

Abscisic acid 농도에 따른 밀 종자의 발아와 단백질체의 발현 특성

정재혁¹ · 김대욱¹ · 황운하¹ · 안승현¹ · 정한용¹ · 이현석¹ · 최인배¹ · 최경진¹ · 윤종탁¹ · 윤성중^{2,†}

Germination and Proteome Profile Characteristics of Wheat Seeds Treated under Different Concentrations of Abscisic Acid

Jae-Hyeok Jeong¹, Dae-Wook Kim¹, Woon-Ha Hwang¹, Sung-Hyun An¹, Han-Yong Jeong¹, Hyeon-Seok Lee¹, In-Bea Choi¹, Kyung-Jin Choi¹, Jong-Tak Yun¹, and Song Joong Yun^{2,†}

ABSTRACT This study was conducted to investigate the germination and proteome profile characteristics of wheat seeds treated under various concentrations of abscisic acid (ABA). After-ripening, the seeds of three wheat cultivars (Baegjoong, Keumkang, and Uri) showing different levels of dormancy were used. Germination index and germination rate of the cultivars was higher than 0.95% and 98%, respectively, and these were not significantly different under 0, 10, 30, and 50 μM ABA at 7 d after germination. However, the growth of the shoot and radicle was significantly inhibited at 10, 30, and 50 μM ABA compared to that at 0 μM ABA. Mean ABA content of the embryos of seeds germinated at 0 and 50 μM ABA for 7 d was 0.8 and 269.0 ngmg^{-1} DW, respectively. Proteins extracted from embryos germinated for 4 d were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis, and proteins showing a difference of 1.5-fold or greater in their spot volume relative to that of 0 μM ABA were identified. The expression of four protein spots increased at 50 μM ABA and two protein spots were detected only at 50 μM ABA; these six proteins were all identified as globulin types. Conversely, the expression of three protein spots decreased at 50 μM ABA and were identified as cytosolic glutamine synthetase, isocitrate dehydrogenase, and S-adenosylmethionine synthetase 2. In conclusion, ABA did not inhibit the germination rate regardless of pre-harvest sprouting characteristics of the cultivars. However, the growth of the shoot and radicle was significantly inhibited by ABA, most likely through the down regulation of glutamine, methyl group donor, and polyamines biosynthesis, among others, while accompanied by globulin accumulation in the embryos.

Keywords : ABA, germination, globulin, proteome, wheat

밀은 전 세계적으로 재배되고 있는 가장 중요한 작물 중의 하나이고, 세계인구 40% 이상의 주요 식량 자원이다(Shewry, 2009). 종자 휴면은 유리한 조건에서 손상되지 않은 살아있는 종자의 발아를 막는 적응 형질인데(Hilhorst, 1995), 밀은 신속하고 균일한 발아를 얻기 위해 종자의 휴면이 약한 자원이 선택되는데, 이로 인하여 수확 전에 습한 조건에서 발아하는 수발아에 대한 감수성이 증가한다(Simpson, 1990).

밀의 휴면성은 종자의 배아에 성장 억제 호르몬의 일종인 abscisic acid (ABA)를 처리했을 때 나타나는 발아 억제 현상과 관련이 깊은 것으로 알려져 있다(Walker-Simmons,

1987). 휴면 타파를 촉진시키는 처리들은 종자 내의 호르몬 함량과 민감성 변화와 관련된다. 밀에서의 호르몬 관련 변화 및 휴면 소거를 유발하는 후속은 ABA와 indole acetic acid (IAA)에 대한 종자의 감수성의 감소와 관련이 있다(Liu *et al.*, 2013). ABA는 저농도에서 종자의 휴면을 적극적으로 유도하고 종자의 발아를 억제하는 식물호르몬이다(Kucera *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2016). 종자는 발아 과정에서 ABA 함량과 ABA 민감성에 영향을 받고, ABA는 배아의 세포벽 이완을 방지하여 수분흡수를 억제할 뿐만 아니라 배아 부위 종피보다는 배아의 파열을 특이적으로 억제한다

¹농촌진흥청 국립식량과학원 작물재배생리과 (Crop Production and Physiology Research Division, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea)

²전북대학교 농업생명과학대학 작물생명과학과 (Department of Crop Science & Biotechnology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea)

[†]Corresponding author: Song Joong Yun; (Phone) +82-63-270-2508; (E-mail) sjyun@jbnu.ac.kr

<Received 6 September, 2017; Revised 14 December, 2017; Accepted 23 December, 2017>

다(Müller *et al.*, 2006). 밀 종자의 ABA 민감성은 배아보다 배아 이외의 부분에서 더 크고(Mares, 1998), 유전자원에 따라서도 차이가 있다(Nyachiro *et al.*, 2002).

종자의 발아와 휴면 등은 유전적 및 환경적 요인의 영향에 의해 생성된 다양한 종류의 단백질들에 의해 표현되고 조절되는 생리적 현상이다. 따라서 다수 다종의 단백질들의 집단(단백질체, proteome)을 분석하면 다양한 생리적 현상의 인과관계를 이해하는데 필요한 정보를 얻을 수 있다(Bove *et al.*, 2005). 단백질체 분석의 가장 기본적인 방법인 이차원젤 전기영동(two dimensional gel electrophoresis, 2DGE)을 이용하면 단백질체의 생성과 분해 등 경시적 변화 경향을 파악하고 이를 바탕으로 단백질체와 생리적 특성과의 관계를 추론하여 이해할 수 있다. 벼 및 다른 식물에서 GA- 및 ABA-반응성 단백질을 분석하는 데에도 2-DE 이 효과적으로 이용되었다(Tanaka *et al.*, 2004; Pawlowski, 2007). 그 결과 벼 종자의 초기 발달 과정에서 대사관련 효소(fructokinases), 산소-무독화효소(glutathione-S-transferase, ascorbate peroxidase), 구조 단백질(b-expansin, caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase), 방어 단백질(ABA-induced protein, OsIFR, OsPR10) 및 신호 단백질(nucleoside-diphosphate kinases, NDPK) 등이 ABA와 GA에 의해서 극적으로 조절되는 것을 확인하였다(Kim *et al.*, 2008).

