

수분 부족 스트레스 처리시 Monodehydroascorbate Reductase (MDHAR)의 반응

강 상 재*
경북대학교 환경원예학과

Response of Monodehydroascorbate Reductase (MDHAR) in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Leaves Subjected to Water Deficit Stress

Kang, Sang Jae*

Dept. of Environmental Horticulture, Kyungpook Nat'l University, 742-711 Sangju, Korea

Abstract. The relationship between water deficit stress and monodehydroascorbate reductase (MDHAR) activity was determined in lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaves under water stress condition imposed by withholding water for 72 hrs. Relative water content determined in water deficit stressed lettuce leaves gradually reduced from 91.29% to 74.58%, and water content of medium drastically decreased 4.73% after quitting of irrigation. Hydrogen peroxide content in leaves subjected to water deficit stress rapidly increased, but soluble protein content rapidly decreased when those were compared to control plant. The relationship between relative water content and hydrogen peroxide content in stressed leaves positively correlated with $R^2=0.8851$, but soluble protein content reversely correlated with $R^2=0.9826$. Total chlorophyll content in stressed plant leaves was higher than that of control plant, and increased rapidly in early stage of treatment of both stressed and control plants. Carotenoid content was higher than that of control plant, and the ratio of carotenoid to total chlorophyll in stressed plant was higher as compared to control plant. As water deficit stress continued progressively, total ascorbate content in stressed plant leaves was a little higher than that of control plant. But dehydroascorbate (DHA) content within 6 hr of water deficit stress was higher than that of control plant, and then, content of control plant in 12 hr of stress treatment higher than that of stressed leaves. The activity of monodehydroascorbate reductase of cytosolic and chloroplastic fractions increased dramatically, and mRNA of MDHAR was highly detected by probing ^{32}P -labeled single stranded MDHAR RNA of lettuce plant leaves subjected to water deficit stress. Relationship between MDHAR activity and relative water content and hydrogen peroxide highly correlated with $R^2=0.9937$ and 0.8645 , respectively.

Key words : ascorbate, chlorophyll, hydrogen peroxide, MDHAR mRNA, oxidative stress

서 언

일반적으로 가뭄이나 고온, 영양소결핍 등으로 활성 산소 종의 생성량이 식물체의 스스로의 항산화 능력을 증가하는 환경에 직면하였을 때 식물세포는 산화적 손상을 받게 되며, 이때 아스코르브산(ascorbic acid: Asc)은 식물체에서 야기되는 산화적 손상을 경감시키는 항산화물질로 잘 알려져 있다. 여러 가지 산화적 스트레

스로 생성되는 과산화수소(H_2O_2)와 하이드록시 라디칼($OH\cdot$) 등과 같은 활성산소의 독성은 식물체내에 존재하는 항산화제 사이의 연결된 네트워크로 적절하게 제거되며, 그렇지 않으면 식물체의 과민성(hypersensitive) 반응이 개시되어 세포가 죽는 원인이 되므로 이에 대한 연구가 많이 수행되었다(Levine 등, 1994; Yoshimura 등, 2000; Yabuta 등, 2004).

아스코르브산은 직접적으로 여러 가지 활성산소를 제거하는데 관여하기도 하며(Padh, 1990), 간접적으로는 아스코르브산 과산화효소(ascorbate peroxidase: APX)의

*Corresponding author: kangsj@knu.ac.kr
Received September 8, 2008; Accepted October 7, 2008

Table 1. Changes in relative water content (RWC) in lettuce leaves and water content of medium subjected to water deficit stress for 72 hrs.

Parameter	Water deficit stress treatment (hr)							
	0	3	6	12	24	48	72	
Relative water content of leaves (%)	C ²	91.29±0.57 ^y	91.20±0.51	91.45±0.42	91.05±1.35	91.68±0.38	91.54±1.41	91.24±0.95
	D	91.29±0.57	89.82±0.61	87.78±0.75	84.70±0.47	82.02±0.42	79.06±0.76	74.58±0.92
Water content of medium (%)	C	24.64±1.02	31.06±1.05	27.07±1.23	25.65±1.40	30.72±0.96	31.90±1.91	28.15±0.75
	D	24.64±1.02	24.54±0.83	18.70±0.95	15.84±1.24	15.51±1.36	7.63±1.04	4.73±0.67

²C: control; D: drought, ^yMean±SD

기질로 사용되어(Asada와 Takahashi 1987; Asada, 1992) 식물체의 환경스트레스 적응 메커니즘과 매우 밀접하게 연관되어 있다. 과산화수소를 물로 환원시켜 식물세포 내 독성을 제거하는 작용을 촉매하는 APX는 특이적으로 아스코브산을 기질로 사용하며 아스코브산을 모노디하이드로아스코브산(monodehydro ascorbate: MDHA)으로 환원시킨다. MDHA를 아스코브산으로 재생하는 MDHA 환원효소(monodehydroascorbate reductase: MDHAR)의 활성도 증가가 식물체내의 아스코브산의 수준을 유지하는데 매우 중요한 역할을 하며 식물이 환경스트레스에 적응하는 메커니즘을 유지하는데 중요한 역할을 한다(Foyer와 Halliwell, 1976; Hossain과 Asada, 1984; Shigeoka 등, 2002). MDHAR의 활성도 변화에 영향을 주는 인자로는 오존 처리(Kang 등, 1999), 수분스트레스(Kim 등, 1999), 관수온도(Kang 등, 2001) 등이 있으며, MDHAR의 활성도 변화에 반응이 시금치(Morell 등, 1997), 완두콩(Leterrier 등, 2005), 토마토(Grantz 등, 1995), 대두(Kim 등, 1999) 등의 식물에서 보고되어 있다.

