

알루미늄 내성과 민감성 보리의 빠른 screening과 원형질막 H⁺-ATPase의 발현

김현성 · 오정민 · 안성주[†]

전남대학교 농업생명과학대학 바이오에너지공학과 바이오에너지연구센터

A Rapid Screening for Aluminum-tolerant and -sensitive in Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Plasma Membrane H⁺-ATPase Expression

Hyun-Sung Kim, Jung-Min Oh, and Sung-Ju Ahn[†]

Department of Bioenergy Science and Technology, Bioenergy Research Center, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

ABSTRACT Here we report a simple screening system using hematoxylin staining (HS) of the root apex. It allowed rapid classification into different aluminum (Al) tolerance from 65 cultivars within one week. Using this system, we selected the most Al-tolerant (Jayae-2) and -sensitive (Pum-2) barley (*Hordeum vulgare* L.) The results show that the different responses in Al-induced growth inhibition, Al accumulation and expression of plasma membrane (PM) H⁺-ATPase in root apices of selected two cultivars. It showed strongly Al-induced growth inhibition in a dose-dependant manner only in Pum-2 but not in Jayae-2. Aluminum accumulation in root apices (10 mm) was significantly higher in Pum-2 only. The H⁺-ATPase expression of PM vesicles by western blotting was decreased in Pum-2 but not in Jayae-2 treated with 20 μM Al for 24 h. These finding indicate to screen from our system is rapid and reliable and to sustain the expression of PM H⁺-ATPase at translational level is an important role in root growth as affected by Al.

Keywords : aluminum, barley, H⁺-ATPase, plasma membrane, rapid screening

산성 조건의 토양에서 자라는 작물의 생산량을 떨어뜨리는 주요 원인 중 하나는 알루미늄(Al) 독성때문이다(Matsumoto, 2000). 알루미늄 스트레스에 내성인 품종을 선발 혹은 육종하는 것은 반드시 필요한 작업이긴 하지만 매우 복잡하고 어려운 문제들이 많다. 그러므로 보다 빠르고 정확한 선별 방법이 필요하다. 알루미늄 내성 품종을 screening하는 방

법으로는 토양과 수경재배 두 가지가 있다. 그러나 산성 토양을 취급하기 어려운 점과 알루미늄 독성의 초기 증상이 뿌리의 생장 억제이므로 이를 관찰하기란 토양재배 조건에서는 쉽지가 않다. 그래서 많은 연구가 수경재배를 이용하고 있다.

알루미늄 스트레스와 관련하여 몇 가지 생리학적 기작이 밝혀져 있다(Kochian 1995). 특히 알루미늄에 의해서 받는 초기 및 가장 현저한 피해 증상으로는 뿌리 끝 생장점 부위의 세포 분열과 신장의 손상이다(Matsumoto, 2000). 그러므로 뿌리의 apex는 알루미늄의 내성 및 독성의 우선적으로 연구해야할 부분이며, 이를 위해서는 먼저 다양한 품종 간에 민감성인 것과 내성인 것을 빠르고 정확하게 screening 하여야할 필요가 있다(Ryan *et al.*, 1993; Sivaguru and Horst, 1998; Ahn *et al.*, 2001, 2002, 2004).

Kochian group(Kochian 1995)에 의하면, 알루미늄 내성 기작을 가지고 있는 식물은 두 가지로 분류되는데 첫째는 뿌리 apex의 세포 안으로 알루미늄의 흡수를 배제하기 위해 세포질로부터 다양한 유기산(citrate, malate, oxalate 등)을 방출시키는 기작이며, 이에 속하는 작물에는 밀, 옥수수, 콩, 메밀 등이 있다(Miyasaka *et al.*, 1989, Delhaize *et al.*, 1993, Ma *et al.*, 1997). 두 번째는 뿌리의 세포 내로 흡수된 알루미늄이 물관부로 적재(translocation)되어 지상부 조직 특히, 잎과 꽃잎 세포의 액포에 저장하여 유입된 알루미늄에 대해 내성을 띠는 식물이다. 이에 속하는 작물은 차나무와 수국이 대표적이다.

최근 분자 수준에서의 알루미늄 내성 기작과 관련된 연구로 밀의 Al-activated malate transporter(ALMT1) 유전자가 밝혀졌다(Sasaki *et al.*, 2004). 밀의 ALMT1은 알루미늄에 민감성인 ES8 품종 보다 내성인 ET8 품종에서 높게 발현

[†]Corresponding author: (Phone) +82-62-530-2052
(E-mail) asjsuse@chonnam.ac.kr <Received January 31, 2011>