ABA는 밀 종자의 휴면과 발아에 영향을 주는 중요한 호르몬이지만, 발아 과정 중에 배아에서 ABA와 반응하여 어떤 단백질이 증가하거나 감소하는지에 대한 연구는 거의 없다. 따라서 본 연구는 ABA가 밀에서 발아와 발아 종자의 배아 내의 단백질체 발현에 미치는 영향을 조사하고 생리적 특성을 이해하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물 재료

한국의 밀 품종 중에서 발아지수가 각각 0.94, 0.61, 및 0.07로서 종자 휴면성의 차이가 큰 백중밀, 금강밀 및 우리밀을 시험재료로 이용하여 후숙한 종자의 발아와 발아 종자 중의 단백질체 발현에 미치는 abscisic acid (ABA)의 영향을 조사하였다. 시험 재료로 이용된 3품종의 밀은 전라북도 완주군 소재 농촌진흥청 국립식량과학원 발작물 시험포장에서 농촌진흥청의 맥류 표준재배법에 준하여 재배하였다. 종자는 2015년 10월 중순에 파종하였고, 성숙한 종자는 2016년 6월에 수확하였다. 수확한 종자는 상온의 실험실에서 보관하여 후숙시켰고 당해 연도 11월에 시험에 사용하였다.

ABA 농도에 따른 발아 특성의 조사

성숙한 밀 종자와 배아는 ABA 민감성에 따라 50 μ M ABA에서 발아율이 각각 약 30%와 약 90%로 큰 차이를 보이므로(Walker-Simmons, 1987), 본 시험은 0, 10, 30 및 50 μ M ABA에서 발아와 관련된 특성을 조사하였다.

선발된 밀 품종 종자의 ABA 농도에 따른 발아지수와 발아율은 반복당 종자 30립씩 6반복으로 조사하였다. 일회용 발아접시(직경 100 mm \times 높이 15 mm)에 여과지 1장을 깔고 종구를 아래로 향하도록 종자를 치상한 다음, 0, 10, 30 및 50 μ M의 ABA (s-(+)-abscisic acid, Tokyo Chemical) 용액을 5 ml씩 첨가하여 뚜껑이 열리지 않도록 점착 테이프로 밀봉하였다. 발아접시를 20°C의 암조건에서 7일 동안 정치시키면서 발아율 등을 조사하였으며, 균류와 세균으로 오염된 종자는 조사에서 제외하였다(Kim *et al.*, 2012). 발아지수는 아래와 같이 측정하였다.

$$\frac{7 \times N1 + 6 \times N2 + 5 \times N3 + 4 \times N4 + 3 \times N5 + 2 \times N6 + 1 \times N7}{7 \times \text{전체립수}}$$

여기에서 N1, N2, N3, N4, N5, N6과 N7은 각 일자에 발아된 종자립수를 나타낸다. 즉, 종자가 조사 1일째에 모두 발아했을 경우의 발아지수는 1로서 최고치를 나타내며, 7일째에도 발아된 종자가 없는 경우의 발아지수는 0으로 최저치를 나타내게 된다(Reddy *et al.* 1985; Kim *et al.*, 2012). 유아 및 유근 길이는 20°C에서 암조건으로 7일 동안 발아한 균일한 유묘를 선별하여 조사하였다.

ABA 처리구에서 발아한 종자의 배아 내 ABA 함량

20°C의 암조건에서 0 μ M 또는 50 μ M ABA로 7일 동안 배양하여 발아한 종자를 채취하여 -80°C에서 보관하였다. 발아한 종자는 동결건조 시키고 유근과 유아를 제거하여 배아를 적출하였다. 적출된 배아는 즉시 액체질소를 이용하여 마쇄하고 -80°C에 보관하였다. 건조한 배아 분말 0.01 g에 메탄올 1 ml (0.45mM butylated hydroxytoluene와 2.38 mM citric acid monohydrate가 함유됨)을 첨가하여 4°C에서 교반하면서 약 16시간 동안 추출하였다. 추출액을 2,000 g로 원심분리하여 얻은 상징액을 취하여 메탄올과 증류수가 제거될 때까지 농축시켰다. 농축된 추출액은 10% 메탄올 1 ml에 재현탁시켜 ABA 측정용 시료로 이용하였다. ABA 함량은 Phytodetek ABA Test Kit (Agdia)를 이용하여 405 nm에서 측정된 흡광도를 이용하여 조사하였다(Walker-Simmons, 1987).

배아의 단백질체 분석

밀 종자를 20°C의 암조건에서 0 μ M 또는 50 μ M ABA로 4일 동안 발아시킨 후 생장이 균일한 유묘를 채취하여 -80°C에 보관하였다. 채취된 발아 종자를 동결건조하고 유아와 유근을 제거한 다음 배아를 적출하고 액체질소로 마쇄하여 약 100 mg의 분말시료를 준비하여 단백질 추출용 시료로 이용하였다. 각각의 시료는 trichloroacetic acid (TCA)/acetone extraction buffer[10% TCA, 0.07% 2-mercaptoethanol]를 이용하여 -20°C에서 1시간동안 배양하면서 단백질 이외의 불순물을 제거하였다. 펠렛 상태의 단백질을 wash buffer [0.07% 2-mercaptoethanol, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), EDTA-free proteinase inhibitor]를 이용하여 정제하였고, 펠렛을 상온에서 30분 이내로 건조시켰다. 펠렛 상태의 단백질을 lysis buffer[LBTT: 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 18 mM Tris-HCl (pH 8.0), 14 mM Tris, 0.2% Triton X-100, EDTA-free proteinase inhibitor, 50 mM dithiothreitol (DTT)]로 용해시켰으며, 원심분리하여 얻은 상층액을 2DGE용 단백질 시료로 사용하였다. 시료는 ProteoExtract™ Protein Precipitation Kit (Calbiochem)을 이용하여 다시 정제하였고, 2-D Quant Kit (GE Healthcare)로 단백질 농도를 측정하였다(Kim *et al.*, 2012).

추출된 단백질체는 2DGE 방법을 이용하여 젤 내에서 공간적으로 분리시켰다(Westermeier *et al.*, 2008). 단백질을 1차원적으로 분리시키는 등전점 전기영동(isoelectric focusing, IEF)은 IPG (immobilized pH gradient, pH 4-7, 24 cm) strip gel을 이용하여 실시하였다. IPG strip gel은 상온에서 15시간 동안 단백질 추출액이 포함된 용액(2.0% IPG buffer)으로 재수화시켰다. IPG strip gel에 부하된 단백질의 IEF는 IPGphor unit (GE-Healthcare)을 이용하여 수행하였으며 최종 70,000 Vh가 되도록 설정하였다.