수분 부족스트레스에 노출된 식물에서도 아스코브산의 항산화작용과 연관된 일련의 작용이 환경스트레스에 적응하는 식물의 반응에 중요한 역할을 하는 항산화작용인 것으로 보고되어 있다(Heber 등, 1996; Kim 등, 1999). 따라서 아스코브산의 세포 내 농도와 아스코브산의 존재 형(산화 형, 환원 형)의 비율이 아스코브산의 항산화작용과 직접 연관성이 있고, 아스코브산의 농도변화가 식물체의 환경스트레스 방어기작에 중요한 요인이 되므로 식물생육 배지 내 수분 함량의 변화에 따라 아스코브산의 재생과 관련된 MDHAR의 활성도 변화와의 관계를 추적하여 식물체의 환경 적응 반응과의 관련성을 연구하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

공시식물과 수분 부족스트레스 처리

본 실험에 사용된 공시식물은 상추(*Lactuca sativa* L. cv. Baronet, Journey Co.)이며 종자를 육묘용 상토(Metro-Mix 350[®])와 10%(v/v)의 모래를 섞어 채운 포트(12×12cm)에 3립씩 파종하였다. 발아된 유식물을 건전한 1주씩만 남기고 제거한 후 생육상(주/야 20°C/18°C, 200μmolm⁻²s⁻¹)에서 생육시켰으며 영양용액(20-10-20)을 2일 간격으로 공급하면서 4주간 생육시켰다. 생육이 균일한 공시식물을 선별하여 72시간 동안 수분 공급을 하지 않고 수분 부족 스트레스 처리를 하였으며, 정상생육 상태인 대조식물은 매일 수분을 공급하였다. 대조식물과 수분 부족 스트레스를 처리한 공시식물을 각각 3, 6, 12, 24, 48, 72시간 후 일정한 시간에 잎 시료를 채취하여 액체질소에서 동결시켜 -70°C에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다. 생육 배지의 수분 함량과 잎의 상대적 수분함량(RWC)은 Tambussi 등(2000)의 방법으로 측정하였으며 함량 변화는 Table 1과 같다.

조효소액의 조제

MDHAR의 활성도 변화를 측정하기 위한 조효소액의 조제는 Jiménez 등(1997)의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 보관중인 시료 약 1그램을 액체 질소를 넣고 분쇄한 후 10배 부피의 완충액(30mM MOPs, pH7.5, 2mM EDTA, 4mM cysteine, 0.35M mannitol, 0.2% PVP)에서 추출하였다. 이 추출액을 2,200×g에서 5분간 원심분리하고 침전물을 세척완충액(20mM MOPs, pH7.2, 0.3M mannitol, 1mM EDTA)으로 2회 세척한 후 적당량 회석하여 조효소액(Chloroplatic Fraction)으로 하였다. 상징액은

다시 100,000×g에서 60분간 원심분리(Beckman, 50Ti rotor)하여 조효소액(Cytosolic Fraction)으로 각각 조제하였다. 조효소액의 단백질 함량은 Bradford(1976)의 방법으로 Bovine Serum Albumin (BSA)을 표준단백질로 하여 측정하였다.

MDHAR의 활성도 측정

MDHAR의 활성도 측정은 Hossain과 Asada(1984)의 방법으로 측정하였으며 모든 시약은 즉시 제조하여 사용하였다. 효소의 활성도는 NADH의 산화 정도를 340nm에서 흡광도의 변화를 다음과 같이 측정하였다. 30~50μL의 조효소 액을 50mM 인산완충액(pH7.6)에 0.3mM NADH, 2.5mM 아스코브산이 들어있는 반응용액(최종부피 1mL)에 넣고 0.5Unit 아스코브산 산화효소(ascorbate oxidase, 시그마 사)를 첨가하여 NADH의 산화 정도($\epsilon=6.2\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 분 당 μmol로 환산하였다.

엽록소와 카로티노이드 함량

엽록소 a와 b, 카로티노이드의 함량은 Arnon(1949)과 Lichenthaler(1987)의 방법을 혼용하여 측정하였다. 시료 0.2그램을 액체질소에서 마쇄한 후 10배 부피의 인산완충액 [pH7.0, 20% sorbitol, 1mM EDTA와 0.1%(w/v) PMSF]으로 현탁하였다. 이 현탁액 100μL에 10배 부피의 95%(v/v) 에탄올을 넣어 완전히 혼합하고 12,000×g에서 10분간 원심 분리한 상정액을 각각 664nm과 648nm, 470nm에서 흡광도를 측정하여 mL당 함량으로 환산하여 나타내었다.

과산화수소 함량

과산화수소 함량의 측정은 Alexieva 등(2001)과 Foyer 등(1997)의 방법을 혼용하여 측정하였다. 시료 0.2그램을 액체질소에서 마쇄하고 10배 부피의 0.1%(w/v) trichloroacetic acid (TCA)로 추출하였다. 현탁액을 12,000×g에서 15분간 원심 분리하여 상정액을 수집하였다. 상정액 500μL를 10mM 인산완충액(pH7.0)과 1mL의 1M KI를 첨가하여 발색시킨 후 390nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화수소 표준곡선으로부터 과산화수소의 함량을 계산하였으며 생체중량당 mM로 나타내었다.

