

The Effects of Phosphate Starvation on the Activities of Acid and Alkaline Phosphatase, Fructose-1,6-bisphosphatase, Sucrose-phosphate Synthase and Nitrate Reductase in Melon (*Cucumis melo* L.) Seedlings

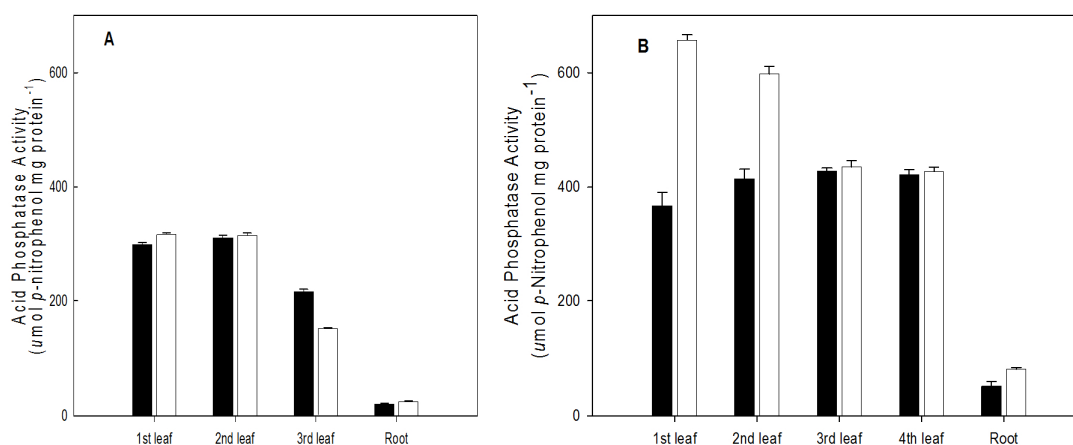
Sang-Jae Kang, Chang-Hee Lee, and Man Park*

School of Applied Life Science, Kyungpook Nat'l University, Daegu, 41566, Korea

(Received: November 24 2015, Revised: January 20 2016, Accepted: February 25 2016)

Plants response to phosphate starvation include the changes of activity of some enzymes, such as phosphatases, fructose-1,6-bisphosphatase, sucrose-phosphate synthase and nitrate reductase. In this study, to determine the effects of phosphate starvation on the change of activities of acid and alkaline phosphatase, fructose-1,6-bisphosphatase, sucrose-phosphate synthase, and nitrate reductase were studied in melon seedlings (*Cucumis melo* L.). The content of the protein and chlorophyll tended to relatively reduced in melon seedlings subjected to phosphate starvation. Acid phosphatase activity in first and second leaves of melon seedlings was relatively higher than that of third and fourth leaves of seedlings in 14 days after phosphate starvation treatment, respectively. Active native-PAGE band patterns of acid phosphatase in melon leaves showed similar to activities of acid phosphatase, whereas alkaline phosphatase activity was different from the change in the activity of acid phosphatase. Inorganic phosphate content in melon seedlings leaves was constant. The changes of Fructose-1,6-bisphosphatase and sucrose phosphate synthase activities showed similar patterns in melon seedlings leaves, and between these enzymes activities and phosphate nutrition negatively related. Fructose-1,6- bisphosphatase and sucrose phosphate synthase activities showed significant difference in second and fourth leaves, but nitrate reductase showed significant difference in first and second leaves in 14days after phosphate starvation treatment. We concluded that phosphate nutrition could affect the distribution of phosphate, carbon and nitrogen in melon seedlings.

Key words: Inorganic phosphate, Phosphatases, Phosphate starvation, Melon seedling



Acid phosphatase activity of leaves and root of melon seedlings subjected to phosphate starvation for 7days and 14days.

*Corresponding author: Phone: +82539505717, Fax: +82539537233, E-mail: manpark@knu.ac.kr

§Acknowledgement: This research was supported by Kyungpook National University Research fund, 2014.

Introduction

식물체는 영양생장 과정에서 토양 중 인산의 함량이 낮아져서 장기적인 결핍이 되거나 또는 일시적으로 영양소의 공급에 제한을 받는 경우가 종종 발생한다. 이러한 경우 식물체는 성숙한 잎으로부터 새롭게 성장하는 어린 잎 부위로 인산이 재이동 (remobilization) 되어야 함은 매우 중요한 과정이며 영양생장이 빠른 유묘의 경우 인산영양의 공급에 매우 중요한 전략이 될 수 있다.

생육 중인 식물이 인산의 영양이 부족해지면 주근의 성장이 둔화되고 뿌리로부터 산성 인산분해효소 (AP: Acid phosphatase : EC 3.1.3.2)의 활성 증가가 상당히 일어난다. 인이 부족한 여러 종류의 식물의 뿌리에서 산성 인산분해효소가 분비된다는 보고 (Ascencio, 1997; Duff et al., 1991; Li et al., 1997)가 있으며, 아라비도시스에서도 뿌리와 지상부에 여러 종류의 동위효소가 존재할 뿐만 아니라 인산의 부족스트레스에 의해 이들 동위효소가 유도된다고 알려져 있다 (Trull et al., 1997). 산성 인산가수분해 효소와 같이 알칼리성 인산가수분해효소 (ALP: alkaline phosphatase: EC 3.1.3.1)도 일반적으로 식물세포에 많이 존재하는 효소로 인산의 결핍 (Duff et al., 1991), 염 스트레스 (Pan, 1987), 수분부족 (Barrett-Lennard et al., 1982)과 같은 스트레스를 받을 경우에 관여하는 것으로 알려져 있다. 생육 중인 식물체에서 인의 공급을 제한하면 무기 인산의 이동과 관련된 유전자의 발현이 증가된다 (Muchhal et al., 1996; Liu et al., 1998; Lin, et al., 2009). 산성 인산분해효소 (Lefebvre et al., 1990; Duff et al., 1994; Miller et al., 2001; Li et al., 2002)와 RNA분해효소 (RNase) (Bariola et al., 1994), 알칼리성 인산가수분해효소 (Alkaline Phosphatase)와 같은 효소가 분비되어 세포 내의 유기태 인이나 근권의 불용성 인을 무기태 인으로 유효화를 촉진하기 위한 대사적인 변화가 일어난다 (Bariola et al., 1994; Duff et al., 1994). 이들 효소의 작용으로 식물체 내부적으로는 지상부로부터 뿌리로의 인산의 재이동의 증가가 일어나는 것이 촉진되며, 재이동된 상당량의 인산은 지상부로 되돌아오게 되는 인산의 순환이 식물체 인산의 항상성을 유지하는데 중요한 과정이다 (Lefebvre et al., 1990; Jeschke et al., 1997).

