

主要作物의 旱魃抵抗性에 관한 研究

第2報 麥類 幼苗期의 水分不足이 窒酸還元酵素 및 蛋白質 分解酵素의 活性變化와 遊離Proline의 蓄積에 미치는 影響

崔元烈·閔庚洙*

Studies on the Drought-Resistance of Major Food Crops

II. Effect of Water Stress on the Activity of Nitrate Reductase and Protease, and the Accumulation of Free Proline in Barley and Wheat at Seedling Stage

Choi, W. Y. and K. S. Min*

ABSTRACT

In order to observe the degree and response of drought-resistance and its physiological mechanism in barley and wheat seedling stage, 5 species (16 cultivars) were tested for the changes of nitrate reductase and protease activity and the accumulation of free proline, by being subjected to water stress by withholding watering for 8 days at 10 days (at the 3rd leaf stage) after emergence and by imposing water stress to the excised first leaf by polyethyleneglycol solution (osmotic potential, -20 bars) for 48 hours.

The average rate of decrease of all cultivars was 42% in nitrate reductase activity and 73% in protease activity. But proline content in water stress was increased 10 folds more than that of control.

The decreased rate of nitrate reductase activity in 5 species was in the order of wheat < rye < covered barley < naked barley < two-row barley: wheat being the lowest.

The decreased rate of protease activity in 5 species was in the order of wheat > rye > two-row barley > covered barley > naked barley: wheat being the heighest.

The accumulated amount of free proline in 5 species by water stress was in the order of wheat > covered barley > rye > naked barley > two-row barley. And the increased ratio (folds) of free proline of water stress to control was in the order of rye(13) > wheat, covered barley(11) > naked barley(9) > two-row barley(7): rye being the highest.

In terms of the enzymatic activity and the physiologically adaptive metabolism during the processing leading to drought-resistance, the degree of drought-resistance of 5 species to water stress at seedling stage was shown to be in the order of wheat > rye > covered barley > naked barley > two-row barley.

結 言

一般的으로 作物의 生理的 變化를 깊이 理解하려면 環境要因別로 極端的 水準에까지 處함으로서 全般的 變化樣相과 範圍를 容易하게 感知할 수 있으리라 본

* 全南大學校 農科大學 農學科

* Dept. of Agronomy, Chonnam National University, Kwangju 500. Korea.

다.

그중 水分의 利用度가 生産性에 가장 크게 影響을 준다고 보기 때문에 人爲的으로 旱魃을 誘發시켜서 作物自體의 旱魃抵抗性 程度와 그 機作에 대한 一面을 몇가지 酵素活性和 代謝物質의 蓄積의 觀點에서 旱魃抵抗性 生理를 檢討하고자 窒酸還元酵素와 蛋白質分解酵素의 活性變化와 imino 酸인 proline의 蓄積 程度를 調査分析 하였다.

Nitrate reductase(NR)는 窒素同化作用의 速度制限⁷⁾ 葉NR活性和 葉水溶性蛋白質間 또는 窒酸態窒素含量 間에 相關이 있음¹⁰⁾은 물론 種實蛋白質含量(%)間이나 全還元窒素間에도 正相關이 있고^{8,9)} 또한 小麥幼苗葉의 NR活性的으로 種實蛋白質의 含量도 推定할 수 있다는 報告⁸⁾ 以外에 水分이 不足한 경우에는 특히 NR活性的의 현저한 減少^{1,14)}와 不適條件에서 反應이 敏感하며^{3,13)} 가벼운 水分 不足에서도 變異가 甚하다⁸⁾고 하였다. 또한 수수의 경우를 품종별로 보면 3 倍까지도 變異가 크다고 하였다.⁷⁾

Protease(PT)活性的은 低 단백질보다 高蛋白質小麥에서 높았고¹⁶⁾ 수분이 부족하면 PT活性的이 현저히 減少한다고 하였다.¹³⁾ 또한 旱魃時 NR活性的減少는 PT活性的의 增加 때문이라는¹¹⁾ 異論도 있다.

