

무 (*Raphanus sativus* L.) 자엽에서 산화질소 (Nitric oxide)에 의해 유도된 부정근 형성과정에 대한 칼슘의 효과

진창덕
강원대학교 자연과학대학 생명과학부

Effects of Calcium on Nitric oxide (NO)-induced Adventitious Rooting Process in Radish (*Raphanus sativus* L.) Cotyledons

Chang-Duck Jin

Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT The treatment of radish cotyledons with a nitric oxide (NO)-releasing substance, sodium nitroprusside (SNP) resulted in an increased adventitious root development in a dose-dependent manner. However, this NO-mediated enhancement effect was reversed when either 0.5 mM EGTA (an extracellular Ca^{2+} chelator) or 0.1 mM $LaCl_3$ (a calcium channel blocker) was applied with 50 μ M SNP. Our results also showed that guaiacol peroxidase (GPX) and syringaldazine peroxidase (SPX) activities, which are known to play a key role in rooting, were more largely increased during adventitious root induction in the cotyledons treated with SNP. However, the treatment of cotyledons with SNP plus $LaCl_3$ inhibited the SNP-induced increases in the activities of both GPX and SPX. Trifluoperazine (TFP), an antagonist of calmodulin (a specific calcium-binding protein), also delayed adventitious root formation and significantly reduced the root length and number of the SNP-treated cotyledons as well as the deactivation of GPX and SPX enzymes. In conclusion, our results suggest that calcium is involved in the NO response leading to induction of adventitious root through a regulation of GPX and SPX.

서론

산화질소 (nitric oxide: NO)가 처음으로 포유동물의 심혈관계, 면역계 및 신경계에서 그 생리적 조절 효과가 밝혀진 후 (Ignarro 1990), 식물계에서도 식물의 생장 및 발달과 관련하여 다양한 생리 반응을 유도할 수 있는 생리 활성물질로 알려졌다 (Beligni and Lamattina 2001, Beligni et al. 2002; Pagnussat et al. 2004). Gouvêa 등 (1997)은 NO가 옥수수 뿌리 절편의 신장생장에 관여하고 있음을 밝혔으며, 최근

에 옥신에 의해 유도된 오이 하배측 절편의 부정근 (adventitious root) 형성 (Pagnussat et al. 2002; 2003; 2004)과 토마토의 부정근 형성 (Creus et al. 2005)에 대한 NO의 촉진 효과가 보고되었다.

부정근 형성은 일부 식물 중에서는 자연적으로 발생되기도 하지만 대부분의 식물은 옥신 호르몬 활성을 보이는 여러 생장 조절 물질을 요구한다 (Haissig et al. 1992, Syros et al. 2004). 일차근계 (primary root system)가 제거된 식물에서 부정근의 형성에는 새로운 분열조직의 발달이 수반되는데 이 경우 옥신은 세포의 탈분화 과정 조절을 통한 분열조직의 재확립을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 그러나

*Corresponding author Tel 033-250-8528 Fax 033-251-3990
E-mail: cdjin@kangwon.ac.kr

새로운 뿌리 분열조직의 유도과 관련된 분자 수준에서의 자세한 기작은 잘 알려져 있지 않고 있다 (Pagnussat et al. 2002; 2004). 뿌리 형성은 특히 기내 식물생산 시스템 (plant production systems in vitro)에서 식물을 영양생장 방법으로 증식시키는데 있어 필수 단계가 된다. 그러므로 뿌리 형성과 연관된 생화학적 사건에 관한 정보는 뿌리 발달에 대한 이해 및 뿌리 발달의 유도과정을 개선시킴으로서 상업적으로도 기내 배양을 통한 유용식물의 대량 증식에 큰 기여를 하게 된다.

여러 식물 종의 줄기에서 혹은 어린 식물의 하배축 및 자엽과 같은 식물 절편 (explant) 조직에서 부정근 뿌리 형성은 상호의존적이면서 연속적으로 일어나는 3가지 단계인 유도기 (induction), 개시기 (initiation), 및 발현기 (expression)의 진행 결과로서 나타나는데 이때 개시기 시작 단계에서 물관부 형성이 뿌리 원기 (root primordia)의 개시와 함께 진행된다고 제안되었으며 (Gaspar et al. 1985, Syros et al. 2004), peroxidase 활성도 및 그 동위효소 양상의 변화가 이들 단계에 관한 생화학적 지표로서 제안되어 왔다 (Hausman 1993, Rout et al. 2000, Syros et al. 2004).

뿌리 발생과정에는 먼저 물관부 형성을 위한 세포벽의 리그닌화 (lignification) 반응이 일어나는데 이 반응에서 세포벽 내에 리그닌과 슈베린 (suberin)이 합성되어 축적된다 (Gaspar et al. 1985, Zeir and Schreiber 1997, Quiroga et al. 2000). Peroxidase는 주로 세포질 및 세포벽에 존재하여 알콜 단량체를 산화시켜 1차 라디칼 형태의 알콜 분자를 만들고 (Christensen et al. 1998), 이들 알콜 화합물이 서로 상호간에 무작위적으로 반응하여 리그닌과 슈베린을 형성하게 된다 (Whetten et al. 1998, Carpin et al. 2001). Quiroga 등 (2000)과 Cupers 등 (2002)도 리그닌 단량체와 유사물질인 syringaldazine과 guaiacol을 기질로 사용하여 높은 peroxidase 활성도를 검출함으로써 guaiacol peroxidase (GPX)와 syringaldazine peroxidase (SPX)가 세포벽 형성에 깊은 연관이 있음을 입증하였다. Rout 등 (2000)은 *Psoralea corylifolia*의 줄기 절편을 기내 배양하면서 뿌리 형성 유도기에 GPX의 활성도 증가 현상을 발견하고 peroxidase가 뿌리 발생과정에 있어 중심적인 역할을 수행한다고 제안하였다. 포플라 식물 줄기에서도 부정근 발생에 앞서 수용성 peroxidase 활성도 값이 최대를 나타냈으며 (Hausman 1993), Gaspar 등 (1985)도 유도기와 개시기가 진행되는 동안 특히 염기성 peroxidase 활성도가 먼저 증가하였다가 뒤이어 감소하나 반면에 산성 peroxidase는

두 시기 내내 증가함을 보고하였다.