또한 식물체의 잎에서 세포질 내 무기인산의 농도와 엽록체로부터 합성되어 세포질로 이동하는 삼탄당 인산 (Glyceraldehyde-3-phosphate)의 상대적 농도는 고정된 탄소가 엽록체에서의 녹말 합성 또는 세포질 내에서 설탕의 합성을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다. 이 과정은 엽록체의 외막에 존재하는 인산 수송단백질 (phosphate transporter)에 의해 화학 양론적으로 작용한다. 따라서 세포질 내 무기인산의 수준이 낮아지면 엽록체로부터 삼탄당 인산의 수송이 감소되어 세포질에서의 설탕의 합성은 제한을 받고 엽록

체에서의 녹말의 합성이 증가된다. 인산의 함량이 높아지면 삼탄당 인산의 유출이 증가되어 설탕인산 합성효소 (SPS: Sucrose phosphate Synthase, EC 2.4.1.14)의 작용이 증가되고 설탕의 합성이 촉진되어 식물의 영양생장이 원활이 이루어질 수 있다. 세포질 내에서 과당-1,6-이인산가수분해효소 (FBPase: fructose-1,6-bisphosphatase, EC 3.1.3.11)는 무기인산의 함량과 삼탄당인산의 함량에 의해 조절되고 있으며, 질소의 대사와 관련된 질산 환원효소 (NR: Nitrate Reductase, EC 1.6.6.1)도 깊은 연관이 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 유묘가 생육하고 있는 과정 중에 인산영양이 결핍되면 성숙 잎에서 어린 잎으로 인산의 재분배를 위한 몇 가지 효소의 작용을 이해하고, 인산 영양과 지상부의 탄소분배 및 질소대사와의 연관성 등 생화학적 변화를 이해하는 것이 식물의 영양 상태를 판단하는데 필요하다. 따라서 인산의 영양수준에 따른 식물체 내 생화학적 변화가 식물의 영양상태를 이해하고 판단할 수 있는 근거를 확립하는데 활용하기 위하여 참외 유묘에서 몇 가지 효소의 활성도 변화에 연구를 수행하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 처리 공시작물은 참외 (*Cucumis melo* L.)를 사용 하였으며, 원예용 상토를 채운 사각 포트 (8×8×7 cm)에 파종하여 3엽이 나올 때까지 1/4 strength의 Hoagland 용액을 일정량 공급하면서 $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량과 28°C/20°C (주, 14 hrs/야, 10 hrs)로 조절된 생육상에서 육묘하였다. 생육이 균일한 유묘를 선정하여 한국원예시험장 표준배양액을 공급한 대조구 (+P)와 1 mM의 KH_2PO_4 의 전량을 동량의 KCl로 대체한 배양액을 공급한 인산공급제한 처리구 (-P)로 하여 배양액을 저면관수 하였다. 처리 후 7일째 유묘의 1~3엽과 14일째 유묘의 1~4엽을 각각 채취하여 즉시 -80°C에 보관하고 모든 실험에 사용하였다.

Acid 및 Alkaline Phosphatase 활성도 산성 및 염기성 인산가수분해효소의 활성도 측정을 위하여 조효소액은 잎 시료 일정량 (약 1 g)을 액체 질소를 넣어 마쇄한 후, 10 배 부피의 추출 완충액 [10 mM MgCl_2 , 2 mM EDTA, 5 mM DTT (dithiothreitol), 2.5%(w/v) glycerol, 1 mM PMSF가 들어 있는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)]으로 추출하여 조효소액으로 하였다 (Bozzo et al., 2004; Granjeiro et al., 1999). 산성 인산가수분해효소의 활성도는 1 mM EDTA, 10 mM MgCl_2 , 5 mM *p*-nitrophenol phosphate (*p*NPP)가 함유된 50 mM Na-acetate buffer (pH 5.1)에서 측정하였다. 염기성 인산가수분해효소의 활성도는 1 mM EDTA, 10 mM MgCl_2 , 5 mM *p*-nitrophenol phosphate (*p*NPP)가 함유된 50 mM diethanolamine buffer (pH 9.8)에서 측정하였다.

반응용액 1 mL에 0.1 mL의 조효소액을 넣은 후, 37°C에서 20분간 반응시키고 3 N NaOH 0.2 mL를 넣은 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 효소반응 생성물인 *p*-nitrophenol (*p*NP)의 함량 ($\epsilon = 18.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)을 환산하고 비활성도로 나타내었다 (Bozzo et al., 2004; Robinson et al., 2012). 조효소액의 단백질함량은 BSA를 표준단백질로 하여 Bradford (1976)의 방법으로 정량하였다. 산성 인산 가수분해효소의 활성밴드의 확인은 Bozzo et al. (2004)의 방법을 변형하여 비변성 전기영동 (native PAGE)으로 확인하였다. 전기영동은 Phast system (Pharmacia 사)에서 8~25% gradient precast gel (5×5 cm, GE Healthcare)을 사용하여 제작사에서 추천하는 방법으로 전기영동 하였다. 전기영동한 젤의 활성밴드 염색은 100 mM Na-acetate buffer (10 mM MgCl₂, 0.03%(w/v) β -naphthyl phosphate, 1 mg/mL Fast Garnet GBC salt)에서 염색하였다. 활성밴드의 분석은 Image Master 1D Prime software (Pharmacia 사)를 이용하여 분석하였다.

Sucrose-phosphate synthase와 Fructose-1,6-bisphosphatase

활성도 설당인산 생성효소의 활성도와 과당-1,6-이인산 가수분해효소의 활성도 측정을 위한 조효소액의 조제는 Kerr et al. (1984)의 방법으로 다음과 같이 조제하였다. 10 배 부피의 추출완충액은 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM PMSF가 함유된 HEPES 완충액 (pH 7.5)을 사용하였다. 모든 조효소액의 현탁액을 원심분리 (13,000 rpm, 4°C, 10 min)한 후 상정액을 일정량으로 나누어 -80°C 냉동고에 보관하면서 각 실험에 사용하였다. FBPase의 활성도 측정은 15 mM MgCl₂, 2 mM FBP가 포함된 50 mM HEPES 완충액 (pH 7.5)에 조효소액을 넣고 30°C에서 20분간 반응시킨 후 30%(v/v) TCA를 동량 첨가하였다. 유리된 인산의 함량은 Drueckes et al. (1995)의 방법을 약간 변형하여 측정하고 비활성도로 나타내었다. 설당인산 생성효소의 활성도 측정은 7.5 mM Fructose-6-P, 7.5 mM UDP-glucose, 15 mM MgCl₂가 포함된 50 mM HEPES 완충액 (pH 7.5)에 조효소액을 넣고 30°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N NaOH 용액을 첨가하였다. 반응용액을 100°C에서 10분간 끓인 후 급냉하고 이 반응용액에 0.25 mL의 0.1%(w/v) Resorcinol 액과 0.75 mL 30%(v/v)의 HCl을 첨가하고 80°C에서 10분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 설당 (sucrose)의 양을 구하여 비활성도로 나타내었다 (Kerr et al., 1984; Rufty et al., 1983). 조효소액의 단백질함량은 BSA를 표준단백질로 하여 Bradford (1976)의 방법으로 정량하였다.

