

고온과 고습 조건하에서 양파 화구의 총 단백질의 발현과 원형질막 H⁺-ATPase의 영향

구양규¹ · 박원¹ · 이을태² · 김철우² · 오정민¹ · 장영석³ · 김용권⁴ · 안성주^{1*}

¹전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부 바이오에너지연구소,
²국립원예특작과학원 목포출장소, ³국립식량과학원 바이오에너지작물센터,
⁴농협중앙회 종묘개발센터

Effect of High Temperature and High Humidity on Protein Expression and Plasma Membrane H⁺-ATPase of Umbel with Flower of Onion (*Allium cepa* L.)

Yang-Gyu Ku¹, Won Park¹, Eul-Tai Lee², Cheol-Woo Kim², Jeong-Min Oh¹,
Young-Seok Jang³, Yong-Kwon Kim⁴, and Sung-Ju Ahn^{1*}

¹Department of Plant Biotechnology, Bioenergy Research Institute,
College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Mokpo Sub-Institute, National Institute of Horticultural & Herbal Science,
Rural Development Administration, Muan 534-833, Korea

³Bioenergy Crop Research Center, National Institute of Crop Science,
Rural Development Administration, Muan 534-833, Korea

⁴National Agricultural Cooperative Federation, Seed Research & Development Center,
Anseong 456-824, Korea

Abstract. This study was undertaken the effect of high temperature and high humidity on protein expression and especially plasma membrane (PM) H⁺-ATPase of umbel with flowers of early cultivar ‘Shinsunhwang’ and intermediate cultivar ‘Maebsihwang’ of onion (*Allium cepa* L.). There were no visible any difference on the protein pattern from before flowering stage to full flowering stage of two onion cultivars, however, seed set stages were revealed induced /deduced protein patterns. At day 18, protein expression pattern of the high temperature and high humidity treatments of two cultivars was significantly reduced compared to controls. Furthermore, various protein expression of the high temperature treatment was more reduced compared to high humidity treatment. PM H⁺-ATPase expression of the control plants of two onion cultivars was clearly shown, but was not detectable under high temperature treatment of the two onion cultivars using western blot analysis. PM H⁺-ATPase expression of the high humidity treatment was faintly detected intermediate cultivar ‘Maebsihwang’, not early cultivar ‘Shinsunhwang’. These results indicate that protein expression pattern and PM H⁺-ATPase under high temperature treatment was considered to be more damaged compared to high humidity.

Key words : protein expression, PM H⁺-ATPase, umbel of onion, seed production, stress condition

서 론

양파는 상업적으로 널리 재배되고 있는 채소작물이

고 특히 양파에는 항균, 항당뇨, 항암 및 해독작용에
유익한 성분들이 많이 함유되어 소비량이 증가함에 따
라 재배면적이 증가되고 있는 실정이다(Ramin, 1999;
Pathak, 2000; Lim 등, 2002; Kumar 등, 2007; Ku
등, 2008; Lee 등, 2008).

국내 양파 재배면적 증가로 인해 양파 종자의 수요

*Corresponding author: asjsuse@chonnam.ac.kr
Received May 18, 2009; Revised June 10, 2009;
Accepted June 23, 2009

가 증가하고 있다. 양파는 방임수분에 의한 open pollinated(OP) 계통이나 웅성불임성을 이용한 1대잡종이 있으나, 중간생종의 경우 1대잡종이 균일성, 수량성, 내병성 등이 OP계통보다 더 우수하기 때문에 현재는 대다수 양파 재배농민들이 1대잡종, 특히 값비싼 외국산 교배품종을 선호함으로써 막대한 외화를 지불하면서 양파를 재배하고 있는 실정이다. 또한, 국내에서 양파 채종은 개화성기인 5월말과 등숙기인 7월 상순에 우기와 장마기가 겹쳐 대체로 채종량이 줄어든다. 최근에 Ku 등(2008)의 연구에 의하면 고온과 고습 조건하에서 양파 채종량은 대조구에 비해 현저하게 감소함을 보고하였다. 양파의 채종상 문제가 되는 고온과 고습기를 피하기 위해 개화시기 조절이나 임실기의 강우를 회피할 수 있는 방안으로 하우스 피복재배가 채택되어 양파 채종에 어려움을 극복할 수 있지만 대량으로 포장에서 재배하는 양파 채종을 효율적으로 수행하기는 어려운 실정이다.