이와 같은 세포 내 peroxidase 활성도 발현 조절과 관련하여 시토크롬 칼슘 이온의 역할 가능성이 제시되었는데, 즉 칼슘 이온이 peroxidase의 apoprotein의 정확한 구조를 유지시킴으로서 효소 활성도를 직접 조절한다는 경우와 세포벽 또는 세포 외부로부터 peroxidase 분비 촉진을 통한 활성도 조절이 보고되었으며 (Gaspar et al. 1985) 또한 칼슘 이온과 특이적으로 결합하는 단백질인 칼모둘린이 칼슘-칼모둘린 복합체를 형성하여 peroxidase 활성도를 조절한다는 결과도 발표되었다 (Poovaiah 1987, Yang and Poovaiah 2002).

한편, Lamotte 등 (2004)은 담배 세포의 스트레스 내성 연구에서 NO 공여체인 diethylamine 화합물이 세포내 칼슘 저장소로부터 칼슘 이온의 방출을 촉진시켜 시토크롬 칼슘 농도를 증가시킨다는 결과를 보여주었다. Wendehenne 등 (2004)도 세포 내 NO 신호를 매개하는 이차 신호전달자로서 cyclic GMP (cGMP)와 칼슘 이온 등을 제시하면서 NO가 guanylate cyclase (GC)의 heme기에 붙어서 GC를 활성화하여 그로 인해 cGMP의 양을 증가시키고 이 때 증가된 cGMP가 세포막의 칼슘 통로를 개방시켜 시토크롬 내로의 칼슘 유입을 유도한다고 하였다. 이러한 과정에서 칼슘 공급처로는 소포체, 골지체, 액포 등 세포내 소기관과 세포벽 및 세포 외부의 세포간극 등이 알려져 있다 (Poovaiah 1987). 이들 연구 결과는 NO가 시토크롬 칼슘이온 농도 조절에 관여하고 있을 가능성을 나타내는 것이다.

그러므로 본 연구에서는 부정근 형성에 관한 산화질소 (NO)의 생리, 생화학적 역할을 규명하기 위해 배양중인 무 유식물의 자엽 조직에서 부정근 발생에 미치는 NO 공여체 화합물인 sodium nitroprusside (SNP) 효과를 조사하였다. 이 때 동시에 부정근이 발생중인 자엽 조직 내에서 GPX와 SPX peroxidase 활성도 변화를 분석하였으며 또한 NO에 의해 유도된 부정근 형성 및 peroxidase 활성도 발현 조절에서 칼슘의 역할 가능성을 분석하기 위해 여러 칼슘 antagonist 처리 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

재료 식물의 생육 조건 및 처리

재료 식물인 무 (*Raphanus sativus* L. cv Taewang) 종자를 크기, 모양, 색깔이 균일한 것으로 선별한 후, 1% sodium

hypochlorite 용액에 15분간 침윤시켜 표면살균 한 후, 흐르는 수돗물과 증류수로 세척하였다. 살균된 종자를 증류수 100 ml로 충분히 적신 바이오플러그 #1 상토 (홍농종묘)를 2/3가량 담은 폴리프로필렌 발아 통 (11.5×11.5×10 cm)에 25 개씩 파종하고 유리덮개를 하였다. 이 발아통을 70%의 상대습도, 25/21°C (낮/밤)의 온도 및 8000 lux의 빛으로 16h/8h (낮/밤)의 광주기 조건이 설정된 growth chamber 내에 옮겨 발아 생육시켰다. 파종한 후 2일째 유리덮개를 벗기고 증류수를 매일 20 mL씩 공급해 주었다. 4일간 키운 무 유식물에서 자엽을 분리 후 수확하여 실험재료로 사용하였다. 무 자엽에 nitric oxide (NO) 처리를 위해 여과지 4장이 포함된 페트리접시에 NO공여체인 50 µM SNP 용액 15 mL를 가한 후 5개의 무자엽을 넣어 온도 25°C, 8000 lux의 연속 광조건하의 incubator에서 9~12일간 배양 하였다. 대조구로는 SNP용액 대신 증류수를 처리하였다. 또한, 무자엽에 methylene blue (MB), EGTA 및 LaCl₃ 처리를 위해 이들 화합물을 각각 50 µM SNP용액에 녹인 후 이들 각 혼합액을 페트리 접시에 가하고 NO처리구와 동일한 방법으로 배양하였다.

처리 용액 제조 및 처리농도 결정

SNP용액은 SNP를 증류수에 녹여 사용하였다. EGTA의 경우 SNP용액에 EGTA를 넣고 소량의 1N KOH를 가하여 녹인 후 다시 1N HCl를 이용하여 pH를 5.6으로 맞췄다. LaCl₃는 SNP용액에 직접 녹여 사용 하였다. SNP의 처리 농도는 자엽에서의 부정근 발생을 가장 현저하게 촉진 시킨 50 µM 농도를 선택하였으며, MB, EGTA, LaCl₃ 및 TFP 처리 농도는 자엽손상을 초래하지 않으면서도 SNP에 의해 유도된 부정근 생장을 효과적으로 억제한 5 µM, 0.5 mM, 0.1 mM 및 50 µM 농도를 각각 선택하였다.