Nitrate reductase 활성도 인산 부족 시 식물체의 질산 환원효소 활성도의 변화를 측정하기 위한 조효소액은 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM PMSF가 함유된 HEPES 완

충액 (pH 7.5)을 10배 부피로 가하여 추출하였다. 반응용액은 10 mM KNO₃, 1 mM EDTA, 0.2 mM NADH가 들어 있는 25 mM 인산완충액 (pH 7.0)에 0.05 mL의 조효소액을 넣고 정확히 30°C에서 20분간 반응시켰다. 이 반응용액에 58 mM sulfanilamide와 0.77 mM *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine (NEDC)를 넣어 10분간 발색반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고 비활성도로 나타내었다.

단백질 함량과 무기인산 함량, 엽록소의 함량 조효소액의 단백질의 함량은 Bradford (1976)의 방법으로 측정하였으며, 무기인산의 함량은 시료 0.5 g을 액체 질소를 넣고 마쇄한 후 10%(v/v) HClO₄ 10 mL를 넣고 추출하였다. 추출액을 원심분리 (13,000 rpm, 10분)하고 상정액 0.5 mL에 0.2 mL ammonium paramolybdate-vanadate 용액과 0.3 mL의 증류수를 넣고 30°C에서 30분간 반응시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선으로부터 무기인산의 함량을 환산하여 생체중량 당 mM로 표시하였다 (NIAS, 1988) 엽록소의 함량은 시료 0.1 g에 액체질소를 넣고 마쇄한 후 10배 부피의 80%(v/v) 아세톤을 넣은 현탁액을 원심분리하고 (13,000 rpm, 5분), 상정액을 645 nm, 663 nm에서 흡광도 각각 측정하여 생체중 당 μg 으로 표시하였다 (Arnon, 1949; Lichtenthaler, 1987).

Results and Discussion

단백질 함량 및 엽록소 함량 참외 유묘의 생육기에 인산의 공급을 제한할 경우 식물체 내 단백질의 함량과 엽록소 함량의 변화를 조사한 결과는 Fig. 1, Fig. 2와 같다. 단백질의 함량은 인산을 공급한 대조구에 비해 인산의 공급을 제한한 처리구에서 약간 낮은 경향을 나타내어 인산의 공급이 단백질의 합성에 영향을 있음을 알 수 있다. 엽록소의 함량은 처리 7일째까지는 거의 변화가 나타나지 않으나 처리 14일째에는 처리구에서의 함량이 대조에서의 함량보다 낮은 경향을 보였다. 총 엽록소 함량에 대한 엽록소 a의 비율은 처리 7일째 3엽에서 처리구에서 약간 더 낮은 경향을 나타내었으나 처리 14일째에는 대조구와 처리구에서 거의 비슷한 경향을 보였다. 이 결과는 인산의 공급은 단백질의 함량과 엽록소의 함량변화에 영향을 미침을 나타내었다.

Acid 및 alkaline phosphatase 활성도 참외 유묘에서 인산의 공급을 제한했을 때 잎과 뿌리에서의 산성 인산가수분해효소의 활성도 변화를 조사한 결과는 Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5와 같다. 7일째 유묘에서 산성 인산가수분해효소의 활성도는 제 1엽과 2엽에서는 비슷한 경향을 보이며 제 3엽과 뿌리에서는 비교적 낮은 경향을 보였다 (Fig. 3A). 이 결과는 참외의 유묘에서 인산의 공급을 제한할 경우 인산의

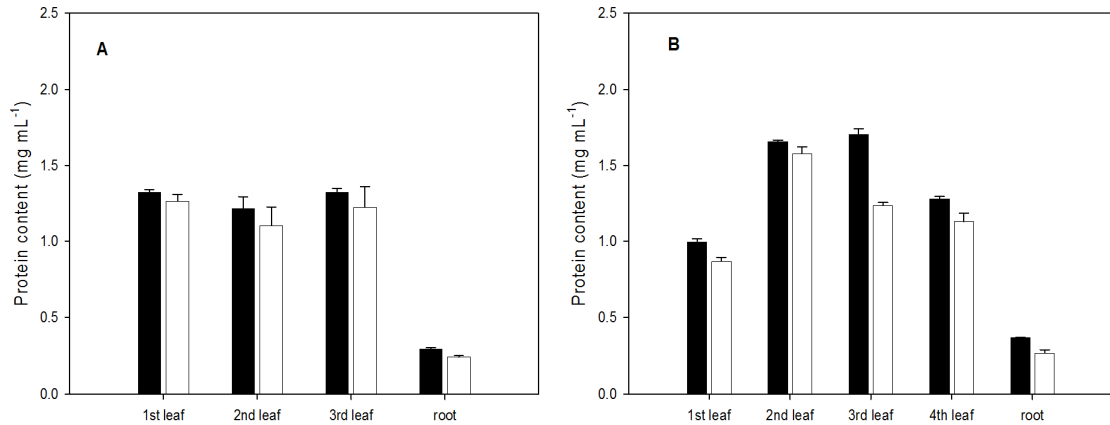


Fig. 1. Protein content of leaves and root of melon seedlings subjected to phosphate starvation for 7days (A) and 14days (B). Potassium phosphate was replaced with potassium chloride [■: 1 mM KH₂PO₄ (+P); □: 0 mM KH₂PO₄ (-P)]. The vertical bars represent standard error (n=5).