그럼에도 불구하고 안정적인 양파의 채종을 위해서 고온이나 고습 조건(Ku 등, 2008), 비가림 하우스 설치, 온도와 일장(Lim 등, 2002; Huh 등, 2002), 관수와 비료(Kumar 등, 2007), 수확시기(Spurr 등, 2002) 등에 관한 연구가 진행되었다.

원형질막 H⁺-ATPase는 원형질막 양쪽에서 H⁺의 전기화학적 차이를 만들고, 이때 발생하는 에너지를 이용하여 제 1차 능동수송을 한다. H⁺을 세포 밖으로 배출하고 막 경계에서 발생하는 H⁺의 농도 구배는 대부분 무기영양소를 능동적으로 흡수하는 기회를 제공한다(Ahn 등, 2007). 또한 이 효소는 생체막의 약 5%를 차지하고 있고, 여러가지 불량한 환경 조건에서 생존을 위한 매우 중요한 역할을 수행한다고 보고되었다(Sussman, 1994). 고온과 고습 조건 하에서 단백질 발현이나 원형질막 H⁺-ATPase 연관된 양파 채종의 연구는 거의 미비한 상태이다. 따라서 본 연구는 조생종과 중생종 품종을 선택하여 개화 후 종자가 성숙되어 가는 단계에서 단백질 발현이나 원형질막 H⁺-ATPase가 고온과 고습에 어떤 영향을 미치는지 규명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료, 재배관리 및 처리

본 시험은 2006년 5~6월에 목포시험장에서 수확하

여 상온에 저장한 양파 조생종 '신선황'과 중생종 '맵시황'을 이용하여 실험을 수행하였다. 구중(274 ± 18g)이 비슷한 양파 모구 20개씩을 3.3m²당 재식거리 40 × 40cm로 개화기 비가림이 가능한 유리온실에 10월 4일에 정식하였다. 시비량은 N-P-K-퇴비-석회 = 28.0-25.0-28.0-3,000-120kg/10a로 하였고, 관수는 점적관수 방법을 사용하였다. 병해충을 방제하기 위하여 정식 전 후라단 입제와 정식 후 코니도 수화제, 파말마 수화제, 리도밀 큐수수화제 주기적으로 살포하였다.

2007년 3월 말부터 4월 중순까지 대부분의 처리구에서 추대가 시작되었고, '신선황'은 5월 25일, '맵시황'은 5월 29일에 만개하였다. '신선황'과 '맵시황'의 개화시기를 동일하지 않으므로 중생종 '맵시황' 개화 후 균일한 화구의 크기와 비슷한 소화의 개화수를 육안으로 선별하여 화구 밑에 테이프를 묶어 표시하였다. 각 처리구에 방충망을 설치하여 처리간 수분매개충인 파리의 역할을 차단하였고 개화 후 파리를 방충망 안으로 방사하여 임실을 촉진하도록 유도하였다(Jang 등, 2002). 개화전 후의 단백질 발현 양상의 차이를 보기 위하여 '신선황'과 '맵시황'의 개화전, 반개화, 만개, 결실후의 양파 화구를 수확하여 각각의 총 단백질의 발현 양상을 조사하였다.

고온과 고습처리는 2007년 5월 31일부터 7월 2일까지 대조구(31.8 ± 0.5°C/43.2 ± 1.2%), 고온(41.4 ± 0.7°C/52.3 ± 1.0%)과 고습(36.1 ± 0.6°C/ 56.5 ± 1.0%)의 3처리를 플라스틱 필름으로 피복하였다. 고온처리는 히터를 사용하여 온도를 조절하고 고습처리는 가습기를 사용하여 습도를 조절하였다. 처리 5일과 14일에 화구를 수확하여 단백질 발현을 조사하였고 처리 18일째에 수확한 화구는 단백질과 원형질막 H⁺-ATPase 발현 양상을 조사하였다.

