

봄무우 유식물의 자엽과 하배축에서 저온처리동안 Polyamine 농도 변화의 분석

이성창 · 박재원 · 조봉희

수원대학교 자연과학대학 생명과학부

(1998. 6. 11 접수)

Analysis of the Change of Polyamine during the Cold Treatment in Spring Radish Young Cotyledons and Hypocotyls

Sung Chang Lee, Jae Won Park and Bong-Heuy Cho

Division of Life Science, University of Suwon, Suwon 445-741, Korea

(Received June 11, 1998)

요약: 봄무우 유식물의 자엽과 하배축에서 저온처리동안 변화하는 polyamine(PA)의 농도를 분석하고, PA이 저온 스트레스와 관련이 있는지를 분석하였다. 자엽에서 저온 스트레스동안 putrescine(PUT)의 농도가 증가되었고, 전반적으로 PUT와 spermidine(SPD) 농도의 변화가 심하였다. 따라서 PUT와 SPD는 저온 스트레스의 조건하에서 합성되거나 또는 유리된 것이다. 그러나 spermine(SPM)의 농도에는 거의 변화가 없었다. 하배축의 대조구에는 SPD만이 존재하고, 저온 스트레스를 주면, 유리된 PA의 농도가 증가되었고, 지속된 저온 스트레스동안 PA의 농도가 급속히 감소되었다. 하배축은 일반적으로 저온처리에 매우 예민성을 나타내는 것으로보아, 자엽과 비교해서 세포내에 PA의 농도가 낮기 때문인 것으로 판단된다. 자엽에서 PUT과 SPD가 저온 스트레스의 저항력에 관여하고, 하배축에서는 PA이 저온 스트레스에 대한 저항력의 증대와 아무 관련이 없는 것으로 사료된다. 이상에 결과로 PUT와 SPD는 저온 스트레스에 대항하여 저항력을 증대시키는 것으로 판단된다.

Abstract: The concentration of polyamine and the relationship between the concentration of PA and cold resistance were analysed during the cold stress in the cotyledons and hypocotyls of young spring radishes. The concentration of PUT was increased during the cold stress in the cotyledons and the concentration of PUT and SPD was changed significantly all the stress time. From the results, we suggested that PUT and SPD were synthesized against cold stress or separated from the bound PA during the cold stress. But, the concentration of SPM was not significantly changed during the cold stress. Only SPD existed in the control hypocotyls. The concentration of SPD was increased during the cold stress, but was decreased dramatically during continuously cold stress. The reactivity against stress of hypocotyls was generally more sensitive during the cold treatment than that of the cotyledons because of the lower concentration of PA in the hypocotyls. PUT and SPD were responsible for the resistance of cold stress in the cotyledons and PA did not play an important role on the resistance of cold stress in the hypocotyls. In this study we suggest that PUT and SPD were responsible for the increase of the resistance against the cold stress.

Key words : cold treatment, polyamine, cotyledon, hypocotyl

1. 서 론

Polyamine(PA)은 생체내에서 두가지 형태로 존재한다. 분자량이 작은 수용성의 유리상태로 존재하는 PA와 고분자화합물의 결합된 상태로 존재하는 PA이 있다.¹ 생체내에서 결합된 상태로 존재하는 PA은 주로 hydroxycinnamic acid, 단백질, 핵산 또는 다른 고분자의 화합물과 결합된 상태로 존재한다.^{2,3} PA은 생리적인 pH영역에서 polycation의 성격을 지니며, polyanion인 DNA, RNA, 또는 phospholipid, polyphosphate, polysulfate들과 결합될 수 있는 특성을 지니고 있다.⁴

식물에서 스트레스에 관여하는 PA은 arginine decarboxylase(ADC)에 의하여 합성된다.⁵ ADC를 경유해서 합성되는 PA은 식물의 재분화, 스트레스 등에 관여하며,⁶⁻⁷ 세포질에 존재한다.⁸ 식물에서 PA은 염류체, 미토콘드리아, 핵에는 극히 미량으로 존재한다.⁶ 그러므로 스트레스에 관여하는 PA은 세포질에서 유리 상태로 존재하고, 생체를 스트레스에 의한 피해로부터 보호하는 것으로 판단된다.

