

## 닭의장풀에 Cd<sup>2+</sup> 처리 시 Cd<sup>2+</sup> 흡수와 nonprotein-SH 합성에 미치는 살리실릭산의 영향

이 준 상

상지대학교 생명과학과

### The Effect of Salicylic Acid on the Accumulation of Cd<sup>2+</sup> and Nonprotein-SH Synthesis in Roots and Epidermal Strips of *Commelina Communis* L.

Joon Sang Lee

Department of Life Science, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

**Abstract** - Three weeks old *Commelina* was cultivated in Hoagland solution with or without 100 μM Cd<sup>2+</sup> and with 100 μM Cd<sup>2+</sup> + 100 μM SA for 4 days. The contents of Cd<sup>2+</sup> and nonprotein-SH synthesis in roots and isolated epidermal strips were measured. In the treatment of Cd<sup>2+</sup>, the concentration of Cd<sup>2+</sup> was 98 μM Cd<sup>2+</sup>/g.fr.wt and it was 6 times higher than that of control. Cd<sup>2+</sup>+SA increased 1.2 times higher concentration of Cd<sup>2+</sup> than that of the treatment of Cd<sup>2+</sup> alone. In the treatment of Cd<sup>2+</sup>, nonprotein-SH also increased 2 times higher than that of the control. Cd<sup>2+</sup>+SA increased 2 times higher concentration of nonprotein-SH than that of the treatment of Cd<sup>2+</sup> as well. In case of isolated epidermal strips, the response was similar with the roots. Therefore, it suggest that the effect of salicylic acid on the accumulation of Cd<sup>2+</sup> and nonprotein-SH synthesis in roots and isolated epidermal strips was related with an increase of the membrane permeability by SA and that SA may be positively involved in the process of nonprotein-SH synthesis.

**Key words** : Cadmium, *Commelina communis* L, nonprotein-SH, salicylic acid

## 서 론

빛에너지를 이용하여 무기물인 이산화탄소와 물을 슈크로스라는 화학에너지로 합성하는 1차 생산자인 식물이나 조류는 그들을 둘러싸고 있는 환경이나 생명체로부터 끊임없이 필수 원소인 구리, 아연, 철, 마그네슘 등을 흡수한다. 식물이나 조류들은 이들 필수원소나 필수

원소가 아닌 중금속을 그들이 서식하는 환경에 따라 적절한 농도를, 때로는 치명적인 농도를 함유한다. 따라서, 환경의 변화에 따라 식물이나 조류들이 함유하는 중금속 농도는 끊임없이 변한다. 따라서, 식물이나 조류는 첫째, 필수원소의 경우 결핍과 유독한 농도 사이를 유지시킬 수 있는, 둘째, 유해한 중금속의 경우 유독한 농도 이하로 유지시키는 메커니즘이 필요하다. 다행히도 식물, 조류 외에도 동물, 곰팡이, 대장균 등을 포함한 모든 생물은 중금속을 격리시킬 수 있는 metallothioneins (MTs)로 알려진 단백질과 펩티드를 함유하고 있으며 이

\* Corresponding author: Joon Sang Lee, Tel. 033-730-0436, Fax. 033-730-0430, E-mail. jslee@mail.sangji.ac.kr

들에 의해 세포 내의 중금속 항상성이 유지되고 해독작용이 일어난다 (Rauser 1990). MTs는 1957년 콩팥에서 처음으로 발견된 이후, 식물, 조류, 곰팡이 등도 초기 포유류에서 발견된 MTs와 유사한 구조로 대부분의 중금속과 결합하는 펩티드가 있다는 사실이 널리 밝혀지게 되었다 (Rauser 1990). 식물에서 MTs에 대한 연구는 90년대 이후 활성화되기 시작되었다. 초기에는 분자량이 9,000인 60개의 아미노산으로 구성된 단백질에서 20개의 시스테인이 분포된 MTs가 그 기본 구조로 알려졌다 (Robinson *et al.* 1993).