부정근 성장량 측정

9일 동안 배양된 자엽에서 발생된 0.3 cm 이상의 부정근 (adventitious root)의 개수와 길이를 측정한 후 사진 촬영을 하였고 발생된 부정근은 잘라서 75°C의 dry oven에서 24시간 건조시킨 뒤 건조 중량을 측정하였다.

효소 추출 및 활성도 측정

Guaiacol peroxidase (GPX)와 syringaldazine peroxidase

(SPX) 효소 용액은 8개의 무 자엽을 냉각된 mortar에 넣고 4 mL의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 2 mM Na₂-EDTA, 1% PVPP 포함)와 0.3 g 석영사를 이용하여 마쇄한 후 4°C에서 원심분리 (10,000 g, 20 min)하여 얻은 상등액을 사용하였다. GPX 활성도는 Polle 등 (1994)의 방법을 기초로 하여 측정하였다. 효소 활성도 값은 반응액 내에서 guaiacol이 tetraguaiacol로 산화될 때 470 nm에서의 흡광도 증가값 ($\epsilon_{470}=25.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)을 spectrophotometer로 측정하여 산출하였다. 이 때 효소 반응은 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5, 16 mM guaiacol 포함) 2.9 mL와 50 µL의 2% H₂O₂ 및 효소 추출액 25 µL가 포함된 3 mL의 반응액에서 2분간 진행되었다. SPX 활성도는 Cupers 등 (2002)의 방법을 기초로 하여 측정하였다. 효소 활성도 값은 반응액 내에서 syringaldazine이 산화로 인한 530 nm에서의 흡광도 증가값 ($\epsilon_{530}=27 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)을 spectrophotometer로 측정하여 산출하였다. 이 때 효소 반응은 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 2.55 mL, 10 mM H₂O₂ 300 µL, 3.5 mM syringaldazine 50 µL 및 효소 추출액 100 µL가 포함된 3 mL의 반응액에서 5분간 진행되었다.

결과 및 고찰

무 자엽에서의 부정근 형성에 대한 산화질소 (nitric oxide: NO)의 생리적 효과

일차근계 (primary root system)가 제거된 식물에서 부정근이 형성될 때에는 새로운 분열조직의 발달이 동반되는데, 이 경우 옥신은 세포의 탈분화과정 조절을 통한 분열조직의 재확립을 촉진시키는 것으로 알려져 있다 (Pagnussat et al. 2002). 그러나 새로운 뿌리 분열조직의 유도과 관련된 분자 수준에서의 자세한 기작은 잘 알려지지 않고 있다 (Pagnussat et al. 2002; 2004). 최근에 옥신에 의해 유도된 오이 하배측 절편의 부정근 형성 (Pagnussat et al. 2002; 2003; 2004)과 토마토에서의 부정근 형성 (Creus et al. 2005)에 대한 NO의 촉진 효과가 보고된 바 있다.

무 자엽 조직에서 부정근 형성에 대한 NO의 생리 생화학적 역할을 조사하기 위해 본 연구에서는 growth chamber에서 4일간 발아 생육시킨 무 유식물에서 자엽을 분리, 수확하여 이들 분리된 자엽 들을 증류수 및 각 농도별 SNP 용액 (10 µM SNP, 50 µM SNP, 200 µM SNP)을 포함한 페트리 디쉬

에 넣고 다시 9일 동안 25°C의 연속 광조건 하의 incubator에서 배양 하여 자엽에서의 부정근 발생에 미치는 SNP 처리 효과를 조사하였다. 이 때 SNP에 의해 유도된 부정근 형성이 SNP 화합물에서 방출된 NO에 의한 결과인지를 확인하기 위해 또 다른 자엽을 50 µM SNP와 5 µM methylen blue (MB)가 혼합된 용액이 들어있는 페트리 디쉬에 넣고 증류수 대조구 및 SNP 단독 처리구와 동일한 조건 하에서 함께 배양하였다. c-PTIO (2-(4-carboxy-phenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide)나 MB 등은 특이적 NO scavenger로서 식물 조직 내의 내재성 NO의 작용을 차단시키기 위하여 식물 검정법 (whole plant assay)에서 많이 사용되고 있다 (Cragan 1999, Pagnussat et al. 2002). 특히, MB는 식물 조직내에서 NO의 생성 또는 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Cragan 1999).

본 실험에서 9일간 광배양한 후 처리구 별로 자엽에서의 부정근 발생량을 비교 관찰한 결과 Figure 1과 같았고, 이 때 발생된 부정근의 성장량을 정량적으로 분석하기 위해 발생된 뿌리의 개수와 길이, 건조 중량을 측정하여 나타내었다 (Figure 2). 그 결과 50 µM SNP 단독 처리구에서 최대 부정근 발달을 보였으며, 처리 농도 의존 방식으로 부정근 성장에 영향을 끼쳤다. 즉, 발생된 부정근의 수는 증류수 대조구에서는 자엽 당 평균 2.3개, 50 µM SNP 단독 처리구에서는 12개로, 대조구 보다 약 5.3배가 증가 하였으나 10 µM SNP와 200 µM SNP 처리구에서는 대조구와 비슷한 수준을 나타내었다(Figure 2A). 부정근의 길이와 건조중량도 50 µM

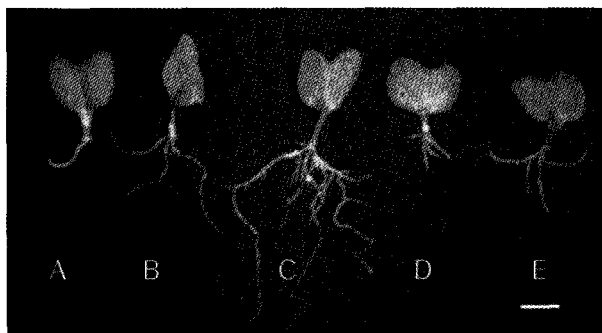


Figure 1. The effect of the nitric oxide (NO) donor, sodium nitroprusside (SNP), on the adventitious root formation in radish cotyledons. The radish cotyledons were prepared from 4-day-old seedlings and were incubated for 9 day with distilled water or different concentrations of SNP as indicated (A: distilled water, B: 10 µM SNP, C: 50 µM SNP, D: 200 µM SNP, E: 50 µM SNP +5 µM methylen blue). Photographs were taken after 9 d of treatments. Bar indicates 1 cm.

