

## 알루미늄에 의한 녹두 뿌리의 성장 억제와 원형질막 H<sup>+</sup>-flux의 손상

안성주<sup>†</sup> · 김유선 · 박 원 · 구양규 · 민경수 · 황태익

전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부 농업과학기술연구소

### Aluminum-induced Root Growth Inhibition and Impaired Plasma Membrane H<sup>+</sup>-flux in Mung Bean

Sung-Ju Ahn<sup>†</sup>, Yu-Sun Kim, Won Park, Yang-Gyu Ku, Kyung-Soo Min, and Tei-ik Whang

*Institute of Agricultural Science and Technology, Department of Plant Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea*

**ABSTRACT** It has been well established that aluminum (Al) inhibits root tip growth rapidly in acid soil. We report the correlation between Al induced growth inhibition and impaired H<sup>+</sup>-influx in mung bean (*Vigna radiata* L. cv. Kumsung). The root growth inhibition was dependent on Al concentration (0, 10, 25, 50, 100 μM) and exposure time (12 and 24 h). Using Hematoxylin staining, it was observed that the root damage was occurred preferentially in regions with high Al accumulation. Using the pH indicator, it was shown that the surface pH of root tip was strongly alkalinized in the control whereas changed only slightly in the 50 μM Al-treated root. The H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane vesicles was inhibited by 56% in the Al-treated roots compared to control root. Decrease in the amount of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase (100 kDa) translation in the plant roots under Al stress was demonstrated by Western blot analysis. These results indicate that the dynamics of H<sup>+</sup>-flux across the root tip play an important role in root growth under Al stress.

**Keywords** : acid soil, aluminum, mung bean, H<sup>+</sup>-influx, root growth, surface pH

**세계** 농경지의 30-40%를 차지하는 산성토양은 아시아를 포함해 세계에 분포하고 있고 토양의 산성화는 점점 더 많이 진행되고 있다(Baligar *et al.*, 1998). 우리나라의 토양 특성이 모재와 강우에 주로 영향을 받아 산성화가 촉진되고 중금속 원소의 활성이 높아져 이들 원소의 흡수가 조장된다. 예를 들어 수국은 꽃잎의 색깔에 따라 알루미늄의 함량

정도를 알 수 있는 작물인데 분홍색은 낮은 알루미늄, 진청색은 높은 알루미늄을 함유하고 있다(Ma *et al.*, 1997a). 또 알루미늄을 잘 축적하는 작물로 알려진 메밀(Shen *et al.*, 2001)과 차나무(Nagata *et al.*, 1992) 등의 식품 안전성을 위해서도 중금속 오염 토양은 최우선적인 개량이 필요하다.

산성토양화는 첫째, 토양 자체의 성분이 산성을 나타내는 경우 둘째, 산성 화학비료의 연용, 산성비와 환경오염 등에 의해 촉진된다. 토양이 산성화됨에 따라 작물의 생육이 저해되는 피해가 많이 발생하는데(Sanchez and Benites, 1987), 이러한 피해는 토양 중에 가장 많이 함유되어 있는 금속원소인 알루미늄 때문이다.

알루미늄은 pH가 중성인 토양에서는 다른 원소와 안정한 화합물을 형성하여 토양공극에 용해되지 않지만, 토양이 산성일 경우에는 알루미늄이 용해되어 뿌리에 흡수되고, 그 결과 뿌리의 성장을 현저하게 방해한다. 즉, pH 5.0 미만의 강산성인 토양에서는 알루미늄이 용해성 8면 6수체형(Al<sup>3+</sup>)으로 존재한다.

알루미늄 독성 피해를 입은 식물은 뿌리 생육이 억제되어 근계가 위축되고 상처를 입어서 광물질 결핍과 수분 스트레스를 받게 된다. 또 식물의 생육에 필수적인 인산이 알루미늄과 결합하기 때문에 식물이 흡수, 이용할 수 없는 형태가 된다고 알려져 있다. 그러므로 세계 경작지의 30-40% 이상을 차지하는 산성토양에서 알루미늄 독성은 농업생산의 주요한 제한요인의 하나이다(Matsumoto, 2000).