Proline의 변화程度와 機能을 水分不足의 경우 蓄積增大^{2,4,6,12,21)}, 水分不足의 指標使用 可能性^{4,15,18)}, proline 蓄積과 한발저항성間에 正相關¹⁸⁾ 旱魃性誘導⁴⁾, 收量安全指數와 proline 含量間에 負相關¹⁸⁾, 細胞膜의 安定化 및 保護力 附與¹⁹⁾ 그리고 種間이나 種內의 差異^{18,19)} 등을 들 수 있는데 作物生育에 도움을 주는 方向으로 旱魃抵抗性을 誘導하고 있다는 報告¹⁸⁾가 支配的이다.

이런 觀點에서 旱魃에 比較的 反應이 敏感한 幼苗期에 繼水處理를 하여 品種別 또는 麥種別로 旱魃抵抗性 程度와 變化범위를 調査分析하였든 바 몇가지 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

그리고 本 研究은 娥山社會福祉事業財團의 研究費 支援(1980 年度)으로 遂行되었음을 밝혀둔다.

材料 및 方法

供試麥類는 栽培의인 面에서 圃場旱魃抵抗性 程度를 考慮하여 胡麥(1 品種), 小麥(4 品種), 大麥(5 品種), 裸麥(3 品種) 그리고 二條大麥(3 品種)의 5 麥種(16 品種)을 使用하였다.

栽培는 四角 plastic pot(25×60×20cm)에 表 1의

Table 1. Properties of soil used.

Soil texture	pH	O. M. (%)	Total -N. (%)	OEC (ppm)	Avai- lble P ₂ O ₅ (ppm)	Exchangeable cation (me/100g)		
						K	Ca	Mg
Sandy loam	6.2	2.5	0.05	11.58	157	0.15	2.65	3.00

性質을 가진 土壤을 담아 播種發芽시켜 本葉 2 枚時에 生育이 均一한 것을 남기고 間引하여 生育시켰다. 斷水處理時까지는 養分供給은 Hoagland 溶液으로 하였고 斷水處理 以後의 對照區는 養分溶液이 아닌 地下水를 灌水하였다.

處理內容은 發芽後 10 日間 生育한 水分不足에 敏感한 本葉 3 枚時에 ① 8 日間 계속 灌水한 것(對照區) ② 8 日間 계속 斷水한 것(斷水區)을 比較하였다.

試驗區는 四反復으로 하였고 osmoticum인 polyethyleneglycol 水溶液에 의한 葉身切片의 分析은 5 回 反復하였다.

Nitrate reductase(NR)分析은 Eck & Hageman 方法⁷⁾으로 하였다. 分析過程을 간추려 보면 ① 試料에 대한 抽出溶媒는 1:6(w/v)으로 하였다. ② 0.1 M tris buffer(pH 8.2)를 사용하여 粉碎後 17,000g에서 30 分간 遠心分離, ③ 上澄液 1ml에 phosphate buffer 1ml, NADH 0.5ml, KNO₃ 0.5ml 그리고 증류수 0.5 ml를 混合後 30 分 室溫에서 孵化後 Zinc acetate 0.8 ml 添加하여 3,600g에서 30 分간 원심분리 하였다. ④ 그 상등액에 發色劑(1.5N HCl에 1% Sulfanilamide 對 0.02% N-(1-naphthyl) ethyleneamine dihydrochloride를 等量混合)를 2ml 添加 10 分後 ⑤ 540nm에서 測定하였다.

Protease(PT)分析은 ① sodium diethyldithiocarbamate(10mM)이 포함된 0.1M Tris buffer(pH 8.0)로 粉碎 ② BSA(Bovine Serum Albumin, 1mg/ml.)와 EDTA(1mM)가 포함된 Tris buffer(0.1M)에 30 °C 1시간 부화 ③ 8% (w/v) TCA로 反應을 정지 후 餘과하여 276nm에서 測定하였다.

