

大豆種자의 紫斑病 感染과 Peroxidase 活性度變化

朴元穆 · 高榮禧 · 兪英濬 · 李章容

The Change of Peroxidase Activity in Soybean Seed Followed by Infection with *Cercospora kikuchii*

W.M. Park,* Y.H. Ko,* Y.J. Yoo,* and J.Y. Lee**

ABSTRACT

The present study was carried out to investigate the change of peroxidase activity of soybean seed infected with *Cercospora kikuchii*. The protein content, polyphenol oxidase activity and peroxidase isozyme pattern in health and infected soybean seed were also compared.

1. The peroxidase activity was substantially higher in the infected soybean seeds than that in the healthy seeds either cracked or not. No significant differences in protein content were recognized among the seeds tested.
2. No significant differences in peroxidase activities and protein contents were notified between healthy and infected seeds from the measurements on each parts of dissected seeds, cotyledon and seedcoat, however the peroxidase activity in the seed coat of the stained seed was 2.5 times to healthy seed.
3. The activities of polyphenol oxidase were undetectable in both healthy and diseased seeds.
4. The electrophoretic patterns of the peroxidase isozyme were the same between healthy and infected seed.
5. Therefore, the increase of peroxidase activity in infected soybean seedcoat was mainly due to the biochemical reaction against the pathogen.

緒 言

植物이 病原菌에 感染되면 이에 感應하여 여러가지 生化學的 變化를 가져 오는데 이런 現象中에는 抵抗性 機作과 밀접한 관계가 있다는 것이 報告되어 있다^{1,10)}

그중에 특히 peroxidase와 polyphenol-oxidase는 phenol compounds를 酸化하여 抗菌성이 높은 quinone으로 變化시켜 病原菌의 확산을 막는다는 것이 담배^{6,7)},

고구마^{11,13)} 등 作物에서 發見되었고 peroxidase는 病原菌이 分泌하는 毒素을 산화하여 不活性化시킴으로 인해서 病的 피해를 막는다고 하였다. 이와 반면에 一般的으로 peroxidase는 病原菌의 侵入뿐만 아니라 植物이 부적합한 조건 즉, 기계적인 상처, 有毒物質, 건조 및 냉해등의 生理的인 장애를 입었을 때도 活性이 증가하므로 耐病성과 관계가 없다는 報告도 있다. 따라서 병든 식물에서 peroxidase 活性의 증가가 과연 耐病성과 관계가 있는지 혹은 단지 病的 侵入으로 생기

* 高麗大 農大 植物保護學科(Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Korea Univ., Seoul, Korea)

** 農村振興廳 農業技術研究所(Inst. of Agric. Sci., ORD, Suwon, Korea)

는 기계적인 상처 또는 기타 환경요인의 결과인지를 밝히는 것은 病理學的인 면뿐만 아니라 生理學的인 면에서도 매우 중요한 일이다. 그러나 아무리 환경조건을 정확히 조절한다 할지라도 자라나는 식물로부터 모든 생리적인 障害를 除去하며, 균일한 조건하에서 病原菌의 영향만을 관찰하기란 거의 불가능한 일이므로 peroxidase의 역할이 저항성에 관여하는지는 아직도 명확히 구명된 바 없다. 本研究는 紫斑病에 感染된 種子의 抵抗力과 peroxidase活性和의 關係를 구명코자 實施하였다.

材料 및 方法

植物材料: 大豆(*Glycine max* L. Merrill)品種 광교 중자를 농촌진흥청 작물시험장으로부터 분양받아 本實驗에 使用하였다.

乾燥種자를 紫色무늬가 있는 種子(diseased seed)와 무늬가 없는 種子로 구별하였다. 무늬없는 種자를 다시 種皮가 자연 열개되어 균열이 생긴 種子(naturally cracked seed)와 아무런 상처없이 온전한 種子로 나누었다. 온전한 중자를 다시 두 群으로 나누어 하나는 면도칼로 種皮에 수차례 刺傷을 주어 기계적 상처를 입게 한 것(artificially cut seed)과 전혀 상처를 입지 않은 健全種子(healthy seed)로 나누는 4가지 種자를 가지고 本實驗을 遂行하였다.

病原菌: 大豆 紫斑病菌(*Cercospora kikuchii*)은 本病에 걸린 大豆種皮에서 純粹分離하였고 分離된 病原을 당근(60g/l)이 첨가된 PDA 1:에서 培養하였다.