살리실릭산(SA)은 개화, 종자 발아, 기공 개폐 등 다양한 식물 반응에 영향을 주는 것으로 알려진 자연적으로 합성되는 페놀성 화합물이다 (Malamy and Klessig 1992). SA에 의한 신호전달 기작이 Jones (1994)에 의해 발표되었다. SA는 카탈라아제 활성을 억제한다. 즉, 카탈라아제가  $H_2O_2$ 를  $H_2O$ 와  $O_2$ 로 분해하는 기능을 차단하여 세포 내 반응성이 높은  $H_2O_2$ 의 농도를 증가시킨다. 증가된  $H_2O_2$ 는 효소 합성의 유전 정보를 가지고 있는 유전자의 promoter를 활성화한다. SA는 병원균의 침입을 감지하여 이에 대한 신호를 전달하여 내성을 갖도록 유도하는 물질이다.

따라서, 본 실험은 식물이 카드뮴 및 SA에 노출시, 뿌리와 분리 표피 등 식물이 카드뮴과 접촉하는 부위와 그리고 카드뮴과 가장 원접한 분리 표피에서의 카드뮴 농도와 MTs인 nonprotein-SH 합성을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물재료

닭의장풀(*Commelina communis* L.) 종자를 질석, 토탄 그리고 양토 혼합물에 심어, 14시간의 명기와 10시간의 암기, 20°C의 온도와  $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (metal halide lamp)의 광도 하에서 재배하였다. 일주일에 한 번 주기로 복합비료(원더그로 2호)를 1g/L의 농도로 주었으며, 발아 후 3주 동안 자란 식물을 실험에 사용하였다.

### 2. 뿌리 및 분리 표피에 축적된 $Cd^{2+}$ 농도 측정

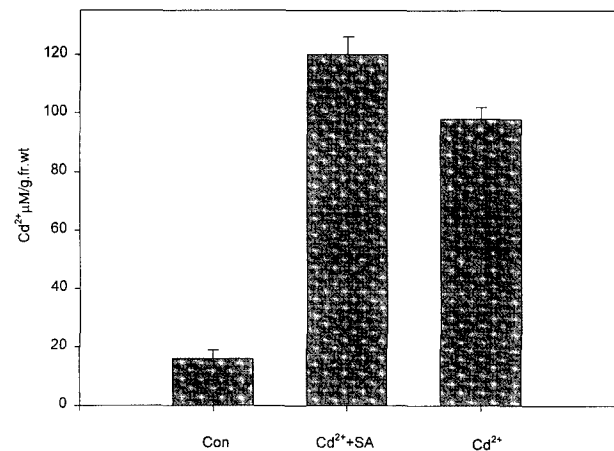
3주간 정상적으로 성장한 닭의장풀을 Hoagland 용액 ( $\pm 100 \mu\text{M}$  cadmium chloride 1-hydrate,  $100 \mu\text{M}$   $Cd^{2+}$  +  $100 \mu\text{M}$  SA)에서 3일간 수경 재배하였다.  $Cd^{2+}$  농도는 원자흡광광도기 (5,100 PC, Perkin Elmer)를 통해 측정하였다.

### 3. 뿌리 및 분리 표피에서의 nonprotein-SH의 정량

3주간 정상적으로 성장한 닭의장풀을 Hoagland 용액 ( $\pm 100 \mu\text{M}$  cadmium chloride 1-hydrate,  $100 \mu\text{M}$   $Cd^{2+}$  +  $100 \mu\text{M}$  SA)에서 3일간 수경 재배한 후 측정하였다. 뿌리 및 분리표피를 5% (W/V) sulfosalicylic acid에 6.3 mM diethylene triaminepenta acetic acid (pH < 1)에 적당량 넣고 얼음 위의 막자 사발로 갈았다. 마쇄액을 20분 동안 15,000 g (40°C)로 원심 분리한 후 상등액 (supernatants)은 thiols와  $Cd^{2+}$  분석을 위해 사용하였다. 약 300  $\mu\text{l}$ 의 상등액을 0.5M  $K_2HPO_4$  630  $\mu\text{l}$ 와 20  $\mu\text{l}$ 의 10 mM 5-dithiosbis (2-nitrobenzoic acid)으로 pH 7.0로 맞추어 2분 후에 412 nm에서 흡광도를 측정하였다 ( $\epsilon_{412} = 13,600$ ). Sulfosalicylic acid의 추출물에 있는  $Cd^{2+}$ 은 Ion Chromatography (DX-120, Dionex)로 정량하였다.

