

## Brassica속 작물 유묘에서 저온처리에 따른 생화학적 변화\*\*

남민희<sup>1\*</sup> · 박우철<sup>2</sup> · 박경배<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 영남농업시험장, <sup>2</sup>경북대학교 농화학과

**초록** : 유채(*B. napus*)와 산동채(*B. campestris*)를 공시하여 발아초기단계에서의 저온처리가 분자산소의 생물학적 환원과 관련이 있는 여러가지 생화학적 인자에 미치는 영향을 분석하여 작물 내한성 기작을 생화학적으로 구명하고자 한 바, 저온장해는 산동채에 비해 유채가 더욱 심하였고 저온처리후 24시간 회복시 유채와 산동채의 peroxidase 활성도는 뿌리부위에서 각각 33%와 87%, 배측부위에서 84%와 206% 정도 크게 증가하였으며 특히 내한성이 강한 산동채가 유채보다, 배측부위가 뿌리보다 약 2.5배 이상 더 높은 효소활성 증가율을 보였다. 또한 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)는 회복직후 부터 급격히 축적되기 시작하여 회복 8시간째에 최고치에 도달하였으며 그 축적정도는 산동채에 비해 내한성이 약한 유채에서 더욱 심하였고, 24시간 회복시에도 산동채는 거의 무처리 수준까지 회복되었으나 유채는 약 38%의 O<sub>2</sub><sup>-</sup>가 여전히 축적되어 있었다. 저온처리 직후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 감소 정도 역시 산동채가 15% 정도인데 반해 유채는 2%에 불과하였고, 회복시간이 경과함에 따라 산동채는 거의 정상수준까지 회복되었으나 저온장해가 심하였던 유채는 불안정한 회복양상을 보였다. 아울러 유채의 배측 및 뿌리부위에서의 peroxidase 활성증가에는 Uniconazole 처리후 저온 병행처리가 단독처리보다 훨씬 더 효과적이었으나 새로운 동위효소의 출현은 볼 수 없었다(1995년 3월 10일 접수, 1995년 4월 13일 수리).

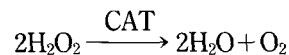
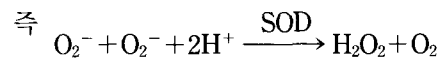
### 서 론

대부분의 식물체는 저온처리(빙결점 이상)에 의해 내한성이 증대된다고 알려져 있으며,<sup>1-3</sup> Weiser<sup>4</sup>)와 Sakai 등<sup>5</sup>)은 저온처리후 광조건하에서 회복시키면 저온처리 중에 유도되는 내한성 증대보다 훨씬 더 효과적이라고 보고하였다. 식물체를 저온처리하면 막내의 지질조성이 변하며,<sup>6</sup> 또한 sucrose,<sup>11</sup> raffinose,<sup>7</sup> sorbitol,<sup>11</sup> proline,<sup>8-9</sup> polyamine,<sup>9</sup> ascorbate나 glutathione,<sup>1,10</sup> glycinebetain<sup>11-12</sup>) 등 저분자의 동결보호물질(cryoprotectants)이 축적된다고 하였고 특히 sucrose는 저온처리시 그 수준이 10배나 증가된다고 하였다.<sup>13</sup> 또한 1984년 Steponkus<sup>14</sup>)는 작물 생산성과 저온 stress와의 관계에 대해 기보고된 연구 결과들을 종합검토해 본 결과, 이들이 비록 수많은 정보를 제공해 주고는 있지만 이들 서로간에 상관관계를 구한다는 것은 매우 어려운 일이라고 지적한 바 있다.