식물에서 PA과 관련된 연구결과가 있지만, 주로 식물의 분화와 발생에 대한 연구가 주종을 이루고, 스트레스와 관련된 PA의 연구결과는 비교적 적은 편이다. 식물이 스트레스를 받으면, PA은 생체내에서 합성되어 축적된다.⁹ 특히 식물이 곰팡이의 침입을 받게되면, 식물의 노화현상이 촉진되고,¹⁰ 이 때 생체내에는 결합된 형태의 PA의 농도가 급속히 감소되고, 유리상태의 PA의 농도가 증가되어 식물의 노화현상을 자연시켰다. 또 생체내에서 PA은 저온 스트레스에 의해서도 합성되어 축적된다.¹¹ 그러나 저온 스트레스에 의하여 생체내에 PA이 어떻게 변화되는지에 대하여는 잘 알려져 있지 않았다. PA중에 하나인 Putrescine(PUT)은 스트레스에 대한 피해로부터 생체를 보호한다고 보고되었다.¹² 특히 삼투 스트레스를 받은 식물에서 PUT의 농도는 감소되는 반면, spermine(SPM)과 spermidine(SPД)의 농도는 증가되었고,¹³ 고염분의 스트레스에서도 PUT의 농도는 감소되었다.¹⁴ 그러나 반대 의견은 PUT는 염분 스트레스, K⁺의 고갈, 및 삼투적인 스트레스에 의하여 증가되고, 스트레스동안 세포막과 핵막을 보호한다고 보고되었다.¹⁵⁻¹⁶ 그리고 이 저자들은 스트레스로 유도된 PA은 이온의 평형을 유지시키는데 기여하고, 세포내에서는

pH의 지속적인 유지에도 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 오이에서는 SPM과 SPD는 저온의 피해로부터 식물을 보호하는 것과 밀접한 관계가 있다.¹⁷ 따라서 위에 연구결과에서 보여주는 것처럼 식물에서 PA은 스트레스와 관여하지만, 식물에 따라서 결과가 다름을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서는 무우의 어린 자엽과 하배축을 사용하여 저온 스트레스동안 관여하는 PA을 분석하여 저온스트레스에 어떤 영향을 주는지를 분석하고자 한다.

2. 실험방법

2.1. 기기 및 시약

분석에서 사용한 기기는 cold microcentrifuge(VS-1500 CF, Vision Scientific Co. Ltd.), cold Lab chamber(KMC-12021, Vision Scientific Co. Lab.), HPLC(waters, 600series)를 사용하였다. 분석에 사용한 모든 시약은 Sigma Co.(USA)를 사용하였다.

2.2. 실험재료 및 발아조건

실험재료로 사용한 장춘 대형 봄무우 씨(F1 Spring White)는 서울 종묘에서 구입하였다. 종자에 붙어 있는 불순물을 제거하기 위해 무우 종자를 2% NaOCl에서 10분간 소독한 후 흐르는 물에서 하룻밤 셧었다. 소독된 종자는 비커에 스푼지를 이중으로 깔고 그 위에 여과지를 깐 후 소독된 종자를 여과지 위에 놓아 물을 뺏아 들일 수 있게 하였고, 심은 후 27 °C 암소에서 3일간 발아시켰다. 물은 매일 일정량을 규칙적으로 주었고, 습기를 일정하게 유지시켜 주어 발아조건을 균일하게 하였다.

2.3. 저온의 처리

암소에서 발아된 어린 쌈은 40 °C 암소조건인 cold chamber안에서 분석될 때까지 유지하였다. 저온처리 동안 일정량의 물을 매일 주었고, 저온처리된 시료에서 배젖을 제거하였고, 자엽과 배축을 분리하였다. 각 부위는 0.25 mg^o 되게 무게를 단 후 PA의 분석을 위해 사용되었다.

2.4. Polyamine의 분석

시료는 분리 즉시 액체질소에 담근 후 즉시 막자사

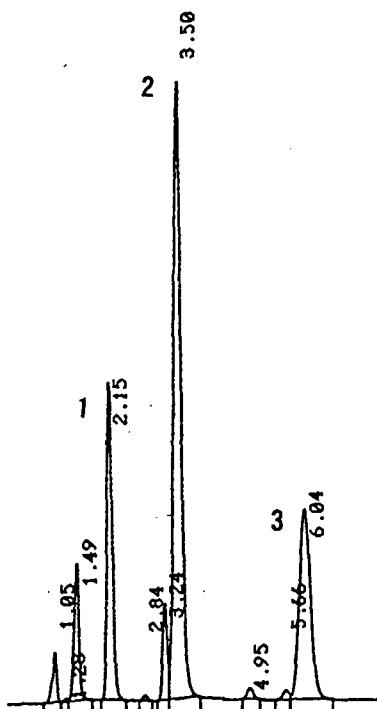


Fig. 1. Chromatogram of standard, putrescine (1), spermidine (2), spermine (3).