산성 토양 내에서 알루미늄 스트레스에 민감한 식물은 뿌리의 선단 부분(세포의 분열과 확장이 일어나는 부분)이 가장 먼저 피해를 받게 되므로(Sivaguru and Horst, 1998), 뿌

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-62-530-2052  
(E-mail) asjsuse@chonnam.ac.kr <Received January 17, 2007>

리의 중요한 기능인 수분과 양분의 흡수가 저해되고 뿌리 생장이 억제되어 결과적으로는 생산력이 저하한다. 한편, 알루미늄 스트레스에 둔감한 식물은 내성(tolerance)을 나타낸다. 알루미늄 스트레스에 대한 내성은 식물체 내로 알루미늄을 흡수하여 도관을 통해 지상부의 엽이나 꽃에 알루미늄을 축적하는 기작과 뿌리의 근단으로부터 유기산(malate, citrate, oxalate 등)과 비유기산(polypeptides, phosphate phenolics 등) 같은 물질을 방출하여 알루미늄의 독성을 무독화시키는 기작에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다(Miyasaka *et al.* 1989, Delhaize *et al.*, 1993, Ma *et al.*, 1997b).

한편 알루미늄 독성(toxicity)에 관해서는 세포막 수준에서의 연구가 진행되고 있는데 세포질내의 칼슘농도 변화(Rengel, 1999)와 세포막의 표면 전위(Ahn *et al.*, 2001, 2004) 등 몇 가지 기작이 제안되어졌다. 또 알루미늄이 식물 뿌리 세포의 apoplastic과 symplastic의 어느 위치에 존재하는지에 대한 논란(Kochian, 1995)에 대해, 최근에 Illes *et al.*(2006)은 애기장대를 사용하여 알루미늄 스트레스로부터 회복되는 동안에 가장 민감한 부위인 근단부 내 transition zone에서만 알루미늄이 세포 안에 존재하고, 다른 부위에서는 존재하지 않는 것으로 보고하였다. 알루미늄의 존재 위치는 우선 세포막 즉, 원형질막을 경계로 이루어지기 때문에 본 연구도 이 점에 초점을 맞추었다.

식물의 원형질막에는  $H^+$ -ATPase가 존재한다. 이 효소는 ATP가 ADP와 인산기로 분해되면서 발생하는 에너지를 이용하여 제 1차 능동 수송을 한다. 이때 세포내  $H^+$ 을 세포 밖으로 배출하고 막 경계에서 발생하는  $H^+$ 의 농도 구배는 다른 양이온과 물질이 세포내로 흡수할 수 있는 기회를 제공한다. 또 여러 가지 열악한 환경 조건에서 생존을 위한 매우 중요한 역할을 담당하고 있으며 생체막의 약 5%를 차지하고 있다(Sussman, 1994). Ahn *et al.*(2001, 2002)은 이미 알루미늄 스트레스 하에서 호박 뿌리의 원형질막에 존재하는 이 효소의 활성이 감소하는 것을 보고하였다.

이에 본 연구에서는 동양의 작물로서 우리나라의 남쪽에서 주로 재배가 되고 있는 녹두를 재료로 실험을 실시하였다. 실험은 산성 토양에서 재배 시 문제가 되는 중금속 중 하나인 알루미늄과 관련하여 조기에 알루미늄 독성 피해를 막아 생산력 감소를 최소화하기 위해 녹두 유묘기의 뿌리 부위에 집중하였다. 특히 녹두의 뿌리 선단 부위에 알루미늄이 미치는 영향을 알아보고자 뿌리의 생장, 알루미늄 함량, 뿌리 표면의 pH 변화, 원형질막의  $H^+$ -ATPase 활성과 단백질의 변화 등을 조사 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 생장조건과 뿌리 생육 조사

금성 녹두(*Vigna radiata* L.)의 종자를 12시간 동안 흡수시킨 다음 발아상(25°C) 내에서 여과지를 깬 petri dish에서 발아시킨 후 1/5배 영양액(Hoagland solution, Gamborg and Wetter, 1975)을 함유한 간이 수경 재배용 포트에 옮겨 심었다(pH 4.5). 생육상에서 5일간 자란 균일한 묘를 처리하기 12시간 전에 인산을 함유하지 않은 수경액으로 옮긴 후 알루미늄 처리를 하였다. 예비실험 결과 뿌리 생장이 억제되는 농도인 0, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (pH 4.5)로 처리하였고, 처리 후 12와 24시간 후 뿌리의 길이를 측정하였다. 또한 알루미늄에 의한 뿌리의 피해 정도를 확인하기 위해 0.2% Hematoxlin 수용액에 10분 간 침지하여 염색시킨 후 증류수에 옮겨 2회 씻어낸 다음 사진을 촬영하였다. 알루미늄 농도 실험은 3회 반복하였으며, 이 후 실험에서는 알루미늄 처리 농도를 모두 50  $\mu$ M로 정하여 수행하였다.