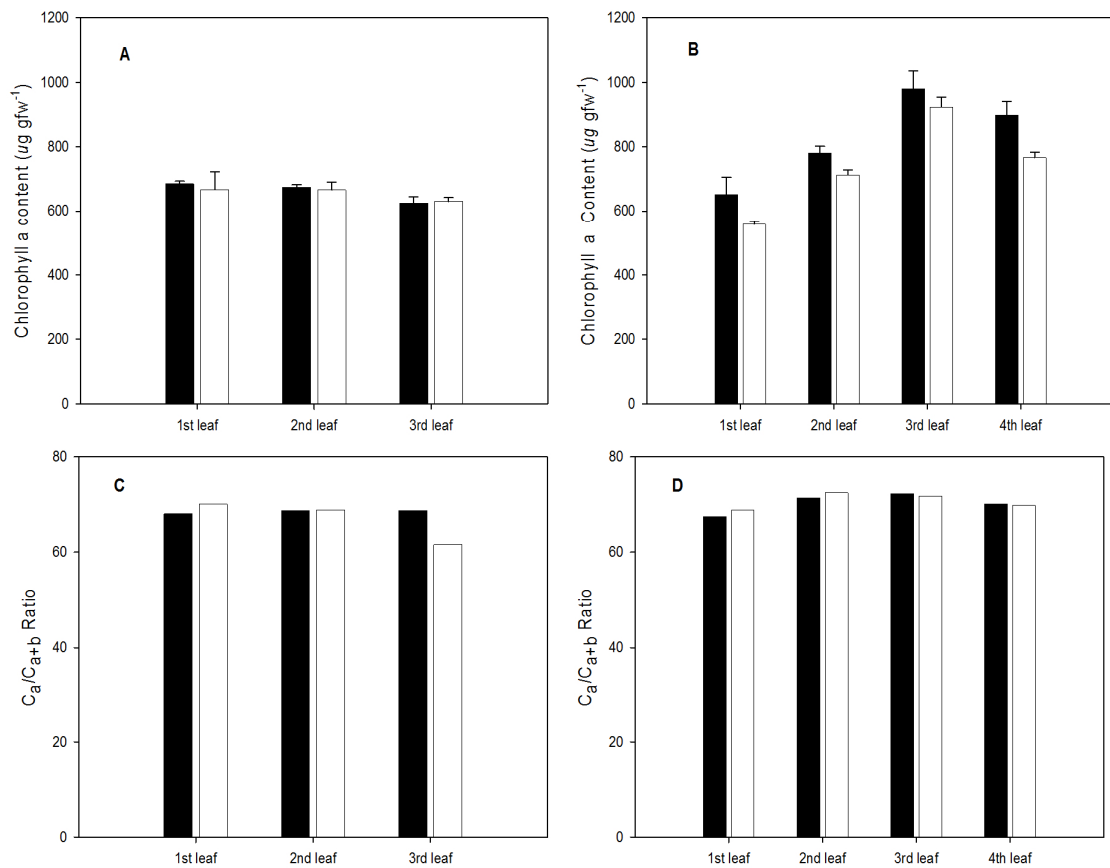


Fig. 2. Ratio of chlorophyll a to total chlorophyll of leaves of melon seedlings subjected to phosphate starvation for 7days (A) and 14days (B). Potassium phosphate was replaced with potassium chloride [■: 1 mM KH₂PO₄ (+P); □: 0 mM KH₂PO₄ (-P)]. The vertical bars represent standard error (n=5).

재분배를 위한 잎에서의 역할이 아직 생성되지 않음을 알 수 있었다. 14일째 유묘에서의 활성도 변화는 제1엽과 2엽에서 매우 크게 증가하였으며 3엽과 4엽에서는 별다른 차이를 보이지 않았다. 특히 인산의 공급을 제한한 경우 제1엽과 2엽에서의 활성도가 인산을 공급한 대조구에 비해 상대적으로 크게 증가하여 인산의 재분배에 큰 역할을 하는 것으로 생각된다 (Fig. 3B).

한편, 처리 14일째 유묘에서 산성 인산가수분해효소의 활성밴드를 확인한 결과 (Fig. 4) Fig. 3에서 나타난 바와 같이 인산을 공급하지 않은 유묘의 제 1엽과 2엽에서 인산을 공급한 유묘에서 보다 더 높은 활성밴드를 확인할 수 있었으며 3엽과 4엽에서는 상대적으로 활성밴드가 낮은 결과를 보였다. 한편, 참외 유묘에서 인산영양 공급 유무에 따른 알칼리성 인산가수분해효소의 활성도 변화를 조사한 결과

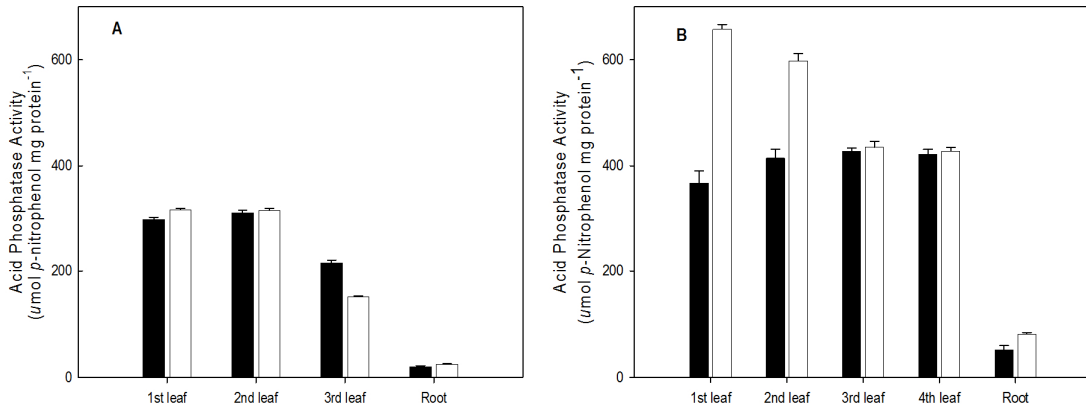


Fig. 3. Acid phosphatase activity of leaves and root of melon seedlings subjected to phosphate starvation for 7 days (A) and 14 days (B). Potassium phosphate was replaced with potassium chloride [■: 1 mM KH₂PO₄ (+P); □: 0 mM KH₂PO₄ (-P)]. The vertical bars represent standard error (n=5).