SNP 단독 처리구에서 최대값을 보이면서 전체적으로 부정근 개수의 경우와 비슷한 경향을 나타냈다 (Figure 2B, C). 한편, 5 µM MB를 50 µM SNP와 혼합 처리 시 SNP에 의해 촉진된 부정근의 개수, 길이 및 건조 중량은 다시 억제되어 대조구와 비슷한 수준을 나타내었다 (Figure 2. A, B and C). 이러한 결과로부터 무 자엽에서 SNP는 50 µM의 최적농도를 나타내면서 농도 의존방식으로 부정근 형성을 유도하였으며 SNP에 의해 유도된 부정근 형성은 NO에 의한 효과임을 알 수 있었다.

NO에 의해 유도된 부정근 형성과정과 칼슘 Antagonist

Perdue 등 (1988)은 뿌리의 굴중성 발현에 칼슘이 관여하고 있음을 제시하였으며 또한 세포의 분화 및 신장 성장에

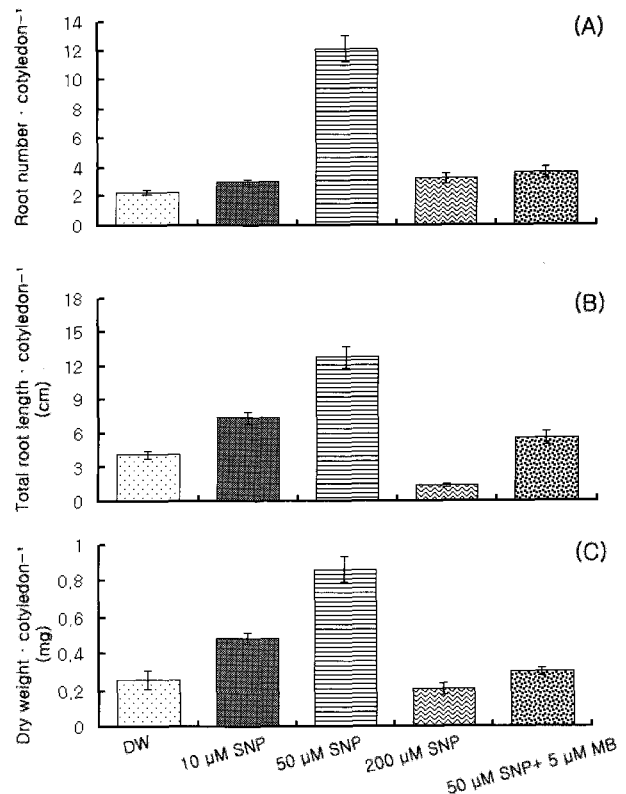


Figure 2. The effect of NO donor, SNP, on the adventitious root number (A), length (B), and dry weight (C) in radish cotyledons. Cotyledons were treated as described in Figure 1. Adventitious roots longer than 0.3 cm were chosen in order to determine the number, length and dry weight after 9 d of treatments. Roots were dried for 24 h at 70°C and weighted. Data are means ± standard errors (n= 36 cotyledons from three independent experiments).

서도 칼슘의 조절역할이 보고되었다 (Schieffelin et al. 1992). Brummell과 MacLachlan (1989)는 칼슘 antagonist인 TMB-8이 완두 줄기에서 옥신에 의해 유도되는 세포신장과 세포벽 합성을 억제한다는 사실과 동시에 세포벽합성 억제 효과가 칼슘 재공급 시 다시없어진다는 사실을 보여주었다. 이와 같이 칼슘이온은 식물의 여러 발달 과정에서 중요 조절 역할을 수행하는 것으로 알려지고 있다.

그러므로 무 자엽에서 NO에 의해 유도된 부정근 형성과정에서 칼슘의 역할을 알아보려고 하였다. 이를 위해 칼슘 chelator인 0.5 mM EGTA와 원형질막 칼슘이온 채널 차단제인 0.1 mM LaCl₃를 50 μM SNP와 각각 혼합 처리하여 9일간 배양한 후 각 처리구 별로 자엽에서의 부정근 발생을 비교 관찰하였고 (Figures 3, 5), 부정근의 성장량을 정량적으로 평가하기 위해 발생된 뿌리의 개수와 길이, 건조중량으로 분석 측정하여 나타내었다 (Figures 4, 6). Figure 3과 Figure 4에서 보듯이, SNP와 EGTA의 혼합 처리구에서 발생된 부정근의 개수는 50 μM SNP 단독처리구 (평균 10개)에 비해 60%가 감소하여 평균 4개로 나타났고, 길이 역시 약 60%가 감소되었다. 건조중량은 30%가 감소하여 SNP 처리에 의해 촉진된 부정근 형성이 0.5 mM EGTA 처리에 의해 다시 현저히 억제되었음을 알 수 있었다. 또한 0.1 mM LaCl₃와 SNP 혼합 처리구의 경우 역시 50 μM SNP 단독처리구에 비해 현저하게 부정근의 생장이 억제되었는데, SNP와 LaCl₃의 혼합처리구에서 발생된 부정근의 개수는 SNP 단독처리구에 비해 약 80%가 감소되어 평균 2개로 나타났으며, 길이는 약 90%가 감소하였고, 건조중량은 약 80%가 감소되었다 (Figures 5, 6).