되는 유전자로써, 전사(transcription) 수준뿐 아니라 번역(translation) 수준에서도 발현의 차이를 보여 세포질에서 세포 밖으로 malate를 수송 및 방출하여 근권의 알루미늄 독성이 증가됨을 무독화 하였다. 또 그들은 보리에 이 유전자를 과발현하도록 형질전환하여 malate 방출량의 증가로 알루미늄에 내성을 보여 주었다(Delhaize *et al.*, 2004). 또 Yamaguchi 등(2005)은 이 단백질이 원형질막에 위치해 있는 것을 증명하였다. 반면에 알루미늄 저항성에 대한 다른 가설은 뿌리 생장시 근권의 pH를 알카리화시켜서 산성 조건에서만 활성화되는 알루미늄을 무독화 시킨다는 주장이다(Foyn *et al.*, 1965). 이를 뒷받침하는 결과로 Kollmeier *et al.*(2000)는 알루미늄 스트레스에 의해서 애기장대의 뿌리 끝 부위가 알카리화되는 것을 확인하였다. 최근에 본 연구 그룹에서도 agar와 pH indicator 시약을 사용하여 호박과 녹두의 알루미늄 처리에 따른 근권 pH의 변화를 추적하였다(Ahn 등 2002, Ahn 등 2007).

알루미늄 스트레스에 의한 뿌리의 생장 억제를 세포수준에서 보면, 뿌리 신장대(elongation zone)에서 양성자(H^+)의 방출이 억제되거나 분열조직(meristematic zone)에서는 양성자의 유입이 발생한다고 하였다(Piñeros and Kochian, 2001). 세포막을 통한 양성자의 유입과 유출은 제1차 능동 수송체인 H^+ -ATPase에 의해서 발생하며, 세포 안과 밖의 이러한 양성자의 농도 기울기(proton motive force)는 세포질의 pH는 증가시키면서 apoplastic acidification을 초래하게 된다. 이로 말미암아 2차 능동수송이 가능하기 때문에 식물의 생장과 발달에 근간이 되는 효소이다(Morsomme and Boutry, 2000). 또한 세포막은 다양한 필수 무기물뿐 아니라 알루미늄과 같은 중금속도 수송을 하고 있기 때문에 무기물 수송의 장벽인 세포막 수준에서 알루미늄 스트레스와 관련하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 본 연구 그룹에서도 몇 가지 작물이 양이온인 알루미늄 처리에 의해 뿌리의 끝부분의 막전위(membrane potential)의 차이가 발생하여 내성 혹은 민감성을 보이는 원인을 규명하였으며, 이러한 원형질막의 특성이 양성자의 유입/방출과 밀접한 관련이 있음을 발표하였다(Ahn *et al.*, 2001, 2004).

알루미늄에 의한 뿌리의 생장 억제가 초기에 발생하는 원인에 대한 많은 연구가 진행되었음에도 불구하고 아직도 정확한 기작은 밝혀지지 않고 있다. 본 연구에서는 다양한 보리 품종 중에서 특별히 알루미늄 스트레스에 민감성과 내성인 품종을 빠르고 정확하게 선별하기 위해 뿌리의 growth elongation rate(GEA), Hematoxylin staining(HS) 방법을 도입하였으며, Al 함량 측정을 통해 선별된 품종을 확인한 후 세포 수준에서 원형질막 H^+ -ATPase의 가능한 역할을 토론하였다.

재료 및 방법

생장조건

보리(*Hordeum vulgare* L.) 종자는 10분 동안 1.5%(v/v)의 NaOCl과 1.0% SDS(sodium dodecyl sulfate)로 소독을 한 후, 수돗물에서 씻어낸 다음, 발아상(25°C) 내에서 여과지를 깔 petri dish에서 암조건에서 2일 동안 발아 시켰다. 발아된 보리는 0.2 mM $CaCl_2$ 용액(pH 4.5)만 함유된 간이 수경 재배용 포트에 옮겨 심었다. 염화칼슘($CaCl_2$) 용액만 사용한 이유는 인산과 알루미늄과의 상호 작용을 피하기 위한 것이다. 생육상(14 h light/10 h dark cycle 580 μ mol m^{-2} s⁻¹light)에서 5일간 자란 균일한 묘는 수경액으로 옮긴 후 알루미늄 처리를 하였다.

뿌리 생육 조사 및 solution plate system

전남대학교 육종학 실험실에 육종된 64 종의 보리를 알루미늄에 민감성과 내성 품종 선별을 위해 사용되었다. 예비실험 결과 뿌리 생장이 현저히 억제되는 농도인 20 μ M $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (pH 4.5)로 처리하였고, 처리 후 24시간 후 뿌리의 길이를 측정하였다. 또, 투명한 아크릴 판을 가로 250 mm, 세로 250 mm, 두께 20 mm으로 주문 제작하였다(그림 3). 제작된 plate에 처리용 용액을 붓고, 5일된 유묘의 뿌리와 줄기 사이를 스폰지로 감싼 후 plate의 가장 윗부분에 고정하였다. 준비된 plate를 알루미늄 호일로 감싼 후 배양실에 두고 처리 시간에 따라 관찰 후 사진 촬영을 하였다.

