Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2017;36(2):97-105. Korean
Published online 2017 June 30. https://doi.org/10.5338/KJEA.2017.36.2.16

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

수분스트레스가 케일 잎의 카로티노이드 및 프롤린 함량에 미치는 영향

이효준, 천진혁, 김선주*

충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과

Effects of Water Stress on Carotenoid and Proline Contents in Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) leaves

Hyo-Joon Lee, Jin-Hyuk Chun and Sun-Ju Kim* (Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea)

Received: 30 May 2010 / Revised: 15 June 2010 / Accepted: 22 June 2010

ORCID

Sun-Ju Kim

http://orcid.org/0000-0003-4872-9637

Abstract

BACKGROUND : Environmental stress has a major effect on the growth and yields of vegetables, and can significantly affect nutritionally important phytochemicals, causing large economic losses.

METHODS AND RESULTS : The present study was aimed at exploring the effects of water stress on the carotenoid and proline contents in kale leaves to understand drought tolerance of kale plants. Kale was randomly divided into two groups at 57 days after sowing (DAS). One of the groups was well-watered (WW) and the other was water stressed (WS). Harvesting of kale leaves was started one day after treatment (58 DAS) and continued for 10 days (~67 DAS). We investigated the status of plant growth (leaf number, length, width, fresh weight) of kale throughout the study. Carotenoid (lutein, α-carotene, zeaxanthin, β-carotene) and proline contents were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Our results showed that the total carotenoid contents ranged from 926.0 to 1,212.0 mg/kg dry wt. (at 3 and 2 days, respectively) in WW treatment and 887.8 to 1,157.4 mg/kg dry wt. (at 10 and 4 days, respectively) in WS treatment. The ratio of individual carotenoid to the total carotenoid contents of kale leaves was 51.4 for lutein, 4.44 for zeaxanthin, 2.76 for α-carotene, and 41.4% for β-carotene. Total carotenoid contents showed a significant reduction from 7 days (1,037.2 mg/kg dry wt.) to 10 days (887.8 mg/kg dry wt.) in WS treatment. The lutein content did not show a significant difference in WW between 7 and 10 days after treatment but showed a significant difference in WS treatment. The α-carotene content showed no significant difference between the treatments. However, zeaxanthin content was higher during 4−10 days and β-carotene content was lower during 6−10 days in WS than in WW on each harvest day. In WW, the proline content showed no significant difference, but in WS, the proline content started to increase at 7 days and almost doubled in 10 days.

CONCLUSION : The marked increase in zeaxanthin and proline contents in kale leaves indicated that the two phytochemicals are associated with drought tolerance in the plant.

Key words: Carotenoids, HPLC analysis, Kale, Proline, Water stress

서 론

케일(*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)은 양배추(B.

*Corresponding author: Sun-Ju Kim
Phone: +82-42-821-6738; Fax: +82-42-821-7142;
E-mail: kimsunju@cnu.ac.kr

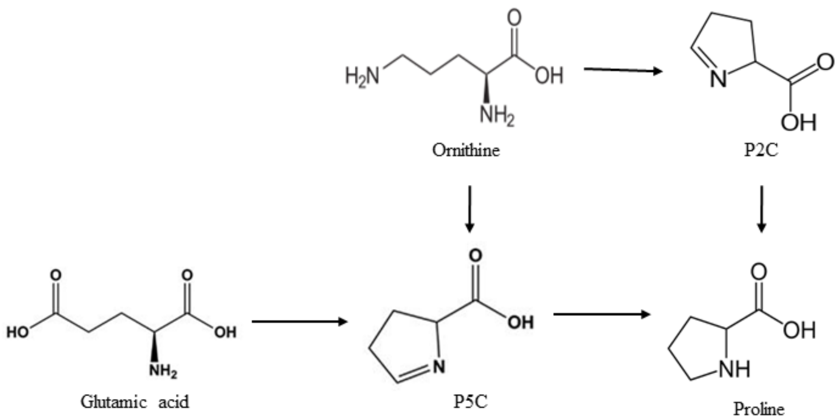

Fig. 1. The proline biosynthesis in plants (modified from Delauney *et al.*, 1993). P2C, delta-pyrroline-2-carboxylate; P5C, delta-pyrroline-5-carboxylate.

oleracea)의 가장 오래된 형태이며, 원산지는 유럽 서북부이다(Balkaya and Yanmaz, 2005). 비타민, 미네랄, 식이섬유, 항산화물과 같은 기능성 생리활성 물질을 다량 함유한 것으로 알려진 배추과(Brassicaceae)의 녹색 잎채소이며 같은 *B. oleracea* 작물로는 양배추, 브로콜리, 컬리플라워 등이 있다(Podse-dek, 2007). 케일은 다른 채소보다 루테인과 β-카로틴 함량이 높고(USDA, 2002), 항암물질로 알려진 글루코시놀레이트(glucosinolates, GSLs) 또한 다량 함유하고 있다(Schmidt *et al.*, 2010). 케일 잎은 쌈, 녹즙용, 샐러드용 채소로 이용된다(Heo *et al.*, 2015).

