

염 환경하에서 근대(*Beta vulgaris* var. *cicla*)의 생장과 항산화효소(SOD, APX, GR)의 활성변화

배정진* · 추연식 · 송승달

경북대학교 자연과학대학 생물학과

Changes of Growth and Antioxidative Enzyme(SOD, APX, GR) Activities of Spinach Beet(*Beta vulgaris* var. *cicla*) Under Saline Condition

Bae, Jeong-Jin*, Yeon-Sik Choo and Seung-Dal Song

Department of Biology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

Antioxidative enzymes (superoxide dismutase; SOD, ascorbate peroxidase; APX, glutathione reductase; GR) play major roles in scavenging mechanism of reactive oxygen species which were involved in various stress conditions including salt. In order to investigate the relation between their growth responses (dry weight) and the changes of antioxidative enzymes activity, salt-tolerant spinach beet having 15cm of shoot length were treated with various salt levels (0, 50, 200, 1000 mM NaCl) for 24 hours. Spinach beet exhibited an increase in the activity of antioxidative enzymes by salt, the maximal activity at 200 mM NaCl and the lowest activity at 50 mM NaCl in 2 hrs. after treatments. As a result of PAGE, it has been confirmed that spinach beet contained 3 isoforms (Fe-SOD, CuZn-SOD and Mn-SOD) of SOD and main isoform was CuZn - SOD form. In case of APX, isoforms of the low molecular weight(No. 7, 8) were showed strong expression especially at 200 and 400 mM NaCl treatment. Meanwhile, GR did not show specific pattern of isoforms among the salt treatments. Especially, in case of 50 mM treatment, plant showed the lowest activity of SOD with the best growth, a low enzyme activity was induced by inactivation of the Mn-SOD. Therefore, we suggested that the decrease of SOD activity at a low salt level (50 mM NaCl) or the increase of enzyme activity at a high salt level (200 mM NaCl) may be related to expression of the Mn-SOD isoform. These antioxidative enzymes showed the increase of activity in a short time by salt addition. So, it is considered that spinach beet copes effectively with a stressful condition such as salt by operating effective antioxidative defense mechanism rapidly under high salt level.

Key words – APX, GR, isoform, salt, SOD, spinach beet.

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-53-950-5348, Fax : 82-53-953-3066
E-mail : jinibae@hanmail.net

서 론

관개토양에서의 염 축적은 작물의 생산량을 감소시키는 주요 원인으로[54,58], 전세계 농업용지의 거의 40%가 이미 염류화로 인한 생산량 제한의 문제점을 가지고 있다[55].

일반적으로 염을 포함한 다양한 환경스트레스는 식물의 광합성능력을 감소시킴으로써 성장을 감소시키며, 탄소동화율의 감소는 산소(O_2)로의 광합성적 전자의 흐름을 증가시켜 활성 산소종(Reactive oxygen species; ROS)의 생성을 촉진함으로써[4] 식물체에 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있다[9,30].

생성된 활성 산소종이 재빨리 제거되지 않을 경우, 이들은 높은 산화력으로 단백질, 지질, 색소분자 및 유전자를 파괴하는 것으로 알려져 있다. 따라서 대부분의 식물들은 생성된 ROS에 대해 효소적(superoxide dismutase; SOD, ascorbate peroxidase; APX, monodehydro ascorbate reductase; MDHAR, dehydro ascorbate reductase; DHAR, glutathione reductase; GR) · 비효소적(주로 항산화 분자로 알려진 tocopherols, carotenes, ascorbate, glutathione 등) 항산화 방어기작을 체내에 발달시키고 있어 산화적 손상을 회피하고 있다[7,24].

항산화 효소들 중 세포질, 엽록체, 미토콘드리아에 존재하는 SOD는 superoxide anion($O_2^{\cdot -}$)을 hydrogen peroxide (H_2O_2)와 산소분자(O_2)로 전환함으로써 항산화 효소반응의 초기과정에 작용하는 효소로, 활성자리에 금속을 함유하며, 함유금속의 종류에 의해 Mn-, Fe-, CuZn-SOD의 3가지 isoform types로 나뉜다[23]. CuZn-SOD는 주로 진핵세포의 세포질과 고등식물의 세포질 및 엽록체에 존재하며, Mn-SOD는 진핵과 원핵세포의 미토콘드리아 기질에, 그리고 Fe-SOD는 박테리아 세포기질과 식물세포의 엽록체에 분포하는 것으로 알려져 있으며, 최근에 Ni를 함유한 Ni-SOD의 새로운 그룹이 다양한 streptomyces species에서 보고되었다[15,16].

SOD작용에 의해 생성된 H_2O_2 의 경우, 광합성을 비롯한 식물체내 대사작용을 저해하는 강한 독성을 가진 활성 산소종으로 알려져 있어 생성 즉시 catalase(CAT)를 비롯한 다양한 peroxidases(POD) 또는 ascorbate-glutathione cycle의 효소들(APX, MDHAR, DHAR, GR)에 따라 신속하게 제거되어야 한다[19,44].

식물에 있어서, APX는 ascorbate-glutathione cycle의 첫 번째 단계에서 환원된 아스코르브산을 이용하며, H_2O_2 의 탈독작용에 있어 가장 중요한 peroxidase로 건조, 염 및 미네랄원소의 결핍을 비롯한 다양한 스트레스 조건에 반응하여 증가하는 것으로 알려져 있다[14,38,56].

GR의 경우, 식물세포내 미토콘드리아 세포질과 엽록체 등에서 보여지며, H_2O_2 제거에 관련할 뿐만아니라[12] NADPH를 이용하여 GSSG(산화형글루타치온)를 GSH(환원형글루타치온)로 전환하는데, 환원된 GSH는 식물체내 주요 항산화 물질로 산화적인 유해한 효과로부터 단백질을 보호하는 기작 등이 알려져 있다[35].