2. 총 단백질 추출

양파 화구 0.5g을 얼음 위에서 미리 차게 해둔 막자사발 안에 넣은 후 액체 질소를 부어 고온 가루가 되도록 마쇄하였다. 마쇄한 시료를 1.5ml tube에 넣은 후 buffer 용액[50mM Tris-HCl(pH 7.5), 250mM Sucrose, 1mM EDTA, 100mM PMSF, 5mM leupeptin, 100mM DTT]을 튜브에 넣고 잘 섞어준 후 4°C에서 1시간 보관 한 후에 4°C에서 7000rpm으로 10분간 centrifuge 후 상층부의 단백질만 피펫을 이용하여 추출하였다.

3. 전기영동(1-D Electrophoresis)

단백질은 표준 BSA를 이용한 단백질의 검량선을 작성하여 정량하였다(Bradford, 1976). 단백질을 정량한 후, SDS-PAGE를 아래와 같이 실시하였다. 10 × running buffer(250mM Tris, 1.92M Glycine, 1% SDS)를 이용하여 전기영동을 시킨다. 첫 칸에 3μl의 marker를 loading시킨 후 두 번째 칸부터 2 × sample buffer[0.125M Tris-HCl(pH 6.8), 10% β-Mercaptoethanol, 4% SDS, 10% sucrose and 0.004% Bromophenol blue]와 정량한 protein을 잘 섞어서 loading한다. Caster에 20mA로 전기를 걸어 주고 1시간 50분 정도 경과 후에 전기영동된 gel을 stain 용액(Coomassie brilliant blue, Acetic acid, Methanol)에 염색하였으며 염색된 gel을 destain 용액(Acetic acid, Methanol)으로 탈색 시킨 후 관찰하였다.

4. 원형질막 분리 및 western-blot

원형질막의 분리는 two-phase partitioning(Palmgren 등, 1990; Ahn 등, 2001, 2002) 방법을 조금 변형하여 4°C에서 수행하였으며, 분리된 원형질막은 바로 다음 실험에 사용하였거나 -80°C에 보관 후 사용하였다. 또한 12% SDS-PAGE로 전기영동한 단백질은 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막으로 옮긴 다음, western-blot을 위해 옥수수 H⁺-ATPase에 대항하여 만들어진 제1차 항체(일본 오카야마대학 Sasagawa 교수로부터 분양받음)를 1:1,000 배로 희석하여 사용하였고, 단백질 H⁺-ATPase 검출은 alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit인 제2차 항체를 1:1,500 배로 희석하여 실시하였다. 사용된 시약은 Sigma(St. Louis, USA)사로부터 구입하여 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 양파 개화기 전 후의 단백질 발현 양상 차이

조생종 '신선황'과 중생종 '맷시황'의 개화전, 반개화, 만개, 결실 단계의 양파 화구를 수확하여 총 단백질을 추출하고 전기영동을 한 결과는 Fig. 1과 같다. 개화전, 반개화, 그리고 만개 단계에서 단백질의 발현 양상에는 큰 차이가 없었으나 결실 단계에서는 induced와 deduced 단백질 패턴이 다르게 나타났다(Fig. 1). 그러나 '신선황'과 '맷시황' 품종간의 차이를 육안으로는

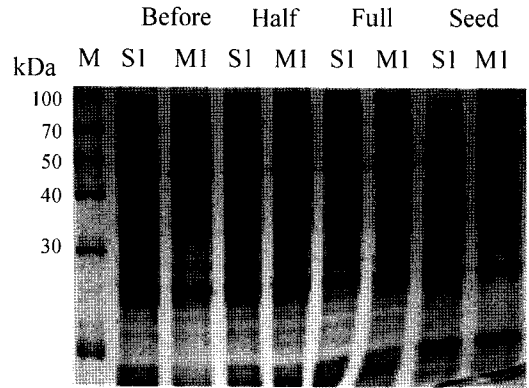


Fig. 1. Protein patterns of two onion cultivars 'S1' (Shin-sunhwang) and 'M1' (Maebshihwang). Before, half, full and seed indicate before flowering, half flowering, full flowering and seed set respectively.

발견 할 수가 없었다. 이런 결과는 양파 종자가 등숙되는 과정에서 종자 내에서 수많은 단백질의 발현이 달라지고 있음을 보여주는 결과이다.