수분스트레스(water/drought stress)는 작물의 생산성을 크게 감소시키는 가장 대표적인 환경 스트레스이다. 농업 생산성을 높이기 위해서는 작물의 수분스트레스에 대한 저항성을 높여야한다. 따라서 작물의 내건성 기작의 이해와 내건성 작물 육종의 필요성이 커지고 있으며, 이에 대한 연구가 전 세계적으로 이루어지고 있다(Ok *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2006). 수분스트레스에 대한 반응들은 식물 종(species), 수분 부족 상태의 지속 시간 및 정도, 식물 생육 단계에 따라 다르게 나타나고(Bray, 1997), 식물 세포의 수분 결핍 현상 및 삼투적 충격을 유발한다(Zhu, 2002). 식물 생장은 수분스트레스에 의해 강한 영향을 받는데(Seki *et al.*, 2007), 약한(mild) 수분스트레스를 받은 식물에서 뿌리 생장은 증가하지만 줄기 생장은 감소한다. 그러나 극심한(severe) 수분스트레스 상황에서는 뿌리와 줄기의 생장 모두 감소한다(Finkelstein *et al.*, 2002). 수분스트레스를 받은 식물의 반응과 연관된 것으로 알려진 식물화학물질(phytochemicals)에는 카로티노이드, 프롤린, 앱시스산(Abscisic acid, ABA) 등이 있다.

먼저 카로티노이드는 탄소 40개의 기본 골격을 가지는 유기분자로 polyene chain과 최대 15개의 중합된 이중 결합을 가진다(Hirschberg, 2001). 카로티노이드는 600개 이상의 다양한 구조를 포함하며, 라이코펜(lycopene), β-카로틴과 같은 hydrocarbon 카로틴과 루테인(lutein), 제아크산틴(zeaxanthin)을 포함하는 xanthophyll로 나뉜다(Jaleel *et al.*, 2009). 식물에서 카로티노이드의 합성은 isopentenyl pyrophosphate (IPP)가 탄소 40개인 phytoene 물질을 합성하면서 시작된다(Fig. 2). Phytoene는 비환형 카로티노이드 최종 물질인 라이코펜으로 합성되고, 이것은 두 종류의 카로틴 물질로 전환되어 α-카로틴과, β-카로틴을 합성한다. α-카로틴이 두 단계의 수산화 반응을 거치면 루테인이 합성되고(①), β-카로틴이 동일한 반응을 거치면 제아크산틴이 생성된다(①′). 생합성 경로가 연장되면 루테인으로부터 합성된 네오산틴(neoxanthin)(②)과 제아크산틴으로부터 합성된 비올라크산틴(violaxanthin)(②′)이 xanthoxin으로 분해되고(③, ③′) 산화 과정을 거쳐 ABA가 합성된다(④)(Seo and Koshiba, 2002; Ha *et al.*, 2012).

식물이 수분스트레스를 받으면 증산으로 인한 수분 손실을 막기 위해 기공을 폐쇄하면서, 광 억제 현상이 일어난다. 즉 이산화탄소 흡수가 감소로 인한 이산화탄소 동화 억제를 초래하여 광합성능이 감소된다. 이 때 카로티노이드는 광 보호를 통해 광 억제로부터 식물을 보호한다. 또한 식물은 프롤린과 같은 용질을 잎에 축적하여 삼투 퍼텐셜을 감소시키는 삼투 조정은 잎으로의 수분 이동을 촉진시켜 기공 세포가 팽창되어 잎의 팽압을 유지시킨다(Hong, 2009). 삼투조정에 의한 기공세포의 팽창은 극심한 수분스트레스 동안 이산화탄소 동화를 가능하게 하여 식물 생장을 돕는다(Hare *et al.*, 1998). 프롤린은 식물에서 글루탐산(glutamic acid)(1.1)과 오르니틴(ornithine)(1.2)으로부터 합성되고, 스트레스 환경(고염, 고온, 건조)에서는 주로 글루탐산으로부터 합성된다(Delauney, 1993)(Fig. 1).

글루탐산 → P5C (delta-pyrroline-5-carboxylate)
→ 프롤린 (1.1)
오르니틴 → P5C/P2C (delta-pyrroline-2-carboxylate)
→ 프롤린 (1.2)

프롤린은 화합성 삼투 용질(compatible osmolytes)로서(Kishor *et al.*, 1995) 삼투 조정뿐만 아니라 세포막의 강도 보호와(Mansour *et al.*, 1998) 에너지, 아미노 질소의 저장

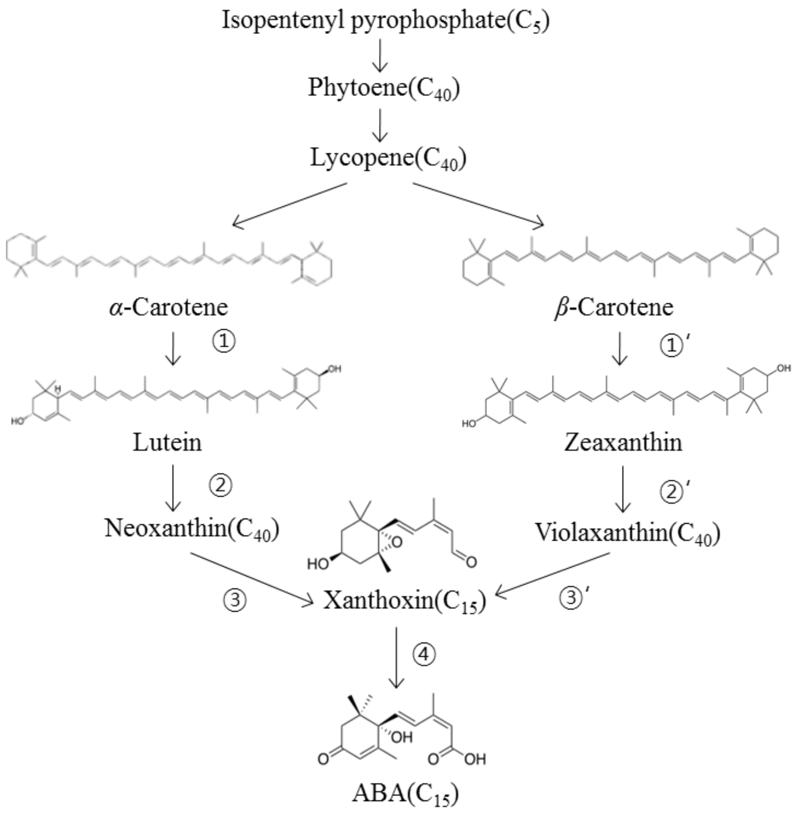

Fig. 2. The carotenoid biosynthesis in plants (modified from Bartley and Scolnik, 1995).