아스코브산의 함량

아스코브산과 디하이드로아스코브산의 함량은 Foyer 등(1983)과 Yoshimura 등(2000)의 방법을 혼용하여 다음과 같이 측정하였다. 시료 0.5그램을 액체질소에서 마쇄하고 10배 부피의 6%(v/v) HClO₄으로 현탁하여 12,000×g에서 10분간 원심 분리한 후 다음과 같이 측정하였다. 아스코브산의 함량은 상정액 100μL와 900μL의 인산완충액(pH12.7)을 넣은 직후 265nm에서 측정된 흡광도와 5Unit의 아스코브산 산화효소(ascorbate oxidase)를 넣은 후 측정된 흡광도차이를 표준곡선에 의하여 계산하였다. 총 아스코브산의 함량은 1mL의 추출액에 400μL의 1.2M K₂CO₃첨가하여 최종 pH를 6.0으로 조정된 후 원심 분리한 상정액에 10mM의 dithiothreitol (DTT)를 넣고 25°C에서 10분간 반응시켜 아스코브산의 함량 측정과 동일한 방법으로 측정하였다. 디하이드로아스코브산의 함량은 총 아스코브산의 함량에서 아스코브산을 뺀 값으로 나타내었다.

MDHAR의 cDNA 증폭 및 Northern Blot

MDHAR의 cDNAs는 시금치의 mRNA (accession. No. AB063289)로부터 프라이머 제작 프로그램(Primer 3, Whitehead Institute, USA)을 사용하여 제작하고 PCR의 방법으로 증폭하였다. PCR은 최종 부피 25μL로 하여 94°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 1분의 순서로 35cycles로 수행한 다음 72°C에서 5분간 안정화시켰으며 증폭시킨 cDNA는 2%(w/v) 아가로스 젤 전기영동으로 단일밴드를 확인하였다. Northern Blot분석을 위한 RNA의 추출은 Chang 등(1993)의 방법을 약간 변형하여 수행하였으며 추출한 총 RNA(14μg each)는 10%(v/v) formaldehyde가 함유된 1.2%(w/v) 아가로스 젤 전기영동을 한 후 nylon membrane (Sigma, Co., USA)에 전이시켰다. 전이시킨 membrane은 55°C의 prehybridization 완충액(6× SSC, 5× Denhardt's 용액, 1%(w/v) SDS, denatured salmon sperm DNA 100μg mL⁻¹)에서 3시간 동안 반응시켰으며(Sambrook 등, 1989), MDHAR의 ³²P-random primed cDNA가 들어있는 hybridization 완충액에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응액을 60°C의 세척완충액(2× SSC, 0.1% SDS)에서 10분간, 0.1× SSC, 0.1% SDS가 들어있는

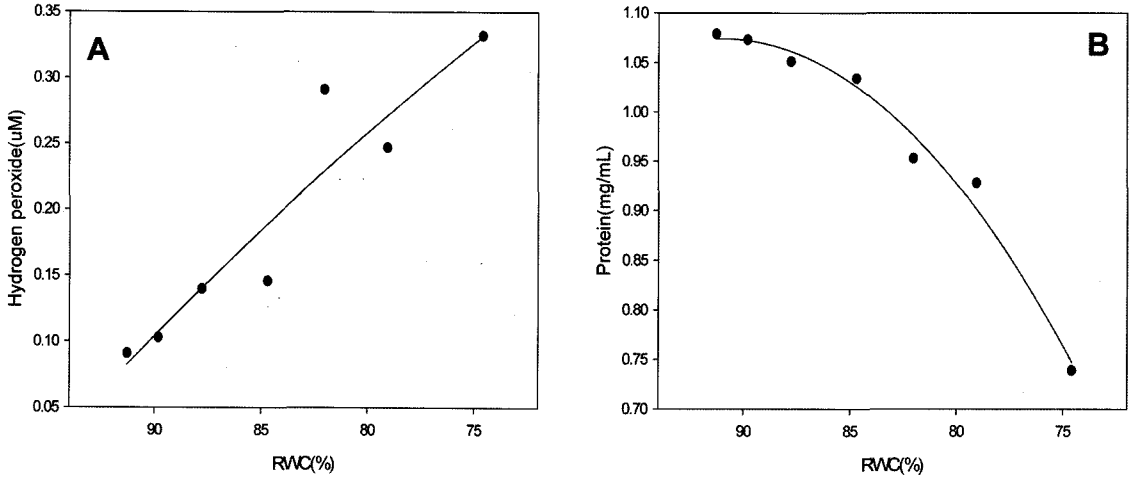


Fig. 1. Relationship between relative water content (RWC) and hydrogen peroxide content (A) and protein content (B) in lettuce leaves subjected to water deficit stress.

세척완충액에서 1시간 세척한 후 24시간 동안 노출시키고 Blot 분석시스템(Storm, GE healthcare, USA)에서 스캔하였다.

결과 및 고찰

단백질 및 과산화수소의 함량

공시작물이 생육하고 있는 배지의 상대수분함량(relative water content)이 상추의 잎 내 단백질의 함량과 과산화수소의 생성량과의 상관관계를 나타낸 결과는 Fig. 1과 같다.

배지의 상대수분함량이 감소함에 따라 과산화수소의 함량이 증가($R^2=0.8851$)하는 경향을 보였다. 이는 수분스트레스를 받은 식물의 세포내 과산화수소의 농도가 일시적인 증가가 유발된다는 결과로서 상추에서 수분스트레스 처리가 산화적 스트레스의 일종임을 확인할 수 있었다(Mittler, 2002). 반면에 단백질의 함량은 감소($R^2=0.9826$)함을 알 수 있으며 이 결과도 수분의 공급부족이 상추의 잎내 단백질의 생성량과 밀접한 관련성이 있음을 확인할 수 있었다.