IPG strip은 1% DTT를 함유한 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS)로 15분간 처리한 후, 이어서 2.5% iodoacetamide가 함유된 equilibration buffer로 15분간 처리하였다. 이후 단백질 2차 분리과정인 변성 폴리아크릴아미드젤 전기영동(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)은 분리용 젤(DALT VI, GE-Healthcare, 12.5% gel)을 이용하여 12°C에서 1시간동안 1.5 W/gel로 전기영동한 이후 5시간동안 10 W/gel로 유지하여 수행하였다. 2DGE가 완료된 젤의 단백질 spot은 coomassie brilliant blue (CBB) R-250을 사용하여 염색하였으며, 염색된 2DGE 젤을 스캐닝하여 TIFF 파일로 저장하였다. 2DGE 젤의 단백질 spot에 대한 양적 분석은 ImageMaster 2D platinum software (ver. 7.0, GE-

Healthcare)를 사용하여 실시하였다. 단백질 spot의 상대값(% volume)은 전체 단백질 spot의 발현양에 대한 개별 단백질 spot의 발현양으로 계산하였으며, 독립적으로 작성된 젤 이미지를 1반복으로 하여 3회 반복 수행하였다. 단백질 spot에 대한 양적 분석결과, 0 μ M ABA와 비교하여 50 μ M ABA 처리에서 단백질 발현양이 0.8배 이하로 감소하거나 1.2배 이상으로 증가한 단백질 spot을 선정하여 질량분석 및 동정을 수행하였다.

단리된 단백질의 질량은 트립신으로 분해시켜 얻은 펩티드를 이용하여 결정하였다(Shevchenko *et al.*, 2007). 단백질 spot은 젤에서 분리한 이후에 30% 메탄올로 2회 세척하고, 50% acetonitrile과 10 mM NH_4HCO_3 로 불순물을 제거시켰다. 젤 조각은 100% acetonitrile로 탈수시킨 이후 건조시켰다. 젤은 50 mM NH_4HCO_3 에서 100 ng/ μ L 트립신을 이용하여 재수화시켰고, 37°C에서 약 16시간 분해시켰다. 트립신 펩티드는 50 mM NH_4HCO_3 와 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)를 함유한 50% acetonitrile에서 추출하여 질량을 분석하였다.

질량분석은 한국기초과학지원연구원의 MALDI TOF/TOF mass spectrometer와 LC/ESI ion Trap mass spectrometer로 수행하였고, 단백질 spot별 MS spectrum 정보는 MASCOT 소프트웨어(Matrix Science, London, U.K.)를 이용하여 NCBI와 SwissProt의 식물 단백질 database에서 검색하였다.

통계분석

통계분석은 R (3.4.1) 프로그램을 이용하여 성적의 분산 분석(ANOVA)과 T-검정(T-test)을 실시하고 처리평균간 유의성을 검정하였다. 처리평균간 유의성은 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

ABA 농도에 따른 발아 특성

ABA 농도에 따른 백중밀, 금강밀, 우리밀의 발아지수, 발아율, 유아 길이, 유근 길이는 Table 1과 같다. 3품종의 평균 발아지수와 발아율은 0, 10, 30 및 50 μ M ABA에서 각각 0.95 이상과 98% 이상이었으며, 발아지수와 발아율 모두 처리 농도 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 발아지수와 발아율은 금강밀이 다른 품종보다 다소 낮았다. 하지만 유아와 유근의 생장은 0 μ M ABA에 비하여 10, 30 및 50 μ M ABA에서 크게 억제되었다(Table 1 & Fig. 1).

ABA는 종자의 발아 억제에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Kucera *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2016). 밀 배아의

ABA 민감성은 봄 밀 10가지 유전자형에서는 25 μ M ABA 이상에서 차이를 보였고(Nyachiro *et al.*, 2002), 가을 밀의 2가지 유전자형에서는 0.5 μ M ABA 이상에서 차이를 보였다(Walker-Simmons, 1987). 종자경도가 다른 연질밀과 경질밀의 발아율은 300 μ M ABA에서 모두 90% 이상이어서

0 μ M ABA에서의 발아율과 큰 차이를 보이지 않다. 유아와 유근의 길이는 발아조사 3일째 이후에는 300 μ M ABA 처리구에서 크게 감소되었지만, 7일째 이후에는 300 μ M ABA 처리와 0 μ M ABA 처리 간에 차이가 크지 않다고 보고된 바 있다(Yu *et al.*, 2016).

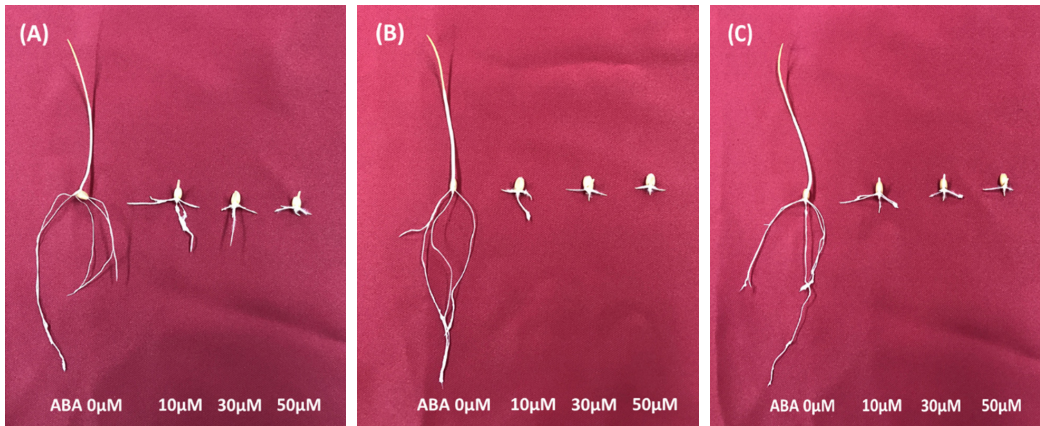


Fig. 1. Growth of shoots and roots of germinated seeds of three Korean wheat cultivars, Baegjoong (A), Keumkang (B), and Uri (C), germinated under different ABA concentrations for 7 d.

Table 1. Germination characteristics of seeds of three Korean wheat cultivars (Baegjoong, Keumkang, and Uri) germinated under different ABA concentrations for 7 d.