酵素抽出: 大豆種자를 자엽과 種皮로 分離하여 콩 2 個當 0.1M phosphate buffer (pH7.5) 5ml을 넣고 유발에서 미세하게 마쇄한 後 고속냉동원심분리기에 넣어 12,000×g로 30分間 회전한 뒤 상등액을 채취하여 蛋白質分析, 酵素活性度 측정 및 電氣泳動의 材料로 使用하였다.

電泳泳動法: gel은 7% polyacrylamide disc gel을 使用하였고 gel buffer는 0.1M Tris-HCl(pH8.9)이었으며 tray buffer는 0.125M Tris-borate (pH8.9)를 使用하였다. sample은 tube當 200 μ l를 使用하였으며 電流는 3mA/tube를 유지하여 약 3時間 電氣泳動시켰다.

發色法: 電氣泳動이 끝난 後 즉시 gel을 發色시켰다 蛋白質染色은 gel을 Coomassie-Brilliant Blue R-250용액(A용액은 trichloroacetic acid 30g, methanol 100 ml, acetic acid 35ml, 증류수 400ml를 混合하여 만들고 B용액은 1% Coomassie-Brilliant Blue R-250 水溶液으로써 染色은 A용액 40ml에 B용액 1ml을 첨가하여 使用하였다)에 1時間 침지 後 脫色液(acetic acid

: methanol : water=1 : 6 : 14)에서 1일간 脫色하였다

Peroxidase發色은 gel을 發色液(benzidin sol. : 0.03% H₂O₂ : water=1 : 1 : 4)에 1分間 침지하였다.

benzidine sol.은 benzidine 1g, acetic acid 9ml과 water 40ml의 混合溶液이다. 蛋白質 및 peroxidase의 發色이 끝난 gel은 5% Acetic acid溶液에 保存하였다

酵素活性測定: 1) Peroxidase assay : enzyme crude extract 0.2ml을 assay mixture[guaiacol 1ml, 1% H₂O₂ 20ml, 0.1M acetate buffer (pH5.2)470ml] 5ml에 넣어 60초간 反應시킨 後 500nm에서 optical density차이를 測定하여 다음과 같이 specific activity를 계산하였다.

$$\text{specific activity} = \frac{\Delta \text{O.D.} \times 1000}{\text{protein(mg)}}$$

2) Polyphenol oxidase assay : 酵素的 基質로는 benzidin과 catechol을 使用하였다. benzidin을 基質로 使用할 때는 crude extract 0.5ml을 5ml의 assay mixture[benzidine 7g, 0.1M acetate buffer(pH4.8)]에 넣고 60초간의 optical density의 (600nm) 차이를 測定하였으며 반면 catechol을 기질로 使用할 때는 crude extract 0.5ml을 5ml의 assay mixture[catechol 1g, 0.1M phosphate-citrate buffer(pH6.0) 119ml]에 넣고 60초간 optical density(420nm)의 차이를 測定하였다.

結果 및 考察

傷處 및 發病이 peroxidase 活性和 protein含量에 미치는 影響.

紫斑病에 感染된 種子和 機械的 혹은 人爲的으로 傷處가 생긴 種子の peroxidase活性和 및 protein含量의 變化를 보기 위하여 健全한 種子, 自然的으로 種皮가 裂開되어 균열이 생긴 種子, 人爲的으로 傷處를 낸 種子 및 紫斑病에 感染된 種子を 가지고 酵素活性和 및 protein含量을 調査하였다. 그 結果 抽出液 0.2ml當 protein含量은 각각 32.5mg, 36.5mg, 39.5mg, 33.0mg으로 各種子들간에 큰 差異를 볼 수 없었으며 peroxidase活性和은 健全한 種子 自然的으로 裂開된 種子, 人爲的으로 傷處를 낸 種子들은 각각 61.5units, 50units, 63units로 별 差異가 없으나 紫斑病 感染 種子是 121units로 현저히 높은 活性和을 보였다(Fig.1.). 이러한 結果는 이미 보고된 바와 같이^{6),7),11),12)} 大豆에 있어서도 紫斑病菌에 對한 生化學的 抵抗力 機作으로 peroxidase의 活性和이 높아진 것으로 생각되며, 機械的 또는 人爲的 傷處와 大豆 種子の peroxidase活性和은 無關한 것으로 생각된다.

