. Plant Physiol. 105:369-376.
- Subbaiah, C.C., D.S. Bush, and M.M. Sachs. 1998. Mitochondrial contribution to the anoxic Ca^{+2} signal in maize suspension-cultured cells. Plant Physiol. 118:759-771.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2002. Photosynthesis: carbon reaction p. 145-170. Plant Physiology, 3rd edition, Sinauer Associates, Massachusetts, USA.