ABA concentration (μ M)	Cultivar	Germination Index (0-1)	Germination (%)	Shoot length (cm)	Radicle length (cm)
0	Baegjoong	0.97 \pm 0.027	98.8 \pm 2.92	7.8 \pm 0.89	10.4 \pm 0.91
	Keumkang	0.91 \pm 0.009	99.4 \pm 1.36	6.6 \pm 0.57	10.2 \pm 1.41
	Uri	0.98 \pm 0.013	100.0 \pm 0.00	8.0 \pm 0.86	10.4 \pm 1.40
	Average	0.95	99.4	7.5 ^{a,†}	10.3 ^a
10	Baegjoong	0.99 \pm 0.005	100.0 \pm 0.00	1.9 \pm 0.55	3.8 \pm 0.78
	Keumkang	0.92 \pm 0.017	100.0 \pm 0.00	1.3 \pm 0.19	2.3 \pm 0.58
	Uri	0.99 \pm 0.006	100.0 \pm 0.00	1.1 \pm 0.25	2.3 \pm 0.87
	Average	0.97	100.0	1.4 ^b	2.8 ^b
30	Baegjoong	0.95 \pm 0.040	96.5 \pm 4.52	1.5 \pm 0.45	2.2 \pm 1.17
	Keumkang	0.94 \pm 0.020	98.9 \pm 1.75	1.1 \pm 0.14	1.4 \pm 0.29
	Uri	0.99 \pm 0.013	99.4 \pm 1.36	0.6 \pm 0.09	1.1 \pm 0.53
	Average	0.96	98.3	1.1 ^b	1.6 ^c
50	Baegjoong	0.97 \pm 0.033	97.7 \pm 2.75	1.2 \pm 0.29	1.2 \pm 0.48
	Keumkang	0.93 \pm 0.018	99.4 \pm 1.36	0.8 \pm 0.22	0.9 \pm 0.13
	Uri	0.99 \pm 0.004	100.0 \pm 0.00	0.6 \pm 0.17	1.0 \pm 0.44
	Average	0.96	99.1	0.9 ^b	1.0 ^c
ANOVA [‡]		ns	ns	**	**

[†]Duncan's multiple range test, $P < 0.05$. Values in the same line with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

[‡]ANOVA P values: ** $P < 0.01$.

벼 종자의 0~50 μM ABA에서의 발아율 및 유근과 유아의 생장을 조사한 결과, ABA 농도가 증가하면서, 발아율은 50 μM ABA에서 20% 수준으로 감소하였고, 유근과 유아의 생장은 10 μM ABA에서 감소하기 시작해서 50 μM ABA에서는 생장이 거의 이루어지지 않았다(Liu *et al.*, 2015). ABA는 커피 배아의 팽창을 억제하여 발아를 포함한 후속 과정을 억제하고, 이후 1 mM ABA를 물로 교체하면 정상적인 발아가 진행된다고 하였다(Da Silva *et al.*, 2008).

ABA는 발아과정뿐만 아니라 발아 이후의 과정에도 깊게 관여하지만, 식물종과 유전자형에 따라 다양한 민감성 범위를 가지는 것으로 알려져 있다.

ABA 처리 배아의 ABA 함량

0 μM ABA와 50 μM ABA 처리구에서 발아한 종자의 배아에 함유되어 있는 ABA 함량은 Table 2와 같다. 배아의 ABA 함량은 0 μM ABA에서는 백중밀, 금강밀 및 우리밀이 각각 0.76, 0.74 및 0.83 ng/mg이었고, 50 μM ABA에서는 백중밀, 금강밀 및 우리밀이 각각 287.41, 222.77 및 296.94 ng/mg으로 처리농도 및 품종 간에 통계적으로 유의한 차이를 보였는데, 금강밀이 다른 품종보다 다소 낮았다.

Yu *et al.* (2016)은 0.01% ABA (378 μM ABA)에서 발아가 억제된 밀 종자와 100 μM H_2O_2 에서 발아가 촉진된 밀 종자의 단백질을 비교한 결과, ABA가 아밀라아제와 헥소키나아제와 같은 가수분해 효소의 활성을 억제한다고 보고하였다. 또한 Gómez-Cadenas *et al.* (2001)은 ABA와 GA에 대해 종자의 발아가 차이를 보이는데, ABA에 의해 유도된 모종의 단백질이 아밀라아제 발현의 억제를 매개할

수 있다고 하였다. 따라서 배아의 ABA 함량에 따라 탄수화물 가수분해효소의 발현이 조절되어 결과적으로 유아와 유근 생장에 영향을 미친 것으로 생각된다.

ABA 농도에 따른 배아의 단백질체 특성

2DGE 젤에서 각각의 등전점 및 분자량에 따라 분리된 단백질체의 각 구성요소는 spot들로 검출되었다(Fig. 2). 3 품종의 밀 배아에서 검출된 spot들의 분포 양상은 품종 및 0 μM ABA와 50 μM ABA 처리 간에 명확한 차이를 보였다. 육안 및 ImageMaster software를 이용한 이미지 분석에 의해 발현양상의 변화가 확인된 18개 단백질 spot의 발현량의 변화 양상은 Fig. 3과 같다. 0 μM ABA에 비하여 50 μM ABA에서 발현양이 증가한 단백질 spot (S1, S3, S4, S6, S15, S16, S17)은 7개였으며, 감소한 단백질 spot (S5, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S18)은 8개였고, 증가와 감소가 동시에 이루어진 단백질 spot (S2)은 1개였다. 50 μM ABA에서만 확인된 단백질 spot (S7, S8)은 2개였다. 유의미한 발현량의 차이를 보이는 단백질 spot 18점의 이름과 기능을 MALDI TOF/TOF mass spectrometer와 LC/ESI ion Trap mass spectrometer로 동정한 결과는 Table 3과 같다.

각 단백질 spot은 0 μM ABA 처리구와 비교하여 50 μM ABA 처리구에서 변화된 양을 평균 배수 값(fold 값)으로 표시하였다. 평균 fold 값이 1.5 이상으로 증가한 단백질 spot은 S1 (globulin-3A), S6 (globulin-1 S allele), S16 (golbulin-1 S allele) 및 S17 (globulin-1 S allele)이었고, 이들은 모두 globulin에 속하는 단백질이었다. 또한 ABA 처리구에서만 확인된 단백질 spot인 S7 (globulin 3)과 S8 (globulin-1 S allele)도 globulin 단백질이었다.

밀의 배아에는 globulin(glo)-3-like peptide 등 총 5종의 glo-3계 단백질이 조직 특이적으로 존재한다(Kozioł *et al.*, 2012). 또한 Yang *et al.* (2013)은 중국 밀 품종 SN1391의 배아에서 globulin 3이 발아 직후보다 발아 35시간 후에 2.5배 증가한다고 보고하였다. 한편 밀 배아를 삼투압 스트레스 조건에서 조직배양하면 globulin 1S와 globulin 3A가 증가하여 수분 결핍 조건에서 저항력을 향상시키는 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다(Kacem *et al.*, 2016). 수분 결핍 스트레스는 밀에서 ABA 함량의 급격한 상승을 유도하는데, 이때의 ABA함량은 수분결핍에 대한 저항성 밀이 민감성 밀보다 많다고 하였다(Saeedipour, 2013). 따라서 50 μM ABA에서 globulin류 단백질이 증가한 것은 ABA에 의해 이들 단백질의 발현이 영향을 받았기 때문인 것으로 생각된다.