### 뿌리 내의 알루미늄 함량

알루미늄을 처리 후, 증류수로 잘 씻어낸 뿌리를 끝으로부터 1 cm의 정단부분(0-1 cm)과 나머지 부분의 1 cm(1-2 cm)를 칼로 잘라 낸 후 2M HCl를 1 mL 함유한 튜브에 넣어 48시간 동안 상온에서 보관하여 분해시켰다. 알루미늄의 함량은 atomic absorption spectrophotometer(Z-8270, Hitachi, Tokyo)를 이용하여 측정하였다.

### 뿌리 표면의 pH 변화 측정

뿌리 표면의 pH 변화를 관찰하기 위해 알루미늄 스트레스 연구에 상대적으로 용이한 변형된 agarose plate technique을 이용하였다(Ahn *et al.*, 2002). 150 mL plate에 0.7% agarose, 인산이 제외된 1/5 Hoagland solution, pH 지시 시약인 0.015% Bromocresol Purple을 녹여 pH를 4.5로 맞추고 plate에 부은 다음 agarose가 굳기 전에 식물을 plate에 옮겨 심었다. 이 경우 agarose의 알루미늄 처리는 최종 monomeric 알루미늄 농도를 50  $\mu$ M로 맞추기 위해 Kerven *et al.*(1989) 방법에 따라 180  $\mu$ M을 처리하였다. pH는 0.5 단위(pH 4.0-6.5)로 표준 색깔을 촬영하여 비교하였다.

### 원형질막 분리, $H^+$ -ATPase 활성 측정 및 Western-blot

원형질막의 분리는 two-phase partitioning(Palmgren *et al.*, 1990; Ahn *et al.*, 2001, 2002) 방법을 조금 변형하여 4°C에서 실행하였으며, 분리된 원형질막은 바로 다음 실험에 사

용하였거나 -80°C에 보관 후 사용하였다. H<sup>+</sup>-ATPase 활성 측정은 Ahn *et al.*(2001)의 방법을 이용하였으며, 막 단백질은 표준 BSA를 이용한 단백질의 검량선을 작성하여 정량하였다(Bradford, 1976). 또한 12% SDS-PAGE로 전기영동한 막 단백질은 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막으로 옮긴 다음, western-blot을 위해 옥수수 H<sup>+</sup>-ATPase에 대항하여 만들어진 제 1차 항체(일본 오카야마대학 Sasagawa 교수로부터 분양받음)를 1:1,000배로 희석하여 사용하였고, 단백질 H<sup>+</sup>-ATPase 검출은 alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit인 제 2차 항체를 1:1,500배로 희석하여 실시하였다. 사용된 모든 시약은 Sigma(St. Louis, USA)사로부터 구입하여 사용하였고, 모든 실험은 최소한 2번 이상의 반복을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 알루미늄 처리에 따른 뿌리 성장 특성

녹두의 알루미늄 처리 농도별 1차 뿌리의 성장 특성을 나타낸 것이 그림 1이다. 양액내 인산기는 알루미늄과 결합하므로 인산을 제외한 수경재배용 양액(1/5배 Hoagland solution)으로 녹두를 12시간 전에 옮겨 심은 후 처리하였다. 또한 알루미늄은 pH 5 이하에서 Al<sup>3+</sup> 이온인 경우에만 독성을 띄게 됨으로 양액의 pH는 4.5로 조정하였다. 처리된 알루미늄의 농도는 10, 25, 50, 100 μM이었으며, 알루미늄에 의한 뿌리 성장의 억제는 12시간부터 차이를 보였다(그림 1). 저농도인