최근에는 수도 냉해발현의 화학적 인자가 광조건하에서 축적되는 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)라는 보고와 함께 superoxide dismutase(E.C 1.15.1.1,SOD)의 세포내 생리적 기능에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다.<sup>15-18</sup> Mitochondria내 전자전달계에서 산소 1전자 반응에 의해 생성되는 superoxide(O<sub>2</sub>+1e→O<sub>2</sub><sup>-</sup>)는 free radical로 존재하며, 강력한 환원력을 지닌과 동시에 산화제로도 작용하여 호흡연쇄체내의 cytochrome C를 환원시킬 뿐만 아니라

세포구성물질들을 파괴하여 결국은 세포를 죽이는 물질로 알려져 있으며<sup>19</sup>) 이러한 기작을 이용하여 개발된 제초제가 바로 paraquat(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium ion)이다.<sup>20</sup>

Superoxide에 의해 유도되는 효소인 superoxide dismutase는 O<sub>2</sub><sup>-</sup>를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub>로 dismutation 시킴으로써 유해산소에 대한 세포보호 기능을 갖는다고 하였으며, 이때 생성·축적되는 과산화수소의 분해에는 아래와 같이 peroxidase(EC 1.11.1.7,POD)와 catalase(EC 1.11.1.6, CAT)가 관여할 것이다.



이러한 관점에서 내한성 정도가 크게 다른 내한유채와 균위산동채를 공시하여 전보<sup>21</sup>)와 동일한 가설을 설정하고 발아초기단계에서 저온처리에 따른 효소활성도 변화와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 세포내 축적양상 등을 종합적으로 비교 검토하여 생화학적 작물 내한성 기작구명을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

찾는말 : *Brassica*, cold shock, cold tolerance, peroxidase, superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide

\*연락처자

\*\*본 논문은 "작물내한성 기작구명을 위한 생화학적 연구"의 제2보임

재료 및 방법

공시재료 및 생육방법, 효소의 추출, peroxidase 및 catalase 활성도 측정, 그리고 단백질 정량 및 조직추출액중의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량 분석 등은 전보<sup>21)</sup>에서와 동일하다. Peroxidase와 catalase의 효소 활성도 단위는 30°C에서 분당 1 μmole의 과산화수소를 분해시킬 수 있는 효소의 양을 1 unit(U)로 하였으며 단백질 mg당 효소의 unit인 비활성도로 나타내었다.

저온처리는 내한유채 및 군위산동채 6.4일 유묘를 1±1°C 정도의 냉장고에서 15시간 저온처리한 후 정상생육조건(낮:24°C,15 hrs, 밤:20°C,9 hrs)하에서 24시간 회복시켰다. Superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 분석은 전보<sup>21)</sup>에서와 마찬가지로 superoxide dismutase를 불활성화시킨 후 얻어진 조직추출액을 Auclair 등<sup>22)</sup>의 방법에 따라 NBT를 사용하여 O<sub>2</sub><sup>-</sup>에 의해 환원된 NBT의 양을 530 nm에서 측정하였다. 반응계의 조성과 혼합순서는 조직추출액 0.3 ml를 1mM NBT 용액 0.5 ml에 가하여 혼합한 후 증류수 1.2 ml를 첨가하였다.

결과 및 고찰



Fig. 1. Comparison of cold tolerance of *B. napus* cv. Naehanyuchae and *B. campestris* cv. Gunwisandongchae at right after cold shock.

Table 1. Changes in peroxidase activities of *Brassica* seedlings according to the recovering time after cold shock (U/mg of protein)

Recovering time (hours)	Root		Hypocotyl		Cotyledon	
	BN	BC	BN	BC	BN	BC
control	12.99	18.48	1.11	1.91	0.72	1.48
0	10.30	16.03	0.98	1.43	0.67	1.39
4	12.97	19.00	1.38	1.95	0.80	1.63
8	15.58	19.82	1.42	2.64	0.81	1.66
24	17.28	34.64	2.04	5.85	0.75	1.74

Cold shock was carried out by subjecting 6.4 days old seedlings to temperature of 1±1°C in refrigerator for 15 hours. Cold shocked seedlings were recovered by transferring from refrigerator to normal growth condition. BN, BC and control indicate *B. napus* cv. Naehanyuchae, *B. campestris* cv. Gunwisandongchae and 7 days old seedlings grown under the normal growth condition, respectively.