또한 *Vicia sativa* 종자에는 globulin이 배아와 자엽에 존재하며, 발아가 시작해서 뿌리가 종피를 뚫고 나올 때는 배

Table 2. ABA contents in the embryos of three Korean wheat cultivars (Baegjoong, Keumkang, and Uri) germinated under different ABA concentrations for 7 d.

ABA concentration (μM)	Cultivar	ABA content (ng/mg)
0	Baegjoong	0.76
	Keumkang	0.74
	Uri	0.83
	Average	0.78
50	Baegjoong	287.41
	Keumkang	222.77
	Uri	296.94
	Average	269.04
T-test [†]		**

[†]T-test P values: ** $P < 0.01$.

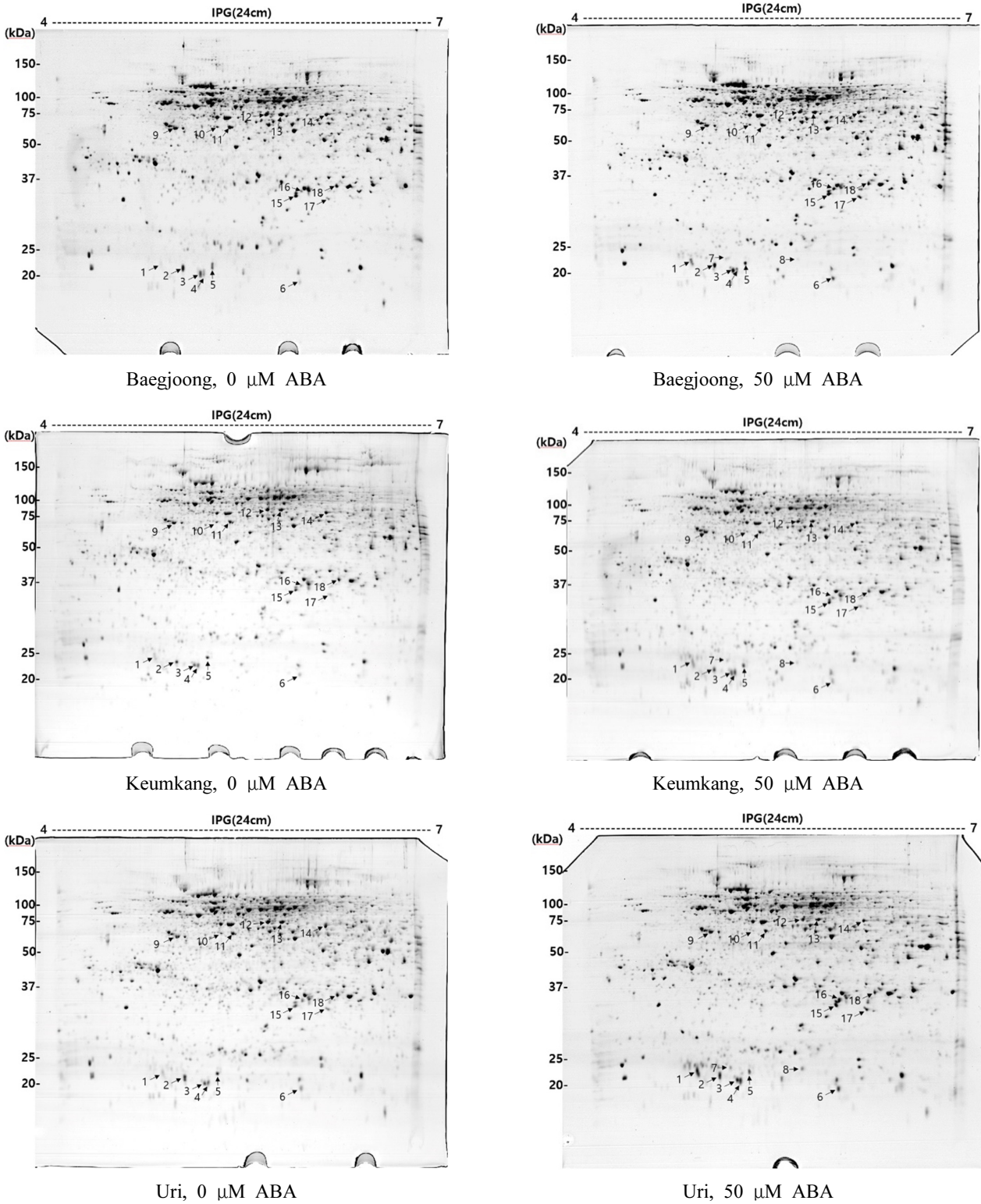


Fig. 2. Representative 2DGE gels showing protein spots from embryos of three Korean wheat cultivars (Baegjoong, Keumkang, and Uri). Seeds were incubated for 4 d at 20°C in the dark at ABA concentrations of 0 or 50 μM prior to harvesting. Total proteins extracted with LB-TT were separated by 2DGE. An equal amount of total proteins (300 μg) was loaded on each gel. Numbered arrows indicate proteins showing significant quantitative changes at 0 and 50 μM ABA treatments. First dimension (right to left): IEF (pI 4-7) and second dimension (top to bottom): SDS-PAGE (12.5%).

아의 globulin을 소모하고, 그 이후에는 시스테인 단백질과 mRNA에 의해 자엽에 있는 globulin의 소모가 유도된다고 하였다(Schlereth *et al.*, 2000). *Arabidopsis thaliana*에 존재하는 시스테인 단백질 분해효소를 억제하는 *AtCYSa*는 발아 과정 중에 높은 염농도, 수분 결핍, 산화성 물질, 추위와 같은 다양한 환경적 스트레스에서 발현이 강하게 유도되는

유전자인데, 이 유전자의 프로모터 영역은 탈수-반응 요소와 ABA-반응 요소를 함유하고 있다(Zhang *et al.*, 2008). 따라서 외부의 ABA에 의해서 *AtCYSa*와 같은 유전자 발현에 의해 시스테인 단백질 분해효소가 억제됨에 따라 globulin이 이용되지 못하고 축적된 것으로 추정된다.

평균 fold 값이 0.7 이하로 감소한 단백질 spot은 S10 (glutamine synthetase cytosolic isozyme, GS), S12 (S-adenosylmethionine (SAM) synthetase (SAMS) 2), S14 (isocitrate dehydrogenase NADP, NADP-ICD)이었다. GS는 옥수수에서 질소를 이용하는 연결 고리의 중심 구성요소이며, 아미드 글루타민에서 암모니움 축적을 촉매하는 역할을 한다(Hirel *et al.*, 2005). GS 유전자인 *Gln1;2*는 애기장대에서 발아하는 종자의 질소 재이동에 매우 중요한 역할을 하며, *Gln1;1*은 외부에 존재하는 질소에 관여하기 위해 1차 뿌리 발생의 반응에 영향을 미치므로(Guan *et al.*, 2015), glutamine이 발아 초기의 뿌리 발생에 깊게 관여한다는 것을 의미한다. 또한 NADP-ICD는 glutamate 합성에 필요한 2-oxoglutarate를 합성할 수 있다(Gálvez *et al.*, 1999). Glutamate는 발아 이후 유아가 성장하는 동안, 특히 1차 NO₃가 없을 때 glutamate dyhydrogenase를 통해 glutamine 합성에 필요한 NH₃를 전달한다(Glevarec *et al.*, 2004). 따라서 ABA에 의해 glutamine 합성에 관여하는 다양한 효소의 발현이 하향 조절되어 유아와 유근의 성장을 억제한 것으로 생각된다.