일반적으로 수분 부족스트레스에 노출된 식물은 광합성작용과 건물량, 단백질함량 등에 손상을 주며 항산화제의 함량 변화나 항산화효소들의 활성도 변화가 확인된 결과(Iturbe-Ormaetxe 등, 1998; Levin 등, 1994)와 비슷한 결과를 보여 수분부족 스트레스는 식물의 성장과 밀접한 관련이 있다고 생각된다. 또한

Yabuta 등(2004)은 담배식물에서 과산화수소를 식물세포에 처리하였을 때 아스코브산 과산화효소(ascorbate peroxidase: APX)의 cDNA의 발현이 유도되며, 세포내 과산화수소의 함량이 증가하면 이 효소의 활성도가 증가하는 것으로 보고하고 있다. APX와 관련된 일련의 반응과 관련된 몇 가지 효소의 활성도 변화에 대한 연구가 많이 수행되고 있으며(Chang 등, 2004; Shigeoka 등, 2002), 아스코브산의 재생과 관련된 MDHAR의 활성도 변화와 깊은 상관이 있을 것으로 추정된다(Sano 등, 2005; Grantz 등, 1995).

엽록소 함량의 변화

수분 부족스트레스가 진행되는 동안 상추의 잎 내 엽록소의 함량의 변화와 이들의 관계를 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다. 총 엽록소의 함량은 수분부족 스트레스에 노출되었을 경우 정상적으로 생육한 식물체의 함량보다 대체적으로 감소하는 경향을 보이고 있다. 엽록소 a의 함량 변화는 총 엽록소의 함량 변화와 거의 동일한 경향을 보였으며, 수분스트레스를 받은 초기에는 대조식물과 비슷하게 증가하다가 그 이후에는 함량이 급격하게 감소하는 경향을 나타내어 수분부족은 식물체의 엽록소 함량을 감소시키는 원인이 됨을 알 수 있으며 엽록소 b의 경우도 비슷한 경향을 보였다. 공시식물의 경우 수분 부족 스트레스시 엽록소 b의 감소율이 엽록소 a의 감소율보다 더 큰 것으로 보아 수분부족으로 나타나는 산화적 스트레스 처리는 엽록소 b

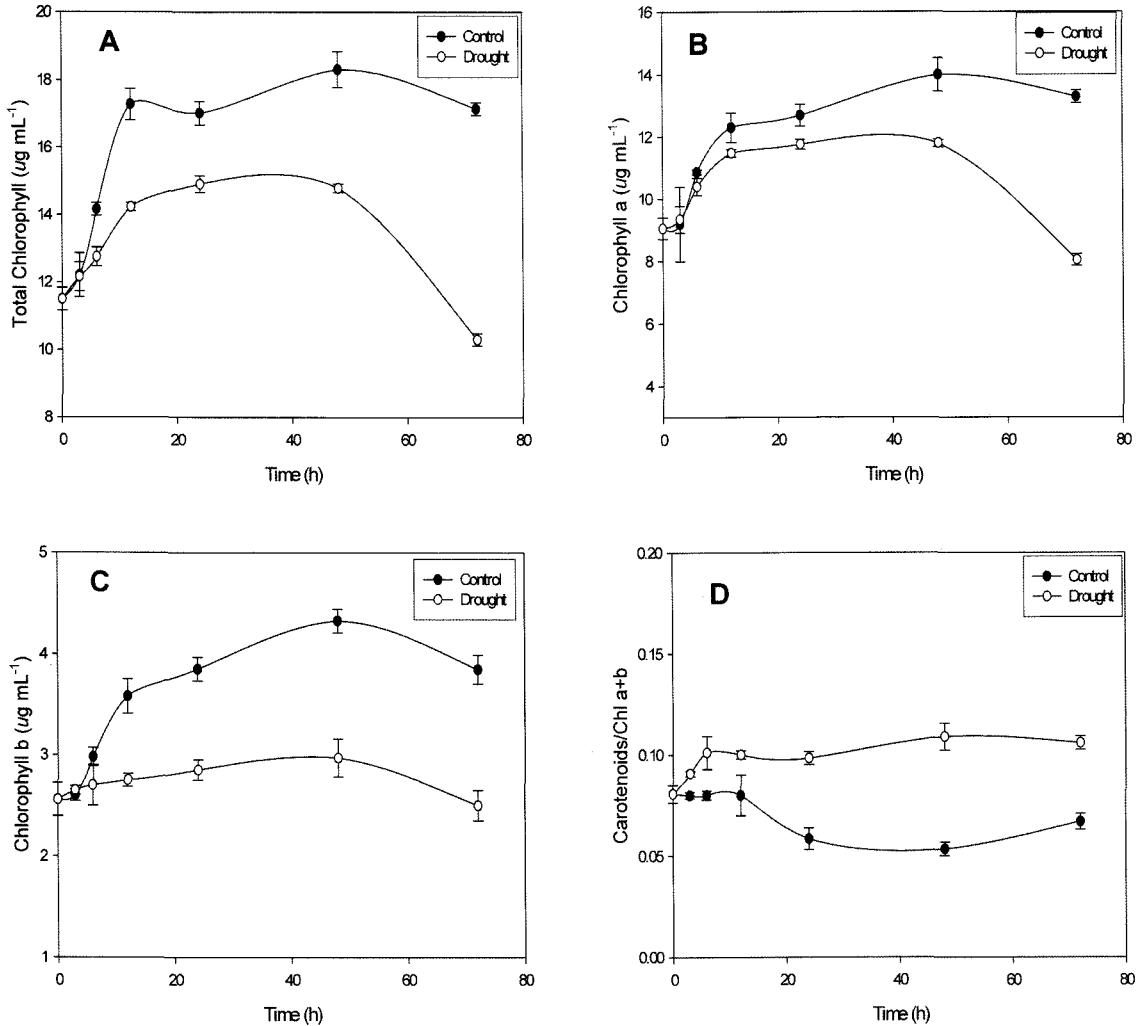


Fig. 2. Changes in total chlorophyll (A), chlorophyll a (B), chlorophyll b (C), and the ratio of carotenoids to total chlorophyll content (D) in lettuce leaves subjected to water deficit stress. The vertical bars represent standard error(n=5).