발에서 분쇄하였다. 10mM 인산완충용액(pH 6.0) 1 mL를 넣고 40 °C에서 계속 분쇄하였다. 분쇄된 시료는 12,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 침전물을 제거하였다. 침전물에 다시 1 mL의 완충액을 넣고 위에 과정을 반복하여 두 상층액을 합하였다. HPLC에서 PA를 측정하기 위한 처리로 60% 메탄을 사용하였으며, column은 C18-Nova-Pak을 사용하였고, 전처리한 시료를 column이 안정된 후 245nm, 46 °C에서 정량하였다. 표준 PA는 PUT, SPD와 SPM의 각 농도를 기준으로하여 분석하고자 하는 시료를 사용하여 나타난 PA의 자료를 농도로 환산하였다 (Fig. 1). 표준 PA와 분석시료의 분석은 3회이상 반복하였다. 분석시료의 표준편차는 ±2.5 nmol로 안정된 측정치를 얻을 수 있어서 유효성이 높았고, 회수율은 99%이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 저온처리동안 자엽에서 polyamine 농도의 변화

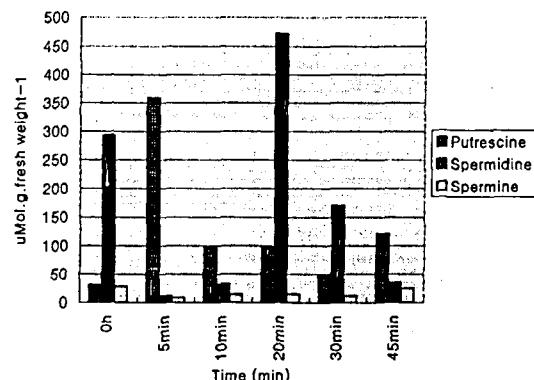


Fig. 2. Change of polyamine content during the cold treatment at 4 °C within 1 hour in the cotyledon of spring radish.

그 동안의 연구보고에 의하면, 저온처리동안 PA중 SPD와 SPM의 농도가 증가되어 저온 스트레스와 밀접한 관계가 있다.^{12,17} 스트레스동안에 결합 PA은 감소되고, 유리 PA의 농도가 증가되어 스트레스로부터 오는 피해에서 생체를 보호하였다.¹¹ 본 연구에서는 우선 봄무우의 어린 쌈을 저온처리한 후 1시간안에 세포내에 존재하는 유리 PA의 변화를 보았다. 대조구자엽의 생체내에 존재하는 PA의 농도를 보면, SPD의 농도가 가장 높았다(Fig. 2). 저온처리후 5분안에 SPD의 농도는 급속히 감소되었고, 그 후 PUT의 농도가 증가되었다. 20분 후에는 SPD의 농도가 급속히 증가되었다가 다시 감소되었고, SPM의 농도에는 큰 변화를 주지 못하여 봄무우에서 SPM은 저온 스트레스와는 큰 관계가 없는 것으로 보인다. 그러나 PUT와 SPD의 농도변화는 저온 스트레스와 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다. PUT와 SPD의 농도의 변화는 스트레스동안 PUT에서 SPD가 합성되므로, 이 합성관계는 스트레스의 처리와 세포상태에 따라서 달라 것이다. 저온처리를 3일동안 계속할 경우 PA의 농도에 어떤 변화를 주는지를 보았다(Fig. 3). 장시간동안 저온처리를 하면, PUT의 농도가 대조구보다 증가되고, SPD의 농도는 약간 감소되었다. 그러나 SPM의 농도에는 중요한 변화가 없었다. 본 연구의 결과로 저온 스트레스동안 PA이 합성되는 것인지¹² 또는 결합 PA이 유리 PA으로 전환되는 것인지는¹¹ 정확히 단행 수 없다. 그러나 저온 스트레스와 PA은 중요한 관계에 있으며, 저온 스트레스로부터 생체를 보호하는 것과 관계가 있을 것으로 판단된다.