소이며(Verbruggen *et al.*, 1996), 탄소와 질소의 공급원으로도 사용된다(Peng *et al.*, 1996; Bartels and Sunkar, 2005). 또한 효소 변성을 방지하고(Rajendrakumar *et al.*, 1994), 세포막과 상호작용한다(Rudolph *et al.*, 1986). 특히 에너지, 아미노 질소의 저장은 세포의 빠른 항상성 복원과 수분스트레스 이후 회복과정에 중요한 역할을 한다(Verbruggen *et al.*, 1996).

수분스트레스 상태에서 잎 내 ABA 함량은 증가하면서 기공 폐쇄를 유도하여 증산작용에 의한 수분손실을 최소화시키고 탈수를 방지한다(Finkelstein *et al.*, 2002). 이러한 메커니즘을 통해 ABA는 건조, 고염과 같은 다양한 환경 스트레스 상태에서 탈수 방지, 광합성 기능 보호 등의 중요한 역할을 한다(Seo and Koshiba, 2002). ABA는 식물 전체와 세포 수준에서 건조에 따른 기공 전도 변화에 대한 신호 물질로도 잘 알려져 있으며(Bray, 1997), 식물의 생장과 발달 과정에서 종자의 발아와 생장, 휴면을 조절하는 중심적인 역할을 한다(Zhu, 2002; Bartels and Sunkar, 2005). 식물 체내에서 ABA는 주로 카로티노이드 중 루테인과 제아크산틴으로부터 생성된 xanthoxin을 통해 합성된다(Fig. 2)(Seki *et al.*, 2007).

20세기 중반 이후 급격히 발생한 지구온난화로 인해 가뭄 발생 빈도 증가로 작물은 수분스트레스를 받아 피해가 증가하고 있다. 이에 따른 작물의 식물의 내건성 기작 이해의 중요성이 커짐에 따라 관련 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 따라서 케일에 수분스트레스를 처리하여 수분스트레스와 내건성 기작과 연관된 것으로 알려진 카로티노이드, 프롤린과의 관계를 조사하였다.

재료 및 방법

시약

Dicholormethane (CH_2Cl_2)은 Merck KGaA (Dermstadt, Germany) 것을 사용하였고, ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$)는 Burdick & Jackson (Ulsan, Korea) 것을 사용하였다. Borate buffer (0.4 N in water, pH 10.2), OPA reagent (conc.), FMOC reagent (conc.), 22 amino acid 표준품은 Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, USA) 것을 사용하였다. *α*-Carotene, *β*-carotene 표준품은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) 것을 사용하였다. Ethanol (C_2H_5OH)과 hexane (C_6H_{14})은 Fisher Scientific Korea, Ltd. (Seoul, Korea) 것을 사용하였다. Methanol (CH_3OH)은 J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ, USA) 것을 사용하였고, potassium hydroxide (KOH)는 Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. (Siheung, Korea) 것을 사용하였다. Sodium phosphate monobasic monohydrate ($NaH_2PO_4 H_2O$)와 lutein, zeaxanthin 표준품은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA) 것을 사용하였고, trichloroacetic acid (CCl_3COOH)은

Samchun Pure Chemical Co., Ltd. (Pyeongtaek, Korea) 것을 사용하였다.

케일 재배 및 수분스트레스 처리

종자는 케일'TBC'로 아시아종묘(Asia seed Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 구입하였고, 유리 온실(충남대학교 농생대)에서 2015년 8월 19일에 파종하였다. 파종은 트레이(plug tray 72홀)에 원예용 상토(High, (주) 부농, 경주, 한국)를 채운 후 물을 적시고, 작은 홈을 내어 케일 종자를 심은 다음 다시 상토로 가볍게 덮어주었다. 수분 증발을 막기 위해 신문지로 덮고 물로 적신 후 그늘로 옮겨 싹이 나면 신문지를 제거한 뒤, 햇빛이 잘 드는 곳으로 옮겼다. 파종 후 21일(days after sowing, DAS)에 120 유묘 중 상태가 좋은 90 유묘를 골라내어 같은 상토를 채운 중형포트(18 cm×18 cm×20 cm)에 이식하였다. 그리고 2일에 한번 씩 지하수를 충분히 주었다. 총 재배기간 동안의 환경은 평균 온도 24.9℃, 습도 20%, 광량 321 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$이었다. 수분스트레스는 57 DAS부터 시작하여 대조구(well-watered treatment, WW)와 수분스트레스구(water stressed treatment, WS)로 나눠 WW 대조구에는 매일 지하수를 충분히 주었으며, WS 실험구에는 관수하지 않았다. 처리 시작 1일 후인 58 DAS(1 day)부터 WW 대조구와 WS 실험구를 10일 간 매일 총 10회(58~67 DAS) 수확하였다. 재배기간은 총 67일이었으며, 수확한 케일 잎은 생육상태(엽수, 엽장, 엽폭, 생체중) 측정한 뒤, -70℃ 급속 초저온 냉동고 (SFDSF 12, Samwon Freezing Engineering Co., Busan, Korea)에 보관하여 순차적으로 동결건조한 후에 막자와 막자사발로 분말하였다.