## 결과 및 고찰

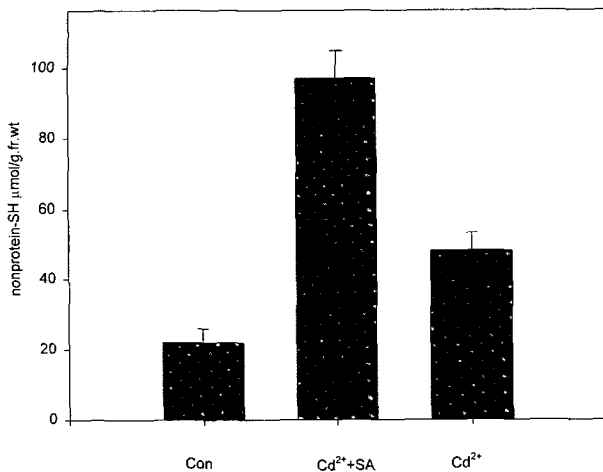
3주간 정상적으로 성장한 닭의장풀을 Hoagland 용액 ( $\pm 100 \mu\text{M}$  cadmium chloride 1-hydrate,  $100 \mu\text{M}$   $Cd^{2+}$  +  $100 \mu\text{M}$  SA)에서 3일간 수경 재배한 후 뿌리에서의  $Cd^{2+}$  농도를 측정하였다 (Fig. 1). 대조구에서  $Cd^{2+}$  농도가 높게 측정된 것은 의외였다. Hoagland 용액은  $Cd^{2+}$ -free인데, 뿌리에서 검출되었다는 것은 Hoagland 용액에서 수경재배 하기 전 3주간 질석(蛭石), 토탄 그리고 양토 혼합물, 복합비료(원더그로 2호)에서 재배 동안 오염된 것으로 추측할 수 있다. 또는 공기 및 실험 조건에서 다른 오염원으로부터 비롯된 것으로 볼 수도 있



**Fig. 1.** The effect of salicylic acid on the accumulation of  $Cd^{2+}$  in roots of *Commelina communis* L. Each value represents the mean ( $\pm$  s.e.m.) of 2 measurements.

다. 그러나,  $Cd^{2+}$  처리구에서는  $98 \mu M/g.fr.wt$ 이 검출되었다. 이는 대조구에 비해 약 6배나 증가한 것이다. 실제 뿌리는 약 4주 가량 자란 닭의장풀에서 차지하는 생중량은 개별 종마다 차이가 있지만 개개의 잎에 비해 무거우며, 그 무게에 비해 축적된  $Cd^{2+}$  농도는 잎에 비해 매우 낮은 농도가 축적하였다(Lee 2000). 실제로 전체 뿌리에 축적된  $Cd^{2+}$  농도가  $6.68 mg/kg.fr.wt$ 이었으나, 뿌리 바로 잎 하나의  $Cd^{2+}$  농도는  $15.63 mg/kg.fr.wt$ 이었다. 이는 뿌리로부터  $Cd^{2+}$ 이 흡수되지만, 뿌리는 저장보다는  $Cd^{2+}$ 의 수송과 분포의 통로로 추측된다.  $Cd^{2+}$ 을 SA와 같이 처리한 경우  $Cd^{2+}$ 만 처리한 경우보다 뿌리에서의  $Cd^{2+}$  농도는  $120 \mu M/g.fr.wt$ 로 약 1.2배 증가하였다. Jones (1994)는 SA가 카탈라아제 활성을 억제한다고 보고하였다. 카탈라아제 활성 억제는 세포 내  $H_2O_2$  농도를 증가시킨다.  $H_2O_2$  농도 증가는 막 투과성에 영향을 주며, 이온 수송을 촉진시키는 것으로 보고되었다(Lee 1988). 따라서, SA 처리는 막 투과성에 영향을 주어  $Cd^{2+}$  흡수를 촉진시킨 것으로 사료된다.