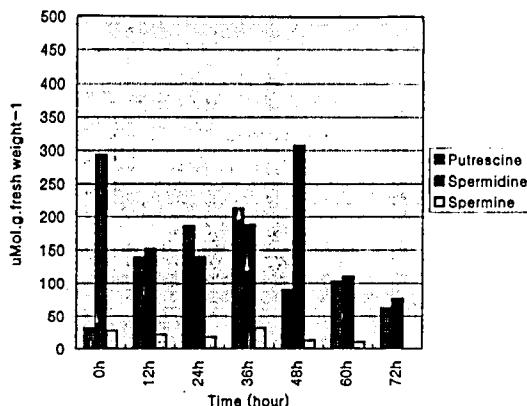


Fig. 3. Change of polyamine content during the cold treatment at 4°C within 3 days in the cotyledon of spring radish.

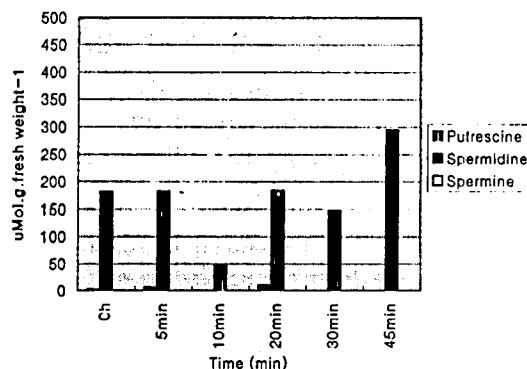


Fig. 4. Change of polyamine content during the cold treatment at 4°C within 1 hour in the hypocotyl of spring radish.

3.2. 저온처리동안 하배축에서 polyamine 농도의 변화

하배축의 대조구(저온처리 하지않은 시료)에 존재하는 PA는 SPD가 높았고, 다른 PA의 농도는 매우 적었다. 저온 스트레스를 주면, 45분까지는 PA의 농도에 변화가 있었고, SPD의 농도가 증가되었으나(Fig. 4), 장시간 저온 스트레스를 주면, SPD의 농도도 급속히 감소되었다(Fig. 5). 봄무우의 자엽은 저온처리하면 하배축보다는 저항력이 강하다. 하배축은 저온처리로 피해를 쉽게 입게 되는데, 그 이유는 생체내에 PA의 농도가 매우 낮기 때문일 것으로 판단된다. 대조구 하배축의 존재하는 총 PA의 농도가 자엽에 존재하는 PA의 농도보다는 낮다. 하배축에서 저온 스트레스때 PA의 농도가 감소하면 저온에 대항할 수 없음을 보여주고 있다.

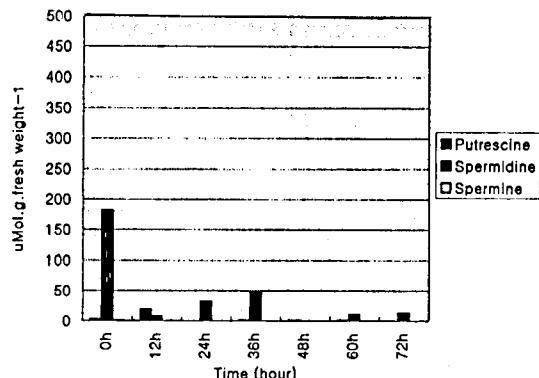


Fig. 5. Change of polyamine content during the cold treatment at 4°C within 3 days in the hypocotyl of spring radish.

3.3. 저온처리에서 자엽과 하배축에서 저온 저항력의 분석

자엽에서 PUT와 SPD의 농도가 저온 스트레스와 밀접한 관계가 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 2, Fig. 3). 저온처리한 자엽을 실온으로 처리하여 PA의 농도를 분석하였고, 다시 저온처리를 하여 자엽이 저온 스트레스에 저항력을 가지는지를 분석하였다(Fig. 6). 3일 동안 자엽을 저온처리한 후 실온에다 자엽을 두면, 갑자기 PUT와 SPD의 농도가 감소되었다. 실온으로 옮긴 후 PUT의 농도는 갑자기 감소되었다가 다시 증가되었다. SPD의 농도에는 주기적인 변화를 주었고, SPM의 농도에는 중요한 변화가 없었다. 자엽을 실온처리 후 다시 저온처리하면, PUT의 농도가 조금 감소된 것을 보였다. 이 결과는 처음 저온 스트레스에서 저항력을 가져서 제 2차로 저온 스트레스를 주면,