카로티노이드 추출

카로티노이드 추출 및 분석은 본 실험실에서 개발한 방법으로 수행하였다(Kim *et al.*, 2015). 분말 시료 500 mg을 칭량하여 50.0 mL-Falcon tube에 넣고 ethanol (5 mL)를 넣은 후, 진동혼합(vortex)하여 항온수조(75℃)에서 5분간 진탕하였다. 80% KOH (1.5 mL)를 넣고 다시 항온수조(75℃)에서 10분간 진탕하였다. 진탕 후에는 얼음(-0.5℃)에 넣어 1시간 반응을 정지시켰다. 그리고 초순수(2.5 mL)와 hexane (2.5 mL)을 넣고 진동혼합 한 뒤, 원심분리(3,000 rpm, 3 min)하였다. 그리고 상층액(hexane층)을 수거하여 농축플라스크에 담았다. 위 과정을 동일하게 총 3회 반복 실시하여 각 상층액을 모두 합하였다. 합한 상층액은 감압 농축기(40℃)로 농축한 후에, dichloromethane: methanol=50:50 (v/v) 1 mL를 넣고 sonicator에서(약 30초) 재용해하였다. 재용해한 용액은 0.45 μm hydrophilic PTFE syringe filter(직경 13 mm)로 여과 후, HPLC용 갈색 vial병에 넣어 HPLC로 분석하였다.

카로티노이드 HPLC 분석

YMC carotenoid C30 column (250×4.6 mm I.D., particle size 5 μm)을 장착한 HPLC (Perkin Elmer Flexar, Inc., MA, USA)를 사용하였다. 분석조건은 검출 파장(detection wavelength) 454 nm, 유량(flow rate) 1.0 mL/min, 컬럼 온도(column temperature) 40℃로 설정하였고, 시료는 자동 주입기로 10.0 μL 주입하였다. 이동상 용매를 A [water: methanol=25 : 75(v/v)]와 B (ethyl acetate)로 구성하여 사용하였다. 용매 구배는 용매 B를 기준으로 처음에 60%로 시작하여 4분에 70%까지 증가시키고, 9분에 75%로 증가시켜 20분까지 유지시켰다. 23분에 100%까지 증가시켜 28분까지 유지시키고, 28.1분에 60%로 급격히 감소시켜 35분까지 유지시켰다(총 분석시간 35분). 4가지 카로티노이드 외부표준물질(루테인, 제아크산틴, *α*-카로틴, *β*-카로틴)에 대응하는 HPLC 피크 면적과 이에 대응하는 시료의 면적을 비교 정량하였다.

프롤린 추출

프롤린의 추출 및 HPLC 분석은 Agilent Technologies에서 개발한 방법을 따랐다(Henderson *et al.*, 2000). 분말 시료 100 mg을 칭량하여 2.0 mL-Eppendorf tube에 넣고 5% trichloroacetic acid 수용액 1.2 mL을 넣은 후, 상온에서 1시간 정치하였다. 정치 후 원심분리(15,000 rpm, 15 min, 4℃)하여 상층액을 수거하였다. 수거한 용액은 0.45 μm hydrophilic PTFE syringe filter(직경 13 mm)로 여과 후, HPLC용 vial병에 넣어 HPLC로 분석하였다.

프롤린 HPLC 분석

Zorbax Eclipse AAA Analytical (150×4.6 mm I.D., particle size 5 μm)를 장착한 1200 series HPLC (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. 분석조건은 검출파장 262 nm, 유량 2.0 mL/min, 컬럼 온도 40℃로 설정하였다. 시료 1.0 μL와 혼합된 반응물질을 10.0 μL 주입하였고, 반응물질은 borate buffer 2.5 μL, OPA 0.5 μL, FMOC 0.5 μL, water (초순수) 32.0 μL의 혼합물이었다. 이동상 용매를 A[40 mM NaH_2PO_4, (pH 7.8)]와 B(acetonitrile: methanol: water=45:45:10)로 구성하여 사용하였다. 용매 구배는 용매 B를 기준으로 처음에 0%로 시작하여 1.9분까지 유지시킨 후, 21.1분에 57%로 급격히 증가시켰다. 21.6분까지 100%로 증가시켜 25분까지 유지시켰다. 25.1분에 0%로 급격히 감소시켜 30분까지 유지하였다(총 분석시간 30분). 아미노산 표준물질의 프롤린 HPLC peak 면적과 이에 대응하는 시료의 면적을 비교 정량하였다.

통계분석

HPLC분석 결과는 Microsoft Office Excel 2010을 이용하여 물질에 대한 함량의 평균값과 반복 (n=3)의 표준편차(SD, standard deviation)를 구하였다. 통계프로그램은 IBM SPSS® version 21을 사용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, 사후분석(post-hoc analysis)은 유의수준(P)을 0.05 이하로 설정한 Tukey 검정법이었다.

Table 1. Plant growth of kale leaves treated with well-watered (WW) and water stress (WS)