저온피해 양상 및 효소 활성도 변화

내한유채 및 군위산동채 6.4일 유묘를 1±1°C 정도의 냉장고에서 15시간 저온처리한 후 정상생육조건인 1일 15시간의 광조건하에서 회복시켰을 경우, 산동채에서는 외관상 거의 어떤 장애도 관찰할 수 없었던 반면 유채는 회복시 몇분 이내에 쓰러지는 현상을 보여 배측부위에서 저온장애가 심하였음을 관찰할 수 있었으나 외관상으로는 1~2시간 이내에 곧 회복되어 정상상태를 유지하는 것처럼 보였다(Fig. 1).

Table 1 및 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 15시간의 저온처리직후(0 hr)에는 모든 부위에서 peroxidase 활성도가 감소되었으며, 이후 회복시간이 경과될수록 뿌리 및 배측부위에서의 효소 활성도는 증가되었으나 자엽부위에서는 큰 변화를 보이지 않았다. 특히 저온처리후 1일간 회복시 뿌리 및 배측부위에서의 peroxidase 활성도는 유채(*B. napus*)가 각각 33%, 84% 증가되어 산동채(*B. campestris*) 무처리 수준까지 도달되었으며, 산동채는 각각 87%, 206% 정도 크게 증가되었다. 다시 말해서 내한성이 강한 산동채가 유채에 비해, 그리고 저온장애가 심하였던 배측부위가 뿌리에 비해 약 2.5배나 더 높은 효소활성 증가속도를 보인 것은 저온처리에 따른 내한성 증대<sup>1-3)</sup>와 관련시켜 볼 때 작물 내한성 판단기준으로 peroxidase 활성도가 이용될 수 있음을 시사해 주는 결과로 생각된다. 그러나 catalase 활성도는 유채와 산동채 둘다 저온장애가 심하였던 배측부위에서도 거의 변화를 보이지 않아 peroxidase와는 큰 대조를 보였다.

Superoxide 및 과산화수소 함량변화

저온처리직후 정상생육조건인 1일 15시간의 광조건하에서 회복시켰을 경우의 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 함량변화를 보면, Fig. 3에서와 같이 회복 8시간까지는 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 축적이 급격하게 이루어져 최고치에 도달한 다음 그 이후는 계속 감소하였으며, 이러한 경향은 유채(*B. napus*)가

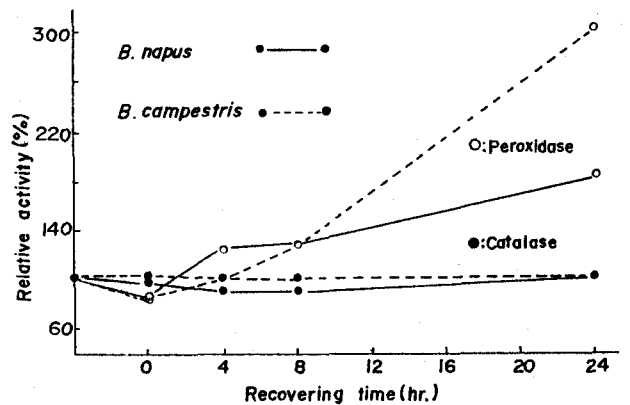


Fig 2. Changes in enzyme activities according to the recovering time after cold shock in the hypocotyl fraction of *Brassica* seedlings. All experimental conditions are the same as described in Table 1. Enzyme activity of the control at each time point was expressed as 100%.