(Lamotte 2004)는 최근에 담배 세포의 스트레스 내성 연구

에서 NO 공여체인 diethylamine 화합물이 세포내 칼슘저장소로부터 칼슘 이온의 방출을 촉진시켜 시토플asm 내 칼슘 농도

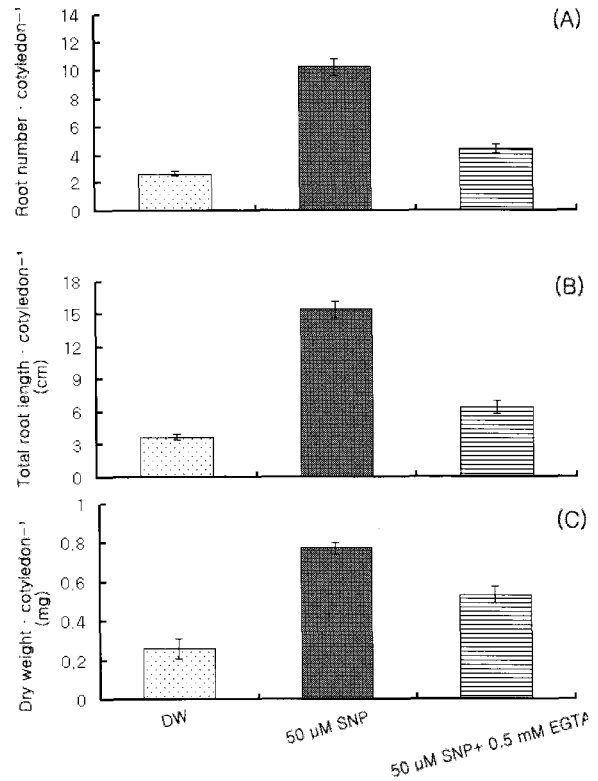


Figure 4. The effect of calcium chelator EGTA on SNP-induced adventitious root number (A), length (B), and dry weight (C) in radish cotyledons. Cotyledons were treated as described in Figure 3. Adventitious roots longer than 0.3 cm were chosen in order to determine the number, length and dry weight after 9 d of treatments. Adventitious roots were dried for 24 h at 70 °C and weighted. Data are means ± standard errors (n= 36 cotyledons from three independent experiments).

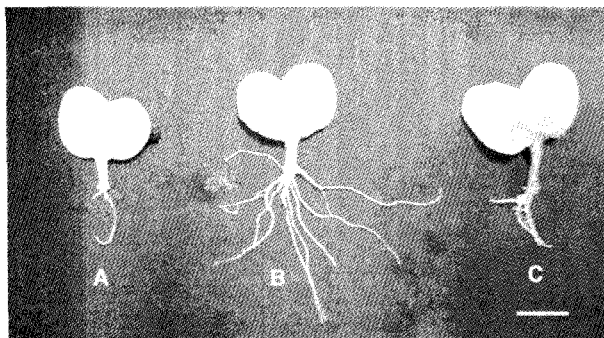


Figure 3. The effect of calcium chelator EGTA on SNP-induced adventitious root formation in radish cotyledons. The cotyledons were prepared from 4-day-old seedlings. They were incubated with distilled water (A), 50 μM SNP alone (B), or 50 μM SNP plus 0.5 mM EGTA (C). Photographs were taken after 9 d of treatments. Bar indicates 1 cm.

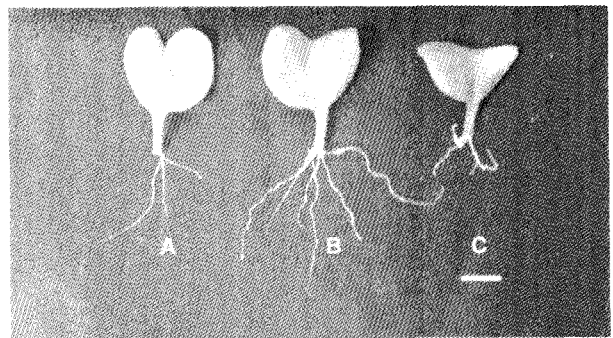


Figure 5. The effect of calcium channel blocker, LaCl₃ on SNP-induced adventitious root formation in radish cotyledons. The cotyledons were prepared from 4-day-old seedlings. They were incubated with distilled water (A), 50 μM SNP alone (B), or 50 μM SNP plus 0.1 mM LaCl₃ (C). Photographs were taken after 9 d of treatments. Bar indicates 1 cm.