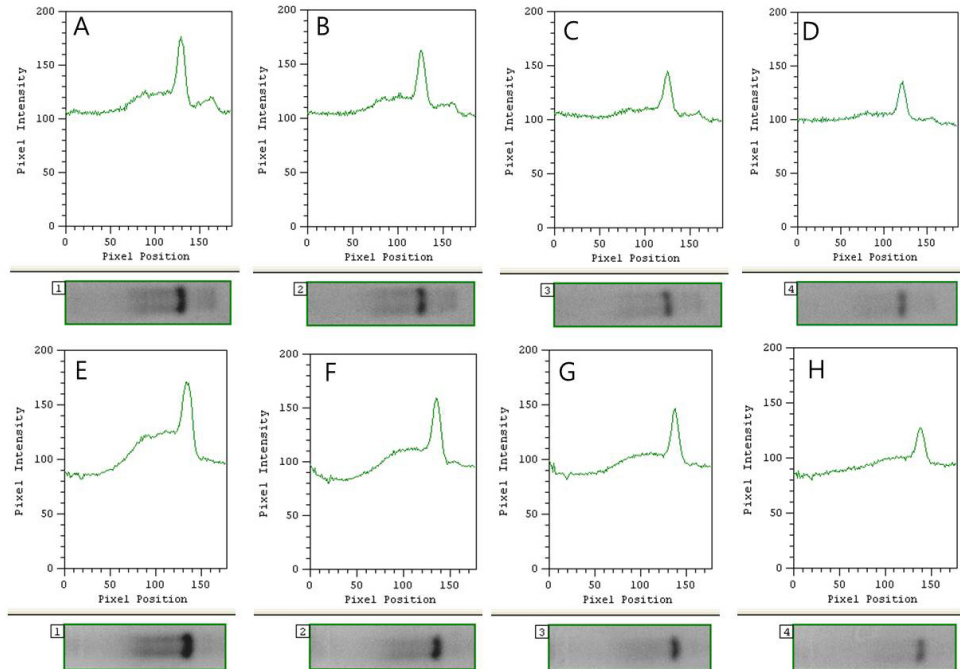


Fig. 4 Profiles of acid phosphatase in the leaves of melon seedlings subjected to phosphate starvation for 14 days. Non-denaturing activity gels were prepared and run as detailed in methods and materials. A~D (+P): 1st, 2nd, 3rd and 4th leaves of melon seedlings subjected to phosphate application; E~F (-P): 1st, 2nd, 3rd and 4th leaves of melon seedlings subjected to phosphate starvation, respectively. Potassium phosphate was replaced with potassium chloride.

처리 7일째 제 1엽과 2엽, 3엽에서의 활성도는 비교적 낮은 경향을 보였으며 인산의 공급을 제한했을 경우 약간 낮은 활성도를 보였다. 그러나 뿌리에서의 활성도가 상대적으로 매우 큰 경향을 보였으며 인산의 공급을 제한하였을 경우 약간 더 높은 결과를 보였다 (Fig 5A). 처리 14일째에는 지상부와 뿌리에서 일정한 경향을 보이지 않으나 인산의 영양이 결핍된 경우 약간 더 높은 활성을 보였으며 뿌리에서의 활성도가 잎에서의 활성도보다 훨씬 더 높은 경향을 보였다 (Fig. 5B).

생육중인 식물체에 인산의 영양이 부족해지면 뿌리로부터 산성 인산가수분해효소의 분비가 증가한다는 보고 (Ascencio,

1997; Duff et al., 1991; Li et al., 1997)와 무기 인산의 이동과 관련된 유전자의 발현이 증가된다는 보고 (Muchhal et al., 1996; Liu et al., 1998) 뿐만 아니라 알칼리성 인산가수분해효소의 활성도의 변화도 일어나 세포내의 유기인이나 근권에서 인의 획득을 위한 생화학적 변화가 일어나게 되는 것으로 사료된다 (Lefebvre et al., 1990; Jeschke et al., 1997). 식물체 내에서 이들 효소의 작용은 인산의 재이동을 촉진하게 되고 특히 인산의 공급이 부족할 경우 어린 조직으로의 이동에 영향을 미쳐 인산 수준의 항상성을 유지하는데 큰 영향을 주는 것으로 판단된다.

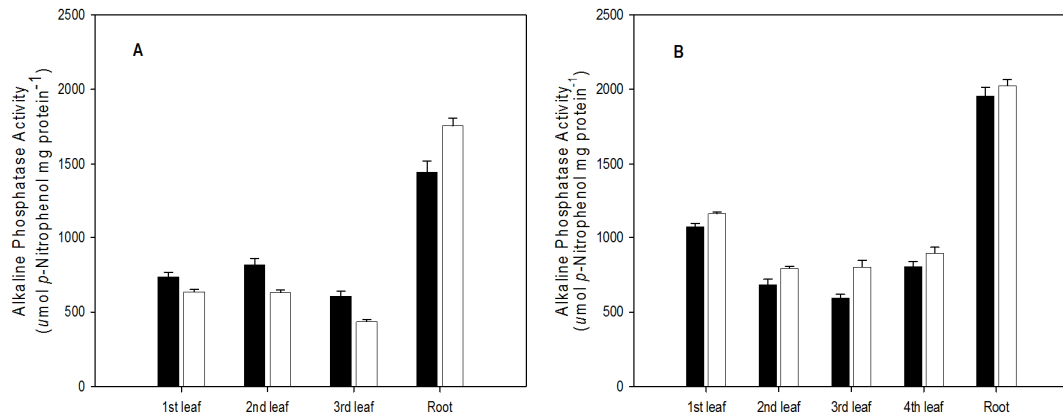


Fig. 5. Alkaline phosphatase activity of melon seedlings subjected to phosphate starvation for 7days (A) and 14days (B). Potassium phosphate was replaced with potassium chloride [■: 1 mM KH_2PO_4 (+P); □: 0 mM KH_2PO_4 (-P)]. The vertical bars represent standard error (n=5).

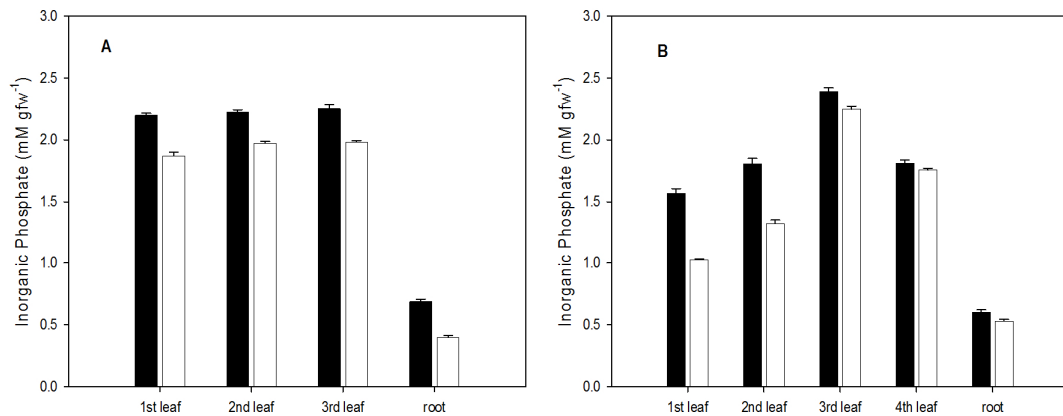


Fig. 6. Inorganic phosphate content of leaves and root of melon seedlings subjected to phosphate starvation for 7days (A) and 14days (B). Potassium phosphate was replaced with potassium chloride [■: 1 mM KH_2PO_4 (+P); □: 0 mM KH_2PO_4 (-P)]. The vertical bars represent standard error (n=5).