Hematoxylin 염색과 알루미늄 함량 측정

알루미늄에 의한 뿌리의 피해 정도를 확인하기 위해 0.2% (w/v)% Hematoxylin 수용액에 10분 간 침지하여 염색시킨 후 증류수에 옮겨 2회 씻어낸 다음 사진을 촬영하였다. 알루미늄 농도 실험은 3회 반복하였다. 알루미늄을 처리 후, 증류수로 잘 씻어낸 뿌리를 끝으로부터 1 cm의 정단부분(0-1 cm)을 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.

원형질막 분리 및 H^+ -ATPase 발현 조사

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 사용하였거나 -80°C에 보관 후 사용하였다. H^+ -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⁺-ATPase에 대하여 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 모든 시약은 Sigma(St. Louis, USA)사로부터 구입하여 사용하였고, 모든 실험은 최소한 2번이상의 반복을 실시하였다.

결과 및 고찰

환경오염 등에 의해 산성화된 토양에서 재배되는 작물은 생육이 저해되는 피해가 많이 발생하는데(Sanchez and Benites, 1987), 이러한 피해는 토양 중에 가장 많이 함유되어 있는 금속원소인 알루미늄 때문이다. 알루미늄은 pH가 중성에서는 토양공극에 용해하지 않지만, 토양이 산성일 경우에는 용해성 8면 6수체형(Al³⁺)으로 용해가 시작되어 뿌리에 흡수되고, 그 결과 뿌리의 성장을 현저하게 방해한다. 또 식물의 생육에 필수적인 인산이 알루미늄과 결합하기 때문에 식

물이 이용, 흡수할 수 없는 형태가 된다고 알려져 있다. 그러므로 세계 경작지의 30-40% 이상을 차지하는 산성토양에서 알루미늄 독성은 농업생산의 주요한 제한요인의 하나이다(Matsumoto, 2000).

보리 품종 screening

보리는 특히 산성 토양에 민감한 작물이며, 특히 알루미늄에 더욱 민감하다. 그러므로 알루미늄에 내성인 품종을 육성하기 위한 가장 선행 되어야 할 과제는 보다 신속하고 정확한 보리의 알루미늄 스트레스에 내성인 품종을 screening 해야만 한다. 이에 본 실험이 수행되었다. 다양한 알루미늄 농도(0, 10, 20, 30, 40, 50 μ M)에 따른 예비실험을 통해 보리의 알루미늄 스트레스에 따른 뿌리의 생장 억제율을 확인하였고, 특히 20 μ M 농도와 24시간 처리에서 뿌리의 생장 억제율이 통계적 유의성을 보여 주었으며 그 이상의 농도에서는 전혀 뿌리가 자라지 못함을 확인하였다. 그러므로 우리는 전남대학교 육종학 실험실로부터 분양을 받은 64가지 보리 품종을 petri dish에 파종 후 5일 된 그리고 일정하게 성장한 유묘 10주를 택하여 1 L pot에 20 μ M 농도로 24시간 동안 처리한 후 뿌리의 생장 특성을 알아본 결과가 그림 1이다. 대부분의 품종이 알루미늄 처리에 의해서 뿌리의 생육이 50% 이상 억제되었으나 일곱 품종이 억제의 폭이 적

