

배추 (*Brassica campestris* L.) 제 1엽의 생장조절에 대한 Nitric Oxide의 역할

함정훈¹, 진창덕^{2*}

¹강원대학교 교육대학원, ²생명과학부

The Role of Nitric Oxide on the Growth Regulation of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L.) Primary Leaves

Jeong-Hun Ham¹, Chang-Duck Jin^{2*}

¹Department of Biological education, Graduate School, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

²Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

ABSTRACT The possible role of nitric oxide (NO)-induced cell division was investigated to explain the physiological effects of a NO donor, sodium nitroprusside (SNP) on the growth of primary leaves in chinese cabbage seedling plants. Exogenous treatment of SNP to chinese cabbage plants for 8 days at different concentrations (0, 200, 500 and 1000 μ M) affected the leaf growth in a concentration-dependent manner, showing a maximum growth at 200 μ M. In accordance with leaf growth responses, the chlorophyll and soluble protein contents increased strongly to 142% and 134% of control at 200 μ M SNP, respectively. However, a very little decrease in chlorophyll and a 13% decrease in protein were observed at 1000 μ M SNP. In addition, the content of DNA and RNA also increased maximumly to 142% and 139% of the control at 200 μ M SNP, respectively, whereas they decreased to 80% and 84% of the control at 1000 μ M SNP. With respect to the development of enzymes related to cell wall synthesis, 200 μ M SNP led to the maximum activities in both phenylalanine ammonia-lyase (212% of the control) and guaiacol peroxidase (134% of the control). However, the activities of both enzymes were not modified significantly at 1000 μ M SNP. In conclusion, these results suggest that the enhancement of leaf growth in chinese cabbage plants by SNP at the effective concentration was probably due to the NO ability in the induction of cell division.

Key words: Chinese cabbage, leaf growth, nitric oxide, phenylalanine ammonia-lyase, sodium nitroprusside

서 론

Nitric oxide (NO: 산화 질소)는 기체성의 자유 라디칼 분자로서 확산성과 투과성이 매우 높아 생체막을 빠르게 통과하며, 짧은 시간 내에 다양한 생리반응을 유도하는 생리 활성 물질로 알려져 있다 (Beligni and Lamattina 2001; Hung and Kao 2003). 생물계에서 NO의 생리적 조절효과는 포유동물계의 심장 혈관계, 면역계 및 신경계에서 처음으로 입증된 바 있다 (Ignarro 1990; Leshem and Haramaty

1996; Uchida et al. 2002).

최근 식물계에서도 NO의 존재가 밝혀졌고 (Beligni and Lamattina 2000), 일련의 연구들을 통하여 그 생리 조절 기능들이 다양하게 보고 되고 있으나, 아직까지 식물에서 NO의 작용 기작이 명확하게 알려져 있지 않다 (Beligni et al. 2002; Pagnussat et al. 2004).

식물의 생장과 발달에 관한 NO의 생리적 효과에 대한 최근의 연구로서 Leshem 등 (1996)은 NO가 노쇠중인 잎에서 에틸렌과 동시에 방출되었으며, 성숙한 잎보다 성장 중인 잎에서의 NO 함량이 더 높다는 것을 밝혀냄으로써 식물의 성숙과 노쇠에 영향을 끼침을 보여주었다. 발아 과정 시 적색광을 요구하는 상추 종자에 NO 처리시 적색광을

*Corresponding author Tel 033-250-8528 Fax 033-251-3990

E-mail: cdjin@kangwon.ac.kr

대신하여 발아 유도 작용을 한다는 보고가 있다 (Beligni and Lamattina 2000). 또한 밀 유식물을 암 조건에서 배양 후 짧은 시간동안 적색광이나 백색광 처리 시, NO를 처리한 유식물과 처리하지 않은 유식물의 엽록소 함량을 측정·비교함으로써 NO가 부분적인 탈황백화를 유도한다는 것이 보고되었다 (Beligni and Lamattina 2000). 그 밖에도 NO는 빛 조건하에서 하배축과 줄기에서 마디 사이의 과잉 신장을 지연시키는 역할이 보고되었다 (Beligni and Lamattina 2000). 더욱 최근에는 옥신에 의해 유도된 부정근 생성 과정에 NO가 관여함이 보고되었는데 (Pagnussat et al. 2002), 즉, 100 μ M sodium nitroprusside (SNP)를 외부에서 가하였을 때 최대의 부정근 형성촉진 효과를 보였으며, 1000 μ M SNP 처리 시에는 오히려 부정근 형성이 억제되었다.

한편, 식물의 생장은 세포의 수적 증가 및 세포 크기의 증가에 의해 이루어진다. 세포의 수적증가는 세포분열이 일어남으로서 나타나게 된다. 세포 분열은 DNA 복제 등 핵산 함량의 증가와 함께 세포벽 형성을 요구 하는데, 세포벽 형성 시 리그닌 합성 및 축적이 수반된다. 리그닌의 합성은 식물 세포의 세포벽에서 일어나는데 1차벽과 2차벽에서 모두 나타난다. 이러한 리그닌은 알콜 중합체로서 (Christensen et al. 1998), 세포벽을 단단하게 하고 줄기의 기계적인 강도를 높여 식물의 안정성을 제공하며 (Monties 1989), 또한, 병원균 감염에 대한 식물의 방어 반응을 향상시킨다 (Lange et al. 1995).