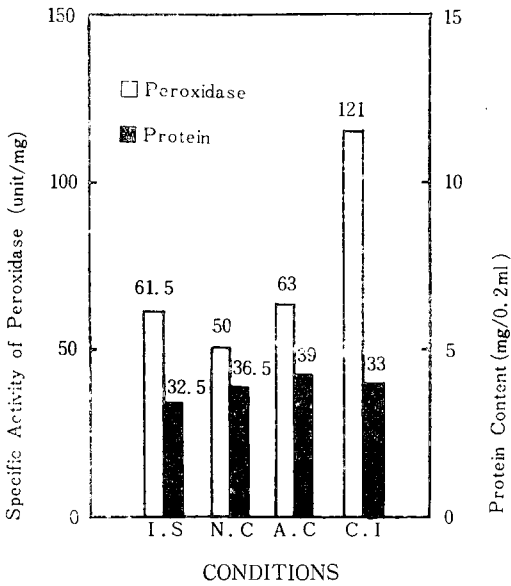


Fig. 1. Peroxidase activity and protein content in dry soybean seeds under various conditions
 I.C.: Intact seed,
 N.C.: Naturally cracked seed,
 A. C.: Artificially cut seed,
 C.I.: *C. kikuchii* Infected seed.

大豆 部位別 peroxidase 活性 및 protein 含量

앞에서 밝혀진 증가된 peroxidase의 활성이 大豆種子의 어느 部位와 關聯이 있는지를 밝히기 위하여 健全한 種子와 紫斑病에 感染된 種子를 각각 種皮와 胚乳로 分離하여 調査하였다.

抽出液 0.2ml當 protein含量은 健全한 種子의 胚乳에서 4.6mg 感染된 種子의 胚乳에서 4.7mg으로 差異가 없었으며 種皮의 胚乳에서도 각각 0.038mg, 0.044mg으로 별 차이가 없었다(Table 1). peroxidase의 活性度를 比較하면 胚乳는 健全種子 50, 感染種子 52로 차이가 없으나 種皮에서는 健全種子 842에 비하여 感染種子是 2,091로 感染種子에서 약 2.5배나 높은 活性을 나타냈다(Table 1).

Table 1. Protein content and peroxidase activity in cotyledon and seedcoat between healthy and infected soybeans

Seed(parts)	Protein (mg/0.2ml)	Peroxidase (spec. act.)
Cotyledon		
Healthy	4.6	50
Infected	4.7	52
Seed coat		
Healthy	0.038	842
Infected	0.044	2,091

Peroxidase isozyme pattern.

感染된 種子의 種皮에서 peroxidase의 活性度가 높은 것이 단순한 抵抗性 機作으로서의 酵素 活性의 增加인지 혹은 새로운 isozyme이 생겼는지, 혹은 種子表面에 있는 病原菌의 菌絲에서 peroxidase를 分泌하기 때문인지를 밝히기 위하여 7% polyacrylamide gel을 사용하여 電氣泳動을 實施하였다. 그 結果 peroxidase isozyme pattern은 健全種子의 種皮와 感染種子의 種皮에서 同·하였으며 紫斑病菌은 전혀 다른 pattern을 보였다(Fig. 2).

또한 感染種子의 band는 더욱 진하게 染色이 되어 酵素 活性이 높은 것을 알 수 있었으며 이러한 결과로 볼 때 大豆 種子 자체의 病原菌에 對한 生化學的 反應으로 peroxidase活性이 높아졌음을 알 수 있다.

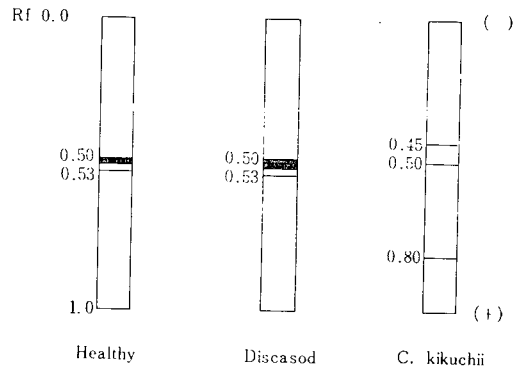


Fig. 2. Peroxidase zymogram of polyacrylamide gel.

Polyphenol-oxidase activity.

健全種子의 種皮, 感染種子의 種皮와 病原菌 菌絲의 polyphenol-oxidase活性度를 benzidine과 catechol을 基質로 하여 測定한 結果 大豆와 菌絲 모두 酵素의 活性을 測定할 수 없을 정도로 낮았다. 혹시 分析法의 잘못이 아닌가 하여 벼의 polyphenol-oxidase를 同·한 方法으로 分析해본 結果 틀림이 없음을 알 수 있었으며(Table 2),

Table 2. Polyphenol oxidase activity in soybean seed-coat, *C. kikuchii* mycelium, and rice leaf