Proline 分析은 Troll & Lindsley 方法²⁰⁾으로 하였고 건물중 측정은 80 °C 건조기에 24시간 건조시켰다.

斷水處理 後 土壤水分을 調査하였든 바 處理末期에서 對照區는 19.1%였고, 斷水區는 5.1%로서 對照區의 ¼ 밖에 되지 않았다 分析과 調査用 試料는 第 1 本葉만 使用하였다.

葉水分 등 其他 調査項目의 變化內容은 崔 等(1981)⁵⁾에 의한 것을 參考하여 주시기 바란다.

結果 및 考察

1. 窒酸還元酵素의 活性變化

Nitrate reductase activity(NRA)은 對照區 75.1 (96.7~56.3) 범위이며 斷水區 43.9(61.7~20.7) 범위로서 減少率은 42%였다.

斷水區에서 品種別로는 강보리와 木浦 55號가 가장 높은 편이고, 두루보리 등보리 1號, 청계밀, 을밀, 조팜 등이 34~36%로서 減少率이 가장 낮은 편이었다. 麥種別로 보면 裸麥과 二條大麥이 가장 많았고 胡麥과 小麥이 가장 낮은 部類의 麥種들이었다.

이것은 水分不足과 不適環境의 경우에 活性이 減少

되며 反應이 敏感하다는 報告^{1,3,13,14)}와 一致되며 活性變異가 甚하며⁸⁾ 또한 Eck 等⁷⁾(1974)은 正常的인 水分水準에서 수단그래스 등 17個 品種간에 3倍까지도 變異가 크다고 하였던 점으로 볼 때 麥種內 또는 種間 差異를 認定할 수 있다. 또한 Maranville 등¹³⁾(1972)은 옥수수 幼苗에서 葉상대팽압도가 70% 程度면 對照區 108에서 斷水區 30 ($\mu\text{M NO}_2^-/\text{g}\cdot\text{Dw./h}$)로서 減少率이 72%인데 반하여 맥류는 42% 밖에 되지 않았다.

小麥의 NRA가 종실단백질 %와 正相關^{8,9)}이 있고 상당히 精確하게 종실단백질의 推定이 가능⁹⁾하다고 볼 때 어느 生育段階거나 또는 不適條件에서 NR活性

Table 2. Changes in Nitrate reductase activity and Protease activity of 16 cultivars subjected to water stress by withholding watering for 8 days at 10 days after emergence.

Species	Items Cultivars	Nitrate reductase activity (A)			Protease activity (B)		
		Control	Stress	Decreased rate (%)	Control	Stress	Decreased rate (%)
rye	Rye	84.0 ^{a*}	52.7 ^{b*}	38	72.0 ^{c*}	19.3 ^{d*}	74
	Chogwang	95.3	61.7	36	69.0	17.3	75
	Geurumil	96.7	57.7	41	74.0	19.0	75
wheat	Olmil	88.7	57.7	35	78.0	19.3	76
	Cheonggaemil	87.7	57.3	35	75.0	18.3	76
	Submean	92.1 ^a	58.6 ^a	36	74.0 ^c	18.5 ^d	75
barley	Durubori	73.7	49.3	34	80.0	23.3	71
	Dongbori #1	72.7	46.7	36	84.3	20.7	76
	Gangbori	69.3	28.7	59	91.3	37.0	60
	Olbori	62.7	38.3	39	101.0	29.0	72
	Milyang #12	66.0	39.0	41	64.3	18.0	73
	Submean	68.9 ^b	40.4 ^c	41	84.2 ^b	25.6 ^c	70
naked barley	Baegdong	56.3	23.7	58	94.3	34.4	64
	Mokpo #55	66.0	27.3	59	120.0	33.7	72
barley	Bangsa #6	78.0	41.7	47	117.0	42.0	65
	Submean	66.8 ^b	29.7 ^d	56	110.4 ^a	36.7 ^a	67
tworow barley	Hyangmaeg	59.3	36.0	40	78.0	23.7	70
	Goldenmelon	81.7	42.7	48	101.0	28.7	72
barley	Sacheon #4	63.3	20.7	68	81.0	23.3	72
	Submean	68.1 ^b	33.1 ^d	51	86.7 ^b	25.2 ^b	71
Total average		75.1	43.9	42	86.4	23.9	73
LSD(5%) between main plot.			1.946			3.591	
LSD(5%) between subplot.			2.473			3.394	
LSD(5%) between subplot for same main plot.			3.497			4.800	
LSD(5%) between subplot for different main plot			3.774			5.590	