Treatmnet	Duration of water stress (days)	Leaf number	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Water content (%)
WW	1	14±1.5abc	26.9±2.5a	18.8±0.7a	113.3±8.1a	12.9±0.7a	88.6±0.2a
	2	12±0.0c	26.0±1.8a	18.9±0.3a	123.6±14.4a	14.5±2.2a	88.3±0.6a
	3	14±0.0abc	26.2±0.8a	19.2±0.5a	117.4±14.5a	11.7±3.3a	90.1±1.6a
	4	14±1.5abc	25.7±0.8a	18.7±1.2a	135.3±3.4a	14.9±1.9a	89.0±1.3a
	5	14±1.5abc	26.0±0.9a	17.5±4.7a	120.9±8.6a	16.0±5.4a	86.8±4.1a
	6	15±1.5abc	25.1±1.4a	17.8±1.9a	121.0±21.0a	15.0±2.8a	87.6±0.5a
	7	17±0.6a	25.6±1.1a	18.2±0.3a	143.1±12.3a	16.7±2.1a	88.3±0.4a
	8	13±1.2bc	24.5±2.3a	18.3±1.2a	117.8±8.7a	15.7±2.2a	86.7±1.1a
	9	16±0.6abc	24.0±0.8a	17.4±1.8a	145.3±15.5a	17.8±0.4a	87.7±1.1a
	10	16±0.6ab	25.9±2.5a	14.7±5.6a	151.5±24.0a	18.9±3.0a	87.5±0.3a
WS	1	13±1.0a	24.6±0.8ab	16.8±0.5a	86.6±14.2a	10.8±1.7a	87.5±0.6a
	2	12±0.6a	25.6±1.4a	17.9±1.2a	85.7±8.2a	10.9±0.4a	87.2±0.8a
	3	13±0.6a	24.0±1.8ab	16.9±1.9a	73.5±11.7ab	11.0±2.5a	84.8±3.5ab
	4	13±2.1a	24.1±2.0a	16.4±1.7a	66.8±16.4abc	11.8±2.4a	82.2±0.8ab
	5	13±1.2a	22.3±0.8ab	17.0±1.8a	62.6±26.6abcd	12.7±3.8a	78.1±9.1ab
	6	13±1.5a	24.4±1.1ab	16.4±1.6a	55.7±11.1abcd	10.4±1.2a	81.0±2.4ab
	7	13±0.6a	21.2±2.0b	15.0±1.0a	40.5±4.9bcd	9.1±0.9a	77.6±1.2ab
	8	12±0.6a	23.2±0.2ab	15.7±0.6a	43.8±5.3de	9.4±1.5a	78.2±5.3aaa
	9	12±0.6a	21.4±0.4b	14.9±1.4a	33.1±8.2de	8.6±1.2a	72.9±8.6bc
	10	13±0.6a	22.2±0.5ab	14.2±0.6a	26.3±2.6e	9.9±0.5a	68.2±4.5c

[a)]Within each column, values followed by the same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$, using Tukey's multiple range test (n=3).

결과 및 고찰

케일의 생장

WW 대조구(well watered treatment, WW)는 67 DAS (10 days)에서 케일의 엽수는 16장이었으며, 엽장 25.9 cm, 엽폭 14.7 cm, 생체중 151.5 g이었다(Table 1). WS 실험구 (water stress treatment, WS)는 엽수 13장, 엽장 22.2 cm, 엽폭 14.2 cm, 생체중 26.3 g이었다. WW 대조구에서는 엽수를 제외한 측정결과에서는 재배기간 동안 통계적 유의차가 없었다. WS 실험구의 엽수, 엽장, 건물중에서 통계적 유의차가 없었지만 생체중은 수분스트레스 기간이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며, WW 대조구의 생체중보다 크게 감소하였다. WS 실험구의 수분함량은 3 days부터 WW 대조구보다 조금씩 감소하여 수분스트레스 기간이 증가함에 따라 계속 감소하는 경향을 보였으며, 10 days (68.2%)에서 가장 낮았다. 소나무(*Pinus densiflora*)에 초기 위조 현상이 나타날 때까지 수분 공급을 제한하였을 때, 잎의 건물중이 감소하였으며 지상부(Shoot)와 지하부(Root)의 비(S/R)도 감소하였다(Kim *et al.*, 2014).

수분스트레스에 따른 카로티노이드 함량

케일 잎에서는 카로티노이드 4종류(루테인, 제아크산틴, α-카로틴, β-카로틴)가 검출되었다. 총 카로티노이드 함량 범위(최솟값~최댓값)는 WW 대조구에서 926.0 (3 days)~1,212.0 (2 days), WS 실험구에서 887.8(10 days)~1,157.7 (4 days) mg/kg dry wt.이었다(Table 2). 총 카로티노이드 함량 대비 성분별 평균 함량 비율은 루테인(51.4)>β-카로틴(41.4)>제아크산틴(4.44)>α-카로틴(2.76%) 순이었다. WW 대조구에서 총 카로티노이드 함량은 재배기간 동안 증감은 있었으나 일정한 경향성은 없었다. WS 실험구에서는 7 days부터 감소하는 경향을 나타내어 10 days에서는 WW 대조구보다 약 19.2% 감소하였다. 초기 위조 현상을 보일 때까지 수분 공급을 제한한 백합나무(*Liriodendron tulipifera* L.)의 잎에서도 카로티노이드 함량이 감소하였다(Kim and Han, 2015). 그러나 포플러(*Populus cathayana*)에 토양 수분 함량이 일정하게 유지되도록 조절하여 수분스트레스 상태를 6주 동안 유지시켰을 때, 잎 내 카로티노이드 함량은 약 1.6배 증가하였고(Xiao *et al.*, 2008), 일정기간 수분 공급을 하지 않은 상추(*Lactuca sativa* L.)내 카로티노이드 함량도 대조구보다 약 1.4배 증가하였다(Kang and Park, 2013).