산동채(*B. campestris*)에 비해 더욱 현저하였다. 특히 회복 8시간후의 superoxide 함량은 저온장해가 심하였던 유채에서는 무처리 대비 약 2.2배 증가된 반면 내한성이 비교적 강했던 산동채에서는 약 1.2배 증가에 그쳤으며, 회복 24시간후에도 산동채는 정상상태인 무처리 수준까지 회복되는데 비해 유채는 약 38% 정도의  $O_2^-$ 가 superoxide dismutase의 작용으로  $H_2O_2$ 와  $O_2$ 로 dismutation 되지 않고 여전히 남아 있는 것으로 보아  $O_2^-$  독성에 대한 세포 보호측면에서 내한성이 약한 유채가 산동채에 비해 불리함을 알 수 있었다. 저온처리후 회복시 superoxide( $O_2^-$ )는 회복 8시간까지는 급격하게 축적되다가 그 이후는 감소하였는데, 이러한 결과는  $O_2^-$ 가 빛에 의해 유도되는 물질이며<sup>23-24</sup>) 저온처리중에는 superoxide의 축적이 거의 일어나지 않으나 광조건의 정상생육조건으로 환원시키면 축적되기 시작하여 벼의 경우 약 8시간후에 최고치에 도달한다는 김 등<sup>25</sup>)의 보고와도 일치하였다. 독성물질인 superoxide의 축적정도는 유채(*B.*

*napus*)가 산동채(*B. campestris*)보다 더욱 심하여 저온장해가 더 컸던 것으로 판단되었으며, 이는 냉해발현의 화학적 인자가 superoxide라는 보고<sup>25</sup>)를 뒷받침해 주는 결과로 생각되었다.

또한 무처리에서의  $H_2O_2$  함량이 산동채(*B. campestris*)에 비해 유채(*B. napus*)가 약 3% 정도 높을 뿐만 아니라 저온처리후(O hr)에도 유채의  $H_2O_2$  함량은 무처리에 비해 2% 정도의 감소에 그친 반면, 산동채는 저온처리중에 15% 정도 감소되어 이후 superoxide dismutase의 작용에 따른  $H_2O_2$  축적에 대비하는 측면에서도 유채보다 유리함을 알 수 있었다. 아울러 저온처리 후 회복시에도 균위산동채의  $H_2O_2$  함량은 회복시간이 경과할수록 계속 증가하여 회복 24시간 후에는 정상조건인 무처리 수준까지 도달되었지만, 저온장해가 심하였던 내한유채의  $H_2O_2$  함량은 회복 후 8시간까지는 다소 증가하다가 그 이후는 감소하여 불안정한 회복양상을 보였다(Fig. 4). 이러한 결과는  $H_2O_2$  농도가 정상수준보다 매우 낮을 경우에는 catalase가 peroxidase 활성을 나타낸다는 John의 보고<sup>26</sup>)로 미루어 볼 때, 저온처리시 유채에 비해 더 높은  $H_2O_2$  감소율을 보이는 산동채가 더 높은 peroxidase 활성증가율을 보였던 것으로 추정되었다.

Table 2는 발아후 3일째에 0.3 ppm Uniconazole로 전처리된 내한유채 6.4일유묘를 상기와 동일한 방법으로 저온처리한 후 회복시켰을 경우의 peroxidase 활성도 변화를 분석해 본 결과이다. Uniconazole과 저온 병행처리후 회복시, 뿌리 및 배측부위에서의 효소활성도는 회복시간이 경과될수록 증가되어 24시간 회복으로 무처리 대비 각각 70%, 98%의 증가를 보였으나 자엽부위에서는 거의 영향을 받지 않았다. 이러한 결과를 Fig. 2 및 전보<sup>21</sup>)의 내한유채 유묘에 0.3 ppm Uniconazole 처리로 배측 및 뿌리부위에서의 peroxidase 활성도가 각각 65%, 15% 증가한다는 결과와 비교해 볼 때, 내한유채의 peroxidase 활성도 증가에는 생장억제제와 저온 병행처리가 단독처리보다 훨씬 더 효과적이었음을