2. 고온과 고습처리에 따른 단백질 발현 양상 차이

고온과 고습처리구를 대조구와 비교하면, 고온과 고

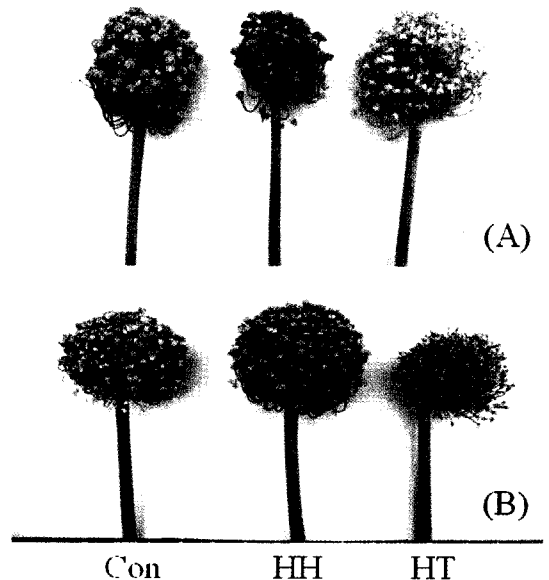


Fig. 2. Pictures of high humidity and high temperature on umbel with flowers of two onion cultivars 'Shin-sunhwang' (A) and 'Maeshihwang' (B). C, HH and HT indicate control, high humidity and high temperature respectively.

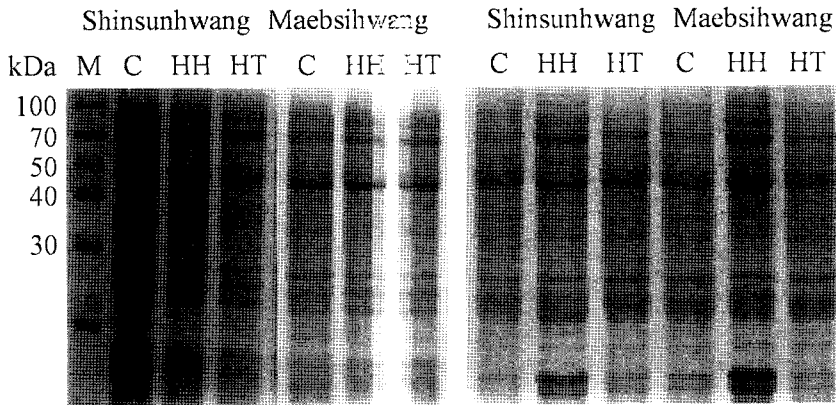


Fig. 3. Effect of high humidity and high temperature on protein expression of two onion cultivars 'Shinsunhwang' and 'Maebisihwang' at day 5 (left graph) and 14 (right graph) after treatment. C, HH and HT indicate control, high humidity and high temperature respectively.

습 처리구에서 양파 화구에 피해를 입었는데 특히 고온 처리구에서 피해가 더 심각하였다(Fig. 2). 전기영동(SDS-PAGE)을 이용한 처리 5일째 단백질의 발현 양상은 '신선황'과 '맵시황' 품종의 고온과 고습처리구에서 아무런 차이를 볼 수가 없었다. 처리 14일째 단백질의 발현 양상은 '신선황'과 '맵시황' 품종의 고온 처리구에서 단백질 패턴이 감소되는 결과를 보인 반면에 고습처리구는 대조구와 비교해서 약간 증가하는 패턴을 나타냈다(Fig. 3). 중생종 '맵시황' 품종의 고온과 고습처리구에서 조생종 '신선황'보다 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈다.

처리 18일째 고온과 고습처리구에서 대조구와 비교해서 단백질 양상은 현저하게 감소하는 현상을 보여주었는데 고습처리구에 비해 고온 처리구에서 단백질 발현 양상은 현저하게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 특히 중생종 '맵시황' 품종의 고습처리구에서 70kDa 위치에 단백질 발현 되는 반면에 조생종 '신선황'에서 단백질 발현이 되지 않았다. 또한 중생종 '맵시황' 품종의 고온처리구에서 50kDa 위치에 단백질 발현 되는 반면에 조생종 '신선황'에서는 30kDa 위치에서 고온처리구에서 발현됨으로 품종간에 차이를 알 수 있었다. 전기영동(SDS-PAGE)의 결과를 요약하면 고습보다는 고온에서 양파 화구 대부분 단백질이 down-regulation이 되는 경향을 보임으로 고온에서 피해가 심함을 알 수 있었다. 또 품종간에도 중생종 '맵시황'보다는 조생종 '신선황' 품종에서 단백질 발현 양상이 현저하게 감소함을 알 수 있었다.