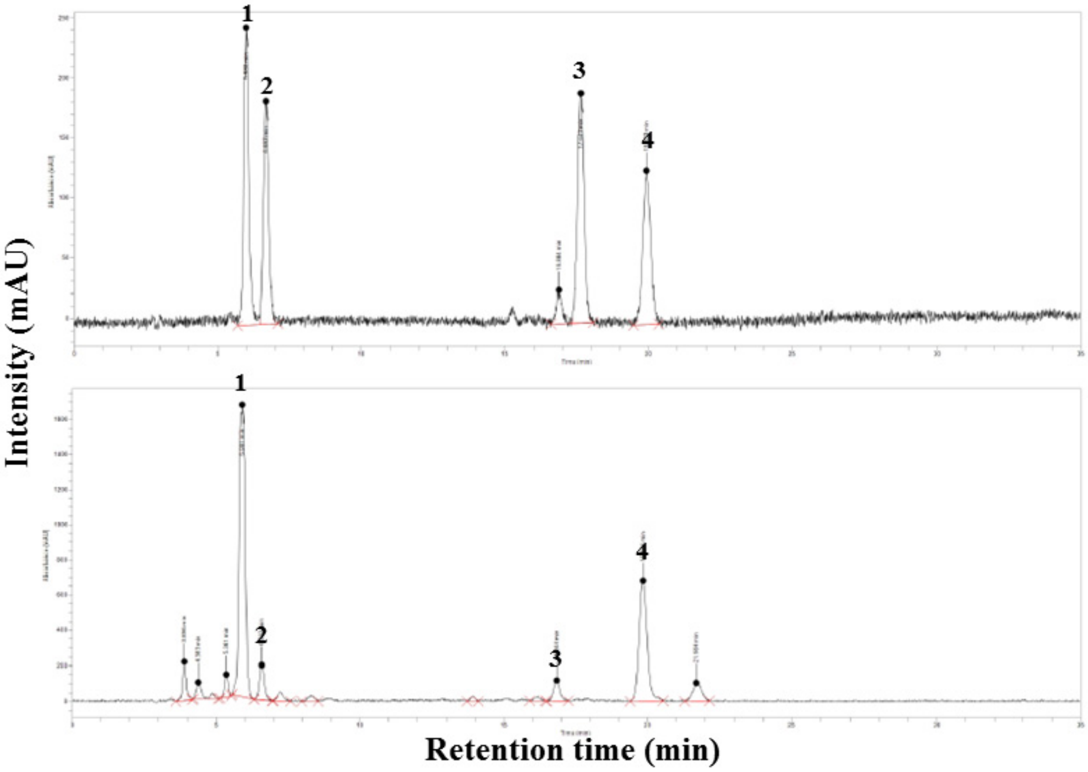

Fig. 3. HPLC chromatogram of four carotenoid standards and kale. Peak 1, Lutein; 2, Zeaxanthin; 3, α-Carotene; 4, β-Carotene.

Table 2. Carotenoid contents (mg/kg dry wt.) of kale leaves under well-watered (WW) and water stressed (WS) conditions

Duration of water stress (days)	Lutein		Zeaxanthin		α-Carotene		β-Carotene		Total	
	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS
1	514.4±37.1 a[a)]	545.6±27.4 ab	89.1±18.0 a	70.4±18.2 abc	23.6±2.3 a	26.6±6.4 a	388.7±85.2 ab	458.5±82.8 ab	1015.8±78.6 ab	1101.1±117.3 ab
2	571.7±39.7 a	575.4±14.8 ab	65.5±33.1 ab	23.1±6.5 cd	35.2±8.1 a	28.8±1.4 a	539.6±79.5 a	451.4±6.7 ab	1212.0±95..5 a	1078.7±20.4 ab
3	552.9±31.0 a	566.4±27.1 ab	15.6±6.7 b	33.4±13.0 bcd	21.3±7.1 a	32.7±4.2 a	336.2±99.6 b	504.6±38.4 a	926.0±140.2 b	1137.1±32.1 ab
4	554.7±11.6 a	584.1±20.9 a	41.1±9.4 ab	75.0±24.1 abc	31.7±2.1 a	28.6±5.1 a	506.5±40.7 ab	469.7±17.2 ab	1134.1±55.3 ab	1157.4±30.1 ab
5	550.0±16.2 a	525.6±10.1 ab	26.7±12.0 b	43.1±17.6 abcd	26.7±8.3 a	27.4±6.4 a	402.0±89.5 ab	425.2±80.9 ab	1005.4±117.1 ab	1021.4±79.7 ab
6	548.0±14.6 a	5 55.2±20.7 ab	22.9±6.5 b	91.0±10.7 a	30.8±2.0 a	29.0±2.8 a	463.5±27.5 ab	440.6±26.7 ab	1065.1±41.3 ab	1115.9±59.4 ab
7	557.9±16.3 a	528.8±12.0 ab	29.3±30.1 b	84.4±28.0 ab	38.4±4.8 a	24.2±2.0 a	538.0±74.4 a	399.7±63.8 ab	1163.5±55.1 ab	1037.2±78.4 ab
8	539.5±9.0 a	561.6±57.5 ab	23.4±5.1 b	43.8±15.0 abcd	32.0±3.0 a	26.8±8.1 a	466.5±20.2 ab	420.8±106.5 ab	1061.4±36.9 ab	1053.2±157.0 ab
9	557.6±27.8 a	532.2±35.9 ab	24.3±14.5 b	46.8±13.6 abcd	33.2±5.1 a	21.4±5.8 a	512.6±72.0 ab	350.6±77.5 ab	1127.6±91.8 ab	951.1±130.2 ab
10	556.7±11.2 a	497.5±46.0 b	40.0±13.9 ab	49.0±6.9 abcd	31.0±1.0 a	40.6±45.2 a	470.5±47.8 ab	300.7±46.1 b	1098.3±53.1 ab	887.8±133.0 b
Ave	**550.4±15.1**	**547.2±25.5**	**37.8±22.9**	**56.0±20.8**	**30.4±5.2**	**28.6±5.0**	**462.4±67.7**	**422.2±73.5**	**1080.9±84.3**	**1054.1±99.3**

[a)]Within each column, values followed by the same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$, using Tukey's multiple range test (n=3).