일반적으로 환경 스트레스하에서는 항산화 효소의 활성 증가가 유도되는데, 이러한 항산화 방어기작의 유도는 환경 스트레스에 의해 증가한 산화적 스트레스의 극복을 위한 전략으로 생각되어진다.

따라서 본 실험에서는 건조지, 염습지를 포함한 생태학적으로 불리한 조건에 출현하여, 다른 과에 속한 식물종보다 일반적으로 환경 내성적 특성을 가지는 것으로 생각되어지는 명아주과에 속하며, 재배종으로 이용되는 근대(*Beta vulgaris* var. *cicla*)를 이용하여 그들의 염 내성이 효과적인 항산화 시스템과 상호 연관성을 가질 것이라는 가정을 세우고, 다양한 농도의 염을 처리한 후 성장반응과 항산화 효소(SOD, APX, GR)의 활성변화 및 염에 의해 유도되는 isoforms의 발현양상을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

해안 염습지 및 건조지대를 비롯한 불리한 환경조건에 잘 적응하여 전세계적 분포를 보이는 명아주과(Chenopodiaceae)에 속하는 종으로서 널리 식용으로 이용되는 근대(*Beta vulgaris* var. *cicla*)를 이용하였다.

생육조건

균일한 크기의 종자를 선별하여 증류수에 48시간 동안 침수시킨 후 생육상($280 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 60-70 % relative humidity, day/night of 12/12 h at 30/20°C)에서 질석토에 발아시켜 한달간 Hoagland 배양액으로 생장시킨 후 균일하게 생육한 유식물(지상부길이: 약 15~16 cm)

을 선발하여 질석토가 담긴 paper pot(직경10 cm×높이15 cm)에 이식하여 야외의 온실에서 한달간 Hoagland 배양액을 100 ml/pot·day 공급하여 생육시켰다.

염 처리 및 수확

생장분석을 위해 처리 염농도에 따라 5개의 구배로 나누어 0, 20, 50, 200, 400 mM NaCl을 포함하는 Hoagland 배양액을 100 ml/pot·day로 22일간 공급하였으며, 환경요인에 의해 빠르게 작동하는 효소활성의 변화를 조사하기 위해 염 처리(0, 50, 200, 1000 mM NaCl) 직후 시간별(0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h.)로 각 처리구배당 5개체의 잎을 수확하여 고루 섞어 약 0.5 g을 정량한 후 효소활성 분석을 위해 액체질소로 냉각하여 냉동고(-70°C)에 보관하였다.

생장분석

염 처리 후 수확(1, 2, 8, 15, 22일째)한 식물체를 지상부와 지하부로 분리하여 생량을 측정하고, 70°C에서 3일간 건조하여 건량을 측정 후 생량과의 차이로 수분함량을 산출하였다.

효소추출 및 단백질정량

냉동보관된 잎시료는 액체질소에 의해 균일한 입자의 고운분말로 분쇄한 후 SOD 추출완충액(0.1 M K-phosphate (pH 7.8), 0.1 M EDTA, 1% PVP(w/v), 0.5% Troton X-100) 또는 APX, GR의 추출완충액 (0.1 M Na-phosphate, 5 mM ascorbate, 1 mM EDTA)을 700 μ l 넣어 고루 섞은 후 4°C에서 12,000 rpm으로 20분간 2회 원심분리하여, 상등액으로 효소활성측정과 전기영동을 수행하였다

Total soluble protein의 정량은 Lowry's method로 BSA (Bovine serum Albumin)를 이용한 표준식에 준하여 계산하였다[39].

항산화효소활성측정 및 전기영동

SOD활성측정은 Beyer와 Fridovich[11]에 의한 NBT (NitroBlueTetrazolium) 환원방법을 이용하였고, SOD one unit은 560 nm에서 NBT환원에 의해 유도되는 SOD활성의 50% 감소량으로 나타내었다.

SOD의 isozymes의 분리는 30% polyacrylamide gel상에서 각 lane마다 효소추출 액을 정량하여 넣은 후 120 V

에서 30분간 loading 후 150 V에서 10시간 running하였으며, 모든 실험조건은 4°C를 유지하였다[10].

SOD isozymes를 동정하기 위해 pre-staining solution (50 mM KPi buffer(pH 7.8), 28 μ M ribofalvine, 28 mM TEMED)에 3 mM KCN(CuZn-isoform발현억제) 또는 5 mM H₂O₂(CuZn-isoform과 Fe-form의 발현억제)를 넣어 25°C를 유지하면서 30분간 암상자에서 배양한 후 pre-staining solution에 2.45 mM NBT를 넣고 강한 빛에서 20분간 발색시킨 후 증류수로 세척하였다[1,10,52].

APX와 GR의 활성측정은 Jimenez et al. [33]의 방법을 이용하여 H₂O₂첨가로 인한 APX의 10 mM ascorbate의 monodehydroascorbate으로의 산화정도를, 그리고 GSSG (50 mM oxi-glutathione)존재 하에서 GR에 의한 NADPH의 산화정도를 2분간 290 nm와 340 nm에서 각각 측정하였으며, APX one unit은 1분간 1 μ M의 ascorbate을 산화시키는 효소의 양으로 정의하고, GR one unit은 1분간 1 μ M의 NADPH를 산화시키는 효소의 양으로 정의하였다.

Native gels에 의한 APX와 GR의 isoforms의 동정은 SOD와 동일한 조성의 30% polyacrylamide gel로 전기영동하였다. APX의 경우 50 mM Na-phosphate buffer(pH 7.0)와 2 mM ascorbate을 넣어 30분간 배양한 후 증류수로 세척하여 50 mM Na-phosphate, 4 mM ascorbate 및 2 mM H₂O₂를 넣고 20분간 배양한 후 증류수로 깨끗이 세척하고, 50 mM Na-phosphate, 28 mM TEMED와 2.45 mM NBT를 넣어 5분간 강한 빛에서 발색시켰으며, GR의 경우 APX와 동일한 방법으로 gel running한 후 staining solution(250 mM Tris-HCl 25 ml에 MTT (4,5-dimethylthiazol) 0.005 g, DPIP(2,6-dichlorophenolindophenol) 0.005 g, 340 mM GSSG 250 μ l, 100 mM NADPH 125 μ l)에서 30분간 배양한 후 밴드가 선명해질 때까지 증류수로 여러 번 세척하여 탈색하였다.