3. 고온과 고습처리에 따른 원형질막 H⁺-ATPase 분석

원형질막 H⁺-ATPase는 식물의 성장과 발육에 중요한 역할을 담당하는 효소이고 제 1차 능동수송체인 원형질막 H⁺-ATPase는 H⁺을 세포밖으로 수송하여 세포의 성장과 항상성 유지를 하는데 중추적 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Ahn 등, 2007). 이 특정 단백질의 발현을 western-blot으로 살펴보았다. '신선황'과 '맵시황' 모두 대조구에서는 원형질막 H⁺-ATPase의 발현이 발현되었지만 고온처리구에서는 원형질막의 H⁺-

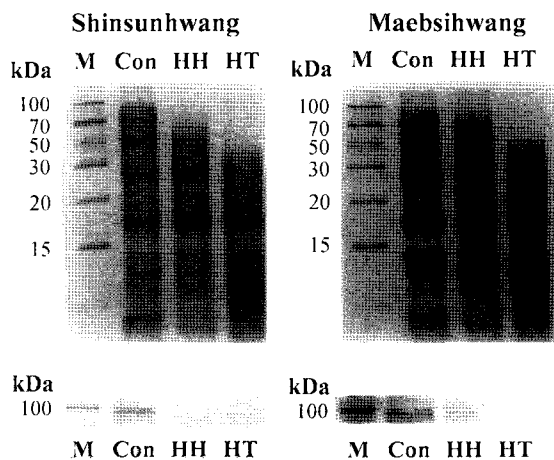


Fig. 4. Effect of high humidity and high temperature on protein expression and western blotting of two onion cultivars 'Shinsunhwang' and 'Maebisihwang' at day 18 after treatment. C, HH and HT indicate control, high humidity and high temperature respectively.

ATPase 발현이 되지 않았다(Fig. 4). 조생종인 ‘신선황’ 고습처리구에서 H^+ -ATPase의 발현이 되지 않았지만 증생종인 ‘맷시황’의 고습 처리구에서 희미하게 발현되었다. Sussman(1994) 연구에서 원형질막 H^+ -ATPase 효소는 불량 환경 조건하에서 생존을 위해 중요한 역할을 수행하는데 고온처리구의 원형질막 H^+ -ATPase 발현되지 않아, 원형질막의 H^+ 의 유입이나 무기양분 흡수에 크게 영향을 미쳐 결과적으로 양파 화구에 심각한 피해를 받고 있는 결과임을 알 수 있다.

안정적인 양파의 채종을 위해 양파 추대 후 일장과 온도를 조절하여 양파의 개화기를 앞당겨 강우기와 휴면기를 피하는 방법(Lim 등, 2002)과 양파 채종 수확 시기 조절(Spur 등, 2002)등을 연구하였다. 또한 최근에 Ku 등(2008) 연구에 의하면 고온과 고습 조건하에서 양파 채종량과 구 생산 및 품질의 감소를 초래함으로 고온과 고습을 피하는 양파 채종량 기술이 필요함을 요구되고 있다. 더불어 고습보다는 고온에서 다양한 단백질 발현 패턴에 현저하게 감소되고 원형질막 H^+ -ATPase가 성장과 발육을 위해서 중요한 단백질인데 이런 불량환경하에서는 발현이 되지 않는 것으로 보아 양파의 화구 및 양파의 종자 생산과 채종시기에 관련이 있는 단백질임을 알 수 있었다. 증생종 품종 ‘맷시황’보다 조생종 ‘신선황’에서 고온과 고습조건하에서 단백질 발현 패턴이나 원형질막 H^+ -ATPase 감소됨으로 품종간의 차이를 발견하였다. 그러므로 본 연구의 결과는 양파 채종 재배 중 양파 품종과 불량 환경하에서 관련한 단백질을 추적함으로써 양파 채종량 증진을 위한 기초 자료로 사용될 것이다.