WW 대조구의 루테인 함량은 재배기간 동안 통계적 유의차가 없었다. WS 실험구의 루테인 함량은 처리기간 동안 유의차는 있었지만 WW 대조구와 비교하였을 때 함량의 변화가 크지 않았다. 그러나 9일 동안 관수하지 않고 재배한 콩(*Pisum sativum* L.) 잎 내 카로티노이드 분석한 결과, 루테인은 대조구보다 약 23.0% 감소하였다(Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998). *α*-카로틴의 함량은 WW 대조구와 WS 실험구에서 모두 재배/처리기간 동안 통계적 유의차가 없었다. WW 대조구의 제아크산틴 함량은 2 days (65.5)와 3 days (15.6 mg/kg dry wt.) 사이에서 68.0% 감소하였으나 이후 재배기간 동안 평균 37.8 mg/kg dry wt.로 큰 함량변화는 없었다. WS 실험구의 제아크산틴 함량은 3 days (33.4)에서 4 days (75.0 mg/kg dry wt.) 사이에 약 2.2배 증가하였으며, 3 days부터 10 days까지 각각의 수확일에서 WW 대조구보다 높았으며 6 days에서는 WW 대조구보다 약 4.0배 증가하여 가장 큰 증가를 보였다. 수분스트레스를 받은 콩 잎의 제아크산틴 함량도 4.8배 증가하였다(Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998). WW 대조구의 *β*-카로틴 함량은 'M'자 형태로 증감을 반복하였다. WS 실험구에서는 6 days부터 10 days까지 각각의 수확일에서 WW 대조구보다 낮았으며, 처리기

Table 3. Proline contents (mg/100g fresh wt.) in kale leaves under well-watered (WW) and water stressed (WS) conditions

Duration of water stress (days)	Proline	
	WW	WS
1	2.33±2.45a[a)]	1.52±0.24bc
2	1.50±0.87a	1.02±0.33c
3	0.68±0.30a	1.55±0.31bc
4	1.27±0.46a	1.49±0.51bc
5	0.95±0.08a	1.35±0.34c
6	1.10±0.29a	1.21±0.37c
7	1.10±0.06a	1.17±0.31c
8	1.12±0.21a	1.74±0.69c
9	1.63±0.43a	2.45±0.35b
10	1.98±0.11a	4.03±0.34

[a)]Within each column, values followed by the same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$, using Tukey's multiple range test (n=3).

간이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내어 10 days에서는 WW 대조구보다 36.1% 감소하였다. 이와 유사하게 수분스트레스를 받은 콩 잎의 β-카로틴 함량은 대조구보다 약 38.0% 감소하였다(Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998). WS 실험구의 루테인과 α-카로틴 함량은 수분스트레스에 의한 경향성은 없었다. 그러나 WS 실험구의 제아크산틴 함량은 3 days부터 WW 대조구의 함량보다 높았으며, β-카로틴 함량은 6 days부터 WW 대조구보다 낮았다. 수분스트레스 기간 동안 각 성분별 함량 변화의 유무는 카로티노이드 생합성 경로와 연관이 있는 것으로 생각된다(Fig. 2). α-카로틴과 α-카로틴의 수산화반응의 생성물인 루테인은 수분스트레스에 의한 함량 변화가 거의 없었다. 반대로 β-카로틴과 β-카로틴의 수산화반응의 생성물인 제아크산틴은 수분스트레스에 의한 함량 변화가 있었으며, 특히 수분스트레스에 의해 제아크산틴의 함량이 가장 두드러지게 증가하였다.

수분스트레스에 따른 프롤린 함량

WW 대조구의 프롤린 함량 범위는 0.68 (3 days)~2.33 (1 day)이었으며, WS 실험구에서는 1.02 (2 days)~4.03(10 days) mg/100g fresh wt.이었다(Table 3). WW 대조구의 프롤린 함량은 수분스트레스 동안 통계적 유의차가 없었다. WS 실험구의 프롤린 함량은 1 day부터 6 days 동안 1.02 (2 days)~1.55 (3 days) mg/100g fresh wt.였으나, 7 days (1.17)부터 10 days (4.03 mg/100g fresh wt.)까지 처리기간이 길어질수록 증가하여 10 days에 가장 높았다. 그리고 3 days부터 10 days까지 각각의 수확일에서 WS 실험구의 프롤린 함량이 WW 대조구보다 높았고, 10 days에서는 WW 대조구보다 약 2.0배 높았다. 수분스트레스 처리기간이 1 day에서 10 days로 증가하였을 때, WS 실험구의 프롤린 함량은 약 2.7배 증가하였다. 수분 공급을 하지 않은 병아리콩 (*Cicer arietinum* L.) 잎에서도 프롤린 함량이 증가하였으며 영양생장기에서는 약 10배 이상 증가하였고(Mafekery *et al.*, 2010), 또한 수분스트레스를 받은 포플러 잎에서도 프롤린 함량이 대조구보다 약 4.0배 이상 증가하였다(Xiao *et al.*, 2008). 이와 같은 WS 실험구의 프롤린 함량 증가는 수분스트레스로 인한 탈수로부터 식물을 보호하고, 삼투 포텐셜을 낮추는 삼투 조정 메커니즘(Xiao *et al.*, 2008)과 관련된 것으로 보인다.

Acknowledgment

This research was supported by Golden Seed Project (311022-05-5-SB020), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Ministry of Oceans and Fisheries, Rural Development Administration and Korea Forest Service.

References

Aktas, L. Y., Türkyilmaz, B., Akça, H., & Parlak, S. (2007). Role of abscisic acid and proline treatment on induction of antioxidant enzyme activities and drought tolerance responses of *Laurus nobilis* L. seedling. C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi Cilt 28 Sayı 1.