이러한 리그닌 합성 과정에 phenylalanine ammonia-lyase (PAL)의 효소 활성도가 깊은 관련이 있음이 보고되었다 (Zucker 1969). 즉, PAL은 L-phenylalanine의 탈아미노화 반응을 촉매하여 trans-cinnamic acid의 생성을 유도하는데, 이 화합물이 리그닌 생합성의 중간산물로 알려졌다.

또한, peroxidase는 hydrogen peroxide를 전자 수용체로 사용하여 다양한 유기 화합물을 산화시키는 효소이고, 세포질과 apoplast에 분포되어 있어 세포벽의 리그닌 형성 과정에 중요한 역할을 한다. 세포질 및 세포벽에 분포하고 있는 특정 peroxidase isozyme들이 알코올 단량체를 탈수소화시켜 1차 라디칼 형태의 알코올을 만든다 (Christensen et al. 1998). 이러한 1차 라디칼 형태의 알코올들이 서로 무작위적으로 반응하여 리그닌을 형성하게 된다 (Whetten et al. 1998; Carpin et al. 2001). Polle 등 (1994)은 가문비 나무 침엽에서 guaiacol peroxidase (GPX)와 리그닌 축적과의 상관관계를 밝혔고, Quiroga 등 (2000)은 리그닌 단량체와 유사한 물질인 guaiacol을 기질로 높은 peroxidase 활성을 측정하였다. 따라서 PAL과 GPX의 활성도 변화는 세포벽 형성의 생화학적 지표로서 사용될 수 있다.

그러므로 본 연구에서는 성장중인 배추 유식물에 NO공여체인 SNP를 처리하였을 때 제 1엽의 초기 성장 중에 미치는 생리적 효과 및 성장조절 기작을 NO에 의한 세포 분열 조절 가능성 수준에서 규명하기 위하여 잎 조직 내

DNA 및 RNA 함량 변화와 더불어 세포벽 리그닌 합성 관련 효소인 PAL과 GPX의 활성도 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

재료 식물의 생육 조건 및 처리

본 실험에 사용된 재료 식물인 배추 (*Brassica campestris* L. cv Heungnong) 종자를 크기, 모양, 색깔이 균일한 것으로 선별한 후, 1% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침윤시켜 표면 살균한 후, 흐르는 수돗물과 증류수로 세척하였다. 산화 질소 (NO) 공여체 화합물인 sodium nitroprusside (SNP)의 각 농도별 (0, 200, 500 및 1000 μ M)용액 100 mL로 충분히 공급된 bio-pluge#2 상토 (흥농종묘)가 2/3 가량 담겨진 투명한 폴리프로필렌 발아통 (11.5×11.5×5 cm)내에 살균된 종자를 36개씩 파종하여 유리덮개를 씌어 습도 70%, 온도 25±1°C 및 연속 광조건 (6000 lux)이 설정된 growth chamber 내에서 8일간 발아, 생육시켰다. 파종한 후 2일째 유리덮개를 제거하고, 농도별로 SNP용액을 20 mL씩 공급하였으며, 3일째부터는 50 mL씩 공급해 주었다. 8일 동안 키운 배추 유식물에서 제 1엽을 수확하여 실험 재료로 사용하였다.

생장량 측정

8일간 배양한 배추 유식물에서 제 1엽을 각 처리구별로 25개씩 수확하여 평균적인 잎의 종축 길이와 생체량을 분석하여 잎의 성장량을 측정하였다.

엽록소 및 단백질 정량

8일간 배양한 배추 제 1엽 5개를 냉각된 mortar와 pestle을 이용하여 4 mL의 80% acetone (0.1%, CaCO₃ 포함)과 0.3 g sea sand를 넣고 마쇄한 후, 원심분리 (2000 × g, 10 min)하여 얻어진 잎 추출액의 A₆₄₅와 A₆₆₃ 흡광도 값을 각각 측정하였다. 이때 엽록소의 함량을 Arnon (1949)의 방정식을 이용하여 산출하였다.

잎의 수용성 단백질 함량은 배추 1엽 5개를 냉각된 mortar와 pestle을 이용하여, 4 mL의 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5, 1% PVPP포함)와 0.3 g sea sand를 넣고 마쇄한 후 4°C에서 원심분리 (10000 × g, 20 min)하여 단백질 추출용액을 얻은 후 정량하였다. 즉, 단백질 추출액 0.1 mL에 Bradford 용액 5 mL를 혼합하고 5분간 반응을 시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때의 흡광도를 BSA 표준곡선과 대조하여 단백질 함량을 정량하였다 (Bradford 1976).

핵산 추출 및 DNA와 RNA정량

배추 잎 조직에서 핵산의 추출 및 정량은 Nieman과 Poulsen (1962)의 방법을 기초로 수행하였다. 25개의 배추 제 1엽을 냉각된 mortar와 pestle에 넣고, 10 mL의 95% ethanol (-10°C)을 가한 후 마쇄하였다. 마쇄물에 10 mL의 95% ethanol (-10°C)을 첨가 후 원심분리 (10000 × g, 10 min)하여 침전물을 획득한 다음 95% ethanol (실온), 50% ethanol (pH 4.5), ethanol-chloroform (3:1), ethanol-ether (3:1), ether를 차례로 이용하여 연속 현탁과 재원심분리하여 최종적으로 얻은 침전물을 2 mL의 ether에 녹인 후 건조시켜 핵산시료로 사용하였다.