적 요

본 연구는 고온과 고습 조건 하에서 양파 화구의 총 단백질 발현과 원형질막 H^+ -ATPase 영향을 조사하고자 조생종 ‘신선황’과 증생종 ‘맷시황’를 이용하여 실험을 수행하였다. ‘신선황’과 ‘맷시황’ 품종의 양파 화구 개화전, 반개화, 그리고 만개 단계에서 단백질의 양상에는 차이를 보이지 않았지만 결실 단계에서는 유도 및 비유도되는 단백질이 현저하게 나타났다. 양파 화구 개화 후 실시한 고온과 고습처리 18일째의 양파 두 품종의 단백질도 현저하게 감소하였고 특히 고온 처리구에서 더 감소되는 경향을 보였다. 원형질막 H^+ -

ATPase 발현을 western-blot으로 살펴본 결과, ‘신선황’과 ‘맷시황’의 경우 대조구에서 원형질막 H^+ -ATPase 단백질 발현이 유지 되는 반면에, 고온처리구에서는 두 품종 모두 원형질막 H^+ -ATPase가 발현 되지 않았다. 고습처리구에서 증생종 ‘맷시황’의 원형질막 H^+ -ATPase는 발현 되었는데 조생종 ‘신선황’에서 발현되지 않았다. 이는 양파 종자 성숙단계에서 고온 조건을 조우하면 고습처리 보다는 단백질 및 원형질막의 H^+ -ATPase피해가 더 심각함을 보여 주는 결과이다.

주제어 : 단백질 발현, 원형질 막 H^+ -ATPase, 양파 화구, 종자 생산, 불량환경

사 사

이 논문은 농림부 농림기술관리센터 연구비에 의하여 수행되었음(과제번호: 306007-03-HD110).

인 용 문 헌

- Ahn, S.J., M. Sivaguru, G.C. Chung, Z. Relgel, and H. Matsumoto. 2002. Aluminum-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx 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 H^+ -ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. Plant Physiol. 126: 1381-1390.
- Ahn, S.J., Y.S. Kim, W. Park, Y.G. Ku, K.S. Min, and T.I. Hwang. 2007. Aluminum-induced root growth inhibition and impaired plasma membrane H^+ -flux inmung bean. Korean J. Crop. Sci. 52(2): 213-219 (in Korean).
- 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.
- Huh, E.J., K.S. Cho, Y.S. Kwon, and J.G. Woo. 2002. Effects of temperature and photoperiod on bulbing and maturity of spring sown onions in highland. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 43(5):587-590 (in Korean).
- Jang, Y.S., D.Y. Hyun, C.W. Kim, E.T. Lee, S.K. Cho, I.H. Choi, and B.C. Jeong. 2002. Artificial rearing method of *Lucilia illustris* for pollination vector in onion (*Allium cepa* L.). J. Kor. Soc. Hort. Sci. 43 (2):

- 178-182 (in Korean).
7. Ku, Y.G., W. Park, E.T. Lee, C.W. Kim, Y.S. Kim, Y.S. Jang, and S.J. Ahn. 2008. Effect of high temperature and humidity on seed production and mother bulb harvesting on onion. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 26(2):97-100 (in Korean).
 8. Kumar, S., M. Imtiyaz, and A. Kumar. 2007. Effect of differential soil moisture and nutrient regimes on post-harvest attributes of onion (*Allium cepa* L.). *Sci. Hort.* 112:121-129.
 9. Lee, E.J., J.K. Jeon, and J.K. Suh. 2008. Effect of supplemental lighting in different lighting Intensity on Pyruvic acid and sugar content in onion (*Allium cepa* L.). *J. Bio-Environ. Control* 17(4):266-272.
 10. Lim, C.H., T.H. Park, J.L. Cho, and S.S. Kang. 2002. Effect of daylength and temperature after bolting on flower curd and seed yield of early onion 'Samnamjo-saeng'. *Kor. J. Hort. Sci. & Technol.* 20:306-308 (in Korean).
 11. Pathak, C.S. 2000. Hybrid seed production in onion. *Journal of New Seeds.* 1:89-108.
 12. 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.
 13. Ramin A.A. 1999. Storage potential of bulb onions (*Allium cepa* L.) under high temperatures. *J. Hort. Sci. & Biotech.* 74:181-186.
 14. Spurr, C.J., D.A. Fulton, P.H. Brown, and R.J. Clark. 2002. Changes in seed yield and quality with maturity in onion (*Allium cepa* L., cv. 'Early Cream Gold'). *J. Agro. & Crop Sci.* 188:275-280.
 15. Sussman, M.R. 1994. Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:211-234.