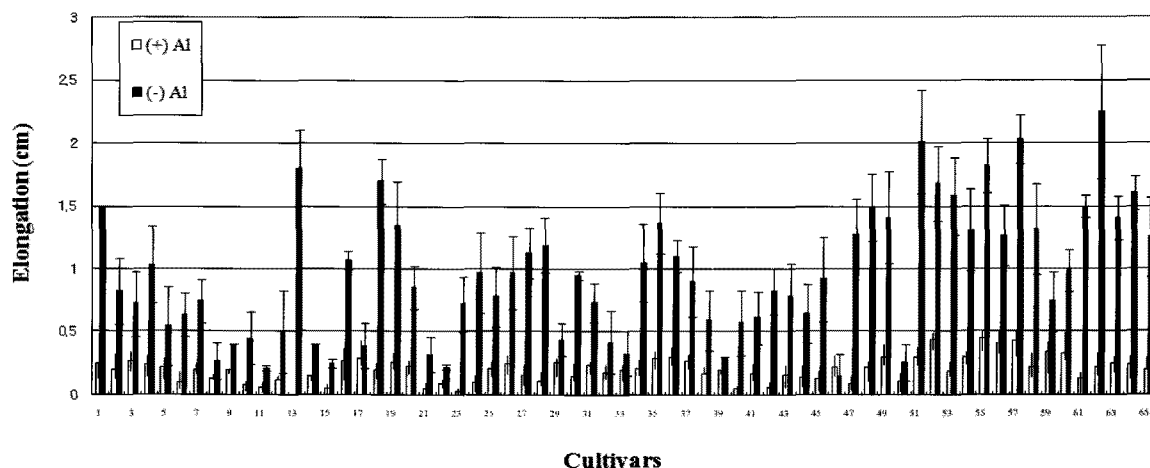


Fig. 1. Screening of 65 barley cultivars for Al tolerance. Five-day-old seedlings were subjected to 20 μ M Al in 0.2 mM CaCl₂ solution(pH4.5). Root growth was measured after 24 h. Values are mean of 10 replicates \pm SE and representative of more than 3 independent experiments. Each number indicate the cultivars as follows 1; Pum6, 2; Yusek6, 3; Mozzimugi, 4; F7-1, 5; Yusek7, 6; Yusek15, 7; Yusek10, 8; Yusek8, 9; F7-2, 10; F7-4, 11; Sessal, 12; Chapssal, 13; Nulssal, 14; Yusek17, 15; Sechapssal, 16; Mozzihadaga, 17; Hovanchalssal, 18; Yusek6, 19; Jayea7, 20; Pum26, 21; Jayea8, 22; Jayea5, 23; F8-1, 24; Jinyang, 25; F8-2, 26; Pum10, 27; Pum13, 28; Pum4, 29; Sinanchalssal, 30; Pum17, 31; Yusek18, 32; Jechonchalssal, 33; Yusek22, 34; F8-3, 35; Hinchalssal, 36; Yusek19, 37; Jayea2, 38; Pum9, 39; Yaya3, 40; Yusek20, 41; Yusek21, 42; Jinmi, 43; Jewonchalssal, 44; Ginssal, 45; Hamanchalssal, 46; Yusek5, 47; Pum3, 48; Allssal, 49; Pum7, 50; Dokushima, 51; Pum1, 52; Pum27, 53; Hinssal, 54; Pum22, 55; Pum28, 56; Jayea6, 57; Pum5, 58; F8-4, 59; F7-5, 60; Yusek22, 61; Jayea10, 62; F8-5, 63; Pum2, 64; Yusek18, 65; Jayea9.

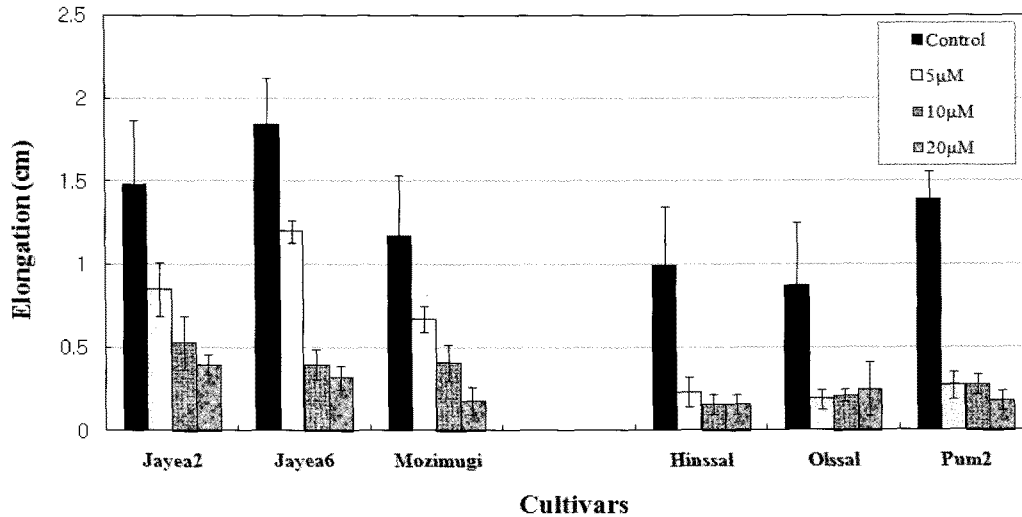


Fig. 2. Five-day-old seedlings of selected 6 cultivars were subjected to 0, 5, 10, 20 μM Al in 0.2 mM CaCl₂ solution (pH 4.5). Root growth was measured after 24 h. Values are mean of mean of 10 replicates±SE and representative of more than 3 independent experiment.

었다. 보다 정확한 결과를 도출하기 위해 2번의 반복 실험을 실시하였고, 최종적으로 내성인 세 품종(자예2, 자예6, 모찌무기)과 민감성 세 품종(품2, 흰쌀, 올쌀)을 선별하였다.

지금까지의 간이 수경 재배법을 이용한 screening은 빠르고 유용하지만 반면에 단점은 그 결과가 과대 혹은 과소평가되는 단점을 가지고 있다(Ma *et al.*, 1997). 그 이유로는 다양한 품종을 좁은 tank에서 동시에 알루미늄을 처리한 후 관찰을 하기 때문인데 이렇게 실험이 진행될 경우 품종에 따라서 뿌리로부터 분비되는 다양한 물질에 의해 다른 품종에도 영향을 미치기 때문이다. 이러한 원인은 서론에서 언급한 알루미늄 내성 기작과 관련이 있다. 내성 기작에는 뿌리의 선단 부위로부터 분비되는 유기산(예를 들어 보리와 밀은 malate, 옥수수는 citrate, 메밀은 oxalate 등)과 뿌리 표면의 pH를 산성에서 알칼리로 변화시키는 양성자(H⁺) 유출 기작이다. 그러므로 본 연구에서는 보다 신속하고 정확한 결과를 도출하기 위해 분리된 tank와 공간에서의 실험을 수행하였다.