Sources	Catechol	Benzidine
Soybean		
Healthy	u.d.*	u.d.
Infected	u.d.	u.d.
<i>C. kikuchii</i>	u.d.	u.d.
Rice leaf(unit)**	58	11

* : u.d. = undetectable
 ** : unit = $\Delta OD \times 1000$

이러한 것으로 볼 때 紫斑病 感染과 大豆種子의 polyphenol-oxidase의 活性化는 無關係를 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면 紫斑病 感染과 大豆種子의 生化學的 反應으로서 種皮의 peroxidase活性的 增加는 앞서의 많은 研究者들이 밝힌 peroxidase를 抵抗性機作^{5-8),11),15)}과 關係해서 더 많은 연구가 必要하다고 생각되며 또한 物質代謝가 낮은 休眠狀態의 種子에서 이와같은 抵抗性機作만이 選擇的으로 活性化된다는 것은 生化學的으로도 重要的 發見이라 생각된다.

摘 要

*Cercospora kikuchii*에 의해서 發病된 大豆種子의 부패균에 대한 획득저항성기작을 구명코자 本 研究를 實施하였다.

1. 大豆의 健全種子, 자연열개증자, 人爲的 상처증자 및 紫斑病 感染種子內의 全蛋白質 含量에는 차이가 없었으나 peroxidase活性도는 感染種子에서 월등히 높았다.

2. 大豆의 健全種子和 紫斑病 感染種子の 種皮 및 子葉內의 蛋白質含量에는 큰 차이가 없었으며 peroxidase 活性도는 子葉에서는 차이가 없었으나 種皮에서 건전한 種皮보다 紫斑病에 感染된 증자가 2.5배 程度 높은 活性도를 보였다.

3. Polyphenol oxidase는 大豆의 健全種子和 紫斑病 感染種子 모두 活性도가 너무 낮아 測定할 수 없었다.

4. 電氣泳動에 의한 peroxidase isozyme pattern은 健全種子和 感染種子간에 차이가 없었다.

5. 紫斑病에 對한 抵抗性機作은 紫斑病菌에 의하여 大豆種皮 自體內에서 生化學的 防禦機作이 더욱 活性化하였으며 peroxidase活性도의 증가는 病原菌에 대한 反應으로 思料된다.

LITERATURE CITED

1. Deverall, B.J. 1977. Defense mechanism of plants. Cambridge University Press. Cambridge.
2. Heitefuss, R., and P.H. Williams. (eds). 1976. Physiological plant pathology., Encyclopedia of plantphysiology, New Series, vol. 4. Springer-Verlag, New York.
3. Horsfall, J.G., and E.B. Cowling. 1980. Plant disease. vol.5. How plants defend themselves. Academic Press.
4. Jakoby, W.B. 1971. Methods in Enzymology. vol. 22:565-578. Academic Press, New York.
5. Lehrer, R. I. 1969. Antifungal effects of peroxidase systems. J. Bacteriol. 99:361-365.
6. Lovrekovich, L., Lovrekovich, H., and Stahmann, M.A. 1963. The importance of peroxidase. Phytopathology 58:193-198.
7. Lovrekovich, L., Lovrekovich, H., Stahmann, and M.A. 1968. Tobacco mosaic virus induced resistance to *Pseudomonas tabaci* in tobacco. Phytopathology 58:1034-1035.
8. Macko, V., W. Woodbury., and M.A. Stahmann. 1968. The effect of peroxidase on the germination and growth of mycelium of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Phytopathology. 58:1250-1254.
9. Park, W.M., and H. Stegemann. 1979. Rice protein pattern comparison by various PAGE-Techniques in slabs. Z. Acker-u. Pflanzenbau. 148:446-454.
10. Rubin, B.A., and Artisikhovskaya., E.V., 1953. Biochemische charakteristik der Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber Mikroorganismen. Berlin: Akademie VIG
11. Rubin. B.A., E.V. Artsikhovskaya., and T.A. Proskurnikova. 1947. Oxidase conversions of phenols and their role in the phenomena of potato resistance to *Phytophthora infestans*. Biochimija 12:141-152.
12. Stegemann, H. 1979. Electrophoresis and focusing in slabs using the Panta-Phor apparatus for analytical and preparative separations in gels (Polyacrylamide, polyacrylamide agarose, agarose, starch, sephadex etc.) 32pp. Inst. Biochemie, Messweg 11, D-3300, Braunschweig (W-Germany).
13. Umaerus, V. 1959. The relationship between peroxidase activity in potato leaves and resistance to *Phytophthora infestans*. Amer. Potato. J. 36 :124-131.
14. Wheeler, H. 1975. Plant pathogenesis. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, New York.