Balkaya, A., & Yanmaz, R. (2005). Promising kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) populations from Black Sea region, Turkey. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 33, 1-7.

Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. Plant Sciences, 24, 23-58.

Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. Trends in Plant Science, 2, 48-54.

Chaves, M. M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. Journal of Experimental Botany, 42, 1-16.

Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant Journal, 4(2), 215-223.

Demmig-Adams, B., & Adams, W. W. (2002). Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. Science, 298, 2149-2153.

Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. L, & Rock, C. D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. The Plant Cell, 14 (Suppl 1), S15-S45.

Ha, S. H., Jeong, Y. S., Lim, S. H., Kim, J. K., Lee, D. H., Lee, J. Y., & Kim, Y. M. (2012). Carotenoid metabolic engineering in flowering plants. Korean Journal of Science Technology, 30(2), 107-122.

Hare, P. D., Cress, W. A., Staden, J. V. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant, Cell and Environment, 21, 535-553.

Henderson, J. W., Ricker, R. D., Bidlingmeyer, B. A., & Woodward, C. (2000). Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids. Agilent Technologies Technical Note 5980-1193E.

Heo, J. W., Kim, H. H., Lee, K. J., Yoon, J. B., Lee, J. K., Huh, Y. S., & Lee, K. Y. (2015). Effect of supplementary radiation on growth of greenhouse-grown kales. Korean Journal of Environmental Agriculture, 34(1), 38-45.

Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. Current Opinion in Plant Biology, 4, 210-218.

Hong, Y. N. (2009). Introduction of Plant Physiology (4th) (eds. Hopkins, W. G., Hüner, N. P. A.), pp. 230, 244, 246-248. World Science Publishing, Seoul, Korea.

Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P. R., Arrese-Igor, C., & Becana, M. (1998). Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. Plant Physiology, 116, 173-181.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants : A review on morphological characteristics and pigments composition. International Journal of Agriculture and Biology, 11, 100-105.

Jeong, N. R., Chun, J. H., Park, E. J., Lim, Y. H., & Kim, S. J. (2015). Variations of glucosinolates in kale leaves (*Brassica oleracea* var. *acephala*) treated with drought-stress in autumn and spring seasons. CNU Journal of Agricultural Science, 42(3), 167-175.

Kang, S. J., & Park, M. (2013). Relationship between relative water content and ascorbate redox enzymes activity in lettuce leaves subjected to soil water stress. Korean Journal of Soil Science and Fertilizer, 46(1), 32-39.

Kim, G. N., & Han, S. H. (2015). Effects on growth, photosynthesis and pigment contents of *Liriodendron tulipifera* under elevated temperature and drought. Korean Journal of Agricultural and Forest Meteorology, 17(1), 75-84.

Kim, G. N., Han, S. H., Park, G. S. (2014). Differences on growth, photosynthesis and pigment contents of open-pollinated *Pinus densiflora* families under elevated temperature and drought. Korean Journal of Agricultural and Forest Meteorology, 15(4), 285-296.

Kim, H. K., Chun, J. H., Kim S. J. (2015). Method development and analysis of carotenoid compositions in various tomatoes. Korean Journal of Environmental Agriculture, 34(3), 196-203.

Kishor, P. B. K., Hong, Z., Miao, G. H., Hu, C. A. A., & Verma, D. P. S. (1995). Overexpression of delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confer osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiology, 108, 1387-1394.

Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., & Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97(6), 2940-2945.

Kozlowski, T. T., & Pallardy, S. G. (2002). Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. The Botanical Review, 68(2), 270-334.

Lefsrud, M., Kopsell, D., Wenzel, A., & Sheehan, J. (2007). Changes in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny. Scientia Horticulturae, 112, 136-141.

Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. C., & Sohrabi, Y. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. Australian Journal of Crop Science, 4(8), 580-585.

Mansour, M. F. (1998). Protecion of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. Plant Physiology and Biochemistry, 36(10), 767-772.

Oh, C. Y., Han, S. H., Kim, Y. Y., & Lee, J. C. (2005). Changes of drought tolerance and photosynthetic characteristics of Poplulus davidiana dode according to REG concentration. Korean Journal of Agricultural and Forest Meteorology, 7(4), 296-302.

Perng, Z., Lu, Q., & Verma, D. P. S. (1996). Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. Molecular Genetics and Genomics, 253(3), 334-341.

Podse-dek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. LWT – Food Science and Technology, 40, 1-11.

Rajendrakumar, C. S., Reddy, B. V., & Reddy, A. R. (1994). Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase. Biochemical and biophysical research communications, 201(2), 957-963.

Rudolph, A., Crowe, J. H., & Crowe, L. M. (1986). Effects of three stabilizing agents-proline, betaine, and trehalos-on membrane phospholipids. Archives of Biochemistry and Biophysics, 245(1), 134-143.

Schmidt, S., Zietz, M., Schreiner, M., Rohn, S., & Kroh, L. W., Krumbein, A. (2010). Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). Food Chemistry, 119, 1293-1299.

Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., & Shinozaki, K. (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. Current Opinion in Plant Biology, 10, 296-302.

Seo, M., & Koshiba, T. (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. Trends in Plant Science, 7(1), 41-48.

Verbruggen, N., Hua, X. J., May, M., & Montagu, M. V. (1996). Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: Evidence for a negative transcriptional regulator. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93, 8787-8791.

Xiao, X., Xu, X., & Yang, F. (2008). Adaptive responses to progressive drought stress in two *Poplulus cathayana* populations. Silva Fennica, 42(5), 705-179.

Xiong, L., Wang, R. G., Mao, G,. & Koczan, J. M. (2006). Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. Plant Physiology 142:1065-1074.

Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Biology, 53, 247-273.