에 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다.

이 결과는 수분 부족스트레스가 식물세포의 산화적 손상과 관련이 있다는 다른 결과(Zlatev 등, 2006; Mittler, 2002)들과 비교해 볼 때 공시식물인 상추의 잎에서도 수분 부족스트레스는 엽록소의 함량을 감소시키는 것과 밀접한 관련성을 가지고 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 잎의 수분포텐셜이 -1.3MPa 일 때 잎의 수분, 광합성작용, 엽록소 a 와 b, 카로티노이드 등의 함량이 감소되었으며, -1.9MPa 정도로 더 심한 수분스트레스를 받았을 때 엽록소 a의 함량이 약 30%, 엽록소 b는 약 20.7%정도 감소하며 카로티노이

드의 함량 변화도 약 37.9% 정도로 더 크게 감소하는 것으로 보고(Iturbe-Ormaetxe 등, 1998)된 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

아스코브산의 함량

수분 부족스트레스 기간이 길어질수록 공시식물의 잎 내 아스코브산의 함량 변화는 Fig. 3과 같다. 생체 중량 당 총 아스코브산의 함량 변화는 수분스트레스를 받은 식물의 체내에서 점점 증가하는 경향을 보이다가 72시간 이후에는 급격하게 낮아지는 경향을 보이고 있다. 총 아스코브산과 디하이드로아스코브산과의 존재비

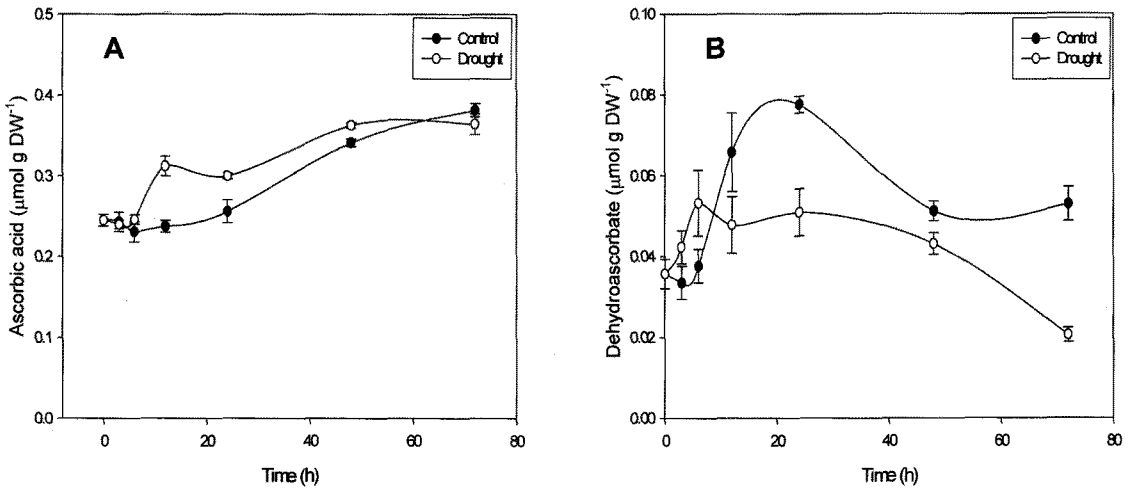


Fig. 3. Changes in content of ascorbate (A), dehydroascorbate (B) in lettuce leaves subjected to water deficit stress. The vertical bars represent standard error(n=5).

물은 수분 부족스트레스를 받은 초기에는 상대적으로 낮은 경향을 보이다가 수분 부족스트레스가 진행될수록 급격하게 증가하는 경향을 보이고 있다. 디하이드로아스코브산의 함량은 수분 부족스트레스 처리 시간이 길어짐에 따라 그 변화는 대조구에서의 함량 변화보다 더 높은 경향을 보이고 있어 식물이 수분 부족스트레스 환경에 적응하는 반응은 아스코브산이 디하이드로아스코브산으로 환원되는 양 만큼 산화적 스트레스를 경감시키는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 아스코브산의 함량의 변화는 비교적 높은 수분 부족스트레스를 받은 식물체 내에서 스트레스를 받지 않은 식물에서 보다 비교적 높은 경향이 나타내었다. 이 결과는 아스코브산이 수분 부족스트레스를 받은 식물체에서 수분 부족스트레스에 적응하기 위한 체내 일련의 반응을 가진다는 사실을 예측할 수 있다. Tokunaga 등(2005)의 보고에 의하면 수분 부족 스트레스시 아스코브산의 생합성과 관련된 효소인 L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase(GalLDH)의 활성도와 이 효소의 유전자 발현 정도가 더 많아진다고 하며, 이는 수분 부족스트레스에 적응하기 위하여 아스코브산의 함량이 증가한다는 보고와 비슷한 결과를 얻었다.