SAMS는 ATP와 L-methionine을 기질로 이용하여 SAM을 생성하는 유일한 효소이다. SAM은 다양한 생물학적 반응에 이용되며 메티오닌 대사의 중심역할을 한다(Martinez-Lopez *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2002). SAM은 보편적인 메틸기 공여체로서 효소에 의해 촉매되는 다수의 반응에 관여한다. 또한 SAM은 에틸렌과 폴리아민의 전구체로 작용하고(Roje, 2006), 폴리아민은 화분 발아와 화분관 신장에 중요하다(Wolukau *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2016). 따라서 50 μ M ABA 처리구에서 SAMS의 발현이 감소되어 메틸기 전이 활성이 저하되고, 이에 따라 폴리아민 생합성이 감소되어 유아와 유근의 생장이 현저히 억제된 것으로 생각된다.

적 요

휴면성이 다른 백중밀, 금강밀, 우리밀 후숙종자의 ABA 농도에 따른 발아 및 배아에서의 단백질체 발현 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 백중밀, 금강밀, 우리밀 등 3품종의 0, 10, 30 및 50 μ M ABA에서의 평균 발아지수와 발아율은 각각 0.95

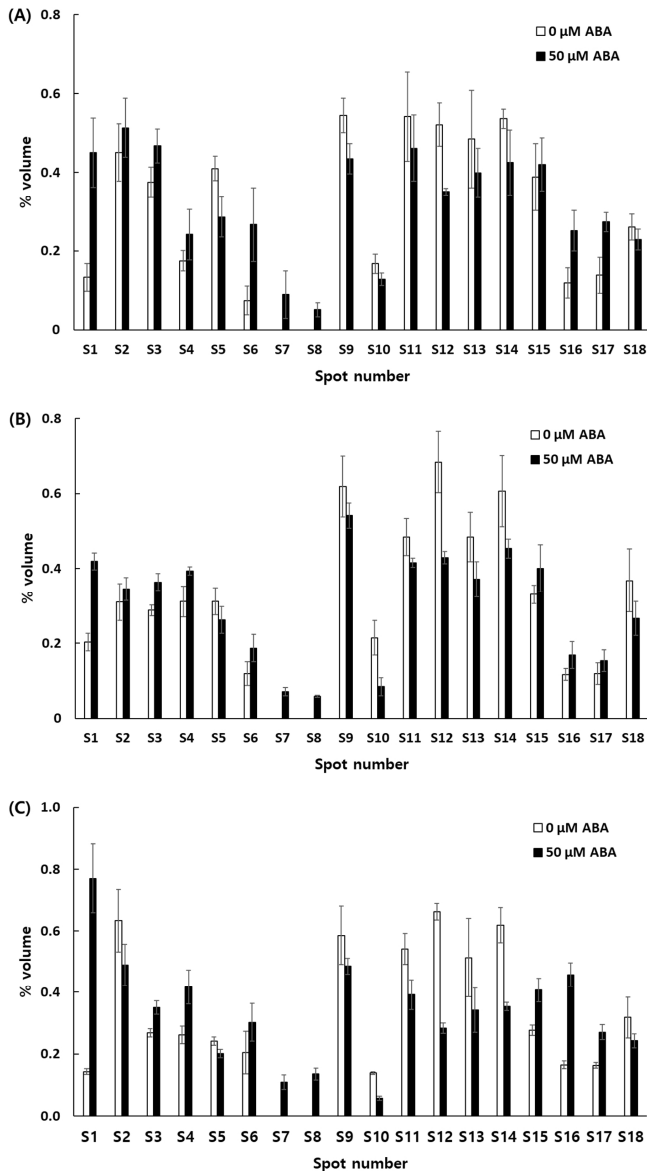


Fig. 3. Graphical presentations of mean spot volume of 21 selected protein spots from the cultivars Baegjoong (A), Keumkang (B), and Uri (C). Proteins were extracted from seeds germinated for 4 d at 20°C in the dark at ABA concentrations of 0 or 50 μ M. The relative spot volume was determined using the ImageMaster 2D Platinum imaging software. Values are means of three replications. Bars indicate standard errors of the mean.

Table 3. Identification of the differentially expressed protein spots on 2DGE gel by using MALDI TOF/TOF mass spectrometer and LC/ESI ion trap mass spectrometer. Fold difference information of the protein spots at 50 μ M ABA was displayed relative to that at 0 μ M ABA.