RNA 추출은 위의 핵산 시료에 5 mL의 0.3 N NaOH를 넣어 현탁한 후 30°C에서 18시간 방치한 다음 1차 원심분리 (10000 × g, 10 min)하여 상등액을 회수하고, 다시 침전물에 5 mL의 0.3 N NaOH를 넣어 2차 원심분리 (10000 × g, 10 min)한 다음 상등액 (1차 상등액 + 2차 상등액)을 회수하여 총 10 mL로 부피를 조정된 후, 15% perchloric acid (PCA)를 이용하여 pH 1.0으로 산성화 시킨다. 산성화시킨 용액을 4°C에서 40분 동안 방치한 다음 현탁하고 원심분리 (10000 × g, 10 min)하여 상등액을 1차 회수하고, 침전물에 2 mL의 증류수와 2 mL의 1 N PCA를 넣고 재현탁하여 4°C에서 20분 방치한 후 원심분리 (10000 × g, 10 min)하였다. 원심분리 후 2차 상등액을 얻어 1차 회수 상등액과 함께 RNA 시료 (1차 상등액 + 2차 상등액)로 사용하였다.

DNA 추출은 위의 RNA 과정에서 나온 침전물 (DNA 시료)을 가지고, 3 mL의 0.5N PCA로 현탁 한 다음, 70°C에서 15분간 배양한 후 원심분리 (10000 × g, 10 min)하여 상등액을 1차 회수하고, 침전물에 2 mL의 0.5 N PCA를 가한 후 재원심분리 (10000 × g, 2°C, 10 min)하여 얻은 상등액을 DNA 시료 (1차 상등액+ 2차 상등액)로 사용하였다.

RNA 함량 측정은 RNA 시료를 먼저 증류수 (RNA:증류수의 비율 1:4 (v/v), 최종 pH 1-2범위로 함)로 희석하여 260 nm의 흡광도 (OD₂₆₀)값을 측정하였다. RNA 함량의 정량법은 표준 RNA 시료값 (RNA 시료용액의 OD₂₆₀ = 0.346 일 경우, 1 µg인산/mL 함유)을 이용하여 측정하였으며 (Nieman and Poulsen 1962), 이때 RNA량을 시료내 인산함량으로 나타내었다.

DNA 함량 측정을 위해 DNA 시료를 0.5 N PCA를 blank로 이용하여 260 nm에서의 OD값을 측정하였다. DNA 함량의 정량법은 표준 DNA 시료값 (DNA 시료용액의 OD₂₆₀ = 0.290 일 경우, 1 µg인산/mL 함유)을 이용하여 측정하였으며 (Nieman and Poulsen 1962), 이때 DNA량을 시료내 인산 함량으로 나타내었다.

효소용액의 추출 및 활성도 측정

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 효소용액 추출은 15개의 배추 제 1엽을 냉각된 mortar와 pestle을 이용하여 4 mL의 0.1 M borate-HCl buffer (pH 8.8, 2 mM Na₂-EDTA, 2 mM sodium bisulfite 포함)와 0.3 g의 sea sand를 넣고 마쇄한 후 4°C에서 원심분리 (20000 × g, 20 min)하여 상등액을 얻어 효소용액으로 사용하였다.

Guaiacol peroxidase (GPX) 효소용액은 10개의 배추 제 1엽을 냉각된 mortar와 pestle을 이용하여 3 mL의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 2 mM Na₂-EDTA, 1% PVPP 포함)와 0.3 g의 sea sand를 넣고 마쇄한 후 4°C에서 원심분리 (20000 × g, 20 min)하여 얻은 상등액을 사용하였다.

PAL 활성도는 Schopfer와 Mohr (1972)의 방법을 기초로 수정하여 사용하였다. 효소 활성도 값은 290 nm에서의 흡광도 증가 값이 3.0일 때 1 µM의 cinnamic acid가 생성되는 것을 기준으로 산출하였다. 이때 효소 반응은 1.5 mL의 0.1 M borate-HCl buffer (pH 8.8), 0.5 mL의 0.1 M phenylalanine 및 효소 추출액 1 mL가 포함된 3 mL의 반응액을 30°C에서 15분간 전배양한 후 다시 15분 배양 동안의 A₂₉₀ 흡광도 변화 값을 구하여 측정하였다.

GPX 활성도는 Polle 등 (1994)의 방법을 기초로 하여 측정하였다. 효소 활성도 값은 반응액 내에서 guaiacol이 tetraguaiacol로 산화될 때 470 nm에서의 흡광도 증가값 ($\epsilon_{470} = 25.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)을 측정하여 산출하였다. 이 때 효소 반응은 2.95 mL의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5, 16 mM guaiacol 포함), 50 µL의 0.35% H₂O₂ 및 효소 추출액 50 µL가 포함된 3.05 mL의 반응액에서 2분간 진행되었다.