결과 및 고찰

염 처리에 의한 근대(*Beta vulgairs* var. *cicla*)의 생장분석을 위해 염 처리 후 1, 2, 8, 15, 22일째 수확하여 생량, 건량 및 수분함량을 측정하였으며, Fig. 1은 염 농도구배별 가장 뚜렷한 생장의 차이를 보였던 22일째의 지상부, 지하부 건물함량을 나타낸 것이다(1, 2, 8, 15th data not shown). 50

염 환경하에서 근대(*Beta vulgaris* var. *cicla*)의 생장과 항산화효소(SOD, APX, GR)의 활성변화

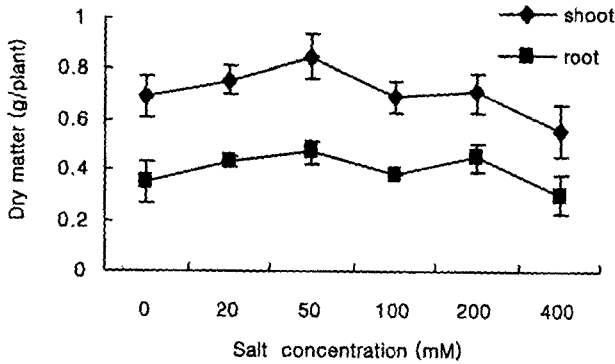


Fig. 1. Changes of dry matter(g/plant)±S.D. of shoot (leaves and stems) and root of *Beta vulgaris* var. *cicla* exposed to various salt levels (0, 20, 50, 100, 200, 400 mM NaCl) at 22nd day after treatment.

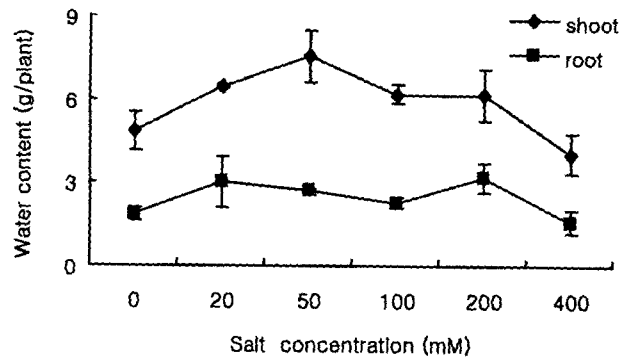


Fig. 2. Changes of water content(g/plant)±S.D. of shoot (leaves and stems) and root of *Beta vulgaris* var. *cicla* exposed to various salt levels (0, 20, 50, 100, 200, 400 mM NaCl) at 22nd day after treatment.

mM NaCl 처리구에서 지상부와 지하부의 건물량이 각각 대조구의 129%와 135%로 증가를 나타내었으며, 400 mM NaCl의 고농도 염 처리에 의해서만 단지 71%와 80%로서 건물량의 감소를 보여 강한 염 내성을 가질 뿐만 아니라 약간의 염(본 실험의 경우, 50 mM NaCl)은 오히려 생장을 촉진하는 것으로 나타났다.

일반적으로 식물은 염류에 대한 성장반응에 따라 고농도(200~300 mM NaCl)의 염류환경에서 최적의 생장을 보이며 생장을 위해 염을 이용하는 염생식물(예; 칠면초)과 비교적 높은 염 농도(50~100 mM NaCl)에서 생장의 증가를 보이며 그 이상의 염농도에서는 점진적인 생장의 감소를 보이는 호염성종(예; 사탕무), 50 mM NaCl 정도의 염 농도에서는 생장의 감소를 보이지 않으나 그 이상의 염농도에서는 성장저해를 나타내는 염 내성종(예; 보리) 그리고 염의 부가에 의해 즉각적인 성장저해를 나타내는 염 민감종(예; 콩)으로 나누어지는데[27], 본 실험의 근대는 50mM NaCl 처리에서 최적의 생장을 보이며, 고농도 염 처리에 의해서도 거의 성장저해현상을 보이지 않아 염 내성종이면서 아울러 생장을 위해 저농도(50mM NaCl)의 염을 요구하는 호염성종(halophilic species)인 것으로 생각되어진다.

Fig. 2는 염 처리 후 22일째 식물체내 수분함량의 변화를 나타낸 것이다.

근대는 50 mM NaCl 처리구(대조구의 156%)까지는 염 농도구배에 따른 함수량의 증가를 보였으며, 200 mM NaCl 처리구에 있어서도 대조구 보다 더 높은 수분함량

(127%)을 나타내었고, 400 mM NaCl의 고농도 염 처리구에 있어서만 단지 대조구 함수량의 83%로 수분함량의 감소를 보여 주었다. 명아주과 식물의 염분에 대한 저항기작으로는 잎 표면의 염모(salt hair)를 통한 염 배출기작과 함수량의 증가를 통한 염분희석효과 및 glycinebetaine과 같은 삼투조절물질의 축적 등이 알려져 있는데[18,28,40,48,59], 본 실험의 근대에 있어 염 처리에 따른 함수량의 증가는 염분 환경하의 고농도 무기이온에 대한 희석효과 및 glycinebetaine과 같은 삼투조절물질의 축적에 따른 삼투퍼텐셜 감소에 대해 체내 수분균형을 유지하기 위한 생리적 적응양상으로 보여진다. 실제로 통통마디를 포함한 명아주과에 속하는 해안 염생식물의 경우 다육화 등의 염분 환경하에서의 생리생태학적 특성을 보여준다[36]. 그리고 20, 50 mM NaCl 처리구에서 보여준 근대의 건물량 증가는 염 공급에 따른 함수량의 증가를 통해 세포내 팽압을 증가시킴으로써 결과적으로 성장증가를 유발한 것으로 생각된다. 한편, 400 mM NaCl의 고농도 염 처리구에서의 성장 감소는 근대의 생리적 내성 범위이상의 고농도 염분으로 인해 체내 수분의 불균형 및 생리적 장애가 유발된 것으로 생각된다. 본 실험의 결과, 근대의 최적 생장을 위한 염분농도는 20~50 mM NaCl였으며, 염에 의해 생장의 저해를 받지 않는 염 내성범위는 100~200 mM NaCl, 그 이상의 염분 농도에서는 생장의 저해가 유발되는 것으로 나타났다.