Inorganic Phosphate 함량 인산 공급은 세포질 내 무기인산의 농도를 결정하는 인자가 되며 세포질 내 인산의 수준은 엽록체로부터 삼탄당 인산의 유출과 밀접한 연관이 있으므로 참외 유묘에서 인산의 공급제한이 세포 내 인산의 수준에 미치는 결과는 Fig. 6과 같았다. 처리 7일째 유묘에서 제 1엽과 2, 3엽에서 비슷한 수준을 보였으나 무기인산을 제한한 처리구에서 함량이 상대적으로 낮은 경향을 나타내었다. 뿌리에서의 경향은 지상부에서의 경향과 비슷하였으나 상대적 함량이 매우 낮았다. 처리 14일째 유묘에서는 제 1엽과 2엽에서는 7일째의 제 1엽과 2엽에서의 함량보다 더 낮아졌으며 제 3엽에서는 비슷한 수준을 유지하였으며 제 3엽과 4엽에서는 인산처리구와 무처리구 간의 차이가 상당히 줄어드는 경향을 보였다. 이 결과는 참외 유묘에서 인산의 공급을 제한할 경우 제 1엽 또는 2엽에서 제 3엽이나 다른 성장점 부근으로 무기 인산의 재이동이 일어났음을 추정할 수 있다. 또한 14일째 두 처리구에서의 무기인산의 함량이 처리 7일째 처리구에서 보다 상대적으로 낮은 함량을 나타내는 것은 참외유묘의 경우 4엽기 이후 급속한 영양생

장으로 인해 상대적으로 함량이 낮아지는 것으로 판단되었다.

설탕인산 생성효소와 과당-1,6-이인산가수분해효소

엽록체의 캘빈회로에서 합성된 삼탄당인산은 세포질로 이동하여 설탕이 형성되는 대사과정을 가지게 되며, 이때 삼탄당인산의 이동은 과당-1,6-이인산가수분해효소의 작용과 설탕인산 인산가수분해효소 (sucrose phosphate phosphatase)의 작용으로 분리된 무기인산 (P_i)이 엽록체 막의 무기인산 수송단백질의 작용으로 촉진되는 것으로 보고되어 있으며 (Taiz and Zeiger, 2002). 참외 유묘에서 인산의 공급제한이 세포질 내에서 설탕의 생성과정의 주요 효소인 설탕인산 생성효소와 과당-1,6-이인산가수분해효소의 활성도와와의 상관관계를 확인하기 위하여 이 두 효소의 활성도를 측정할 결과는 Fig. 7, 8과 같다. 인산영양을 제한할 경우 과당-1,6-이인산가수분해효소의 활성도는 처리 7일째에 급격하게 감소하여 인산의 영양이 설탕의 형성과 밀접한 영향이 있음을 시사하고 있으며 (Fig. 7A), 처리 14일째에도 비슷한

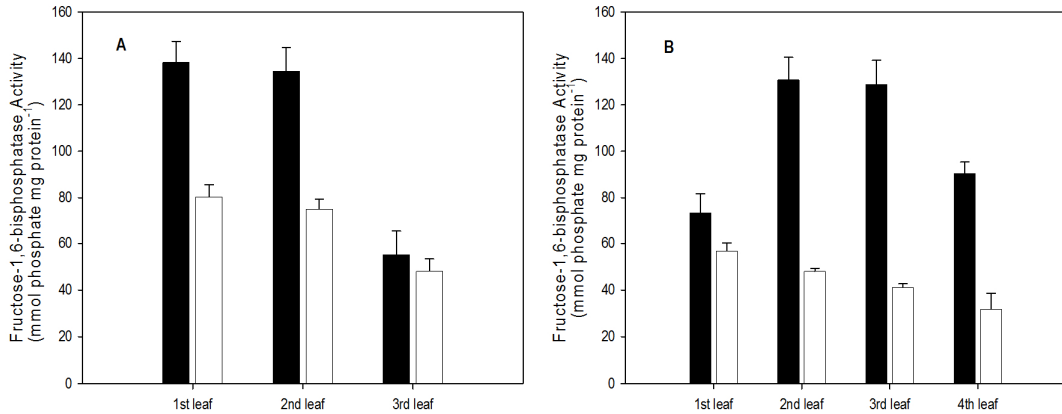


Fig. 7. Fructose-1,6-bisphosphatase activity of leaves of melon seedlings treated with phosphate starvation for 7days (A) and 14days (B). Potassium phosphate was replaced with potassium chloride [■: 1 mM KH₂PO₄ (+P); □: 0 mM KH₂PO₄ (-P)]. The vertical bars represent standard error (n=5).

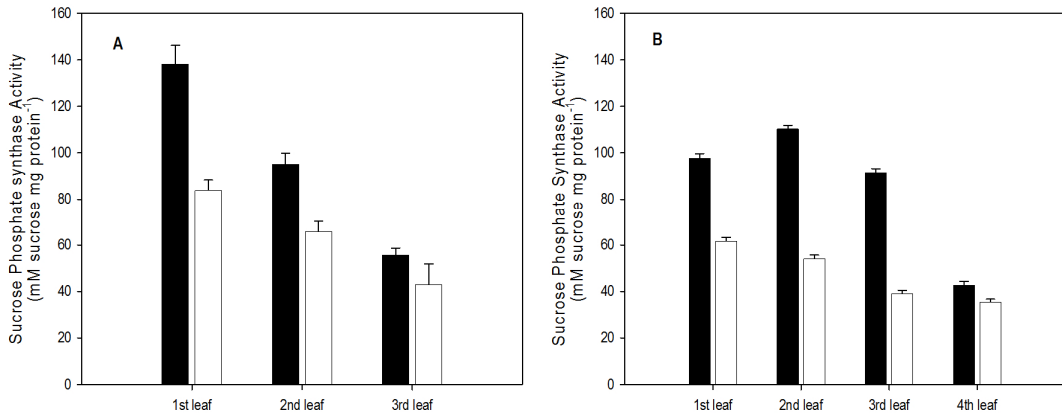


Fig. 8. Sucrose-phosphate synthase activity of leaves of melon seedlings subjected to phosphate starvation for 7days (A) and 14days (B). Potassium phosphate was replaced with potassium chloride [■: 1 mM KH₂PO₄ (+P); □: 0 mM KH₂PO₄ (-P)]. The vertical bars represent standard error (n=5).