결 과

SNP 처리 농도에 따른 배추 제 1엽의 생장량과 엽록소 및 단백질 함량의 변화

산화 질소 (nitric oxide: NO)에 의한 배추 제 1엽의 생장에 미치는 효과를 알아보기 위하여 8일 동안 SNP (NO 공여체 화합물)를 농도별로 처리하여 키운 배추 유식물에서 제 1엽의 생체량과 잎 종축 길이 변화를 조사하였다. 각 처리구를 대표하는 크기의 잎을 놓고 비교 하였을 때 처리 농도별 잎 크기의 차이가 가시적으로 관찰 되었다 (Figure 1). 또한, 생체량은 대조구에 비해 200, 500 µM SNP 처리구에서는 각각 33%, 14% 증가되었다. 그러나 1000 µM 처리구에서는 오히려 23% 감소되었다 (Figure 2A). 잎 종축 길이도 역시 대조구에 비해 200, 500 µM 처리구에서는 각각 19%, 4% 증가되었으나 1000 µM 처리구에서는 24% 감소되었다

(Figure 2B). 이처럼 생체량과 증축 길이는 SNP 처리구별로 대조구에 비해 뚜렷한 증가 또는 감소 현상을 보였다.

배추 제 1엽에서 엽록소 함량 변화의 경우에는 대조구에 비해서 200, 500 μM SNP 처리구에서 엽록소 함량이 각각 42%, 21% 증가되는 결과를 얻었다. 그러나 1000 μM 에서는 대조구에 비해 유의한 변화를 보이지 않았다 (Figure 3A). 또한, 잎의 수용성 단백질 함량변화를 측정할 결과, 대조구에 비해서 200, 500 μM SNP 처리구에서는 각각 34%, 18% 증가되었으나, 1000 μM 에서 다시 13% 억제되었다 (Figure 3B).

잎 조직 내 핵산 함량의 변화에 미치는 SNP의 효과

SNP의 농도별 처리에 따른 잎의 성장 촉진 효과가 단순한 물 유입에 의한 세포 부피의 증가로 기인된 것인지 아니

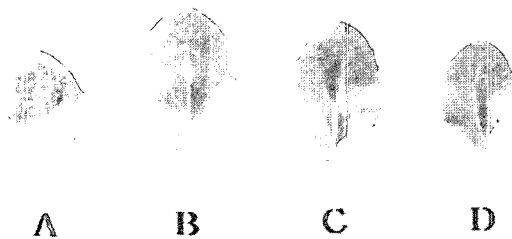


Figure 1. Effects of sodium nitroprusside (SNP) at different concentrations on the growth of primary leaf in 8 day-old chinese cabbage plants. Chinese cabbage seeds were germinated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ with continuous white light (6,000 lux) for 8 days in the presence or absence of SNP. A: control (DW treatment), B: 200 μM SNP, C: 500 μM SNP, D: 1000 μM SNP.

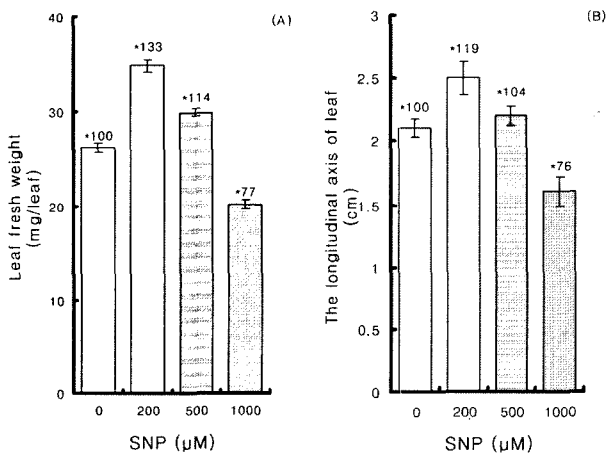


Figure 2. Effects of sodium nitroprusside (SNP) at different concentrations on the fresh weight (A) and longitudinal axis (B) of primary leaves in 8 day-old chinese cabbage plants. Chinese cabbage seeds were germinated as the same manner in Figure 1. The data presented are means \pm SE of three independent experiments. *Relative values against the control.

면 세포분열로 인한 세포수의 증가에 의해 유도되었는지를 알아보기 위해 잎 조직 내 핵산 함량 즉, DNA와 RNA 함량변화를 측정하였다. DNA 함량은 SNP 처리구별로 대조구에 비해서 200, 500 μM 에서는 각각 42%, 25% 증가되었으며, 1000 μM 에서는 20% 억제되었다 (Figure 4A). RNA 함량은 SNP 처리구별로 대조구에 비해서 200, 500 μM 에서는 각각 39%, 30% 증가되었으며, 1000 μM 에서는 16% 억제되는 경향을 보였다 (Figure 4B). 이와 같은 DNA와 RNA 함량분석 결과 잎의 성장 촉진이 세포분열로 인한 세포수의 증가로 인하여 유도될 수 있는 것으로 생각되었다.

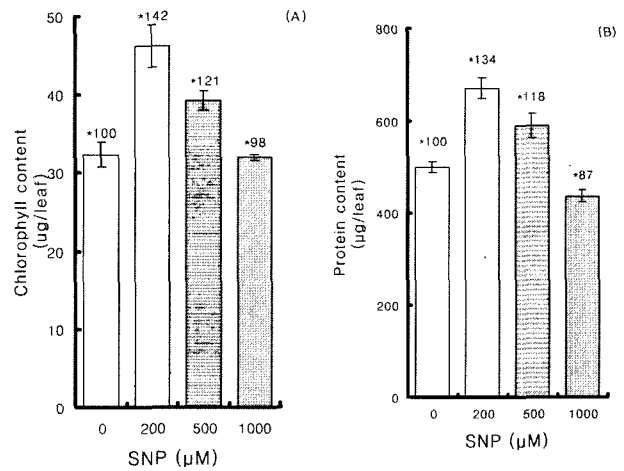


Figure 3. Effects of sodium nitroprusside (SNP) at different concentrations on the levels of total chlorophyll (A) and soluble protein (B) in primary leaves of 8 day-old chinese cabbage plants. Chinese cabbage seeds were germinated as the same manner in Figure 1. The data presented are means \pm SE of three independent experiments. *Relative values against the control.