염 처리에 의한 산화적 스트레스의 유발 유·무 및 항산화 효소(SOD, APX, GR)의 반응양상을 조사하기 위해 염

처리 직후 시간별 활성을 측정하였다.

SOD(superoxide dismutase)의 경우, 염 처리에 의한 항산화 효소의 활성변화를 보였으며, 처리 후 2시간째에 가장 높은 활성을 나타내었고(200 & 1000 mM NaCl), 200 mM NaCl 처리구에서 가장 높은 활성(대조구의 190%)과 50 mM NaCl 처리구에서 가장 낮은 활성(대조구의 66%)을 보였다(Fig. 3).

환경 스트레스하에서 식물의 탄소동화율은 감소되며, 산소로의 광합성적 전자흐름의 증가로 인해 ROS의 생성이 증가하게 되는데[4], 건조[47]와 염[17,26,43] 스트레스 하의 식물의 엽록체에서 ROS의 과생성이 알려져 있다. 근대의 경우, 50 mM NaCl의 최적 생장조건에서의 광합성을 증가 및 이로 인한 ROS의 생성 감소로 인해 항산화 초기단계의

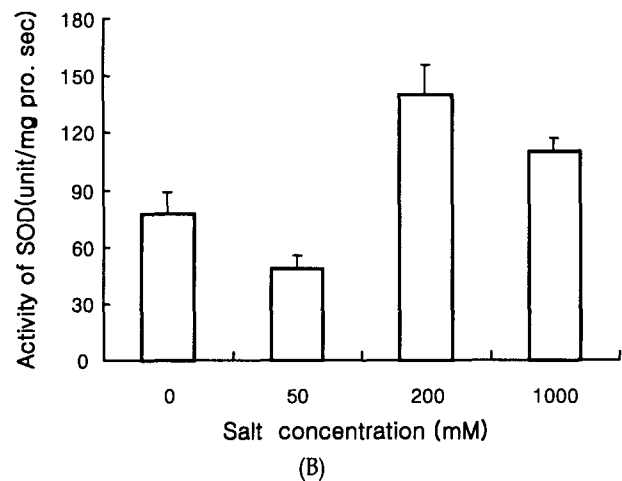
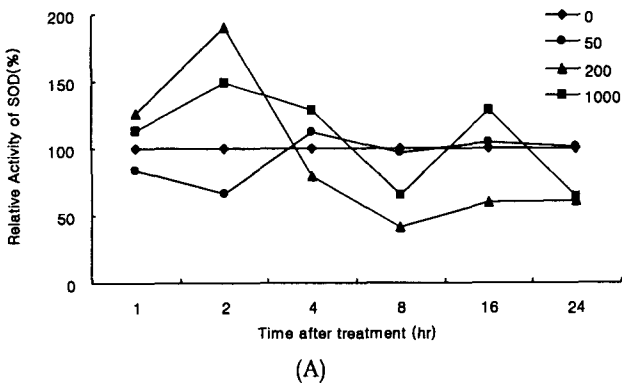


Fig. 3. A) Changes of relative SOD activities of *Beta vulgaris* var. *cicla* leaves for various salt levels (0, 50, 200, 1000 mM NaCl) after treatment. B) Activities of SOD of *Beta vulgaris* var. *cicla* leaves in 2h. of salt treatment.

효소인 SOD의 활성감소가 유발된 것으로 생각된다. 그리고 200 mM NaCl의 염 농도에서 빠르게 나타나는 SOD의 활성증가는 고농도 염에 의해 산화적 스트레스가 유도되었음을 의미하며, 동시에 생성된 ROS를 제거하는 항산화 방어기작의 일차적 반응으로 증가한 SOD활성은 산화적 스트레스와 관련된 손상으로부터 보호기능의 증가 양상으로 여겨진다[6,53]. 실제로 SOD의 발현강화를 통한 환경스트레스에 대한 내성의 증가가 형질전환식물에서 보고되었다[41,42]. 일반적으로 고등식물은 다량의 CuZn-SOD와 소량의 Mn-SOD를 갖는 것으로 알려져 있으며, Fe-SOD의 경우 원핵생물 및 몇몇 고등생물(은행과, 십자화과, 수련과 등)에서만 존재가 보고된 바 있으나[50,51], 근대의 경우 PAGE에 의한 isoforms 확인결과 Fe-SOD의 발현양상을 나타냄으로써 지금까지 고등식물에서 알려진 3개의 SOD isoforms를 보여주었으며, 동정결과 가장 높은 활성을 보인 major isoform은 CuZn-SOD였다(Fig. 4). 뿐만아니라 가장 낮은 활성 값을 보였던 50 mM NaCl 처리구의 경우 Mn-SOD의 발현억제양상을 보여 낮은 염 농도(50 mM NaCl)에서의 활성감소 및 고농도 염(200 mM NaCl)에서의 활성증가의 원인은 Mn-SOD isoform의 발현과 직접적인 연관성을 가지며, 염에 의해 유도되는 산화적 스트레스에 대한 내성에 있어 Mn-SOD가 중요한 역할을 수행하는 것