선별된 내성 세 품종과 민감성 세 품종을 5, 10, 20 μM 알루미늄 처리 농도에 따른 뿌리의 생장을 관찰한 결과가 그림 2이다. 처리 24시간동안 알루미늄 처리 후 대조구에서는 내성 및 민감성 모두 약 1.5 cm 정도의 생장을 하는 반면에 처리구에서는 내성과 민감성 품종간의 반응에 차이가 있었다. 즉, 내성인 세 가지 품종의 경우 5 μM 농도에서는 25-35%, 10 μM 농도에서는 약 70%, 20 μM 농도에서는 80%의 성장 억제가 일어난 반면, 민감성인 세 가지 품종의 경우는 5 μM의 상대적으로 낮은 농도 처리임에도 불구하고

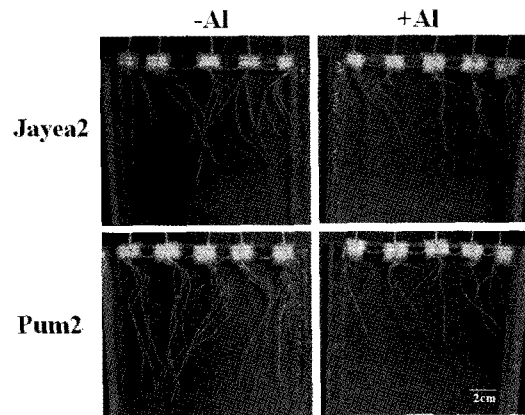


Fig. 3. Photographs of root of barley treated with 0 (-Al) and 20 μM Al (+Al) for 24 h (B) by a new solution plate system. The roots from a representative replicate are shown. Bar represents 2 cm.

고 약 60%의 성장 억제가 발생하였다. 게다가 높은 농도의 경우에는 거의 생장이 정지되는 것을 알 수가 있었다. 또 내성과 민감성의 가장 대표적인 두 품종인 자예2와 품2의 생육 비교를 본 연구를 통해 고안한 solution plate system을 이용하여 관찰한 결과 그림2의 결과와 일치함을 확인할 수 있었다(그림 3). 대부분의 실험이 지상부는 직접 관찰이 가능하지만 지하부 즉 근권은 관찰이 제한적이므로, 이 시스템은 직접 근권의 상황을 관찰 할 수 있기 때문에 본 실험에서 적용된 알루미늄을 포함한 중금속 스트레스 뿐 아니라 무기물의 과잉과 결핍, 온도, 광, 염 및 가뭄 스트레스 등의 screening에도 사용될 수 있을 것이다.

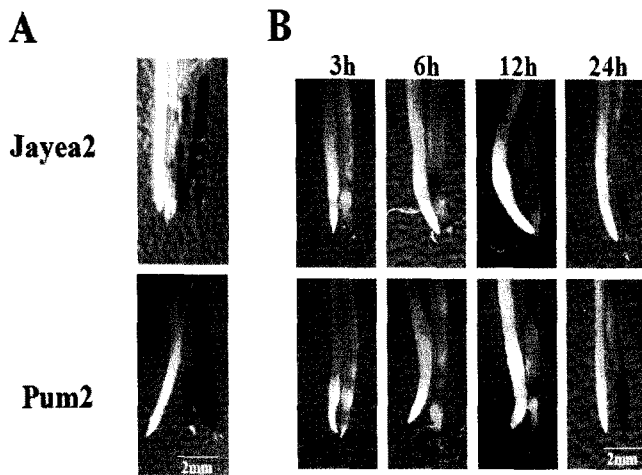


Fig. 4. Photographs of hematoxylin (0.2%) stained root of barley by 0, 5, 10, and 20 μM Al (A) and 3, 6, 12, and 24 h (B). The roots from a representative replicate are shown. Bar represents 2 mm.