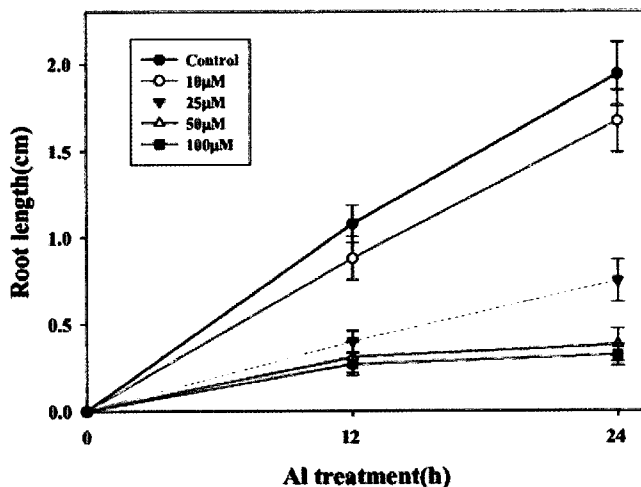


Fig. 1. Effects of Al (0, 10, 25, 50, and 100 μM) supply on the root elongation rate of mung bean roots after 12 and 24 h treatment period. Values are mean ± SE and representative of at least three independent experiments.

10 μM 처리에서는 12시간째부터 생장이 억제되기는 하였으나 유의차는 없었다. 그러나 25 μM 농도에서부터는 뿌리 생장이 심각하게 억제되었고, 50과 100 μM 처리구에서는 생장이 거의 중지되었다(그림 1).

파괴된 세포를 가시화할 수 있는 0.2% Hematoxilin으로 염색한 뿌리의 사진이 그림 2이다. Hematoxilin은 알루미늄이 처리된 뿌리의 선단부에서 주로 염색되었으며, 50 μM 농도로 처리된 뿌리의 경우 12시간째(그림 2A)보다는 24시간째(그림 2B)에 뿌리의 선단부 전체가 염색되어 그 피해가 심각함을 보여 주었다. 또 뿌리의 선단부위가 대조구와 비교하여 어두운 갈색을 띠었고 약간 두꺼워졌으며, 표면이 심각할 정도로 가로 쪽으로 갈라지는 현상도 관찰되었다. 그러므로 이 후 모든 실험은 50 μM 알루미늄 농도로 처리하여 실시하였다. 이러한 알루미늄에 의한 뿌리의 성장 억제 현상이 신장대(elongation zone)에서 나타나는 것은 호박을 재료로 본 연구진이 이미 보고 하였다(Ahn *et al.*, 2001, 2002). 본 연구에서 사용된 녹두의 경우는 아직까지 보고된 바가 없는 것으로 사료된다.

### 뿌리 내 알루미늄 함량

각 농도별로 24시간 알루미늄 처리를 한 후 뿌리의 근단부(1 cm)와 근단부를 제외한 부위(근단 제외부)의 뿌리르 나누어 알루미늄 함량을 측정하였다. 10 μM 처리구에서는 근단부와 근단 제외부와 차이가 없었다. 그러나 알루미늄 처리 농도가 높을수록 그 차이는 더욱 크게 나타났다. 즉, 25 μM 알루미늄 처리구에서는 근단부가 근단 제외부 보다 알

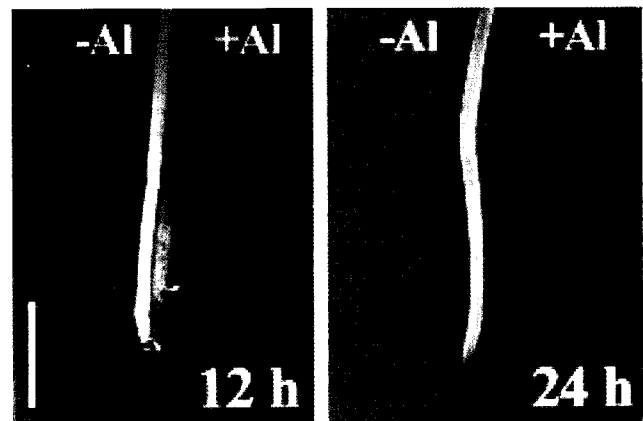


Fig. 2. Hematoxilin (0.2%) stained root of mung bean. The plants were grown in the presence (+Al) and absence (-Al) of 50 μM for 12 (A) and 24 h (B) in Hoagland solution (1/5 X) adjusted to pH 4.5. The roots from a representative replicate are shown. Bar represents 1 cm.

루미늄 함량이 2배 높았고, 50과 100  $\mu\text{M}$  처리구에서는 2.5 배 높았다(그림 3). Sivaguru and Horst(1998)는 알루미늄 처리한 옥수수의 뿌리에서 알루미늄이 근단부에 더 많이 축적되었다고 보고하였고, 본 연구진도 호박의 2-4 mm 지점인 신장대에서 알루미늄 함량이 다른 부위보다 2배 정도 높음을 보고하였다(Ahn *et al.*, 2001). 알루미늄 함량 뿐 아니라 callose의 함량도 뿌리 끝에서 처리 농도와 시간에 따라 더 많이 축적되었다는 보고(Sivaguru and Horst, 1998)가 있으나 본 연구에서는 확인하지 못하였다.