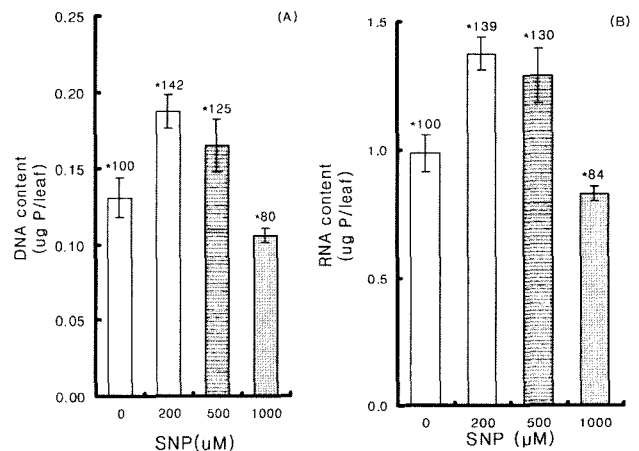


Figure 4. Effects of sodium nitroprusside (SNP) at different concentrations on the DNA (A) and RNA (B) contents in primary leaves of 8 day-old chinese cabbage plants. Chinese cabbage seeds were germinated as the same manner in Figure 1. The data presented are means \pm SE of three independent experiments. *Relative values against the control.

Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL)와 Guaiacol Peroxidase (GPX)의 총 활성도 변화에 미치는 SNP의 효과

SNP의 농도별 처리에 따른 잎의 성장 촉진이 세포분열로 인한 세포수의 증가에 의하여 유도되었는지를 세포 대사 수준에서 더욱 입증하기 위해 세포벽 구성물질의 합성과 관련된 PAL과 GPX의 활성도 변화를 조사하였다. PAL은 L-phenylalanine의 탈아미노화 반응을 일으켜 리그닌 합성과정의 중간 기질 화합물로 이용되는 trans-cinnamic acid를 생성하는 반응을 촉매하는 효소로, PAL의 활성도가 리그닌 합성과 상관관계가 있음이 알려졌다 (Zucker 1969; Schopfer and Mohr 1972).

PAL의 활성도는 대조구에 비해서 200 µM 처리구에서는 112% 증가하여 두 배 이상의 활성도 증가가 나타났다. 500 µM 처리구에서는 55%의 활성도 증가가 나타났다. 그러나 1000 µM에서는 대조구와 별 차이가 없었다 (Figure 5). 또한 GPX의 활성도 변화를 조사하였다. 가문비 나무 침엽에서 GPX 활성도와 리그닌 축적과의 상관관계가 알려졌다 (Polle et al. 1994). GPX의 활성도는 SNP 처리구별로 대조구에 비해서 200, 500 µM 처리구에서는 각각 34%, 25%의 활성도 증가가 나타났다. 1000 µM 처리구에서는 대조구에 비해 12% 증가가 나타났다 (Figure 6). 결과적으로 잎의 확장 생장이 일어난 처리구와 PAL과 GPX 활성도의 증가가 일치하여 나타났다.

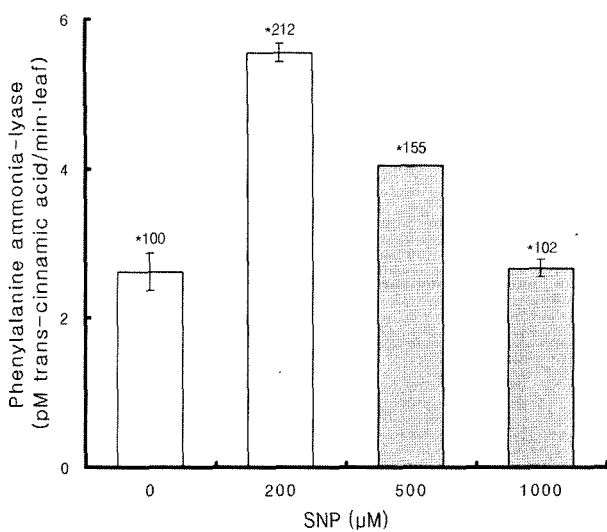


Figure 5. Effects of sodium nitroprusside (SNP) at different concentrations on the phenylalanine ammonia-lyase activity in primary leaves of 8 day-old chinese cabbage plants. Chinese cabbage seeds were germinated as the same manner in Figure 1. The data presented are means ± SE of three independent experiments. *Relative values against the control.