알루미늄 피해 증상의 가시화

알루미늄 스트레스에 의한 뿌리 apex의 생장 피해 정도를 가시화하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 뿌리의 세포가 파괴되었음을 보여주는 염색 시약 0.2% hematoxylin을 사용하였으며, 본 연구진은 이미 호박, 녹두, 밀을 재료로 이미 보고 하였다(Ahn *et al.*, 2001, 2002, 2007). 내성과 민감성 보리 뿌리를 알루미늄 처리 농도별(0, 5, 10, 20 μM)과 시간별(0, 3, 6, 12, 24 h)에 따라 hematoxylin으로 염색한 결과가 그림 4A와 B이다. 우선 민감성 세 품종 피해 증상이 뿌리 apex의 신장대(elongation zone)에서 주로 관찰되었으며, 대조구와 비교하여 어두운 청색을 띄었다. 또 농도가 높은 처리구의 경우에는 신장대 표면이 심각할 정도로 가로 쪽으로 갈라지는 현상도 관찰되었다. 반면에 내성인 품종의 경우에는 5 μM 처리구는 대조구와 비교하여 그 피해 증상이 미미하였고, 더 높은 농도에서만 피해 증상이 나타났다(그림 4A). 20 μM 농도로 처리 한 후, 시간대별로 피해의 정도를 관찰한 결과 내성인 품종 ‘자예’는 3시간까지 대조구와 큰 차이가 없었으나 처리 6시간부터는 신장대에 염색이 되어 생장에 피해를 입은 것을 보여주었으나, 민감성인 품종 ‘품2’는 이미 처리 3시간부터 염색되었고 시간이 지날수록 그 피해 정도가 심하여 20 μM 농도로 24시간 처리한 경우는 신장대의 세포가 회복 불능 상태가 되었다(그림 4B).

품종 간의 알루미늄 함량 비교

보리 뿌리의 알루미늄 처리에 의한 내성과 민감성의 생장

Table 1. Effects of 20 μM Al supply on the Al content in the root tip (10 mm) 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.

| Cultivars | | Al content (nmol/root apex) |
|-----------|----------|-----------------------------|
| Tolerant | Jayea2 | 47.1 \pm 1.01 |
| | Jayea6 | 55.7 \pm 2.12 |
| | Mozimugi | 62.2 \pm 3.56 |
| Sensitive | Hinssal | 64.9 \pm 4.84 |
| | Olssal | 63.5 \pm 3.93 |
| | Pum2 | 63.0 \pm 2.67 |

차이와 세포 내의 알루미늄 함량과의 관계를 파악하기 위해 20 μM 알루미늄을 24시간 처리 후 뿌리의 apex(1cm)만 수확하여 알루미늄 함량을 측정하였다(표 1). 내성인 품종이 주당 47-62 nmol 그리고 민감성 품종이 주당 63-65 nmol의 측정치를 보여주어 가장 민감한 품종 ‘품2’와 가장 내성인 품종 ‘자예’와는 약 1.5배의 함량 차이를 보여 주었다. Sivaguru and Horst(1998)는 알루미늄 처리한 옥수수의 뿌리에서 알루미늄이 근단부에 더 많이 축적되었다고 보고하였고, 본 연구진도 호박과 녹두의 apex에서 알루미늄 함량이 다른 부위보다 2배 정도 높음을 보고하였다(Ahn *et al.*, 2001, Ahn *et al.*, 2007). 흥미롭게도 내성 품종 중에서 ‘모치무기’는 민감성 품종들과 비교하여 뿌리 apex의 알루미늄 함량이 큰 차이를 보여주지 않았다. 그 이유는 아마도 알루미늄 내성을 띠는 품종 간에도 기작의 차이가 있음을 시사하고 있다. 즉, 많은 작물들(예를 들면, 밀, 옥수수, 메밀)이 알루미늄 내성을 띠기 위해 뿌리로부터 근권으로 malate, citrate, oxalate 등 다양한 유기산을 방출하여 알루미늄 독성을 무독화 시킨다는 기작이 보편적이다. 그러나 수국과 차나무는 산성토양 조건에서 알루미늄을 흡수(uptake) 및 적재(translocation)가 일어나 물관부를 통해 지상부의 꽃잎과 잎의 액포에 저장(sequestration)한다는 보고가 있다(Matsumoto, 2000). 그러나 어떻게 알루미늄이 식물체 내로 흡수되고 적재되어 지상부로 축적이 되는지에 대한 기작은 밝혀져 있지 않고 있다.

원형질막 H⁺-ATPase의 발현 차이

식물의 원형질막에는 ‘master enzyme’이라 불리우는 H⁺-ATPase가 약 5% 존재한다. 이 효소는 ATP가 ADP와 인산기로 분해되면서 제1차 능동 수송을 한다. 이때 세포내 H⁺을 세포 밖으로 배출하고 막 경계에서 발생하는 H⁺의 농도 구배는

다른 양이온과 물질이 세포내로 흡수할 수 있는 제2차 능동 수송의 기회를 제공한다(Sussman, 1994). 또 산성화된 세포 벽이 이완되어 세포가 성장할 수 있다는 '산 성장설'도 이 효과와 관련이 있다. 게다가 여러 가지 불량 환경 조건에서 생존을 위한 아주 중요한 역할을 담당하고 있으며, 이미 알루미늄 스트레스 하에서 호박, 밀, 녹두, 콩 뿌리의 원형질막 H^+ -ATPase가 알루미늄 내성과 민감성 기작에 관련이 있음을 보고하였다(Ahn *et al.*, 2001, 2002, 2004, 2007, Kim *et al.*, 2010).