아스코브산은 식물에서 여러 가지 기능을 하는 물질로서 총 수용성 탄수화물의 약 10%정도를 차지하며 식물체내에서 생합성은 식물체의 발육과 환경요인에 의해 달라진다(Smirnoff와 Wheeler, 2000). 아스코브산

의 항산화제로서의 역할은 많은 관심을 집중시키고 있으며 많은 다른 주요 항산화효소의 보조효소로서의 역할에도 많은 관심을 집중시키고 있다(Conklin, 2001). Pastori 등(2003)이 아스코브산의 합성이 결여된 아라비도시스 변이주의 유전자 발현을 조사한 결과 방어와 생존의 조절은 물론 성장을 조절하는 식물호르몬과 같은 역할을 한다고 하였다. 식물체 잎 중의 아스코브산은 잎의 자유공간에서 주요 항산화제로서 역할을 담당하고 있으며(Veljovic-Jovanovic 등, 2001) 아스코브산과 연관된 몇 가지 항산화효소의 활성도 변화에도 관련성이 있는 것으로 잘 알려져 있다.

효소활성도 변화 및 MDHAR의 유전자 발현

수분 부족스트레스가 점점 진행될수록 엽록소의 함량과 단백질의 함량이 감소하며, 반면 과산화수소의 함량이 증가하는 경향을 보임에 따라(Fig. 1과 2 참조) 식물은 이에 적응하기 위한 일련의 대사적 과정을 가진다는 것이 잘 알려져 있다. 이와 같은 산화적 스트레스 증가로 과산화수소가 세포 내에 축적되면 세포에 손상을 유발하기 때문에 이를 제거하기 위한 여러 가지 효소적 작용 중에 아스코브산은 효소의 기질로 작용하여 과산화수소를 물로 환원시키는 작용으로 환경 스트레스에 적응하거나 내성을 가지게 된다. 즉, 아스코브산은 아스코브산 과산화효소(APX)의 작용으로 모노디하이드로아스코브산으로 환원시키는 효소의 작용

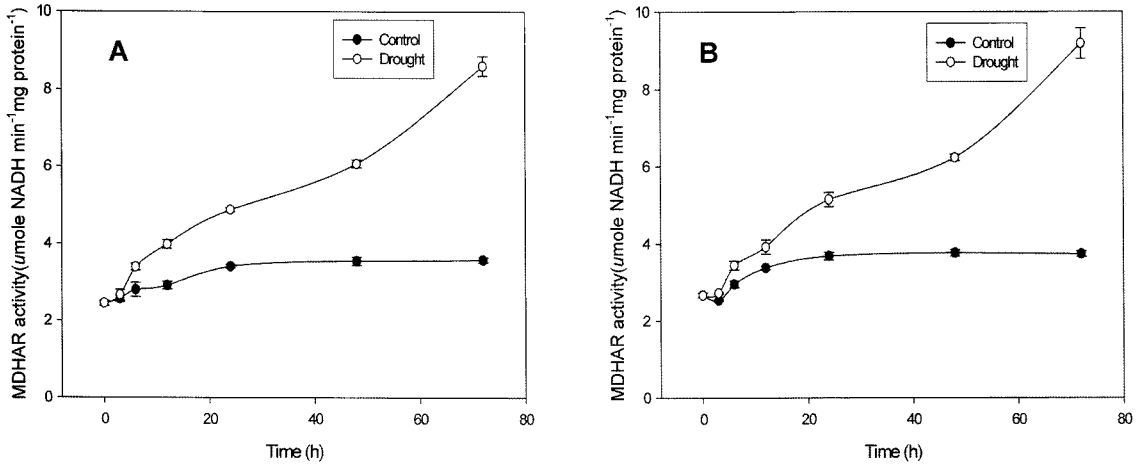


Fig. 4. Changes in cytosolic MDHAR (A) and chloroplastic MDHAR (B) activity in lettuce leaves subjected to water deficit stress. The vertical bars represent standard error (n=5).

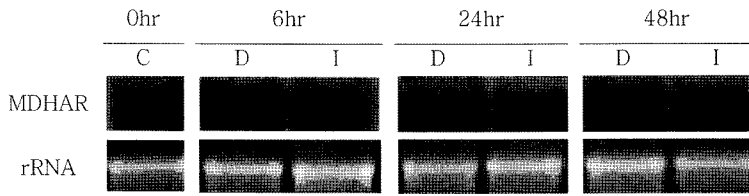


Fig. 5. RNA blot hybridization analysis for MDHAR mRNA. Total RNA was isolated from lettuce leaves, and separated by electrophoresis (14 µg each) for detection of MDHAR mRNA. MDHAR mRNA was detected by probing ³²P-labeled single stranded MDHAR RNA. Total RNA on the agarose gel was stained with Ethidium Bromide (C:control; D:drought; I:irrigation).

으로 산화적 손상을 완화시키는 작용을 가진다. 식물이 항산화력을 가지기 위해서는 아스코르브산의 농도 조절이 필요하므로 환원형인 모노디하이드로 아스코르브산을 산화형인 아스코르브산으로 재생하는 반응을 촉매하는 효소인 MDHAR의 활성도 변화가 식물이 수분 스트레스 환경에 적응하는 기작을 설명할 수 있게 된다. 이를 확인하기 위하여 공기식물인 상추에서 수분 부족 스트레스가 진행됨에 따라 MDHAR의 활성도 변화를 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다.

전체적으로 MDHAR의 활성도는 수분 부족 스트레스를 받은 식물체의 잎에서 더 높으며 수분 부족 스트레스가 더 진행됨에 따라 증가하는 경향을 보이고 있어 수분 부족 스트레스가 상추에서 산화적 손상을 유발하며 상추식물은 이에 적응하거나 내성을 유지하기 위하여 효소적 과정을 가진다는 것을 알 수 있다. MDHAR의 활성도는 사이토졸(Fig. 4A)과 엽록체(Fig. 4B)에서 비슷한 경향의 활성도를 보이고 있으며 사이

토졸과 엽록체에서 각각 생성되는 과산화수소를 제거하여 세포의 산화적 손상을 막는 역할을 하고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 식물은 수분 부족 스트레스가 진행될수록 그 환경조건에 적응하기 위하여 활성 산소를 제거하는 시스템 중 아스코르브산의 재생과 관련된 MDHAR의 활성도가 증가함으로써 저항성을 나타낸다고 생각할 수 있다.