또한  $Cd^{2+}$  흡수와 더불어 SA자체도 흡수된 것으로 추측된다. SA에 의한 신호전달과정을 살펴보면, SA에 의해 증가된  $H_2O_2$ 는 효소 합성의 유전 정보를 가지고 있는 유전자의 promoter를 활성화한다(Malamy and Klessig 1992). SA는 병원균의 침입을 감지하여 이에 대한 신호를 전달하여 내성을 갖도록 유도하는 물질이다. 따라서, SA가  $Cd^{2+}$ 에 의한 PCs 합성에 주는 영향을 보기 위하여, 3주간 정상적으로 성장한 닭의장풀을 Hoagland 용액( $\pm 100 \mu M$  cadmium chloride 1-hydrate,  $100 \mu M Cd^{2+} + 100 \mu M SA$ )에서 3일간 수경 재배한 후

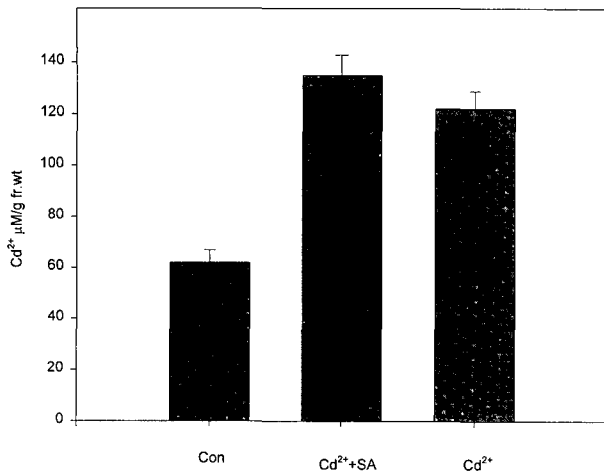


**Fig. 2.** The effect of salicylic acid on the nonprotein-SH synthesis by  $Cd^{2+}$  in roots of *Commelina communis* L. Each value represents the mean ( $\pm s.e.m.$ ) of 2 measurements.

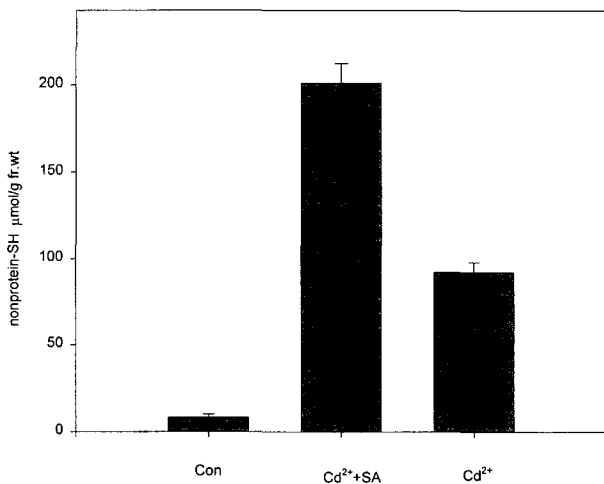
뿌리의 nonprotein-SH 함량을 측정하였다(Fig. 2). 대조구에서의 nonprotein-SH 농도는  $22 \mu mol/g.fr.wt$ 이었다. 이는 일반적인 식물에서도 PCs 계열의 펩티드가 존재한다는 것을 보여 주는 결과이다. 뿌리 대조구에서도  $16 \mu M/g.fr.wt$ 의  $Cd^{2+}$ 이 축적된 것과 관련이 있다고 볼 수 있으며, 또는  $Cd^{2+}$ 과 무관하게 nonprotein-SH가 존재할 수도 있는 것으로 사료된다. 그러나,  $Cd^{2+}$  처리는 nonprotein-SH 농도를 약 2배 이상 증가시켰다( $48 \mu mol/g.fr.wt$ ). 이 결과는  $Cd^{2+}$  처리는 nonprotein-SH 합성을 증가시킨다는 것을 보여준 것이다. 식물은  $Cd^{2+}$ 의 농도가 높을수록 식물체의 지상부, 지하부 및 전체 식물의 생산량 감소와 낙화가 촉진되었다(Page et al. 1972; Kim and Park 1992; Kim 1982). Kim (1992)은 사르비아, 맨드라미, 채송화, 들나물(*Sedum sarmentosum* Bunge)에서  $1 \mu g/l Cd^{2+}$ 에 의해서 전체적으로 약 67% 이상의 생장억제가 일어났음을 관찰하였다.  $Cd^{2+}$ 을 비롯한 다른 중금속 및 오존, 이산화황을 비롯한 환경오염원은 식물의 광합성 기작 및 생장을 억제하고 노화를 촉진하는 것이 공통적인 특성이다(Willmer 1983).