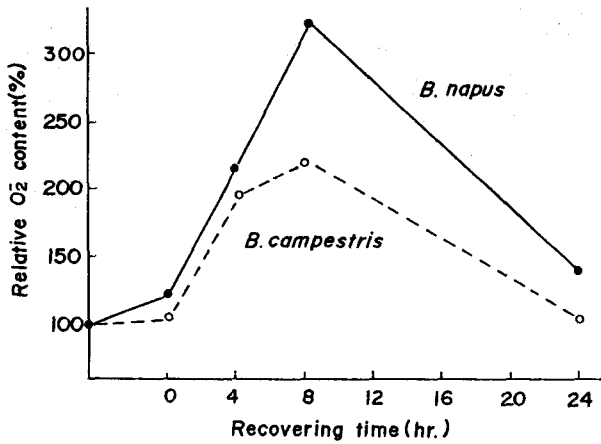


Fig. 3. Change of superoxide content due to the recovering time after cold shock in the hypocotyl fraction of *Brassica* seedlings. All experimental conditions are the same as described in Table 1.  $O_2^-$  content of the control at each time point was expressed as 100%.

Table 2. Changes in peroxidase activities according to the recovering time after cold shock in *B. napus* cv. Naehanyuchae seedlings pretreated with Uniconazole

Recovering time (hours)	POD activity (U/mg of protein)		
	Root	Hypocotyl	Cotyledon
control	8.39 (100)	0.85 (100)	0.81 (100)
0	7.40 ( 88)	0.84 (100)	0.73 ( 90)
4	7.80 ( 93)	0.90 (106)	0.72 ( 89)
8	11.76 (140)	1.43 (168)	0.64 ( 79)
24	14.22 (170)	1.68 (198)	0.81 (100)

Uniconazole 0.3 ppm was treated to 3 days old seedlings. Conditions of cold shock and recovery after 3.4 days of Uniconazole treatment were the same as described in Table 1. Numbers in parenthesis indicate percentage against control.

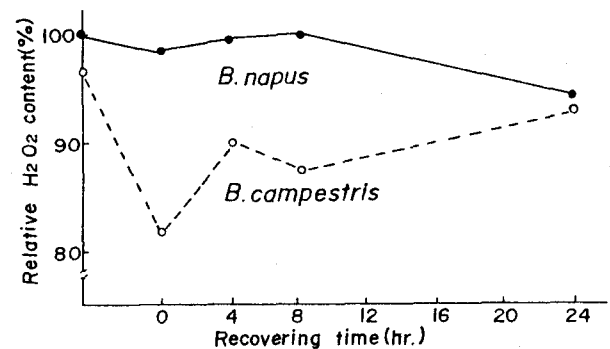


Fig. 4. Change of  $H_2O_2$  content due to the recovering time after cold shock in the hypocotyl fraction of *Brassica* seedlings. All experimental conditions are the same as described in Table 1.  $H_2O_2$  content of the control of *B. napus* cv. Naehanyuchae at each time point was expressed as 100%.