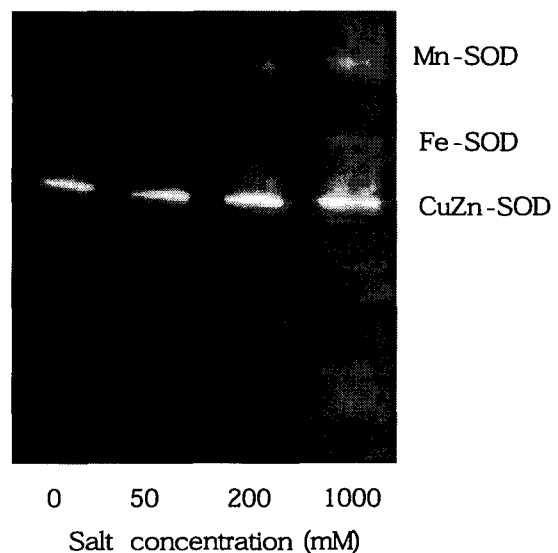


Fig. 4. SOD isozymes of *Beta vulgaris* var. *cicla* leaves for various salt levels (0, 50, 200, 1000 mM NaCl) in 2h. of salt treatment.

으로 생각된다. 유사하게 Hernandez에 의하면 pea의 salt-tolerant cultivar의 경우, 염분 환경하에서 mitochondrial SOD(Mn-SOD)활성의 증가 및 salt-sensitive cultivar에 있어 활성 감소가 보고된 바 있다[29].

Superoxide anion($O_2^{\cdot-}$)의 탈독과정이 SOD에 의한 효소적 과정이든지 아니면 비효소적 과정이든지 간에 항상 대사산물로 H_2O_2 를 생성하게 되는데 이것은 Calvin cycle의 강력한 억제자일뿐만 아니라 $O_2^{\cdot-}$ 와의 상호작용의 결과 높은 반응성을 지닌 OH^{\cdot} 를 생성하기 때문에 $O_2^{\cdot-}$ 의 H_2O_2 로의 전환은 문제점을 가진다[31,34].

따라서 식물의 염 내성 획득에 있어 SOD 활성증가와 동시에 H_2O_2 를 제거할 수 있는 APX와 CAT 및 POD의 활성증가가 수반되어야 한다[19,44].

일반적으로, 식물에 있어 H_2O_2 를 제거하는데 있어 더 나

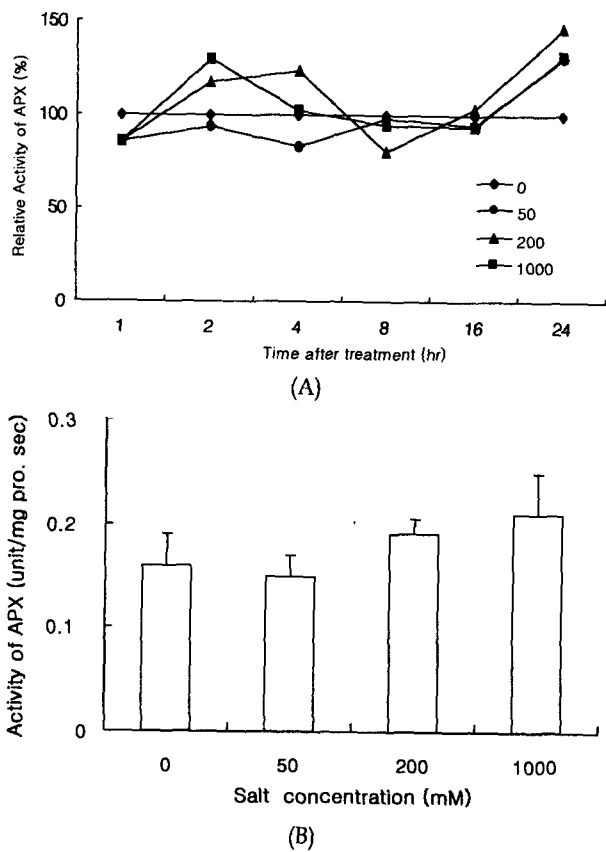


Fig. 5. A) Changes of relative APX activities of *Beta vulgaris* var. *cicla* leaves for various salt levels (0, 50, 200, 1000 mM NaCl) after treatment. B) Activities of APX of *Beta vulgaris* var. *cicla* leaves in 2h. of salt treatment.

은 능력을 가진다는 것은 환경스트레스에 의해 유도된 산화적 조건에 대해 내성을 가진다는 것을 의미하며[49], 특히 ascorbate-glutathione cycle의 첫 번째 단계에서 환원물질로 ascorbate reduced form(ASC)을 이용하는 APX의 경우 H_2O_2 의 탈독작용에 있어서 가장 중요한 key enzyme으로 알려져 있다[4,19].

근대의 경우, 염 처리에 의한 SOD의 반응 양상과 유사하게 APX는 처리 후 2~4시간째에 가장 높은 활성을 보여 주었으며, 50 mM NaCl 처리구에서 가장 낮은 활성과 200과 1000 mM NaCl 처리구에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

SOD와 더불어 APX에서의 활성 증가는 스트레스 조건 하에서의 효소를 비롯한 단백질의 생리적 불활성으로부터 그들 스스로를 보호하는 것과 연관되며, 다양한 환경 스트레스 조건에서의 활성 증가가 알려져 있다[14,38,56].

산화적 스트레스에 대처하는 SOD의 활성 증가로 인한 H_2O_2 의 발생은 스트레스 내성과 관련된 몇몇 유전자 및 APX유전자 발현을 유도하는 것으로 알려져 있으며[37], 본 실험에서 보여준 고농도 염 처리구에서의 APX활성 증가도 염에 의한 SOD활성의 증가와 상호 연관성을 가지는 것으로 생각되어진다.

지금까지 알려진 APX의 isoforms는 soluble cytosolic form, chloroplast form(stromal, thylakoid bound)과 최근에 보고된 peroxisome, glyoxysome의 막 결합성 isoforms가 있다[13]. 본 실험에서는 체내 총 9개의 bands발현양상을 나타내었으며, 높은 활성 값을 보였던 200 mM NaCl 이상의 고농도 염 처리구에 있어서 저분자isoforms(특히 7,8번 bands)의 발현 강도가 증가하는 양상을 보여, 고농도 염에서의 APX활성 증가와 연관성을 가지는 것으로 생각된다.