Spot No.	Score	MW (Da) /pI	Accession	Protein name	Function	Up/Down (Fold)			
						Baeg joong	Keum kang	Uri	mean
1	320	66627/8.48	gi 390979705	Globulin-3A	Seed storage protein	Up (3.4)	Up (2.1)	Up (5.4)	Up (3.6)
2	119	16302/5.41	gi 974605	Single-stranded nucleic acid binding protein	Seed embryo protein, cold stress responsive	Up (1.1)	Up (1.1)	Down (0.8)	-
3	136	16043/6.28	gi 114145394	Glycine-rich RNA-binding protein	Cold stress responsive	Up (1.2)	Up (1.3)	Up (1.3)	Up (1.3)
4	67	16043/6.28	gi 114145394	Glycine-rich RNA-binding protein	Stress responsive	Up (1.4)	Up (1.3)	Up (1.6)	Up (1.4)
5	122	16302/5.18	gi 974605	Single-stranded nucleic acid binding protein	Seed embryo protein, cold stress responsive	Down (0.7)	Down (0.8)	Down (0.8)	Down (0.8)
6	154	51841/6.81	gi 475542024	Globulin-1 S allele	Seed storage protein	Up (3.6)	Up (1.6)	Up (1.5)	Up (2.2)
7	187	66652/7.78	gi 215398470	Globulin 3	Seed storage protein	ABA 50 μ M [†]	ABA 50 μ M	ABA 50 μ M	-
8	121	55586/7.76	gi 474323981	Globulin-1 S allele	Seed storage protein	ABA 50 μ M	ABA 50 μ M	ABA 50 μ M	-
9	193	37647/5.02	gi 475626178	Adenosine kinase 2	ATP metabolism	Down (0.8)	Down (0.9)	Down (0.8)	Down (0.8)
10	744	38316/5.69	GLNA1_DAUCA	Glutamine synthetase cytosolic isozyme	Nitrogen metabolism	Down (0.8)	Down (0.4)	Down (0.4)	Down (0.5)
11	181	39401/5.41	gi 71361900	Glutamine synthetase isoform GS1a	Nitrogen metabolism	Down (0.9)	Down (0.9)	Down (0.7)	Down (0.8)
12	520	31545/7.34	gi 115589746	S-adenosylmethionine synthetase 2	Polyamine metabolism	Down (0.7)	Down (0.6)	Down (0.4)	Down (0.6)
13	480	43277/5.61	gi 669029002	Unnamed protein product	Unknown	Down (0.8)	Down (0.8)	Down (0.7)	Down (0.8)
14	355	47717/5.99	gi 473933356	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	ATP metabolism	Down (0.8)	Down (0.7)	Down (0.6)	Down (0.7)
15	472	22044/5.73	gi 42391858	Cold shock domain protein 3	Stress responsive	Up (1.1)	Up (1.2)	Up (1.5)	Up (1.3)
16	279	51841/6.81	gi 475542024	Globulin-1 S allele	Seed storage protein	Up (2.1)	Up (1.4)	Up (2.8)	Up (2.1)
17	176	51841/6.81	gi 475542024	Globulin-1 S allele	Seed storage protein	Up (2.0)	Up (1.3)	Up (1.7)	Up (1.6)
18	246	23609/5.79	gi 5923877	Glutathione S-transferase	Signal transduction	Down (0.9)	Down (0.7)	Down (0.8)	Down (0.8)

[†]Protein spots (spot no. 7, 8) were detected only at 50 μ M ABA.

와 98% 이상으로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 유아와 유근의 생장은 0 μ M ABA보다 10, 30 및 50 μ M ABA에서 생장이 크게 억제되었는데, ABA 농도가 높을수록 생장이 더 억제되었다.

2. 3품종 배아의 평균 ABA 함량은 0 μ M ABA와 50 μ M

ABA에서 각각 0.78 ng/mg과 269.04 ng/mg으로서 농도에 따른 ABA 함량의 차이가 컸다.

3. 0 μ M ABA 처리구에 비하여 50 μ M ABA 처리구에서 발현양이 증가한 단백질 spot (S1, S3, S4, S6, S15, S16, S17)은 7개였으며, 감소한 단백질 spot (S2, S5,

- S9, S10, S11, S12, S13, S14, S18)은 8개였고, 증가와 감소가 동시에 이루어진 단백질 spot (S2)은 1개였다. 50 μ M ABA에서만 검출된 단백질 spot (S7, S8)은 2개였다.
4. 각 단백질 spot의 0 μ M ABA 처리구 양에 대한 50 μ M ABA 처리구 양의 평균 배수 값(fold 값)이 1.5배 이상으로 증가한 단백질 spot은 S1 (globulin-3A), S6 (globulin-1 S allele), S16 (globulin-1 S allele), S17 (globulin-1 S allele) 등으로 모두 globulin류 단백질이었다. 또한 50 μ M ABA에서만 확인된 단백질 spot인 S7 (globulin 3)과 S8 (globulin-1 S allele)도 globulin 단백질이었다.
 5. 각 단백질 spot의 0 μ M ABA 처리구 양에 대한 50 μ M ABA 처리구 양의 평균 배수 값(fold 값)이 0.7 이하로 감소한 단백질 spot은 S10 (glutamine synthetase cytosolic isozyme), S12 (S-adenosylmethionine synthetase 2), S14 (isocitrate dehydrogenase NADP)이었다.

이상의 결과는 ABA에 의한 밀 유묘의 유아와 유근의 생장억제는 배아에서의 ABA 농도 증가, 그리고 이에 따른 배아의 glutamine 합성에 관여하는 다양한 효소의 발현 감소 및 메틸기공여물질의 감소와 이에 따른 메틸기 전이활성의 감소 등이 관여하고 있음을 의미한다. 한편 배아에서의 ABA에 의한 globulin 단백질의 증가는 배아 특이적 globulin의 일시적 합성 증가와 globulin 분해 효소의 활성 억제 등이 복합적으로 관여한 결과로 생각된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 시험연구과제 ‘밀의 등숙기간 중 고온과 토양수분조건이 휴면성에 미치는 영향 구명(PJ01149901)’의 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌(REFERENCES)

- Bove, J., P. Lucas, B. Godin, L. Ogé, M. Jullien, and P. Grappin. 2005. Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana glauca*. *Plant Mol. Biol.* 57(4) : 593-612.
- Chen, Y., T. Zou, S. and McCormick. 2016. S-adenosylmethionine synthetase 3 is important for pollen tube growth. *Plant Physiol.* doi: org/10.1104/pp.16.00774.
- Da Silva, E. A. A., P. E. Toorop, A. A. M. Van Lammeren, and H. W. M. Hilhorst. 2008. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* ‘Rubi’) seed germination. *Ann. Bot.-London* 102(3) : 425-433.
- Gálvez, S., M. Lancien, and M. Hodges. 1999. Are isocitrate dehydrogenases and 2-oxoglutarate involved in the regulation of glutamate synthesis? *Trends Plant Sci.* 4(12) : 484-490.
- Glevarec, G., S. Bouton, E. Jaspard, M.-T. Riou, J.-B. Cliquet, A. Suzuki, and A. M. Limami. 2004. Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* 219(2) : 286-297.
- Gómez-Cadenas, A., R. Zentella, M. K. Walker-Simmons, and T.-H. D. Ho. 2001. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *The Plant Cell* 13(3) : 667-679.
- Guan, M., I. S. Moller, and J. K. Schjoerring. 2015. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms play specific roles for seed germination and seed yield structure in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 66(1) : 203-212.
- He, M., C. Zhu, K. Dong, T. Zhang, Z. Cheng, J. Li, and Y. Yan. 2015. Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential expression proteins involved in wheat seed germination. *BMC Plant Biol.* 15 : 97.
- Hilhorst H. W. M. 1995. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Sci. Res.* 5 : 61-73.
- Hirel, B., A. Martin, T. Tercé-Laforgue, M. B. Gonzalez-Moro, and J. M. Estavillo. 2005. Physiology of maize I: a comprehensive and integrated view of nitrogen metabolism in a C4 plant. *Physiol. Plant.* 124(2) : 167-177.
- Kacem, N. S., S. Mauro, Y. Muhovski, F. Delporte, J. Renaut, A. Djekoun, and B. Watillon. 2016. Diagonal two-dimensional electrophoresis (D-2DE): a new approach to study the effect of osmotic stress induced by polyethylene glycol in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Mol. Biol. Rep.* 43(9) : 897-909.
- Kim, D. W., H. S. Kim, H. H. Park, J. J. Hwang, S. L. Kim, J. E. Lee, G. H. Jung, T. Y. Hwang, J. T. Kim, S. J. Kim, R. Randeep, and Y. U. Kwon. 2012. Characterization of grain amino acid composition and proteome profile of a high-lysine barley mutant line M98. *Korean J. Crop Sci.* 57(2) : 171-181.
- Kim, K.-H., C.-S. Kang, J.-C. Park, S.-H. Shin, J.-N. Hyun, and C. S. Park. 2012. Evaluation of pre-harvest sprouting in Korean wheat cultivar. *Kor. J. Breed. Sci.* 44(4) : 526-537.
- Kim, S. T., S. Y. Kang, W. Wang, S. G. Kim, D. H. Hwang, and K. Y. Kang. 2008. Analysis of embryonic proteome modulation by GA and ABA from germinating rice seeds. *Proteomics* 8(17) : 3577-3587.
- Kozioł, A. G., E. Loit, M. McNulty, A. J. MacFarlane, F. W. Scott, and I. Altosaar. 2012. Seed storage proteins of the globulin family are cleaved post-translationally in wheat embryos. *BMC Res. Notes* 5 : 385.
- Kucera, B., M. A. Cohn, and G. Leubner-Metzger. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15(4) : 281-307.