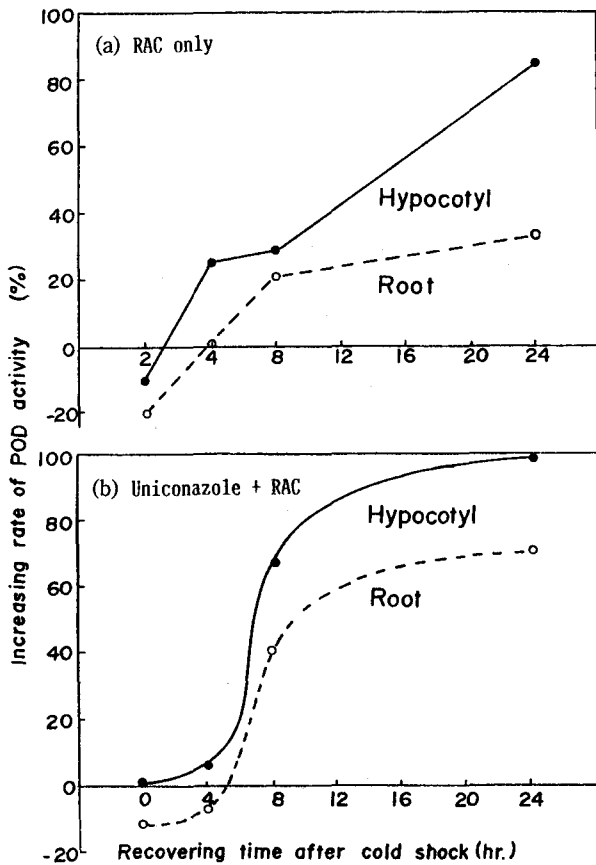


Fig. 5. An increasing rate of peroxidase activity upon the recovering time after cold shock (RAC) with (b) or w/o (a) Uniconazole in *B. napus* cv. Naehanyuchae seedlings.

알 수 있었으며 Uniconazole 처리는 배측, 저온처리는 뿌리부위의 효소 활성증가에 더 큰 영향을 미치는 것으로 추측되었다.

저온처리후 회복시간에 따른 유체의 배측 및 뿌리부위에서의 peroxidase 활성도 증가양상을 보면(Fig. 5), 저온 단독처리시는 불안정한 증가양상을 보이는 반면 Uniconazole과 저온 병행처리로는 식물 생장곡선과 거의 유사한 전형적인 S자형의 효소활성 증가양상을 보여, *Brassica*속 작물의 내한성 유도에는 peroxidase 활성증대가 관여함을 재차 추정할 수 있었고, 아울러 Uniconazole 처리에 따른 배측부위의 효소활성도 증가로 보아 내한성 증대의 재배적 조치효과로서의 생장억제제 이용가능성에 대해서도 앞으로 계속 검토해 볼 가치가 있을 것으로 생각되었다.

한편, 저온처리후 회복시간에 따른 peroxidase 및 superoxide dismutase 동위효소의 pattern 변화를 보면(자료 미제시), 그 어떤 처리도 동위효소 band의 강도에만 영향을 미쳤을 뿐 새로운 동위효소는 출현되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Levitt, J. (1972) Responses of Plants to Environmental Stresses, p. 697, Academic press, New York.

2. Levitt, J. (1980) Responses of Plants to Environmental Stresses: Vol.1, Chilling, freezing and high temperature stresses, 2nd Ed., p.497, Academic press, New York.

3. Sakai, A. and W. Larcher (1987) Frost Survival of Plants, p.321, Springer Verlag, Berlin

4. Weiser, C.J. (1970) Cold resistance and injury in woody plants. *Science* **169**, 1269-1278.

5. Sakai, A. and S. Yoshida (1968) The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiology* **5**, 160-174.

6. Lynch, D. V. and G. A. Thompson (1984) Microsomal phospholipid molecular species alterations during low temperature acclimation in *Dunaliella*. *Plant Physiol.* **74**, 193-197.

7. Parker, J. (1962) Relationships among cold hardiness, water soluble protein, anthocyanins, & free sugars in *Hedera helix* L. *Plant Physiol.* **37**, 809-813.

8. Krall, J. P., G. E. Edwards and C. S. Andreo (1989) Protection of pyruvate, Pi dikinase from maize against cold lability by compatible solutes. *Plant Physiol.* **89**, 280-285.

9. Kushad, M. M. and G. Yelenosky (1987) Evaluation of polyamine and proline levels during low temperature acclimation of citrus. *Plant Physiol.* **84**, 692-695.

10. Guy, C. L. and J. V. Carter (1984) Characterization of partially purified glutathione reductase from cold hardened and nonhardened spinach leaf tissue. *Cryobiology.* **21**, 454-464.

11. Coughlan, S. J. and U. Heber(1982) The role of glycinebetaine in the protection of spinach thylakoids against freezing stress. *Planta* **156**, 62-69.

12. Hanson, A. D. and W. D. Hitz (1982) Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol* **33**, 163-203.

13. Salerno, G. L. and H. G. Pontis (1989) Raffinose synthesis in *Chlorella vulgaris* cultures after a cold shock. *Plant Physiol.* **89**, 648-651.