한편, H_2O_2 의 경우 막을 투과하여 세포질 밖으로 확산되기 때문에 막 결합성 APX와 ROS가 생성되는 장소에서의 탈독과정이 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는데 있어 중요하다[3,13]. 그러나 본 실험의 경우, 세포내 구획적 위치에 대한 ROS생성 및 APX를 비롯한 항산화 효소활성에 대한 구획적 측정이 이루어지지 않아 이후 세포 소기관의 분리를 통한 각 위치별 ROS생성 및 탈독효소들의 공간적 분포에 대한 연구가 수행될 것으로 기대된다.

한편, GR(glutathione reductase)은 전자수용체로 NADPH

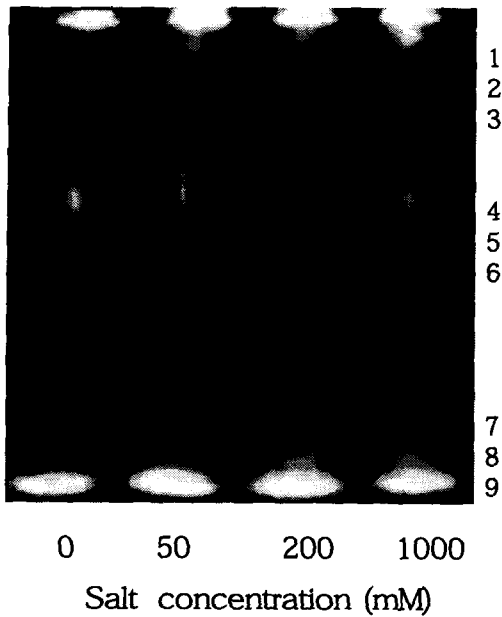


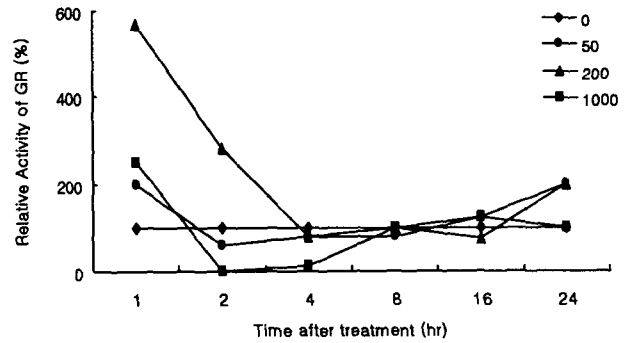
Fig. 6. APX isozymes of *Beta vulgaris* var. *cicla* leaves for various salt levels (0, 50, 200, 1000 mM NaCl) in 2h. of salt treatment.

를 이용하여 GSSG를 GSH로 전환하며, 부분적으로 H₂O₂의 탈독작용에 관련한다[25,45]. GR에 의해 환원된 GSH(L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine)는 식물체내 thiol을 함유한 주요 저분자 항산화 물질로 엽록체의 ascorbate-gluthathione pathway에서의 아스코르브산의 환원 및 식물체의 산화적 방어 시스템에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다[2].

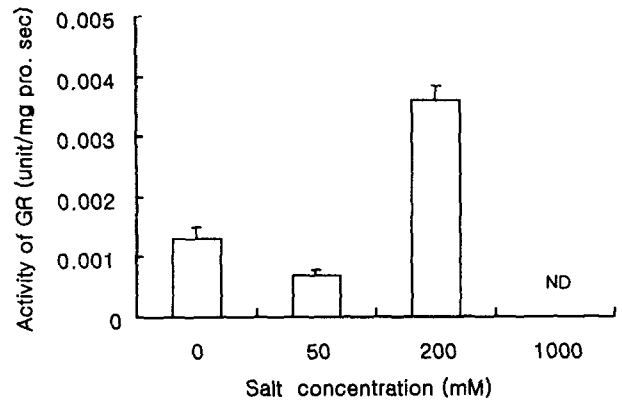
근대는 염에 의한 GR의 즉각적인 활성의 증가양상을 나타내었으며, SOD, APX와 유사하게 50 mM NaCl 처리구에서 가장 낮은 활성값(대조구의 약 70%)과 200 mM NaCl 처리구에서 가장 높은 활성값(대조구의 약 260%)을 보였다. 그러나 1000 mM NaCl 처리구의 경우 거의 활성을 보이지 않아 특별히 GR의 경우 고농도 염에 의한 강한 활성 저해를 나타내었다.

심각한 스트레스의 결과로서 세포내 GSSG의 농도는 증가하며[57], UV하에서 GSSG의 축적이 보고 된 바 있으며[57], 스트레스에 의한 GSH/GSSG 감소는 잎에서의 광합성적 CO₂동화와 같은 대사과정을 심각하게 저해하는 것으로 알려져 있다[21,46].

그러나 GR활성의 증가는 NADP⁺/NADPH의 비를 증가시킬 수 있으며, 따라서 광합성적 전자전달계로부터 전



(A)



(B)

Fig. 7. sA) Changes of relative GR activities of *Beta vulgaris* var. *cicla* leaves for various salt levels(0, 50, 200, 1000 mM NaCl) after treatment. B) Activities of GR of *Beta vulgaris* var. *cicla* leaves in 2h. of salt treatment. *ND ; Not Determined.

자 수용체로서의 NADP⁺의 이용성을 증가시켜 O₂로의 전자흐름과 그로 인한 O₂⁻생성을 감소함에 의해 ROS생성을 억제 할 수 있다. Baisak et al.[8]은 몇몇 광합성적 CO₂고정효소의 활성과 ascorbate의 재생성은 GSH/GSSG의 높은 비와 연관되며, 따라서 식물체에서의 GR활성의 증가는 GSH의 축적을 유발하여 궁극적으로 식물에 내성을 제공한다고 하였다.