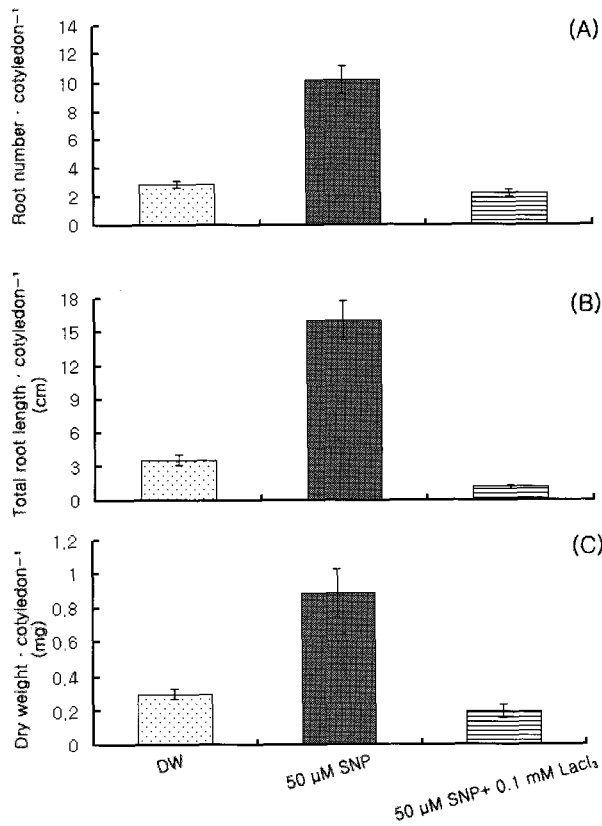


Figure 6. The effect of calcium channel blocker LaCl₃ on SNP-induced adventitious root number (A), length (B), and dry weight (C) in radish cotyledons. Cotyledons were treated as described in Figure 5. Adventitious roots longer than 0.3 cm were chosen in order to determine the number, length and dry weight after 9 d of treatments. Roots were dried for 24 h at 70°C and weighted. Data are means ± standard errors (n=36 cotyledons from three independent experiments).

를 증가시킨다는 결과를 보여주었다. Wendehenne 등 (2004)도 세포 내 NO 신호를 매개하는 이차 신호전달자로서 cyclic GMP (cGMP)와 칼슘 이온 등을 제시하면서 NO가 guanylate cyclase (GC)의 heme기에 붙어서 GC를 활성화하여 그로 인해 cGMP의 양을 증가시키고 이 때 증가된 cGMP가 세포막의 칼슘 통로를 개방시켜 시토플 내로의 칼슘 유입을 유도한다고 하였다. 이러한 과정에서 칼슘 공급처로는 소포체, 골지체, 액포 등 세포내 소기관과 세포벽 및 세포 외부의 세포간극 등이 알려져 있다 (Poovaiah 1987). 이들 연구 결과는 NO가 시토플 칼슘이온 농도 조절에 관여하고 있음을 제시하는 것이다. 그러므로 본 실험결과와 이들 보고들로부터 NO가 무자엽에서 시토플 내 칼슘이온 농도 조절을 통해 부정근 형성촉진을 유도하고 있음을 알 수 있었다.

SNP, LaCl₃ 및 Trifluoperazine (TFP)에 의한 peroxidase 활성도 변화와 부정근 발달

뿌리 발생 유도과정에는 먼저 물관부 형성을 위한 세포벽의 리그닌화 (lignification) 반응이 일어나는데 이때 세포벽 내에 리그닌과 슈베린 (suberin)이 합성되어 축적 된다 (Gaspar et al. 1985, Zeir et al. 1997, Quiroga et al, 2000). Peroxidase는 주로 세포질 및 세포벽에 존재하여 알콜 단량체를 산화시켜 1차 라디칼 형태의 알콜 분자를 생성하는 반응을 촉매하며 (Christensen et al. 1998), 이들 알콜 화합물이 상호 무작위 적으로 반응하여 리그닌과 슈베린을 형성하게 된다 (Whetten et al, 1998, Carpin et al, 2001). Quiroga 등 (2000)과 Cupers 등 (2002)도 리그닌 단량체와 유사물질인 syringaldazine과 guaiacol을 기질로 사용하여 높은 peroxidase 활성도를 검출함으로써 guaiacol peroxidase (GPX)와 syringaldazine peroxidase (SPX)가 세포벽 형성에 깊은 연관이 있음을 입증하였다. 한편, Rout 등 (2000)은 *Psoralea corylifolia*의 줄기 절편을 기내 배양하면서 뿌리 형성 유도기에 GPX의 활성도 증가 현상을 발견하고 peroxidase가 뿌리 발생과정에 있어 중심적인 역할을 수행한다고 제안하였다. 포플러 (poplar) 식물 줄기에서도 부정근 발생에 앞서 수용성 peroxidase 활성도 값이 최고를 나타냈으며 (Hausman 1993), Gaspar 등 (1985)도 뿌리 형성 유도기와 개시기가 진행되는 동안 특히 염기성 peroxidase 활성도가 먼저 증가하였다가 뒤이어 감소하나 반면에 산성 peroxidase는 두 시기 내내 증가함을 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 무 자엽에서 NO에 의해 유도된 부정근 형성과 관련하여 GPX 와 SPX의 활성도 변화를 측정하였다.

부정근 발생 시기별로 peroxidase 활성도 변화 양상을 분석 한 결과, Figure 7의 결과에서 보이듯이 GPX 활성도는 배양 2일째 까지는 증류수 대조구, 50 μM SNP 단독 처리구, 50 μM SNP와 LaCl₃혼합 처리구 사이에서 유의한 차이가 없이 매우 낮은 활성도를 보였으나 3일 이후부터 모든 처리구에서 증가하였고, 특히 50 μM SNP 단독 처리구에서 빠른 증가를 보여 9일째에 최고값 (26.4 mM tetraguaiacol · min · cotyledon⁻¹)을 보였다. 그러나 50 μM SNP와 LaCl₃혼합 처리구는 증류수 대조구와 비슷한 값을 보인 후 9일 이후부터 감소하기 시작 하여 각 처리구 별로 유의한 차이가 없었다. SPX 활성도의 경우에도 배양 2일째 까지는 모든 처리구에서 유의한 차이가 없이 낮은 활성도를 보였으나 3일 이후부터는 증가하기 시작 하였고 이 중 50 μM SNP 단독 처리구에서 신

속한 증가를 보여 8일째에 최고값 (2.9 mM syringaldazine·min·cotyledon⁻¹)을 나타내었으나 반면에 50 μM SNP와 LaCl₃ 혼합 처리구는 증류수 대조구와 비슷한 값을 나타내면서 8일 이후 감소하였다 (Figure 8). 이들 결과는 NO가 칼슘 존재 하에 무 자엽에서 GPX와 SPX의 활성도 발현을 증가시켜 부정근 형성을 촉진 시킬 수 있음을 보여주는 것이다.