따라서, 본 결과에서도,  $Cd^{2+}$ 에 노출되었을 때는 식물이 이에 대한 독성을 줄이기 위해 PCs를 합성하는 것으로 볼 수 있다.  $Cd^{2+}$ 을 SA와 같이 처리한 경우  $Cd^{2+}$ 만 처리한 경우보다 뿌리에서의 nonprotein-SH 농도는  $97 \mu mol/g.fr.wt$ 로 약 2배 증가하였다. 이는 결국 SA가 PCs 합성 과정의 신호전달과정에 영향을 주는 것으로 추측할 수 있다.

광합성과 증산 작용이라는 식물 생리의 가장 중심적인 역할을 맡고 있는 분리표피의 기공에 어떠한 영향을 줄 수 있을지 조사하기 위해 분리표피에서의  $Cd^{2+}$ 과 nonprotein-SH 함량을 측정하였다(Figs. 3, 4). 분리표피에서의  $Cd^{2+}$  농도가 뿌리 보다 더 높게 측정되었다. 이는 단위인 g.fr.wt에서의 비교이지만,  $Cd^{2+}$ 이 기공개폐에 간접적으로 영향을 줄 수 있다는 것을 의미한다고 보여진다. 실제로, 잎에서의  $Cd^{2+}$  축적은 위에서 언급하였듯이 뿌리에 비해 훨씬 높다(Lee 2000). 더불어서, 잎 중에서 분리표피에서의  $Cd^{2+}$  축적 결과는 이외였다. 결과는 뿌리와 비슷하지만 단위 당 축적된  $Cd^{2+}$  농도는 조금 높았다. 이는 Lee (2000)에서 뿌리에 비해 잎이 주된 축적 장소인 것으로 볼 때  $Cd^{2+}$ 은 주로 잎에 축적되지만, 아울러 분리표피도  $Cd^{2+}$  축적 장소라는 것은 생리적 의미가 크다고 볼 수 있다. Nonprotein-SH 합성도 뿌리와 비슷하게  $Cd^{2+}$  농도에 의존하며 증가되었다. SA는 분리표피까지의  $Cd^{2+}$  수송에도 크게 기여함을 알 수 있었다. 즉,  $Cd^{2+}+SA$  처리는  $Cd^{2+}$  처리구에 비해  $Cd^{2+}$  농도를 약 1.1배 증가시켰으며, 뿌리에서는 약 1.2배 증



**Fig. 3.** The effect of salicylic acid on the accumulation of Cd<sup>2+</sup> in the isolated epidermal strips of the leaves in *Commelina communis* L. Each value represents the mean ( $\pm$ s.e.m.) of 2 measurements.



**Fig. 4.** The effect of salicylic acid on the nonprotein-SH synthesis by Cd<sup>2+</sup> in the isolated epidermal strips of the leaves in *Commelina communis* L. Each value represents the mean ( $\pm$ s.e.m.) of 2 measurements.