경향을 나타내었고 제1엽에서는 큰 차이를 보이지 않지만 2엽과 3엽에서는 인산의 공급이 부족해지면 활성도에서 큰 차이를 보였다 (Fig. 7B). 설탕인산 생성효소의 활성도도 과당-1,6-이인산가수분해효소의 활성도 변화와 비슷한 결과 (Fig. 8)를 보여 참외유묘에서 인산의 공급이 부족해지면 대부분의 식물 중에서 설탕의 형태로 체관부를 이동하여 전체로 분배되는 탄수화물의 주요형태로서 캘빈회로의 중간물질인 삼탄당인산으로부터 합성되는 것으로 알려져 있다 (Beck and Ziegler, 1989). 설탕 생성과정에서 포도당-1-인산은 UDP-포도당으로 전환된 후 설탕-6-인산 생성효소와 설탕-6-인산 인산가수분해효소의 작용으로 설탕이 합성이 완료된다. 이 반응은 비가역적으로 일어나며 설탕-6-인산 인산가수분해효소의 작용이 설탕인산 생성효소의 반응을 이끄는 방향으로 일어난다. 외부에서 인산의 공급제한은 설탕의 생성 경로에서 주요효소인 과당-1,6이인산 가수분해효소와 설탕인산 생성효소의 활성도를 감소시켜 탄소의 분배에도 영향을 미치는 것으로 생각되며, 잎의 위치에 따라 활성도 변화가 달라지기도 하는 것으로 생각된다. 설탕과

녹말의 생성은 서로 경쟁하는 반응으로 무기인산과 삼탄당인산의 상대적인 농도는 고정된 탄소의 분배를 조절하는 주요 요인이다. 세포질내의 무기인산의 농도가 낮을 때에는 녹말의 합성을 촉진하고 세포질 내 무기인산의 농도가 높을 때에는 설탕의 합성이 촉진되는 대사과정을 가진다는 가설과 비슷한 결과를 보였다. 인산의 공급제한으로 세포질 내 무기인산의 농도가 낮아지면 세포질 내 설탕 생성의 주요효소인 과당-1,6이인산 가수분해효소와 설탕인산 생성효소의 활성도가 감소되어 설탕의 합성을 저해하고 탄소의 분배에도 영향을 미칠 것으로 추정된다 (Taiz and Zeiger, 2002).

질산 환원효소의 활성도 인산의 공급을 제한하였을 때 참외유묘의 지상부 내 질소분배와 연관된 효소인 질산 환원효소의 활성도 변화는 Fig. 9와 같다. 처리 7일째 유묘에서는 인산의 공급이 부족할 경우에 질산 환원효소의 활성도는 1엽과 2, 3엽에서 크게 차이를 보이지 않으나 (Fig. 9 A), 14일째 유묘의 경우에는 인산이 부족한 조건에서 질산 환원효소의 활성도가 1엽과 2, 3엽에서 크게 감소하는 경향

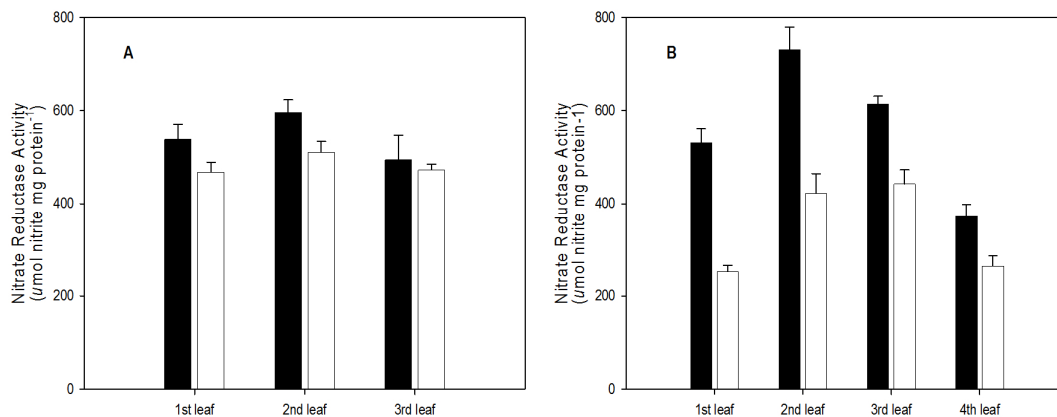


Fig. 9. Nitrate reductase activity of leaves of melon seedlings subjected to phosphate starvation for 7days (A) and 14days (B). Potassium phosphate was replaced with potassium chloride [■: 1 mM KH_2PO_4 (+P); □: 0 mM KH_2PO_4 (-P)]. The vertical bars represent standard error ($n=5$).

을 보였다 (Fig. 9B).

참외 유묘에서 인산의 공급 제한은 설탕인산 생성효소의 활성도 감소와 질산 환원효소의 활성도의 변화는 처리 7일째 유묘에서는 서로 다른 경향을 보이지만 처리 14일째 유묘에서는 동일한 경향으로 변화되는 결과를 보였다. 대부분의 식물에서 지상부와 지하부 내에서 질산태질소를 동화하는 효소의 작용이 일어나지만 뿌리보다는 지상부에서 더 효과적으로 환원된다. 그 이유는 식물의 종에 따라 광합성작용으로 생성된 환원제, 에너지, 탄소골격 등이 지상부에서 더 효과적이기 때문인 것으로 알려져 있다 (Solomon and Barber, 1990). 설탕생성 경로에서 중요한 효소인 설탕인산 생성효소와 질소동화에 주요 효소인 질산 환원효소는 엽육 세포의 세포질에 공존하는 효소로서 여러 가지 환경조건에 따라 이 설탕인산 생성효소와는 일정한 상관관계를 보이는 것으로 알려져 있다 (Huber et al., 1989; McMichael et al., 1995). 따라서 인산 영양은 식물체에서 탄소와 질소의 분배에 관여하는 효소의 활성에 영향을 미치며 참외 유묘에서 적절한 인산의 공급이 여러 가지 효소의 활성도에 미치는 영향이 매우 큰 것으로 판단되었다.