Notes; A: Micromoles NO_2^- formed/g leaf dry weight/hour.

B: Micromoles tyrosine/g leaf dry weight/hour.

*: In tables 2 to 3, the same letters are not significantly different at the 5% level according to DMRT between species for the same main plot.

$$\text{Decreased rate (\%)} = \frac{\text{control} - \text{stress}}{\text{control}} \times 100 (\%)$$

이 높아야 하고 減少率이 적은 것이 旱耐抵抗性이 크다고 볼 수 있겠고 등숙기 한밭에 의한 단백질 감소를 줄일 수 있을 것이다.

2. 蛋白質 分解酵素의 活性變化

Protease(PT)의 活性變化를 表 2에서 보면 對照區에 대한 斷水區에서의 減少率이 73%나 되어 水分不足에 대한 反應이 매우 敏感하였다. 品種別로 보면 강보리와 백동이 가장 낮았고 胡·小麥이 높은 傾向이나 全體적으로는 變異幅이 적었다. 麥種別로는 小麥>胡麥>二條大麥>大麥>裸麥의 順으로 減少率에 있어서 小麥이 가장 심하고 裸麥이 가장 적었다.

Maranville 等¹³⁾(1972)은 옥수수 幼苗를 8日間 斷水處理 하는 過程에서 處理後 6日부터 活性이 顯著히 감소하였는데 相對평압도가 70%에서, 대조구

에 대한 斷水區의 減少率이 26%였다는 점으로 미루어 작물은 다르나 이것은 같은 傾向임을 알 수 있다.

對照區의 麥種間 PT의 傾向이 裸麥>二條大麥>大麥>小麥>胡麥의 順으로 胡·小麥이 가장 낮게 되어 있어서, 小麥麥種內的 品種比較에서 低蛋白質小麥보다 高蛋白質小麥에서 活性이 더 높다는 Rao 等¹⁶⁾(1968)의 報告에 비추어 볼 때 蛋白質이 小麥보다 낮은 裸麥이 더 높은 것은 남득이 가지 않으나 대체적으로 活性이 높은 小麥에서 蛋白質의 Amino 酸으로의 分解가 삼투압 증가에 기여하리라 볼 때 旱耐抵抗性이 크다고 할 수 있겠다.

3. Proline의 變化

Proline의 變化를 보면 表 3과 같다. 對照區는 1.08로서 함량이 낮았으나 斷水區는 10.80으로 대조구

Table 3. Changes in free proline content of the first leaf subjected to water stress by withholding watering for 8 days(A), and of the excised first leaf exposed to P. E. G. solution (osmotic potential-20 bars) for 48 hours(B), at 10 days after emergence in 16 cultivars, respectively.