시토플 내 칼슘은 특이적 칼슘 결합 단백질인 칼모듈린 (calmodulin)과 결합된 복합체 형태이거나 (Babu et al. 1985) 혹은 유리 칼슘이온 (Ca²⁺) 상태로 빛, 중력 및 호르몬 자극에 대한 세포반응에서 중요한 매개 역할을 할 수 있다 (Yang and Poovaiah 2002). 따라서 SNP에 의하여 유도된 부정근 형성 촉진과정에서 어떤 형태의 칼슘이 효과적으로 작용하는가를 알아보려고 칼모듈린 길항제인 TFP를 이용하여 GPX와 SPX 활성도 변화를 조사하였다. Table 1에서 보여 지듯이, 무자엽 배양 9일째에, 50 μM SNP와 50 μM TFP 혼합 처리구에서 발생된 자엽당 부정근의 개수는 50 μM SNP 단

독처리구 (평균 10개)에 비해 70%가 감소하여 평균 3개로 나타났고, 길이 역시 약 73%가 감소되었다. 건조중량도 67%가 감소하여 SNP 처리에 의해 촉진된 부정근 형성이 50 μM TFP 처리에 의해 다시 현저히 억제 되어 증류수 대조구 수준을 보여 주었다. 이때 동시에 GPX 활성도의 경우, SNP와 TFP 혼합 처리구는 50 μM SNP 단독 처리구에 비해 37% 감소된 22.27 mM tetraguaiacol·min·cotyledon⁻¹ 값을 나타내었고, SPX 활성도 역시 49%감소한 1.32 mM syringaldazine·min·cotyledon⁻¹ 값을 나타냈다 (Table 1). 이들 결과는 무자엽의 부정근 형성과 관련하여 NO가 칼슘을 매개로 GPX와 SPX 활성도 발현을 증진 시키는 과정에서 칼슘은 칼모듈린과 결합된 칼슘-칼모듈린 복합체 형태로 작용하고 있음을 의미 하는 것이다. 그러나, 칼슘-칼모듈린 복합체를 매개로 NO가 어떻게 이들 Peroxidase 활성도를 조절하는가에 대한 자세한 연구는 계속 진행되어야 할 것이다.

결론적으로, 본 실험에서 얻어진 결과들로부터 NO는 시

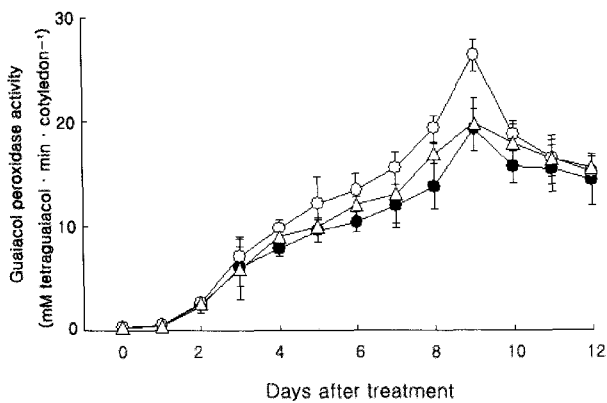


Figure 7. Changes in guaiacol peroxidase activity in cotyledons. Cotyledons were prepared from 4-day-old germinated radish seedlings. These cotyledons were incubated with distilled water (●), 50 μM SNP alone (○), or 50 μM SNP plus 0.1 mM LaCl₃ (△), respectively. Data are means ± standard errors (n= 24 cotyledons from three independent experiments).

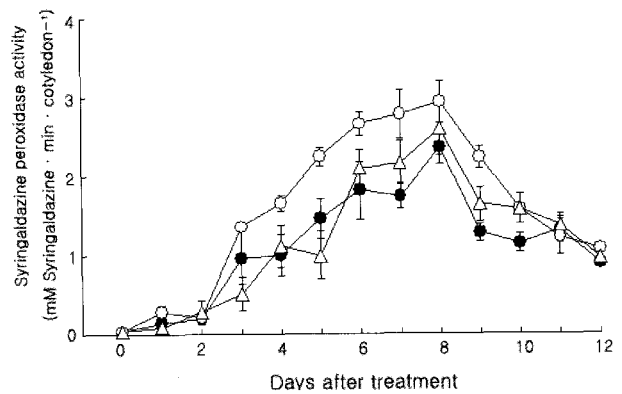


Figure 8. Changes in syringaldazine peroxidase activity in cotyledons. Cotyledons were prepared from 4-day-old germinated radish seedlings. These cotyledons were incubated with distilled water (●), 50 μM SNP alone (○), or 50 μM SNP plus 0.1 mM LaCl₃ (△). Data are means ± standard errors (n= 24 cotyledons from three independent experiments).

Table 1. Effects of trifluoperazine (TFP) on SNP-induced adventitious root formation and activities of guaiacol peroxidase (GPX) and syringaldazine peroxidase (SPX) in radish cotyledons

Treatment	Number of roots	Length of roots (cm)	Dry weight of roots (mg)	GPX (mM tetraguaiacol/min/cotyledon)	SPX (mM syringaldazine/min/cotyledon)
DW	2.08 ± 0.12	3.14 ± 0.16	0.27 ± 0.02	21.70 ± 3.45	1.53 ± 0.30
50 μM SNP	9.91 ± 0.42	13.08 ± 0.46	0.74 ± 0.02	30.52 ± 4.42	2.55 ± 0.41
50 μM SNP +50 μM TFP	2.83 ± 0.20	3.56 ± 0.29	0.25 ± 0.03	22.27 ± 1.8	1.32 ± 0.43

Data are means ± standard errors (n= 24 cotyledons from three independent experiments)

토출 칼슘 농도 조절을 통해 GPX와 SPX 활성도 발현을 유도하여 무 자엽에서 부정근 형성을 촉진하고 있음을 알 수 있었다.