Conclusion

참외유묘에서 인산의 영양과 관련이 있는 몇 가지 효소의 활성도 변화를 측정하여 식물체 내 인산영양 상태를 판단할 수 있는지에 대한 기초자료를 얻기 위하여 수행한 연구결과는 다음과 같다. 인산의 공급을 제한할 경우 단백질의 함량과 엽록소의 함량은 상대적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 산성 인산가수분해효소의 활성도는 처리 14일째 참외유묘의 제 1엽과 2엽에서 상대적으로 높은 경향을 보이며 3엽과 4엽에서는 차이를 나타내지 않았다. 산성 인산가수분해효소의 활성밴드를 확인한 결과도 활성도 변화와 동일한 경향을 나타내었으나, 알칼리성 인산가수분해효

소의 활성도는 산성 인산가수분해효소의 활성도 변화와는 경향이 서로 다르게 나타나 인산의 재분배에는 산성 인산가수분해효소 활성과 더 관련이 많은 것으로 판단된다. 식물체 내 무기인산의 함량은 인산의 공급제한 시 상대적으로 함량이 낮은 경향을 보이며, 처리 시간이 진행되어도 어린 조직 내의 항상성이 유지되는 것을 알 수 있다. 인산의 공급 제한은 과당-1,6-이인산가수분해효소와 설탕인산 생성효소의 활성도 변화가 상당히 비슷한 경향을 보이며, 인산의 공급을 제한할 경우 처리시간이 길어질수록 활성도가 점점 감소하는 경향을 나타내므로 처리 14일째 2엽과 3엽에서의 활성도 변화를 이용하여 인산의 영양상태를 판단할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 질산 환원효소의 활성도 변화가 처리 14일째 1엽과 2엽에서 크게 나타나므로 인산의 영양상태와 연관성이 있는 것으로 판단되었다.

References

- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- Ascencio, J. 1997. Root secreted acid phosphatase kinetics as a physiological marker for phosphorus deficiency. *J Plant Nutr.* 20:9-26.
- Bariola, P.A., C.J. Howard, C.B. Taylor, M.T. Verburg, V.D. Jaglan, and P.J. Green. 1994. The Arabidopsis ribonuclease gene RNA1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J.* 6:673-685.
- Barrette-Lennard, E.G., A.D. Robson, and H. Greenway. 1982. Effect of phosphorus deficiency and water deficit on phosphatase activities from wheat leaves. *J. Exp. Bot.* 33:682-693.
- Beck, E. and P. Ziegler. 1989. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:95-118.
- Bozzo, G.G., K.G. Raghothama, and W.C. Plaxton. 2004.

- Structural and kinetic properties of a novel purple acid phosphatase from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell culture. *Biochem. J* 377:419-428.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Drueckes, P., R. Schinzel, and D. Palm. 1995. Photometric microtiter assay of inorganic phosphate in the presence of acid-labile organic phosphate. *Anal. Biochem.* 230:173-177.
- Duff, S.M.G., G. Sarah, and W.C. Plaxton. 1994. The roles of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Plant* 90:791-800.
- Duff, S.M.G., D.D. Lefebvre and W.C. Plaxton. 1991. Phosphate starvation response in plant cells: *De novo* synthesis and degradation of acid phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9538-9542.
- Epstein, E., and A.J. Bloom. 2005. Ecology and Environmental Stress. p. 328-330. *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspective*, 2nd edition, Sinauer Associate, MA, USA.
- Granjeiro, P.A., C.V. Verissima, J.M. Granjeiro, E.M. Taga, and H. Aoyama. 1999. Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups. *Physiol. Plant* 107:151-158.
- Huber, J.L.A., Huber, S.C., and T.H. Nielsen. 1989. Protein phosphorylation as a mechanism for regulation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase activity. *Arch Biochem. Biophys.* 270:681-690
- Jeschke, W.D., E.A. Kirkby, A.D. Peuke, J.S. Pate, and W. Hartung. 1997. Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). *J. Exp. Bot.* 48:75-91.
- Kerr, P.S., S.C. Huber, and D.W. Israel. 1984. Effect of N-source on soybean leaf sucrose phosphate synthase, starch formation and whole plant growth. *Plant Physiol.* 75:483-488.
- Lefebvre, D.D., S.M.G. Duff, C.A. Fife, C. Julien-Inalsingh, and W.C. Plaxton. 1990. response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol.* 93:504-511.
- Li, D., H. Zhu, K. Liu, X. Liu, G. Leggewie, M. Udvardi, and D. Wang. 2002. Purple acid phosphatase of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277:2772-27781.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigment of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymol.* 140:350-382.
- Lin, W-Y., S. Lin, and T-J. Chiou. 2009. Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants. *J. Exp. Bot.* 60: 1427-1438.
- Liu, C., U.S. Muchhal, M. Uthappa, A.K. Kononowicz, and K.G. Raghothama. 1998. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol.* 116:91-99.
- McMichael, R.W., Bachmann, M., and S.C. Huber. 1995. Spinach leaf sucrose -phosphate synthase and nitrate reductase are phosphorylated/inactivated by multiple protein kinase in vitro. *Plant Physiol.* 108:1077-1082.
- Miller, S.S., J. Liu, D.L. Allan, C.J. Menzhuber, M. Fedorova, and C.P. Vance. 2001. Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. *Plant Physiol.* 127:594-606.
- Muchhal, U.S., J.M. Pardo, and K.G. Raghothama. 1996. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10519-10523.
- NIAST. 1988. *Methods of soil chemical analysis*. National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, Korea.
- Pan, S. (1987) Characterization of multiple acid phosphatases in salt stressed spinach leaves. *Aust. J Plant Physiol.* 14:117-124.
- Robinson, W.D., J. Park, H.T. Tran, H.A. Del Vecchio, S. Ying, J.L. Zins, K. Patel, T.D. McKnight, and W.C. Plaxton. 2012. The secreted purple acid phosphatase isozymes *AtPAP12* and *AtPAP26* play a pivotal role in extracellular phosphate scavenging by *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 63:6531-6542.
- Rufty, T.W., P.S. Kerr, and S.C. Huber. 1983. Characterization of diurnal changes in activities of enzymes involved in sucrose biosynthesis. *Plant Physiol.* 73:428-433.
- Solomon, L.P., and M.J. Barber. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 41:224-253.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2002. *Photosynthesis: carbon reaction*. In: *Plant Physiology*, 3rd edition, Sinauer Associates, Massachusetts, p. 145-170.
- Trull, M.C., M.J. Guitman, J.P. Lynch, and J. Deikman. 1997. The response wild type and ABA-mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus deficiency. *Plant Cell Environ.* 20:85-92.