### 뿌리 표면의 pH 변화

뿌리 표면의  $\text{H}^+$ 의 유입과 유출( $\text{H}^+$ -flux)를 보기 위해 pH 지시약(Bromocresol purple)과 agarose plate technique를 이용하여 녹두 뿌리 대조구와 50  $\mu\text{M}$  알루미늄 처리를 24시간 실시한 후 관찰한 사진이 그림 4이다. 대조구 근단 표면에서는 색깔의 변화가 일어났다. 즉, 노란색(pH 4.5)에서 보라색(pH 6.0 이상)으로 변하는 뿌리 표면의 알카리화를 관찰하였으나 알루미늄 처리구에서는 그 차이가 미미하여 사진으로는 색깔의 변화를 감지할 수 없었다. 뿌리 표면의 색깔 변화는 12시간 정도부터 관찰 되었으며 대조구의 근단부(약 1 cm)에서 그 변화가 심하였다(그림 4). 이 결과는 정상적인 조건에서는 세포의 분열이 활발하게 일어나고 있는 뿌리 끝의 부위에서 왕성한  $\text{H}^+$ 의 유입이 일어나고 있다는 증

거이며, 알루미늄 처리 하에서는 이 부위의 세포막에 다량의  $\text{Al}^{3+}$  이온이 이미 존재하고 있어서  $\text{H}^+$ 의 유입이 자유롭지 못한 것으로 보고 있다. Agarose 안에 Bromocresol purple을 이용한 식물 뿌리의 pH의 변화를 관찰하는 방법은 매우 유용한 것으로 이미 우리는 호박과 오이 뿌리의 알루미늄 처리(Ahn *et al.*, 2002)에 의한 알카리화와 저온 처리(Rhee *et al.*, 2007)에 의한 산성화를 보고하였다. 또 Ahn *et al.* (2001, 2002)은 낮은 농도( $\mu\text{M}$  단위)의 알루미늄 처리에 의한 뿌리 생장의 억제가 원형질막의  $\text{H}^+$ -flux의 손상과 표면전위(surface potential)의 변화에 밀접한 관계가 있다고 보고하였는데 뿌리 표면의 pH 변화는 세포 수준에서 세포막을 통과하는  $\text{H}^+$ -flux의 변화이므로 우리는 이어서 원형질막의  $\text{H}^+$ -ATPase의 활성을 측정하여 보았다.

### 뿌리 원형질막의 $\text{H}^+$ -ATPase 활성 및 translation 발현의 변화

우선 two-phase partitioning법(Palmgren *et al.*, 1990)으로 분리된 원형질막의 순도를 다양한 저해제를 이용하여 조사한 결과 높은 순도(89%)의 원형질막이 분리되어짐을 확인하였다. 24시간 동안 50  $\mu\text{M}$  알루미늄에 처리한 녹두 뿌리와 대조구의 뿌리를 수확한 후 원형질막을 분리하였으며, 분리된 원형질막의  $\text{H}^+$ -ATPase 활성 변화를 알아보았다. 알루미늄을 처리한 뿌리 원형질막  $\text{H}^+$ -ATPase 활성은 대조구에

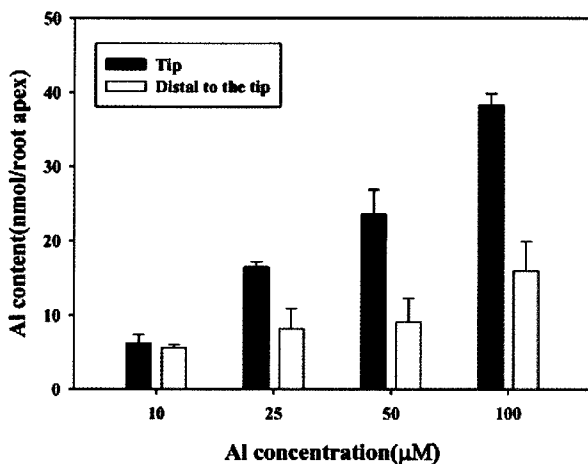


Fig. 3. Effects of Al (10, 25, 50, and 100  $\mu\text{M}$ ) supply on the Al content in the root tip (1 cm) and distal to the tip of mung bean after 24 h treatment period. Al was not detected in control root apices. Values are mean  $\pm$  SE and representative of at least three independent experiments.