본 실험에서도 보리의 알루미늄 스트레스와 원형질막 H^+ -ATPase의 연구를 하기 위해 우선 two-phase partitioning법 (Palmgren *et al.*, 1990)으로 분리된 원형질막의 순도(purity)를 다양한 저해제를 이용하여 조사한 결과, 약 88% 높은 순도의 원형질막이 분리되었음을 확인 하였다. 선행 실험을 통해 선별된 보리의 알루미늄 내성 품종 '자예2'와 민감성 품종 '폼2'의 유묘를 20 μ M 알루미늄에 24시간 동안 처리한 뿌리를 수확한 후 원형질막을 분리하였으며, 분리된 원형질막 전체 단백질의 전기영동(SDS-PAGE) 결과가 그림 5A이다. 내성과 민감성 그리고 대조구와 처리구 간에 막 단백질의 pattern에는 아무런 차이를 볼 수가 없었다. 그러나 항체(polyclonal antibody)를 이용한 H^+ -ATPase(100 kDa)의 발현 변화는 흥미로운 결과를 보여 주었다(그림 5B). 즉, 내성과 민감성에 따라 단백질의 번역(translation) 수준에서 다른 결과를 얻을 수 있었는데 내성인 품종에서는 알루미늄을 처리한 뿌리 원형질막 H^+ -ATPase의 발현이 대조구와 비슷하였으나, 민감성인 품종에서는 이 단백질의 발현이 현저하게 감소하였다. 이는 내성 품종의 경우 알루미늄 스트레스 하에서도 원형질막 H^+ -ATPase와 14-3-3 단백질이 지속적인 인산화(phosphorylation) 작용을 유지하는 반면에 민감성 품종의 경우는 이미 알루미늄에 의해 뿌리 성장을 위한 원형질막 H^+ -ATPase의 활성이 감소되어 있기 때문일 것이다(Ahn *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2010).

결론적으로 산성비와 산성비료의 사용 증가로 재배 토양의 산성화가 진전되고 있으며, 알루미늄의 용해도를 증가시켜 작물 뿌리의 성장장애 및 양수분의 흡수를 저해하고, 더 나아가 작물의 생육 및 수량의 감소를 초래하고 있다. 본 연구의 재료인 보리는 전세계 뿐 아니라 우리나라에서도 중요한 작물임에도 불구하고 알루미늄 스트레스 관련 연구는 거의 없다. 이에 60 여종의 보리를 파종해서 알루미늄에 민감성 혹은 내성인 품종을 선별하기 위한 빠르고 정확한 방법을 제안하였으며, 이에 걸리는 기간은 단지 1주일 정도에 불과하였다. 이는 품종 육종에 걸리는 오랜 시간과 높은 비용을 고려한다면 대단히 큰 장점을 가지고 있다. 또 보리와

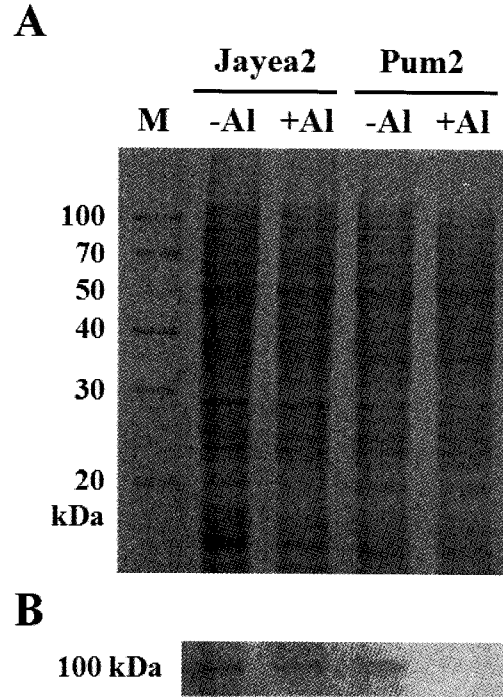


Fig. 5. Coomassie-blue-stained SDS-PAGE profile (A) and western-blot analysis (B) of plasma membrane H^+ -ATPase (100 kDa) using an antibody against plasma membrane H^+ -ATPase isolated from the roots of barley treated with Al for 24 h. +Al and -Al: presence and absence of 20 μ M Al, respectively.

같은 크기의 종자 즉 벼, 밀, 호밀 등을 screening 하고자 할 때에도 본 system은 적용될 것으로 보인다.

적 요

본 연구는 간이 수경재배법을 이용하여 보리의 알루미늄 스트레스 내성과 민감성 품종을 간편하고 빠르게 screen하는 방법을 소개하고, 선별된 품종간의 뿌리의 성장, 뿌리 조직의 염색, 알루미늄 함량, 원형질막의 H^+ -ATPase의 발현 변화를 조사하여 분석하였다.