또한 수분 부족 스트레스가 진행됨에 따라 MDHAR의 cDNA의 발현이 여러 가지 환경 스트레스에서 증가한다고 보고(Leterrier 등, 2005)한 바와 같이 상추의 잎에서 MDHAR의 cDNA 발현이 수분 부족 스트레스가 증가할수록 증가하였다(Fig. 5). MDHAR은 물리적인 손상(Grantz 등, 1995)이나 환경 스트레스에 적응하기 위하여 아스코르브산을 재생하는 일련의 반응의 결과로 생각된다. MDHAR의 활성도 증가는 식물체내 아스코르브산의 함량을 증가시켜 항산화작용을 촉진하는 것이며, 환원형 아스코르브산 (MDHA)의 함량은

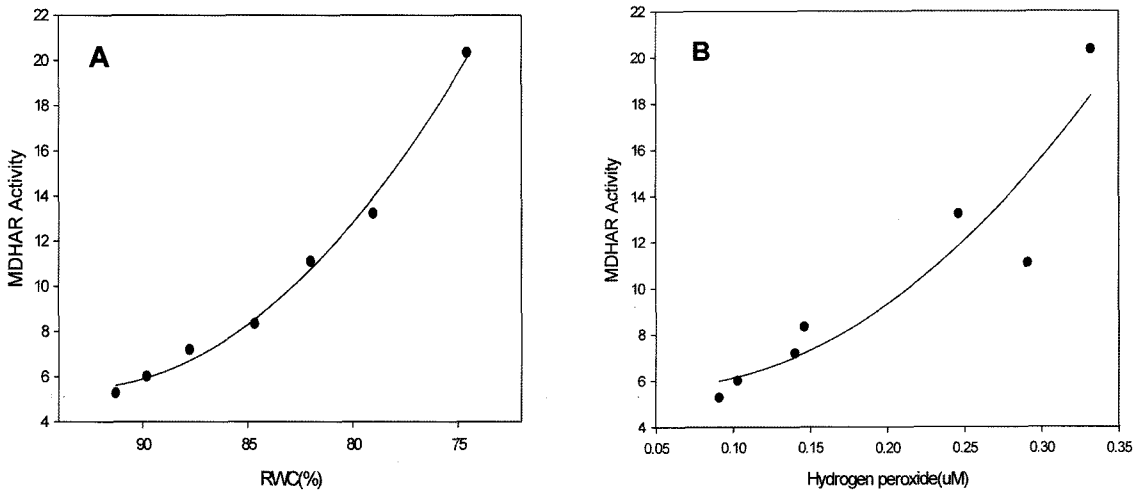


Fig. 6. Relationship between MDHA Reductase activity and RWC (A) and hydrogen peroxide (B) in lettuce leaves subjected to water deficit stress.

감소하는 결과(Fig. 3 참조)를 보여 아스코브산이 재생되는 효소적 작용에 MDHAR의 유전자가 발현이 촉진됨을 알 수 있었다.

MDHAR 활성도와의 상관관계

MDHAR의 활성도와 생육배지 중 수분의 상대함량과 과산화수소와의 상관관계를 나타낸 결과는 Fig. 6과 같다. 상대 수분함량이 감소되면 MDHAR의 활성도가 증가($R^2=0.9937$)하며, 과산화수소 함량이 증가함에 따라서도 MDHAR의 활성도가 증가($R^2=0.8645$)하는 경향을 보여 수분 부족 스트레스로 나타나는 요인들과 MDHAR와 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다.

생육배지 중 수분의 함량이 감소함에 따라 과산화수소의 함량이 증가하고(Fig. 1A 참조)있으며, 이들 간 상호작용에 의하여 수분 부족 스트레스의 강도가 MDHAR의 활성도를 증가시키는 요인으로 작용한다는 것을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 다른 연구자들의 연구결과(Leterrier 등, 2005; Sano 등, 2005)와 비슷하게 수분 부족 스트레스에서도 식물체의 환경적응 내지 내성반응으로 나타나는 결과라고 생각할 수 있었다.

적 요

수분 공급을 제한하여 수분 부족 스트레스를 처리한

상추식물에서 산화적 스트레스와 관련된 monodehydroascorbate reductase (MDHAR)의 활성도, 엽록소 함량, 과산화수소의 함량 등과의 상관관계를 조사한 결과, 생육배지의 수분의 함량이 감소함에 따라 식물체내 과산화수소의 생성량이 증가($R^2=0.8851$)하였으며, 수용성단백질 함량은 점차 감소($R^2=0.9826$)하는 경향을 나타내었다. 총 엽록소함량은 수분 부족 스트레스를 처리한 공시작물에서의 함량이 정상 생육시 보다 그 함량이 대체적으로 낮은 경향을 보였으며, 엽록소 a와 엽록소 b함량 변화도 총 엽록소의 함량변화와 비슷한 경향을 보였다. 그러나 총 엽록소에 대한 카로티노이드의 비율은 수분 부족 스트레스를 처리한 식물에서 정상생육 시 보다 더 높은 경향을 보였다. 수분 부족 스트레스가 진행됨에 따라 아스코브산의 함량은 정상 생육 시 보다 더 높은 경향을 보였으나 환원형인 디하이드로아스코브산의 함량은 수분 부족 스트레스를 처리한 초기에 정상생육 시 보다 더 낮은 경향을 보였다.