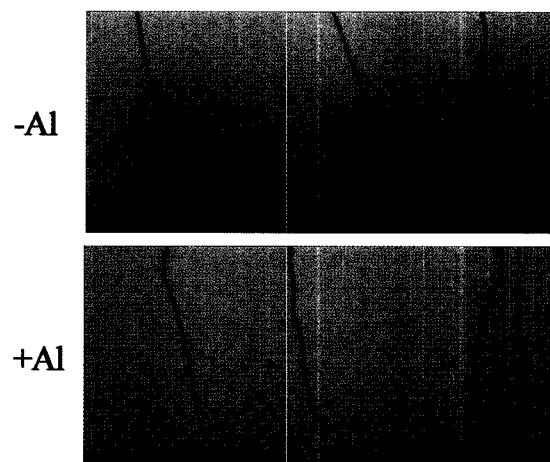


Fig. 4. Effect of 50  $\mu\text{M}$  Al on shift of surface pH ( $\text{H}^+$ -influx) in mung bean root. Alkalization of agarose layer covered roots and Bromocresol purple was used as a pH indicator. The experiment was replicated five times independently, giving similar results. Images from a representative replicate are shown. +Al and -Al : presence and absence of 50  $\mu\text{M}$  Al, respectively.

비해 56%가 억제되었다(그림 5). 흥미롭게도 항체를 이용한 H<sup>+</sup>-ATPase 단백질(100 kDa)의 발현을 조사한 Western blotting 결과는 효소 활성의 감소(그림 5)와 동일한 경향을 보였다. 즉 알루미늄이 처리된 뿌리의 translation 발현 양이 대조구와 비교하여 현저하게 줄어들었음을 확인할 수 있었다(그림 6). 그러나 그림 6A에서 볼 수 있듯이 단백질 전기영동(SDS-PAGE)을 이용한 단백질의 pattern에는 아무런 차이를 볼 수

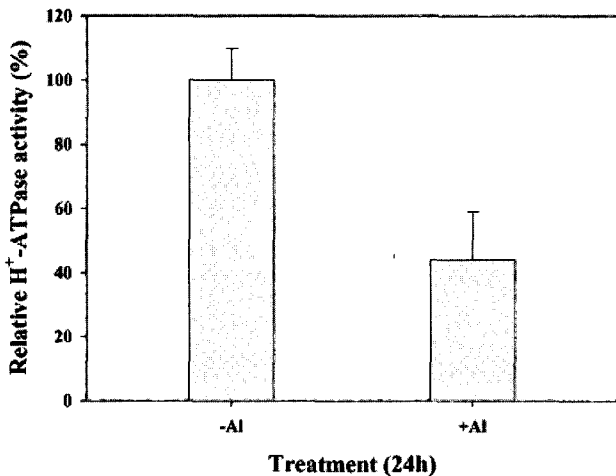


Fig. 5. Effect of 50  $\mu\text{M}$  Al for 24 h on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activities of mung bean roots. Values are mean  $\pm$  SE and representative of at least three independent experiments. +Al and -Al : presence and absence of 50  $\mu\text{M}$  Al, respectively.

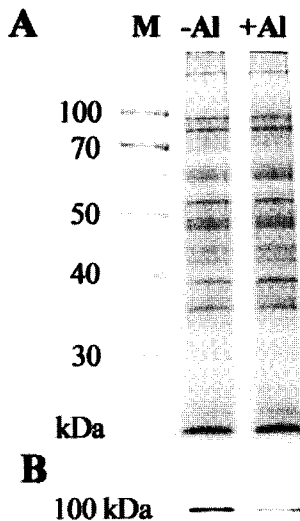


Fig. 6. Coomassie-blue-stained SDS-PAGE profile (A) and western analysis (B) of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase (100 kDa) using an antibody against plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isolated from the roots of mung bean treated with 50  $\mu\text{M}$  Al for 24 h.

가 없었다. 이 결과는 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 활성의 감소와 더불어 단백질의 양도 감소하였다는 결과로 지금까지 보고된 바가 없는 새로운 결과이다.