Species	Items Cultivars	Free proline(A)			Free proline(B)	
		Control	Stress	Folds	Stress (P. E. G.)	Folds
rye	Rye	0.87**	11.70**	13.4	14.9**	16.1
	Chogwang	1.67	13.50	8.0	15.5	9.3
	Geurumil	1.40	14.80	10.5	16.8	12.0
wheat	Olmil	0.77	13.20	17.1	15.4	20.0
	Cheonggaemil	1.37	13.60	9.9	15.1	11.0
	Submean	1.30 ^b	13.78 ^a	10.6	15.7 ^a	12.1
barley	Durubori	0.77	14.00	18.1	14.9	19.4
	Dongbori #1	1.27	12.70	10.0	13.8	10.9
	Gangbori	1.17	11.93	10.1	13.8	11.8
	Olbori	1.47	12.40	8.4	14.0	9.5
	Milyang #12	0.87	11.30	12.9	13.0	14.9
	Submean	1.11 ^{ab}	12.45 ^b	11.2	13.9 ^c	12.5
naked barley	Baegdong	0.87	8.98	10.3	9.3	10.7
	Mokpo #55	1.37	9.87	7.2	11.7	8.5
	Bangsa #6	0.87	8.13	9.3	10.3	11.8
	Submean	1.04 ^{ab}	8.99 ^d	8.6	10.4 ^d	10.0
two-row barley	Hyangmaeg	0.93	8.00	8.6	9.7	10.4
	Goldenmelon	0.77	4.70	6.1	7.1	9.2
	Sacheon #4	0.83	3.97	4.7	6.7	8.1
	Submean	0.84 ^b	5.56 ^e	6.6	7.8 ^e	9.3
Total average		1.08	10.80	10.0	12.7	11.8
LSD(5%)	between main plot.		0.560		0.561	
	between subplot.		0.760		0.501	
LSD(5%)	between subplot for same main plot.		1.075		0.708	
LSD(5%)	between subplot for different main plot.		1.145		0.840	

Notes ; Folds : A: stress/control.

P. E. G.: polyethyleneglycol.

B: stress/control in A.

다 10 배의 蓄積增加를 보여 주고 있다.

斷水區의 品種別로 보면 供試小麥 全部와 두루보리가 축적이 많았고 二條大麥이 낮았다. Proline의 축적배율로 보면 胡麥>大麥>小麥>裸麥>二條大麥의 順이나 斷水區의 絶對量으로 보면 小麥>大麥>胡麥>裸麥>二條大麥의 順이었다.

또한 對照區의 末期에 葉切片을 채취하여 P. E. G. 水溶液(osmotic potential-20bars)에 48 시간 浮遊시켜 分析된 結果는 蓄積量이나 蓄積倍率이나 다소 높게 나타나고 있다. 이것은 完全植物體보다는 緩衡能力이 적어 反應度가 높기 때문에 생각된다. 그러나 경향은 pot 斷水區와 切片葉 分析值間에는 一致한 傾向을 찾을 수 있었다.

水分不足下에서 蓄積이 현저하고,^{2, 4, 5, 12, 21)} 旱魃抵抗性과는 正相關¹⁸⁾이며 細胞膜을 安定化시킨다¹⁹⁾는 점으로 볼 때 有利한 方向으로 진행됨을 알 수 있다. 또한 水分程度의 指標로서의 가능성^{4, 5, 18)}을 보이며 조직에 添加한 proline은 저항성을 주기 때문에 葉色의 褪色을 지연시킨다고 하였다.¹⁹⁾ 또한 Stewart 等¹⁹⁾(1974)은 滲透壓을 增加시키고 溶解度를 높이며 極성이 아니며 無毒性的 特性을 갖고 있다고 하였다. proline은 旱魃後 水分供給時에 에너지와 窒素源으로 利用된다는 보고^{1, 2)}가 있으며 Singh 等¹⁷⁾(1972)은 旱魃地域에서의 麥類圃場收量安全指數와 葉proline 含量間에는 負相關($r=0.89$)를 갖고 幼苗의 축적능력은 화곡류의 旱魃抵抗性 育種過程에서 豫備選拔法으로 利用할 수도 있다고 하였다.¹⁸⁾ 鹽生植物에서의 보호적 역할¹⁹⁾ 高温, 低温 等 다양한 不適環境을 적응하는데 도움을 준다는 보고도 있다.

물론 圃場旱魃抵抗性에 있어서 種間 또는 種內的 差異가 體內的 水分保有나 水分流動調節能力의 差異로만 볼 수 없는데 이것은 水分의 樣態 등에 따라서 組織內的 代謝作用의 變異가 全體적으로 볼 수 있으므로 극히 일부분만을 가지고서는 抵抗性反應이나 變化方向을 判別하기는 용기하지 않은 것 같이 생각된다.