본 실험에 있어, 근대의 GR활성은 SOD, APX와는 달리 1000 mM NaCl처리구에서 처리 후 2시간째 거의 활성을 보이지 않아 특별히 고농도 염에 의한 GR의 강한 저해를 보였다. 따라서 성장반응에서 보였던 고농도 염분 환경에서의 성장 감소는 염 스트레스에 의한 특별히 GR의 불활성화와 연관성을 가질 것으로 생각되며, 이로인한 GSH/GSSG의 비 감소 및 광합성적 CO₂동화와 같은 대사과정의

방해로 인해 성장감소가 유발된 것 같다.

이상의 결과를 요약하면, 근대의 경우 성장에 있어 최적의 염농도는 20~50 mM NaCl로, 저농도의 염 부가에 의한 생장의 증가를 보여 염 내성종의 특성을 보여주었다. 염에 의한 항산화효소의 반응에 있어 SOD, APX, GR의 경우, 200 mM NaCl 처리구에서 가장 높은 활성을 보였으며, 200 mM NaCl까지의 염 농도에서는 ROS생성과 항산화 효소의 활성증가를 통한 방어 시스템간의 균형을 유지함으로써 염에 대한 내성적 기작을 가지나 그 이상의 고농도 염은 함수량의 감소 및 항산화 효소 중 특별히 GR의 불활성화를 유발하여, 염에 의한 ROS생성량이 근대의 항산화 방어기작의 내성적 범위를 초과함으로써 결과적으로 산화적 스트레스로 인한 성장저해를 유발하는 것으로 생각된다.

요 약

환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 것으로 알려진 명아주과에 속하는 근대(지상부길이 15 cm)를 이용하여, 다양한 염 농도에서의 건물함량 측정을 통한 성장반응과 항산화 효소(SOD, APX, GR)의 효과를 밝히기 위하여 다양한 농도(0, 50, 200, 1000 mM NaCl)의 염을 처리한 후 24시간 동안의 효소의 활성변화를 측정하였다. 근대는 처리 2시간째 200 mM NaCl처리구 에서 SOD, APX, GR의 최대활성을 보였으며, 50 mM NaCl처리구에서 가장 낮은 활성을 나타내었다. PAGE에 의한 isoforms의 확인결과, 근대는 3개의 SOD isoforms(Fe-SOD, CuZn-SOD, Mn-SOD)를 함유하고 있었으며, major isoform은 CuZn-SOD로 밝혀졌다. APX의 경우, 9개의 bands 중 특별히 저분자 isoforms (No. 7,8)의 강한 발현양상을 보였다. SOD의 경우 50 mM NaCl처리에서 Mn-SOD isoform의 불활성을 보여 활성의 증감에 있어 Mn-SOD가 직접적인 연관성을 가질 것으로 생각된다. 근대의 항산화 효소는 염 처리후 단시간내 효소 활성의 증가양상(특별히 처리후 2시간째 200 mM NaCl처리구)을 보여, 고농도 염 환경하에서 항산화시스템의 빠른 작동을 통해 염스트레스에 의해 생성된 활성산소를 제거함으로써 염에 의한 산화적 스트레스에 대해 효과적으로 대처해 나가는 것으로 생각된다. 검색어-근대, 염, 활성산소, SOD, APX, GR.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 특정기초연구(R01-2000-000-00066-0)지원에 의해 수행된 것입니다.

참 고 문 헌

1. Almansa, M. S., L. A. del Rio, C. Alcaraz and F. Sevilla. 1989. *Physiologia Plantarum* **89**, 441-447.
2. Alscher, R. G. 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Plant physiol.* **77**, 457-464.
3. Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Plant physiol.* **85**, 235-241.
4. Asada, K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue, in: C. H. Foyer, P. M. Mullineaux (Eds.), *Causes of photooxidative stress in plant and amelioration of defense system*, CRC Press, Boca Raton, FL. p 77-103.
5. Asada, K. 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. p 715-735.
6. Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 601-639.
7. Baier, M., K. J. Dietz. 1998 The costs and benefits of oxygen for photosynthesizing plant cells. *Prog. Bot.* **60**, 282-314.
8. Baisak, R., D. Rana, P. B. B. Acharya and M. Kar. 1994. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. *Plant Cell Physiol.* **35**, 489-495.
9. Bartosz, G. 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* **19**, 47-64.
10. Beauchamp, C., I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276-287.
11. Beyer, W. F., I. Fridovich. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* **161**, 559-566.
12. Bower, C., M. Van Montagu and D. Inze. 1992.

- Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol Biol.* **43**, 81-116.
13. Bunkelmann, J. R., K. N. Trelease. 1996. Ascorbate peroxidase: a prominent membrane protein in oil seed glyoxysomes. *Plant physiol.* **110**, 589-598.
 14. Cakmak, I., H. Marschner. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant physiol.* **98**, 1222-1227.
 15. Choudhury, S. B., J. W. Lee, G. Davidson, Y. I. Yim, K. Bose, M. L. Sharma, S. O. Kang, D. E. Cabelli and M. J. Maroney. 1999. Examination of the nickel site structure mechanism in *Streptomyces seoulensis* superoxide dismutase. *Biochemistry* **38**, 3744-3752.
 16. Chun, J., H. D. Youn, Y. I. Yim, H. Lee, M. Y. Kim, Y. C. Hah and S. O. Kang. 1997. *Streptomyces seoulensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteria.* **47**, 492-498.
 17. Dionisio-Sese, M. L., S. Tobita. 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* **135**, 1-9.
 18. Flower, T. J., J. L. Hall. 1978. Salt tolerance in halophyte, *Suaeda maritima* L. Dunn. : The influence of salinity of culture solution on the content of various organic compounds. *Ann. Bot.* **42**, 1057-1063.
 19. Foyer C. H., B. Halliwell. 1976. The presence of glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21-25.
 20. Foyer C. H., P. Descourvieres and K. J. Kunert. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ* **17**, 507-523.
 21. Foyer, C. H., N. Souriau, S. Perret, M. Lelandais, K. J. Kunert, C. Pruvost and L. Jouanin. 1995. Over-expression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increase in antioxidant capacity and improved photosynthesis in poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) trees. *Plant physiol.* **109**, 1047-1057.
 22. Foyer C. H. 1997. In : Scandalios, J. G. (ed) Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defense. Cold spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 587-621.
 23. Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880.
 24. Fridovich, I. 1986. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol. Biol.* **58**, 61-97.
 25. Gosset D. R., S. W. Banks, E. P. Millhollon and M. C. Lucas. 1994. *Plant Physiol.* **112**, 803-809.
 26. Gosset D. R., E. P. Millhollon and M. C. Lucas. 1994. Antioxidant responses to NaCl stress in salt-tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci.* **34**, 706-714.
 27. Greenway and Munns. 1980. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 149-190.
 28. Hanson, A. D., B. Rathinasabapathi, B. Chamberlin and D. A. Gage. 1991. Comparative physiological evidence that β -alanine betaine and choline-o-sulfate act as compatible osmolytes in holophytic *Limonium* species. *Plant Physiol.* **97**, 1199-1205.
 29. Hernandez, J. A., F. J. Corpas, M. Gomez, L. A. Del Rio and F. Sevilla. 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Plant physiol.* **89**, 103-110.
 30. Holmberg, N., L. Bulow. 1998. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends Plant Sci.* **3**, 61-66.
 31. Imlay, J. A., S. Linn. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.* **240**, 1302-1309.
 32. Ishikawa, T., K. Yoshimura, K. Sakai, T. Takeda and S. Shigeoka. 1998. Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant Cell Physiol.* **39**, 23-34.
 33. Jimenez, A., J. A. Hernandez, L. A. del Rio and F. Sevilla. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* **114**, 275-284.
 34. Kaiser, W. 1976. The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplast. *Biochem. Biophys. Acta.* **440**, 475-482.
 35. Kranner, I., D. Grill. 1996. Significance of thiol-disulphide exchange in resting stages of plant development. *Bot. Acta* **109**, 8-14.
 36. Larcher, W. 1995. *Physiological plant ecology.* p 396-409.
 37. Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon and C. Lamb. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-593.
 38. Lopez, F., G. Vansuyt, F. Case-Delbart and P. Fourcroy. 1996. Ascorbate peroxidase activity, not the mRNA level, is enhanced in salt-stressed *Raphanus*

- sativas* plants. Plant physiol. **97**, 13-20.
39. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and H. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
 40. Matoh, T., J. Watanabe and E. Takahashi. 1984. Sodium, potassium, chloride and betaine concentrations in isolated vacuoles from salt-grown *Atriplex gmelini* leaves. Plant Physiol. **84**, 173-177.
 41. Mckersie, B. D., Y. Chen, M. De Beus, S. R. Bowley, C. Bowler and D. Inze. 1993. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa(*Medicago sativa* L.). Plant physiol. **103**, 1155-1163.
 42. Mckersie, B. D., S. R. Bowley, E. Harjanto and O. Leprince. 1996. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. Plant physiol. **111**, 1177-1181.
 43. Meneguzzo, F., Navari-Izzo and R. Izzo. 1999. Antioxidative responses of shoots and roots of wheat to increasing NaCl concentrations. J. Plant physiol. **155**, 274-280.
 44. Nakano, Y., K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. **22**, 867-880.
 45. Noctor, G., A. C. M. Arisi, L. Jouanin, M. H. Valadier, Y. Roux and C. H. Foyer. 1997. Plant Physiol. **100**, 255-263.
 46. Noctor, G., M. Strohm, L. Jouanin, K. J. Kunert, C. H. Foyer and H. Rennenberg. 1996. Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar(*Populus tremula* × *P. alba*) over-expressing γ -glutamyl cystein synthetase. Plant physiol. **112**, 1071-1078.
 47. Prise A. H., N. M. Atherton and G. A. F. Hendry. 1989. Plants under drought stress generate activated oxygen. Free Radical Res. Commun. **8**, 61-66.
 48. Reimann, C., S. W. Breckle. 1988. Salt secretion in some Chenopodium species. Flora. **180**, 289-296.
 49. Rout, N. P., B. P. Shaw. 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. Plant Science **160**, 415-423.
 50. Salin, M. L., S. M. Bridges. 1981. Plant Physiol. **68**, 156-162.
 51. Salin, M. L., S. M. Bridges. 1982. Plant Physiol. **69**, 161-165.
 52. Salin, M.L., D. S. Lyon. 1983. In Oxy Radicals and Their Scavenger Systems. p 344-347.
 53. Scandalios, J. G. 1997. Molecular genetics of superoxide dismutase in plants. In: Scandalios J. G. (ed) Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p 527-568.
 54. Serrano, R. 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. Int. Rev. Cytol. **165**, 1-52.
 55. Serrano, R., R. Gaxiola. 1994. Microbial models and salt tolerance in plants, Crit Rev. Plant Sci. **13**, 121-138.
 56. Smironoff, N., S.V. Colombe. 1998. Drought influences the activity of the enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. J. Exp. Bot. **39**, 1097-1108.
 57. Strid, A., W. S. Chow and J. M. Anderson. 1994. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. Photosynth. Res. **39**, 475-489.
 58. Volkmar, K. M., Y. Hu and H. Steppuhn. 1998. Physiological responses of plant to salinity: a review, Can. J. Plant Sci. **78**, 19-27.
 59. Wyn Jones, R.G. and R. Storey. 1981. Betains. In Paleg, L.G. and D. Aspinall (eds.), Plant and biochemistry of drought resistance in Plant. Academic Press, Sydney. p 121-136.

(Received May 30, 2003; Accepted October 7, 2003)