MDHAR의 활성도는 사이토졸(cytosolic) 분획과 엽록체(chloroplastic) 분획에서 공히 크게 증가하였으며 MDHAR의 mRNA 전사 정도도 수분 부족 스트레스가 진행됨에 따라 크게 증가하였다. 수분함량이 감소함에 따라 MDHAR의 활성도가 크게 증가하였으며, 또한 과산화수소의 함량이 증가함에 따라서도 MDHAR의 활성도가 크게 증가($R^2=0.9937$ 과 0.8645)되어 수

분 부족 스트레스로 나타나는 요인들과 MDHAR 사이에 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다.

주제어 : 과산화수소, 모노디하이드로아스코브산 환원 효소 mRNA, 산화적 스트레스, 아스코브산, 엽록소

인용문헌

- Alexieva, V., I. Sergiev, S. Mapelli, and E. Karanov. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment* 24:1337-1344.
- Amon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85:235-241.
- Asada, K., and M. Takahashi, 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition: Topics in photosynthesis*(eds D.J. Kyle, C. B. Osmond and C.J. Arntzen), pp. 227-287, Elsevier, Amsterdam.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 59:248-254.
- Chang, S., J. Puryear, and J. Cairney. 1993. A simple method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:113-116.
- Chang, C.C., L. Ball, M.J. Fryer, N.R. Baker, S. Karpinski, and P.M. Mullineaux. 2004. Induction of ascorbate peroxidase 2 express in wounded *Arabidopsis* leaves does involve known wound signaling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant J.* 38:499-511.
- Conklin, P.L. 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environment* 24:383-394.
- Foyer, C.H., and B. Halliwell. 1976. Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133:21-25.
- Foyer, C.H., J. Rowell, and D. Walker. 1983. Measurements of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 157:239-244.
- Foyer, C., H. Lopez-Delgado, J.F. Dat, and I.M. Scott. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant* 100:241-254.
- Grantz, A.A., D.A. Brummell, and A.B. Bennett. 1995. Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. *Plant Physiol.* 108:411-418.
- Heber, U., C. Moyake, J. Mano, C. Ohno, and K. Asada. 1996. Monodehydroascorbate radical detected by electron paramagnetic resonance spectrometry as a sensitive probe of oxidative stress in intact leaves. *Plant and Cell Physiol.* 37:1066-1072.
- Hossain, M.A. and K. Asada. 1984. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiol.* 25:85-92.
- Iturbe-Ormaetxe, I., P.R. Escuredo, C. Arrese-Igor, and M. Becana. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol.* 116:173-181.
- Jiménez, 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.
- Kang, S.J., J.Y. Oh, and J.D. Chung. 1999. Changes of antioxidant enzyme activities in leaves of lettuce exposed to ozone. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 40:541-544.
- Kang, S.J., J.Y. Oh, and J.H. Kim. 2001. Effect of temperature of irrigation water on the growth and activities of some enzymes in cucumber seedling(*Cucumis sativus* L.) *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 42:399-404.
- Kim, T.S., S.J. Kang, and W.C. Park. 1999. Changes in antioxidant enzymes activities of soybean leaves subjected to water stress. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 42:246-251.
- Leterrier, M., F.J. Corpas, J.B. Barosso, L.M. Sandalio, and L.A. del Rio. 2005. Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiol.* 138:2111-2123.
- Levin, A., R. Tenkaken, R. Dixon, and C. Lamb. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestra the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148:350-382.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sci.* 7:405-410.
- Morell, S., H. Follmann, M.D. Tullio, and I. Haberlein. 1997. Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicator of oxidative stress in plants. *FEBS Letters* 414:567-570.
- Padh, H. 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. and Cell Biol.* 68:1166-1173.
- Pastori, G.M., G. Kiddle, J. Antonie, S. Bernard, S. Veljovic-Jovanovic, P.J. Verrier, G. Noctor, and C.H. Foyer. 2003. Leaf vitamine C contents modulate plant

- defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell* 15:939-951.
27. Sambrook, J., E. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 28. Sano, S., S. Tao, Y. Endo, T. Inaba, M.A. Hossain, C. Miyake, M. Matsuo, H. Aoki, and K. Saito. 2005. Purification and cDNA cloning of chloroplastic mono-dehydro ascorbate reductase from spinach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:762-772.
 29. Shigeoka, S., T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyakawa, T. Takeda, Y. Yabuta, and K. Yoshimura. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. of Exp. Bot.* 53:1305-1319.
 30. Smirnoff, N. and G.L. Wheeler. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19:267-290.
 31. Tambussi, E.A., C.G. Bartoli, J. Beltrano, J.J. Guiamet, and J.L. Araus. 2000. Oxidative damage to thylakoid proteins in water stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum* 108:398-404
 32. Tokunaga, T., K. Miyahara, K. Tabata, and M. Esaka. 2005. Generation and properties of ascorbic acid-over-producing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Planta* 220:845-863.
 33. Veljovic-Jovanovic, S.D., C. Pignocchi, G. Noctor, and C.H. Foyer. 2001. Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intercellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol.* 127:426-435.
 34. Yabuta, Y., T. Maruta, K. Yoshimura, T. Ishikawa, and S. Shigeoka. 2004. Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 45:1586-1594.
 35. Yoshimura, K., Y. Yabuta, T. Ishikawa, and S. Shigeoka. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* 123:223-233.
 36. Zlatev, Z.S., F.C. Lidom, J.C. Ramalho, and I.T. Yordanov. 2006. Comparison of resistance to drought of three bean cultivar. *Biologia Plantarum* 50:389-394.