결론적으로 갈수록 심각해지는 산성비와 산성비로 시용의 증가는 많은 재배 토양의 산성화를 촉진시키고, 알루미늄의 용해도를 증가시켜 작물 뿌리의 성장장애 및 양수분의 흡수를 저해하고, 더 나아가 작물의 생육 및 수량의 감소를 초래하고 있다. 그러나 아직까지 산성토양 내 알루미늄에 의한 피해 정도가 정확히 조사되지 않고 있으며, 본 연구의 재료인 녹두의 알루미늄 스트레스 관련 연구는 전무한 상태이다. 이에 본 연구에서는 상대적으로 낮은 농도인 50  $\mu\text{M}$  알루미늄(pH 4.5) 처리가 뿌리의 신장을 빠른 시간(12시간) 내에 현저히 감소시키고(그림 1), 뿌리 끝 성장 부위의 알루미늄 축적(그림 3)과 가시적 피해(그림 2)가 관찰된다. 이로 인한 세포막 수준에서 원형질막의 H<sup>+</sup>-ATPase 활성의 감소(그림 5)와 함께 뿌리 표면 pH의 알칼리화 현상(그림 4)이 거의 일어나지 않는 것으로 보아, 알루미늄이 세포막 수준에서의 H<sup>+</sup>의 유입뿐 아니라 유출에도 크게 영향을 미쳐 결과적으로 뿌리의 가장 민감한 성장점 부위의 손상(그림 2)과 성장 억제(그림 1)를 유발하는 것으로 생각된다. 그러므로 알루미늄에 의한 식물 뿌리 성장점 부위의 세포막 H<sup>+</sup>-flux의 감소가 초기 알루미늄 독성 기작 중에서 아주 중요한 역할을 하고 있다.

끝으로 본 연구에 사용된 녹두를 포함하여 다른 작물의 직파 재배 시 파종 후 발아 및 생육 초기, 육묘 재배 시 정식 직후 뿌리의 활착기에 일어날 수 있는 알루미늄 독성 피해에 대처할 수 있는 기초 자료로 사용되어 지기를 기대한다.

## 적 요

본 연구는 알루미늄 스트레스가 녹두에 미치는 영향을 보기 위해 뿌리의 성장, 알루미늄 함량, 뿌리 표면의 pH 변화, 원형질막의 H<sup>+</sup>-ATPase 활성과 단백질 양의 변화를 조사하여 분석하였다.

1. 처리된 알루미늄의 농도는 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ 이었으며, 알루미늄에 의한 뿌리생장의 억제는 25  $\mu\text{M}$  이상의 농도 처리구에서 12시간부터 현저히 나타났고, 50과 100  $\mu\text{M}$  처리구에서는 뿌리의 생장이 거의 중단되었다.

2. 0.2% Hematoxylin으로 염색 시 알루미늄이 처리된 근단부에서 주로 염색되었으며, 50  $\mu\text{M}$  농도로 처리된 뿌리의 경우 12시간째 보다는 24시간째에 근단부 전체가 염색되어 그 피해가 심각함을 보여 주었다. 또 근단 부위가 대조구와 비교

하여 어두운 갈색을 나타내고, 표면이 가로 쪽으로 갈라졌다.

3. 처리 농도별 근단부(1 cm)와 근단부를 제외한 부위의 뿌리로 나누어 24시간 처리를 한 후 알루미늄 함량을 측정 한 결과, 10  $\mu\text{M}$  처리구에서는 차이가 없었다. 그러나 알루미늄 처리 농도가 높을수록 즉, 25  $\mu\text{M}$  이상 알루미늄 처리 구에서는 근단부에서 2.5배 이상 높았다.

4. pH 지시약과 agarose plate technique를 이용하여 뿌리 표면의  $\text{H}^+$ -flux의 차이를 본 결과 녹두의 근단부 표면의 알카리화가 대조구에서는 12시간 정도부터 노란색(pH 4.5)에서 보라색(pH 6.0 이상)으로 변하는 것을 관찰하였으나 알루미늄 처리구에서는 색깔의 변화를 볼 수 없었다.

5. 24시간 동안 50  $\mu\text{M}$  알루미늄을 처리한 뿌리 원형질막  $\text{H}^+$ -ATPase 활성은 대조구에 비해 56%가 억제 되었다.  $\text{H}^+$ -ATPase 단백질의 발현을 조사한 Western blotting 결과는 효소 활성의 감소와 유사하게 알루미늄이 처리된 뿌리에서 현저하게 줄어들었음을 확인할 수 있었다.