고찰

동물계에서 다양한 생리반응을 유도하는 생리 활성 물질로 알려져 있는 NO가 최근 식물계에서도 그 존재가 밝혀졌다 (Beligni and Lamattina 2000). 일련의 연구들을 통하여 그 생리 조절 기능들이 점차 보고되고 있으나 아직까지 식물에서 NO의 작용 기작이 명확하게 알려져 있지 않다 (Beligni et al. 2002; Pagnussat et al. 2004). 식물계에서 NO에 관한 연구는 크게 세 가지 방향으로 연구가 진행되고 있다. 첫째, NO와 NO 발생원인 Nitric oxide synthase (NOS) 효소의 탐색에 대한 연구이다. 둘째는 NO의 외부처리에 대한 식물의 생리 반응 측면에 초점을 맞춘 연구가 진행되고 있다. 셋째, 동물의 cGMP, Ca²⁺, calmoduline과 같이 NO에 의한 신호도입 과정에 포함된 분자들의 탐색에 대한 측면에서 연구가 진행되고 있다 (Beligni and Lamattina 2001).

NO 처리에 의해 식물에서 나타나는 성장조절 반응의 예로, 노쇠 과정 (Leshem and Haramaty 1996), 종자 발아 (Keeley and Fotheringham 1997; Beligni and Lamattina 2000), 탈황백화 (de-etiolation) 현상과 하배축 과잉 신장 억제 (Beligni and Lamattina 2000; 2001)등 여러 생리현상에 관련되어 있다는 보고들이 있다. 또한 Gouvêa 등 (1997)은 NO 공여체 화합물인 S-nitrosoglutathione, S-nitrosocysteine 및 sodium nitroprusside (SNP) 등을 IAA (indole acetic acid)와 비슷한 농도 수준으로 처리되었을 때 옥수수 뿌리의 신장이 더욱 촉진됨을 입증하였다.

그러므로 본 연구에서는 성장 중인 배추 유식물에 NO 공여체 화합물인 SNP를 처리하였을 때 제 1엽의 성장에 미치

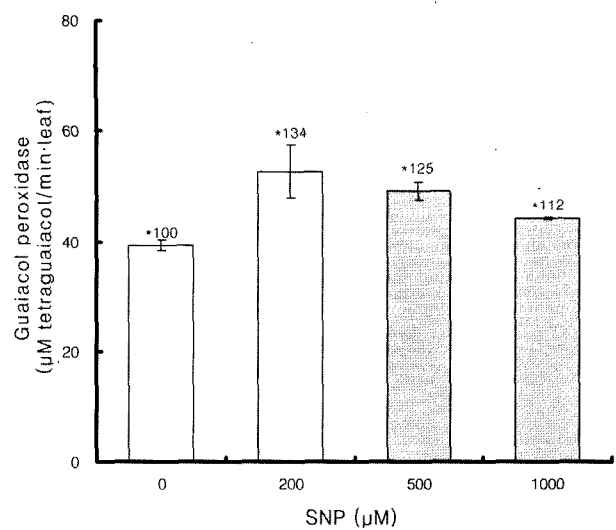


Figure 6. Effects of sodium nitroprusside (SNP) at different concentrations the guaiacol peroxidase activity in primary leaves of 8 day-old chinese cabbage plants. Chinese cabbage seeds were germinated as the same manner in Fig. 1. The data presented are means ± SE of three independent experiments. *Relative values against the control.

는 생리·생화학적 효과 및 그와 관련된 성장 조절기작을 NO에 의한 세포 분열 조절 측면에서 규명하고자 하였다. 본 연구에서는 NO의 성장조절 능력을 입증하기 위해 8일 동안 SNP를 각 농도별 (0, 200, 500 및 1000 μM)로 처리하여 키운 배추 유식물의 제 1엽에서 생체량과 잎 종축 길이 변화를 조사하였다. Figure 2A에서 보여 지듯이, 생체량은 대조구에 비해 200 μM 에서 최대 33% 증가 효과를 보였으나, 1000 μM 에서는 오히려 23% 감소되었다. 종축 길이 생장에 대한 SNP의 효과도 생체량의 결과와 같은 경향성을 나타냈다(Fig. 2B). 이처럼 생체량과 종축 길이는 SNP 처리 농도별로 대조구에 비해 뚜렷한 증가 또는 감소 현상을 보였다. 이러한 결과는 완두잎 disk 확장 생장에 NO가 처리 농도 의존방식으로 관여한다는 보고 (Leshem and Haramaty 1996; Leshem et al. 1998)와 일치하는 것이다. 또한 황백화된 식물에 빛 처리 시 탈황백현상이 유도되는 과정에서 NO가 엽록소 생성에 관여하고 있음이 보고되었는데 (Beligni and Lamattina 2000), 즉, 암조건하에 있는 밀 유식물의 잎에 100 μM SNP를 spray 방법으로 처리하였을 때, SNP를 처리하지 않은 잎보다 엽록소 함량이 30% 증가하였다. Laxalt 등 (1997)도 스트레스를 받은 감자 잎에서 NO 처리에 대한 효과를 보기 위해 SNP를 10 μM 부터 100 μM 사이의 범위에서 전 처리 (pretreatment) 하였을 때, 전 처리하지 않은 잎보다 엽록소 함량이 증가되었음을 밝혔다.