- Liu, A., F. Gao, Y. Kanno, M. Jordan, Y. Kamiya, M. Seo, and B. Ayele. 2013. Regulation of wheat seed dormancy by after-ripening is mediated by specific transcriptional switches that induce changes in seed hormone metabolism and signaling. *PLoS One*. 8 : 1-18.
- Liu, S. J., H. H. Xu, W. Q. Wang, N. Li, W. P. Wang, I. M. Moller, and S. Q. Song. 2015. A proteomic analysis of rice seed germination as affected by high temperature and ABA treatment. *Physiol. Plant*. 154(1) : 142-161.
- Mares, D. 1998. The seed coat and dormancy in wheat grains. In: WeiprD (ed) Eighth International Symposium on Pre-harvest Sprouting in Cereals. Association of Cereal Research Federal Centre for Cereal Potato and Lipid Research. Detmold, Germany. pp: 77-81.
- Martinez-Lopez, N., M. Varela-Rey, U. Ariz, N. Embade, M. Vazquez-Chantada, D. Fernandez-Ramos, L. Gomez-Santos, S. C. Lu, J. M. Mato, and M.L. Martinez-Chantar. 2008. S-Adenosylmethionine and proliferation: new pathways, new targets. *Biochem. Soc. T*. 36 : 848-852.
- Müller, K., S. Tintelnot, and G. Leubner-Metzger. 2006. Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 47(7) : 864-877.
- Nyachiro, J. M., F. R. Clarke, R. M. DePauw, R. E. Knox, and K. C. Armstrong. 2002. The effects of cis-trans ABA on embryo germination and seed dormancy in wheat. *Euphytica* 126(1) : 129-133.
- Pawlowski, T. A. 2007. Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: Influence of abscisic and gibberellic acids. *Proteomics* 7(13) : 2246-2257.
- Reddy, L., R. Metzger, and T. Ching. 1985. Effect of temperature on seed dormancy of wheat. *Crop Sci*. 25(3) : 455-458.
- Roje S. 2006. S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* 67: 1686-1698.
- Saeedipour, S. 2013. Relationship of Grain Yield, ABA and proline accumulation in tolerant and sensitive wheat cultivars as affected by water stress. *PNAS India B*. 83(3) : 311-315.
- Schlereth, A., C. Becker, C. Horstmann, J. Tiedemann, and K. Muntz. 2000. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *J. Exp. Bot*. 51(349) : 1423-1433.
- Sharma, S., H. Dhaliwal, D. Multani, and S. Bains. 1994. Inheritance of preharvest sprouting tolerance in *Triticum aestivum* and its transfer to an amber-grained cultivar. *J. Heredity* 85(4) : 312-314.
- Shen, B., C. Li, and M. C. Tarczynski. 2002. High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the Arabidopsis S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. *Plant J*. 29 : 371-380.
- Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen, and M. Mann. 2007. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc*. 1(6) : 2856-2860.
- Shewry P. R. 2009. Wheat. *J. Exp. Bot*. 60(6) : 1537-1553.
- Simpson G. M. 1990. Seed Dormancy in Grasses. Cambridge University Press. Cambridge. UK.
- Tanaka, N., H. Konishi, M. M. K. Khan, and S. Komatsu. 2004. Proteome analysis of rice tissues by two-dimensional electrophoresis: an approach to the investigation of gibberellin regulated proteins. *Mol. Genet. Genomics* 270(6) : 485-496.
- Walker-Simmons, M. 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol. Bioch*. 84(1) : 61-66.
- Westermeier, R., T. Naven, and H.-R. Hopker. 2008. Proteomics in Practice : A Guide to Successful Experimental Design, 2nd, Completely Revised Edition. Wiley-VCH, Germany. pp: 309-356.
- Wolukau, J. N., S. L. Zhang, G. H. Xu, and D. Chen. 2004. The effect of temperature, polyamines and polyamine synthesis inhibitor on in vitro pollen germination and pollen tube growth of *Prunus mume*. *Sci. Hort*. 99 : 289-299.
- Yang, Weibing, T. Cai, Y. Li, J. Guo, D. Peng, D. Yang, Y. Yin, and Z. Wang. 2013. Effects of exogenous abscisic acid and gibberellic acid on filling process and nitrogen metabolism characteristics in wheat grains. *Aust. J. Crop. Sci*. 7(1) : 58-65.
- Yu, H., L. L. Wang, X. Y. Chen, Y. Yang, X. R. Yu, Z. Wang, and F. Xiong. 2016. Effects of exogenous gibberellic acid and abscisic acid on germination, amylases, and endosperm structure of germinating wheat seeds. *Seed Sci. Technol*. 44(1) : 64-76.
- Yu, Y. L., S. M. Zhen, S. Wang, Y. P. Wang, H. Cao, Y. Z. Zhang, J. R. Li, and Y. M. Yan. 2016. Comparative transcriptome analysis of wheat embryo and endosperm responses to ABA and H₂O₂ stresses during seed germination. *BMC Genomics* 17(1) : 97.
- Zhang, X., S. Liu, and T. Takano. 2008. Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, *AtCYSa* and *AtCYSb*, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. *Plant Mol. Biol*. 68(1-2) : 131-143.