14. Steponkus, P.L. (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 543-584.

15. Bolter, C. J. and W. Chefurka (1990) The effect of phosphine treatment on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in the granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Pesticide Biochem. Physiol.* **36**, 52-60.

16. Deby, C. and R. Goutier (1990) New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutase. *Biochem. Pharma.* **39**, 399-405.

17. Kim, J. P., C. K. Hahn and J. Jung (1991) Induction of antioxidigenic enzymes as defense systems in plant cells against low temperature stress:(I) Accumulation of pyruvate in cells during cold treatment and activation of antioxidigenic enzymes during post chilling period. *J. Kor. Agr. Chem. Soc.* **34**, 162-167.

18. Hahn, C. K., J. P. Kim and J. Jung (1991) Induction of antioxidigenic enzymes as defense systems in plant cells against low temperature stress:(II) Mn<sup>2+</sup>-induced SOD activation and enhancement of cold tolerance in rice seedling. *J. Kor. Agr. Chem. Soci.* **34**, 168-173.

19. Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. The

- radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science* **201**, 875-880.
20. Ebermann, R. and H. Pichorner (1989) Detection of peroxidase catalysed phenol polymerization induced by enzymatically reduced paraquat. *Phytochemistry* **28**, 711-714.
  21. 남민희, 박우철 (1995) Brassica속 작물 유묘에서 성장억제제 Uniconazole 처리에 따른 생화학적 변화. *한국농화학회지* **38**, 202-206.
  22. Auclair, C., M. Torres and J. Hakim (1978) Superoxide anion involvement in NBT reduction catalyzed by NADPH-cytochrome P-450 reductase: A pitfall. *FEBS Letters* **89**, 26-28.
  23. Packer, L. (1984) Biological sources of  $O_2^-$ . *Meth. Enz.* **105**, 59-96.
  24. Asada, K., K. Kiso and K. Yoshikawa (1974) Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *J. Biol. Chem.* **249**, 2175-2181.
  25. Kim, J. P., I. Hyun and J. Jung (1987) Postchilling accumulation of superoxide in cells and chilling injury in rice plant. *J. Kor. Agr. Chem. Soci.* **30**, 364-370.
  26. John, R. W. (1972) In 'Principles of Enzymology for the Food Sciences', Catalase and peroxidase, Vol.2, p.591-605, Marcel Dekker Inc., New York.

---

### Biochemical Changes in Brassica Seedlings Due to Cold Treatment

Min-Hee Nam<sup>1\*</sup>, Woo-Churl Park<sup>2</sup> and Kyeong-Bae Park<sup>1</sup> (<sup>1</sup>National Yeongnam Agricultural Experiment Station, Milyang, 627-130, Korea; <sup>2</sup>Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, 702-701, Korea)

**Abstract:** In order to determine the mechanism of cold tolerance in crops, changes in biochemical factors related with the biological reduction of molecular oxygen upon cold shock treatment were analyzed at an early stage of *Brassica* germination. As the cold shocked seedlings were recovered under the normal growth condition for 24 hours, the peroxidase activities in cold sensitive rape (*B. napus*) and cold tolerant "Sandongchae" (*B. campestris*) were considerably increased by 33% and 87% in root fraction and, 84% and 206% in hypocotyl, respectively. The content of superoxide ( $O_2^-$ ) in hypocotyl fraction was dramatically accumulated until 8 hours after recovery and then gradually decreased. The extent of superoxide accumulation was severer in *B. napus* than *B. campestris*. At 24 hours after cold shock,  $O_2^-$  content was decreased to the nearly control level in *B. campestris* but still remained by 38% in *B. napus*. Even though  $H_2O_2$  content in hypocotyl fraction was decreased only 2% in *B. napus* during cold shock, while in *B. campestris* it was severely decreased about 15%. On the other hand, the cold shock at 3 days after Uniconazole treatment was more effective in increase of peroxidase activity than each separate treatment.

\*Corresponding author

\*\*This is the second paper of a series, "Biochemical Studies for the Mechanism of Cold Tolerance in Crops".