본 연구에서도 NO에 의한 잎의 성장 촉진 효과와 관련하여 잎 조직 세포 내 엽록소 및 수용성 단백질 함량 변화를 측정하였다. SNP를 처리하여 키운 배추 유식물에서 제 1엽의 엽록소 함량을 측정한 결과 대조구에 비해서 200 μM SNP가 처리되었을 때 최대 42%의 엽록소 함량 증가를 보였다. 반면, 1000 μM SNP 처리구에서는 대조구에 비해 유의한 변화를 보이지 않았다 (Figure 3A). 잎의 수용성 단백질 함량 변화 역시 200 μM SNP 처리구에서 최대 증가를 보였으나, 1000 μM 에서는 13% 감소되었다 (Figure 3B). 이러한 결과로 미루어 보아 NO는 잎의 엽록소 및 단백질 합성 과정에 관여하면서 잎의 성장을 조절하는 것으로 생각되었다.

위의 결과들은 SNP 처리 농도에 따라 배추 잎의 성장 조절 효과가 다르게 나타남을 보이고 있는데, 즉, 200 μM 농도에서는 잎의 성장을 촉진시키며, 1000 μM 고농도에서는 억제시킨다. 이와 같은 결과는 오히려 고농도의 NO가 산소 분자와 함께 peroxynitrite와 같은 라디칼을 형성하여 세포막 파괴를 통한 세포 내용물질 유출 및 주요 효소를 불활성화시키고, 이러한 NO 독성 효과가 시토플asm 내에 확산되어 세포를 파괴하며, 결과적으로 식물의 성장을 억제한다는 보고와 관련 있는 것으로 보인다 (Leshem and Haramaty 1996).

한편, 다양한 식물종에서 발견되고 있는 NOS (nitric oxide synthase)효소는 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되는 과정에서 촉매로 작용하여 NO를 생성하게 한다 (Ninneman and Maier 1996). Ribeiro 등 (1999)은 옥수수의 활발한 세

포분열 조직에서 NOS가 검출되었음을 밝혔다. Malyshev 등 (1999)은 뿌리 성장촉진과 관련된 NO의 기능은 옥수수 뿌리 끝의 신장대에서 유전자 전사 기작을 통한 세포분열 과정에 가담함으로써 빠른 뿌리 성장을 조절할 가능성을 제시하고 있다. 따라서 본 연구에서는 SNP 처리에 대한 잎의 성장 촉진이 단순한 물 유입에 의한 세포 부피의 증가로 인한 것인지 아니면 세포분열로 인한 세포수의 증가에 의해 유도되었는지를 알아보기 위해 잎 조직 내 핵산 함량, 즉, DNA와 RNA 함량변화를 측정하였다.

DNA와 RNA 함량은 Figure 4A, B에서 보여지는바와 같이 SNP 처리구별로 대조구에 비해서 200 μM 농도에서는 각각 42%, 39%로 최대 증가 효과를 보였으며, 반면에 1000 μM 에서는 각각 20%, 16% 감소되는 경향을 보였다. 이러한 결과로 미루어 보아 NO에 의한 잎의 성장 촉진은 세포 분열로 인한 세포수의 증가로 인해 유도될 수 있음을 예상할 수 있었다. 이런 가능성을 세포 내 대사계 수준에서 입증하기 위해 phenylalanine ammonia-lyase (PAL)와 guaiacol peroxidase (GPX)의 활성도 변화를 조사하였다. 식물세포 분열은 DNA 증가와 함께 세포벽 형성을 요구 하는데, 세포벽 형성 시 리그닌 합성 및 축적이 수반된다. 리그닌의 합성은 식물 세포의 세포벽에서 일어나는데 1차벽과 2차벽에서 모두 나타난다. PAL은 L-phenylalanine의 탈아미노화 반응을 일으켜 리그닌 합성의 중간 산물로 이용되는 trans-cinnamic acid를 생성하는 반응을 촉매하는 효소로 PAL의 활성도가 리그닌 합성과 상관관계가 있음이 알려졌다 (Zucker 1969; Schopfer and Mohr 1972). Peroxidase는 hydrogen peroxide를 전자 수용체로 사용하여 다양한 유기 화합물을 산화시키는 효소이며, 특정 peroxidase isozyme들이 알코올 단량체를 탈수소화시켜 1차 라디칼 형태의 알코올을 만든다 (Christensen et al. 1998). 이러한 1차 라디칼 형태의 알코올들이 서로 무작위적으로 반응하여 리그닌을 형성하게 된다 (Whetten et al. 1998; Carpin et al. 2001). Polle 등 (1994)은 가문비 나무 침엽에서 guaiacol peroxidase (GPX)와 리그닌 축적과의 상관관계를 밝혔고, Quiroga 등 (2000)은 리그닌 단량체와 유사한 물질인 guaiacol을 기질로 높은 peroxidase 활성을 측정하였다.

그러므로 PAL과 GPX는 리그닌 합성에 필요한 효소들이고, 따라서 세포벽 형성의 생화학적 지표로서 사용될 수 있다. PAL의 활성도는 대조구에 비해서 200 μM 처리구에서는 112% 증가하여 두 배 이상의 활성도 증가가 나타났다. 그러나 1000 μM 에서는 유의한 변화를 보이지 않았으며 (Figure 5), GPX의 활성도는 SNP 처리구별로 대조구에 비해서 200 μM 처리구에서는 34%의 활성도 증가가 나타났으나, 1000 μM 처리구에서는 대조구에 비해 12% 증가가 나타났다 (Figure 6).

결론적으로, 본 연구에서 얻어진 결과들로부터 SNP의 처리로 인한 배추 잎의 성장 촉진 반응은 NO에 의하여 유도

된 세포 분열로부터 기인되었을 가능성이 있음을 의미하는 것이다.