1. 보리 65가지 품종을 간이 수경재배법을 이용하여 20 μ M 알루미늄을 24시간 처리 후 뿌리생장의 차이로 내성 세 품종(자예2, 자예6, 모치무기)과 민감성 세 품종(흰쌀, 올쌀, 폼2)을 선별하였다.
2. 알루미늄에 내성 품종은 알루미늄 처리 농도(0, 5, 10, 20 μ M)에 따라 뿌리 성장 감소폭이 적었으나, 민감성 세 품종은 상대적으로 낮은 5 μ M 농도에서부터 80%의 생장이 억제되었다.

3. 내성인 자예2와 민감성인 품2의 알루미늄 처리 후, 농도별(0, 5, 10, 20 μM), 시간별(3, 6, 12, 24시간)로 0.2% hematoxylin으로 염색 시 주로 apex에 3시간 이후부터 염색되었으며, 민감성 품2가 내성인 자예2에 비해 농도와 시간에 따라 그 피해 정도가 매우 심각하였다.
4. 20 μM 로 24 시간 처리된 뿌리 apex(10 mm)의 알루미늄 함량을 측정한 결과, 내성인 자예2는 주당 47.1 nmol 의 함량을 보여 주었으나, 민감성인 품2는 주당 64.9 nmol의 높은 함량을 보여 주었다.
5. 24시간 동안 20 μM 알루미늄을 처리한 뿌리 원형질막 H^+ -ATPase 발현을 western blotting을 통해 분석한 결과, 내성인 자예2는 차이가 없었으나, 민감성 품2는 현저히 억제 되었다. 이로 보아 원형질막 H^+ -ATPase가 알루미늄의 내성 기작에 관여 하는 것으로 보인다.
6. 본 연구를 통해 간이 수경재배와 hematoxylin을 이용한 염색으로 간단하고 빠르게 보리의 알루미늄 내성과 민감성 품종의 screening을 할 수 있었고, 보리뿐 아니라 쌀, 밀 등의 다른 종자에도 적용할 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 농림수산식품부 농업수산물기술평가원과 교육과학기술부 중점연구소 프로그램(project no. 2010-0020141)에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Ahn, S. J., M. Sivaguru, H. Osawa, G. C., Chung, and H. Matsumoto. 2001. Aluminum inhibits the H^+ -ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiol.* 126: 1381-1390.
- 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 of H^+ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *J. Exp. Bot.* 53: 1959-1966.
- Ahn, S. J., K. Yu-Sun, et al. 2007. Aluminum-induced Root Growth Inhibition and Impaired Plasma Membrane H^+ -flux in Mung Bean. *Kor. J. Crop Sci.* 52(2): 213-219.
- Ahn, S. J., Z. Rengel, and H. Matsumoto. 2004. Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H^+ -ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytol.* 162: 71-79.
- 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, D. M. Hebb, Y. Yamamoto, T. Sasaki, and H. Matsumoto. 2004. Engineering high level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. *PNAS* 101(42): 15249.
- Delhaize, E., P. R. Ryan, 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.
- Foyn, E. 1965. Disposal of waste in the marine environment and the pollution of the sea *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 3 3: 95-114.
- Kim, YS., Park. W. Nian, H. Sasaki, T. Ezaki, Bunichi. Jang, YS. Chung, GC. Bae, HJ. Ahn, SJ. 2010. Aluminum tolerance associated with enhancement of plasma membrane H^+ -ATPase in the root apex of soybean. *Soil Science & Plant Nutrition* 56(1): 140-149.
- Kochian L. V. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 237-260.
- Kollmeier, M., H. H. Felle. 2000. Genotypical Differences in Aluminum Resistance of Maize Are Expressed in the Distal Part of the Transition Zone. Is Reduced Basipetal Auxin Flow Involved in Inhibition of Root Elongation by Aluminum? *Plant Physiol.* 122(3): 945-956.
- Ma, J. F., S. J. Zheng, H. Matsumoto, and S. Hiradate. 1997. 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, K^+ , and H^+ transport, and root-cell membrane potentials. *Plant Physiol.* 91: 1188-1196.
- Morsomme, P. and M. Boutry 2000. The plant plasma membrane H^+ -ATPase: structure, function and regulation. *Biochimicaet Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465(1-2): 1-16.
- 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.
- Pineros, M. and L. Kochian 2001. A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al^{3+} -induced anion channels. *Plant Physiology* 125(1): 292.
- Ryan, N. 1993 Coping with Volatility: Four Models of Policy Communities. In Hede, A and S. Prasser (Eds) *Policy Making in Volatile Times*, Hale and Iremonger, Sydney.
- 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.
- Sasaki, T., Y. Yamamoto. 2004. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal* 37(5): 645-653.
- 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.
- Yamaguchi, M., T. Sasaki. 2005. Evidence for the Plasma Membrane Localization of Al-activated Malate Transporter (ALMT1). *Plant and Cell Physiology* 46(5): 812-816.