## 사 사

이 논문은 2005년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 인용문헌

- Ahn, S. J., M. Sivaguru, G. C. Chung, Z. Rengel, and H. Matsumoto. 2002. Aluminum-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of  $\text{H}^+$  across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *J. Exp. Bot.* 53 : 1959-1966.
- Ahn, S. J., M. Sivaguru, H. Osawa, G. C. Chung, and H. Matsumoto. 2001. Aluminum inhibits the  $\text{H}^+$ -ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiol.* 126 : 1381-1390.
- Ahn, S. J., Z. Rengel, and H. Matsumoto. 2004. Aluminum-induced plasma membrane surface potential and  $\text{H}^+$ -ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytol.* 162 : 71-79.
- Baligar, V. C., W. V. Bearer, and J. L. Ahlrichs 1998. Nature and distribution of acid soils in the world. In Schabent, R. E. (ed.) *Proceeding of the workshop to develop a strategy for collaborative research and dissemination of technology in sustainable crop production in acid savavas and other problem soils of the world.* Purdue University, pp. 1-11.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Delhaize, E., P. R. Ryan, and P. J. Randall. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103 : 695-702.
- Gamborg, O. L. and L. R. Wetter. 1975. *Plant Tissue Culture Methods.* Saskatoon: Natl. Res. Council of Canada.
- Illes, P., M. Schlicht, J. Pavlovkin, I. Lichtscheidl, F. Baluska, and M. Ovecka. 2006. Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in Arabidopsis root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *J. Exp. Bot.* 57 : 4201-4213.
- Kerven, G. L., D. G. Edwards, C. J. Asher, P. S. Hallman, and S. Kokot. 1989. Aluminium determination in soil solution. II. Short-term colorimetric procedures for the measurement of inorganic monomeric aluminium in the presence of organic acid ligands. *Aust. J. Soil Res.* 27 : 91-102.
- Kochian, L. V. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46 : 237-260.
- Ma, J. F., S. Hiradate, K. Nomoto, T. Iwashita, and H. Matsumoto. 1997a. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea. Identification of Al form in the leaves. *Plant Physiol.* 113 : 1033-1039.
- Ma, J. F., S. J. Zheng, H. Matsumoto, and S. Hiradate. 1997b. Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature.* 390 : 569-570.
- Matsumoto, H. 2000. Cell biology of Al tolerance and toxicity in higher plants. *Int Rev. Cytol.* 200 : 1-46.
- Miyasaka, S. C., L. V. Kochian, J. E. Shaff, and C. D. Foy. 1989. Mechanism of aluminum tolerance in wheat: an investigation of genotypic differences in rhizosphere pH,  $\text{K}^+$ , and  $\text{H}^+$  transport, and root-cell membrane potentials. *Plant Physiol.* 91 : 1188-1196.
- Nagata, T., M. Hayatsu, and N. Kosuge. 1992. Identification of aluminium forms in tea leaves by  $^{27}\text{Al}$  NMR. *Phytochemistry.* 31 : 1215-1218.
- Palmgren, M. G., P. Askerlund, K. Fredrikson, S. Widell, M. Sommarin, and C. Larsson. 1990. Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles: optimal conditions for formation and separation. *Plant Physiol.* 92 : 871-880.
- Rengel, Z. 1996. Tansley review No. 89: Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytol.* 134 : 389-406.
- Rhee, J. H., S. H. Lee, A. P. Singh, G. C. Chung, and S. J. Ahn. 2007. Detoxification of hydrogen peroxide in the root system maintains the activity of water transport and plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase in figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia*) exposed to low temperature. *Physiol. Planta.* 130 : 177-184.
- Sanchez, P. A. and J. R. Benites. 1987. Low-input cropping for acid soils of the humid tropics: a transition technology between shifting and continuous cultivation. In Latham, M.

- and P. Ahn (eds). *Africaland* : Land Development and Management of Acid Soils in Africa. BSRAM Proceedings No.7. Bangkok, Thailand, pp. 85-106.
- Shen, R. and J. F. Ma. 2001. Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. *J. Exp. Bot.* 52 : 1683-1687.
- Sivaguru, M. and W. J. Horst. 1998. The distal part of the transition zones is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* 116 : 155-163.
- Sussman, M. R. 1994. Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45 : 211-234.