적 요

배추 유식물 제 1엽의 생장에 미치는 sodium nitroprusside (SNP: NO 공여체)의 생리적 효과를 NO에 의한 세포 분열 조절의 가능성 수준에서 조사하였다. 배추 유식물에 서로 다른 농도의 SNP (0, 200, 500 및 1000 µM)를 8일간 처리하고 배양한 결과 200 µM SNP 농도에서 최대 잎 생장을 보이면서 처리농도 의존 방식으로 잎의 생장에 영향을 끼쳤다. 잎의 생장반응과 일치하여, 잎의 엽록소 및 수용성 단백질 함량은 200 µM 농도에서 최대로 증가하여 각각 대조구의 142%와 134% 수준을 보였으나, 오히려 1000 µM 처리 농도에서는 엽록소의 경우 미미한 감소와 그리고 단백질 함량에서는 13%의 감소가 일어났다. 게다가, 잎 조직의 DNA와 RNA 함량 역시 200 µM 처리시 최대로 증가하여 각각 대조구의 142% 및 139% 수준을 보였으나, 반면에 1000 µM 농도에서는 각각 대조구의 80% 및 84% 수준까지 감소되었다. 세포벽 합성과 관련된 효소 활성도 변화에서 phenylalanine ammonia-lyase와 guaiacol peroxidase 활성도는 200 µM SNP 처리시 대조구에 비해 각각 최대 212%와 134% 증가 하였으나, 1000 µM 농도에서는 두 효소 활성도 모두 유의한 변화를 보이지 않았다.

결론적으로, 이들 결과는 효과적인 농도에서의 SNP 처리에 의한 배추 제 1엽의 생장 촉진 현상은 세포분열 유도에 대한 NO의 능력에 기인될 수 있음을 제시하는 것이다.

인용문헌

- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24: 1-5
- Beligni MV, Fath A, Bethke PC, Lamattina L, Jones RL (2002) Nitric Oxide acts as an antioxidant and delay programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol* 129: 1642-1650
- Beligni MV, Lamattina L (2001) Nitric oxide in plant: the history is just beginning. *Plant, Cell and Environ* 24: 267-278
- Beligni MV, Lamattina L (2000) Nitric oxide induces seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221
- Bradford MM (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
- Carpin S, Crevecoeur M, Meyer MD, Simon P, Greppin H, Penel C (2001) Identification of a Ca²⁺-pectate binding site on an apoplastic peroxidase. *The Plant Cell* 13: 511-520
- Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, Montagu MV, Boerjan W (1998) Purification and characterization of peroxidase correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol* 118: 125-135
- Gouveia CMCP, Souza JF, Magalhaes ACN, Martins IS (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul* 21: 183-187
- Hung KT, Kao CH (2003) Nitric Oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *Journal of Plant Physiol* 160: 871-879
- Ignarro LJ (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium derived nitric oxide. *Annu Rev of Pharmacol and Toxicol* 30: 535-560
- Keely JE, Fotheringham CJ (1997) Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. *Science* 276: 1248-1250
- Lange BM, Lapierre C, Sanderman H (1995) Elicitor-induced spruce stress lignin - Structural similarity to early developmental lignins. *Plant Physiol* 108: 1277-1287
- Laxalt AM, Beligni MV, Lamattina L (1997) Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Eur J Plant Pathol* 73: 643-651
- Leshem YY, Haramaty E (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* L. foliage. *Plant Physiol* 148: 258-266
- Leshem YY, Wills BH, Ku VV (1998) Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide(NO)- as an endogenous maturation and senescence regulation factor in higher plant. *Plant Physiol* 36: 825-833
- Malyshev I, Manukhina E, Golubeva L (1999) NO paradox in adaptation of the organism. *Acta Physiologica Scandinava* 167: 91
- Monties B (1989) Lignins. In PM Dey, JB Harborne, eds, *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 1, Academic Press, London, pp. 113-157
- Nieman RH, Poulsen LL (1962) Spectrophotometric estimation of nucleic acid. *Plant Physiol* 38: 31-35
- Ninnemann H, Maier J (1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem and Photobiol* 64: 393-398
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombarbo MC, Lamattina L (2004) Nitric Oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol* 135: 279-286
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarub S, Lamattina L (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* 129: 954-956
- Polle A, Otter T, Seifert F (1994) Apoplastic peroxidase and lignification in needles of Norway Spruce(*Picea abies* L.). *Plant Physiol* 106: 53-60

- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barcelo A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, de Forchetti SM, Tigier HA, Valpuesta V (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122: 1119-1128
- Ribero EA JR, Cunha FQ, Tamashiro WMSC, Martins IS (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Letters* 445: 283-286
- Schopper P, Mohr H (1972) Phytochrome-mediated induction of phenylalanine ammonia-lyase in mustard seedlings. *Plant Physiol* 49: 8-10
- Uchicda A, Jagendorf AT, Hibino T, Takabe T, Takabe T (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci* 163: 515-523
- Whetten RW, MacKay JJ, Sederoff RR (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 585-609
- Zucker M (1969) Induction of phenylalanine ammonia-lyase in xanthium leaf disks - Photosynthetic requirement and effect of daylength. *Plant Physiol* 44: 912-922

(접수일자 2005년 11월 21일, 수리일자 2005년 12월 8일)