摘 要

麥類의 旱魃抵抗性 反應과 程度 그리고 抵抗生理的 機作을 究明하기 위하여 發芽後 10日된 幼苗期(本葉 3枚時)에 8日間 斷水處理를 하여 窒酸還元酵素와 蛋白質分解酵素의 活性變化 그리고 proline蓄積을 調查하였던 바 그 結果는 다음과 같다.

1. 全品種의 平均 減少率은 窒酸還元酵素의 活性이 42%였으며 蛋白質分解酵素의 活性은 73%였으며, 이에 반하여 proline은 對照區에 比하여 斷水區가 무려 10배나 增加하였다.

2. 窒酸還元酵素의 活性減少率을 麥種別로 보면 小麥<胡麥<大麥<二條大麥・裸麥의 順으로 小麥이 가장 낮았다.

3. 蛋白質分解酵素의 活性減少率을 麥種別로 보면 小麥>胡麥>二條大麥>大麥>裸麥의 順으로 小麥이 높고 裸麥이 가장 낮았다.

4. 斷水區의 proline의 蓄積絶對量을 麥種別로 보면 小麥>大麥>胡麥>裸麥>二條大麥의 順으로 小麥과 大麥이 높았으며, 對照區에 대한 斷水區의 增加比는 胡麥(13배)>小麥・大麥(11배)>裸麥(9배)>二條大麥(7배)의 順으로 胡麥이 가장 높았다.

5. 旱魃抵抗性 過程에서 酵素的 및 生理的 代謝作用의 觀點에서 볼 때 小麥>胡麥>大麥>裸麥>二條大麥의 順으로 旱魃抵抗性이 강한 것으로 推定된다.

引 用 文 献

1. Bardzik, J. M. et al.(1971) Effects of water stress on the activities of three enzymes in maize seedlings. *Plant Physiol.* 47 : 828-831.
2. Barnett, N. M., and A. W. Naylor(1966) Amino acid and protein metabolism in Bermudagrass during water stress. *Plant Physiol.* 41:1222-1230.
3. Beevers, L., and R. H. Hageman(1969) Nitrate reduction in higher plants. *Annu. Plant Physiol.* 20 : 495-522.
4. Blum, A., and Adelina Ebercon(1976) Genotypic responses in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop Sci.* 16 : 428-431.
5. Brown, L. M., and J. A. Hellebust(1978) Sorbitol and proline as intracellular osmotic solutes in the green alga stichococcus bacillaris. *Can. J. Bot.* 51 : 676-679.
6. Chu, T. M., D. Aspinall, and L. D. Paleg(1974) Stress metabolism. VI. Temperature stress and the accumulation of proline in barley and redish. *Aust. J. Plant Physiol.* 1 : 87-97.
7. Eck, H. V., and R. H. Hageman(1974) Nitrate

- reductase activity in Sudangrass cultivars. *Crop Sci.* 14 : 283-287.
8. Eilrich, G. L.(1968) Nitrate reductase activity in wheat and its relationship to grain protein production as affected by genotype and spring application of calcium Nitrate. Ph.D. thesis, University of Illinois, Urbana-Campaign. Diss. Abstr. No. 69-11691.
 9. Eilrich, G. L., and R. H. Hageman(1973) Nitrate reductase activity and its relationship to accumulation of vegetative and grain nitrogen in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Sci.* 13 : 59-66.
 10. Harper, J. E., and G. M. Paulsen(1967) Changes in reduction and assimilation of Nitrogen during the growth cycle of winter wheat. *Crop Sci.* 7 : 205-209.
 11. Huffaker, R. C., and L. W. Peterson(1974) Protein turnover in plants and possible means of its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25 : 363-392.
 12. Kemble, A. R., and H. T. MacPherson(1954) Nitrogen metabolism of wilting ryegrass. *Biochem. J.* 58 : 46-49.