적 요

분리된 무 자엽 조직에 산화질소 (nitric oxide: NO) 공여체인 sodium nitroprusside (SNP) 처리 시 농도 의존방식으로 부정근의 발달을 증진시켰다. 그러나 이러한 NO 증진 효과는 세포외 칼슘 chelator인 0.5 mM EGTA 또는 세포막 칼슘채널 차단제인 0.1 mM LaCl₃를 각각 50 μM SNP와 함께 혼합처리 시 반전되었다. 또한, 뿌리 발생에서 중심적 역할을 수행하는 것으로 알려진 guaiacol peroxidase (GPX)와 syringaldazine peroxidase (SPX)의 활성도가 SNP 단독 처리된 자엽에서 부정근이 형성되는 동안 현저히 증가하였다. 그러나, SNP와 LaCl₃ 혼합처리 시 SNP에 의해 유도된 GPX와 SPX 활성도 증가가 거의 증류수 대조구 수준으로 억제되었다. calmodulin의 antagonist인 trifluoperazine 역시 SNP로 처리된 자엽에서 부정근 형성을 억제하여 발생된 뿌리의 개수와 길이를 감소시켰으며 동시에 GPX와 SPX를 불활성화하였다. 결론적으로, 이들 결과는 칼슘이 GPX와 SPX 활성도 조절을 통해 부정근 유도를 이끄는 NO 반응에 포함되어 있음을 나타내는 것이다.

인용문헌

- Babu YS, Sack JS, Greenhough TJ, Bugg CE, Means AR, Cook WJ (1985) Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature* 315: 37-40
- Beligni MV, Lamattina L (2001) Nitric oxide in plant: the history is just beginning. *Plant Cell and Environ* 24: 267-278
- Beligni MV, Fath A, Bethke PC, Lamattina L, Jones RL (2002) Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol* 129: 1642-1650
- Brummell DA, Maclachlan GA (1989) Calcium antagonist TMB-8 inhibits cell wall formation and growth in pea. *J Exp Bot* 40: 559-565
- Carpin S, Crèvecoeur M, Meyer MD, Simon P, Greppin H, Penel C (2001) Identification of a Ca²⁺-pectate binding site on an apoplastic peroxidase. *The Plant Cell* 13: 511-520
- Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, Montagu MV, Boerjan W (1998) Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol* 118: 125-135
- Cragan JD (1999) Teratogen update: methylene blue. *Teratology* 60: 42-48
- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L (2005) Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* 221: 297-303
- Cupers A, Vangronsveld J, Clijsters H (2002) Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* copper and zinc phytotoxicity: A comparison. *J Plant Physiol* 159: 869-876
- Gaspar T, Penel C, Castillo FJ, Greppin H (1985) A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol Plant* 64: 418-423
- Gouvêa CMCP, Souza, JF, Magalhaes ACN, Martins IS (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segment. *Plant Growth Regul* 21: 183-187
- Haissig BE, Davis TD, Riemenschneider DE (1992) Researching the controls of adventitious rooting. *Physiol Plant* 84: 310-317
- Hausman JF (1993) Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised in vitro. *Plant Growth Regul* 13: 263-268
- Ignarro LJ (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium derived nitric oxide. *Annu Rev of Pharm and Toxic* 30: 535-560
- Lamotte O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-Legrand A, Lebrun-Gracia A, Durner J, Pugin A, Wendehenne D (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor. *Plant Physiol* 135: 516-529
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* 129: 954-956
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the IAA-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* 132: 1241-1248
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombardo MC, Lamattina L (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol* 135: 279-286
- Perdue DO, LaFavre AK, Leopold AC (1988) Calcium in the regulation of gravitropism by light. *Plant Physiol* 86:

- 1276-1280
- Polle A, Otter T, Seifert F (1994) Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway Spruce (*Picea abies* L.) *Plant Physiol* 106: 53-60
- Poovaiah BW (1987) The role of calcium and calmodulin in senescence. In: Thompson WW, Nothnagel EA, Huffaker, (eds), *Plant senescence. : Its Biochemistry and Physiology*, ASPP, Rockville, pp 182-189
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló, A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, de Forchetti SM, Tigier HA, Valpuesta V (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122: 1119-1128
- Rout GR, Samantaray S, Das P (2000) In vitro rooting of *Psoralea corylifolia* Linn: Peroxidase activity as a marker. *Plant Growth Regul* 30: 215-219
- Schiefelbein JW, Shipley A, Rowse P (1992) Calcium influx at the tip of growing root-hair cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 187: 455-459
- Syros T, Yupsanis T, Zafiriadis H, Economou A (2004) Activity and isoforms of peroxidase, lignin and anatomy during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *J Plant Physiol* 161: 69-77
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence. *Plant Biol* 7: 449-455
- Whetten RW, MacKay JJ, Sederoff RR (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 585-609
- Yang T, Poovaiah BW (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4097-4102
- Zeier J, Schreiber L (1997) Chemical composition of hypodermal and endodermal cell walls and xylem vessels isolated from *Clivia miniata*. *Plant Physiol* 113: 1223-1231

(접수일자 2007년 6월 8일, 수리일자 2007년 6월 25일)