가시켰다. 이 SA에 의한 Cd<sup>2+</sup> 수송의 결과는 Cd<sup>2+</sup> 이동 거리에 따른 요인으로 추측된다. Cd<sup>2+</sup>+SA 처리는 Cd<sup>2+</sup> 처리구에 비해 nonprotein-SH를 약 2배 가량 증가시켰다. 위 결과로부터 신호전달물질인 SA 처리는 SA가 카탈라아제 활성 억제제로 인한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도 증가로 막 투과성에 영향을 주어 Cd<sup>2+</sup> 흡수를 촉진시키며, 아울러 nonprotein-SH 합성 과정에도 영향을 주는 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 2000년 한국과학재단의 목적기초연구(과제번호 2000-1-20300-001-3)의 부분적 지원을 받아서 수행되었음.

## 적 요

3주간 성장한 닭의장풀을 Hoagland 용액 ( $\pm$ 100  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup> 또는 100  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>+100  $\mu$ M SA)에서 4일 동안 수경 재배한 후 Cd<sup>2+</sup> 및 살리실릭산(SA) 처리시, 닭의장풀의 뿌리와 분리 표피에서의 Cd<sup>2+</sup> 농도와 nonprotein-SH 합성을 측정하였다. Cd<sup>2+</sup> 처리구에서는 98  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>/g.fr.wt이 검출되었다. 이는 대조구에 비해 약 6배 증가한 것이다. Cd<sup>2+</sup>을 SA와 같이 처리한 경우 Cd<sup>2+</sup>만 처리한 경우보다 뿌리에서 약 1.2배의 Cd<sup>2+</sup>이 증가하였다. Cd<sup>2+</sup> 처리는 nonprotein-SH 농도를 약 2배 이상 증가시켰다. Cd<sup>2+</sup>을 SA와 같이 처리한 경우 Cd<sup>2+</sup>만 처리한 경우보다 뿌리에서 nonprotein-SH 농도는 약 2배 증가되었다. 분리표피에서 Cd<sup>2+</sup>+SA 처리는 Cd<sup>2+</sup> 처리구에 비해 Cd<sup>2+</sup> 농도를 약 1.1배 증가시켰으며, 뿌리에서는 약 1.2배 증가시켰다. Nonprotein-SH도 합성도 뿌리와 비슷하게 Cd<sup>2+</sup> 농도에 의존하며 증가되었으며, Cd<sup>2+</sup>+SA 처리는 nonprotein-SH 합성을 Cd<sup>2+</sup> 처리구에 비해 약 2배 증가시켰다. 위 결과로부터 신호전달물질인 SA 처리는 Cd<sup>2+</sup> 흡수를 촉진시키며, 아울러 nonprotein-SH 합성 과정에도 영향을 주는 것으로 사료된다.

## 인 용 문 헌

- Kim BW. 1982. Studies on the effect of heavy metal on the growth of various plants. Korean J. Ecology 5(4):176-186.
- Kim BW and JS Park. 1992. Study on the resistance of various herbaceous plants to the effects of heavy metals -Responses of plants to soil treated with cadmium and lead. Korean J. Ecol 15(4):433-449.
- Kim BW. 1992. Ecological study on the effect of heavy metals to the vascular plants. 상지대학교 자연과학 논총:1-8.
- Jones AM. 1994. Surprising signals in plant cells. Science 263:183-184.
- Lee JS. 1998. The mechanism of stomatal closing by salicylic acid in *Commelina communis* L. J. Plant Biol.

- 41(2):97-102.
- Lee JS. 2000. 닭의장풀 내  $Cd^{2+}$ 의 분포와 생리적 독성. 환경 생물학회지 18(1):63-67.
- Malamy J and DF Klessig. 1992. Salicylic acid and plant disease resistance. *The Plant J.* 2:643-654.
- Oquist G, WS Chow and JM Anderson. 1992. Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. *Planta* 186:450-460.
- Page AL, FT Bingham and C Nelson. 1972. Cadmium absorption and growth of various plant species as by solution cadmium concentration. *J. Environ. Quality* 1: 288-291.
- Rausser WE. 1990. Phytochyletins. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 61-86.
- Robison NJ, AM Tommey, C Kuske and PJ Jackson. 1993. Plant metallothioneins. *Biochem. J.* 295:1-10.
- Willmer CM. 1983. *Stomata*. Longman Inc., New York.

(Received 25 July 2001, accepted 7 September 2001)