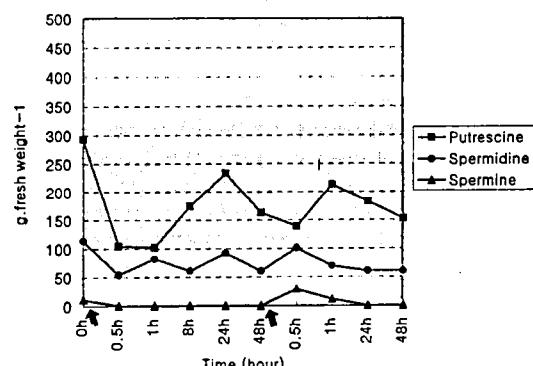


Fig. 6. Change of polyamine content during 4°C → 27°C → 4°C treatment 4 days in the cotyledon of spring radish.

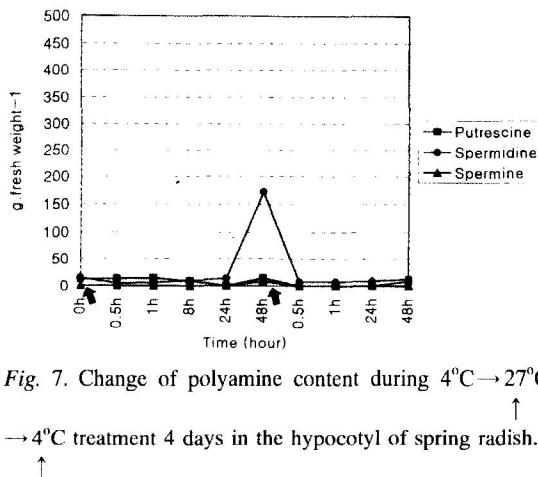


Fig. 7. Change of polyamine content during $4^{\circ}\text{C} \rightarrow 27^{\circ}\text{C}$
 \uparrow
 $\rightarrow 4^{\circ}\text{C}$ treatment 4 days in the hypocotyl of spring radish.
 \uparrow

처음 저온처리때 보다 PA의 농도에 변화를 주지 않아, 저온 스트레스에 대항하는 능력이 증가된 것으로 판단된다. 그러나 하배축에서는 저온처리 후 실온으로 처리하고, 다시 저온 처리하여도 생체내에 존재하는 모든 PA의 농도에는 변화를 거의 주지 않았다(Fig. 7). 그러므로 하배축에서 PA은 저온 스트레스의 저항력 증대에 큰 역할을 하지 못하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 학술진흥재단 기초과학연구소 학술연구비 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- J. Martin-Tanguy, *Plant Growth Regul.*, **31**, 381 (1955).
- D. Burtin, T. Martin-Tanguy, M. Paynat and N. Rossini, *Plant Physiol.*, **89**, 104 (1989).
- N. Bagini, M. M. Altamura, S. Biondi, M. Mengoli and P. Torrigiani, *Plant Mol. Approach. Pleum Press, New York*, (1991).
- D. Berafini-Fracassini, P. Torrigiani and C. Branca, *Physiol. Plant.*, **60**, 351 (1984).
- T. A. C. Smith, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **36**, 117 (1985).
- C. A. Robie and S. C. Minocha, *Plant Sci.*, **65**, 45 (1989).
- A. W. Galston and R. Kaur-Sawhney, *Plant. Physiol.*, **94**, 406 (1990).
- A. T. Greenland and D. M. Lewis, *New Phytol.*, **96**, 283 (1984).
- D. D. Songstad, D. R. Duncan and J. M. Widholm, *J. Exp. Bot.*, **41**, 289 (1990).
- A. Hiatt and R. L. Malmberg, *Plant Physiol.*, **861**, 441 (1988).
- R. Raggiani, P. Ginsseni and A. Bertanie, *Plant Cell Physiol.*, **31**, 489 (1990).
- A. E. Tiburcio, M. A. Masdeu, F. M. Dumortier and A. W. Galston, *Plant Physiol.*, **82**, 369 (1986).
- A. Altman, *Physiol. Plant.*, **54**, 189 (1982).
- G. F. Kramer and C. Y. Wang, *Physiol. Plant.*, **76**, 479 (1989).