

## Brassica속 작물 유묘에서 장기 저온 순화처리에 따른 생화학적 변화\*\*

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

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

**초록 :** 내한성이 약한 유채(*B. napus*)와 내한성이 강한 산동채(*B. campestris*)를 공시하여 발아초기단계에서의 장기저온순화처리가 peroxidase와 superoxide dismutase 활성도 및 동위효소 pattern에 미치는 영향을 분석하여 작물 내한성 기작을 생화학적으로 구명함과 아울러 내한성 관련 genetic marker를 탐색하고자 본 연구를 수행하였다. 장기저온순화시킨 유묘를 저온처리후 24시간 회복시켰을 경우, peroxidase 활성도는 유채와 산동채의 뿌리부위에서 각각 157%와 50%, 배측부위에서는 201%와 250% 정도 크게 증가하였고, superoxide dismutase 역시 배측 및 뿌리부위에서 크게 활성화가 일어남을 관찰할 수 있었다. 또한 배측부위에서의 단백질 함량도 유채는 약 11.4%, 산동채는 57.4% 증가하였다. 장기저온순화처리로 새로 생합성된 peroxidase 동위효소들중 특히 5번 band(pI 6.4)는 유채와 산동채의 뿌리부위에서 모두 출현될 뿐만 아니라 내한성이 강한 산동채의 배측부위에서도 강하게 출현되어 내한성 관련 genetic marker로서의 이용 가능성을 높여 주었다. 이상의 결과와 전보의 결과들을 종합적으로 고찰하여 저온 shock에 따른 분자산소의 생화학적 상호전환 모델을 제시하여 작물 내한성 기작을 생화학적으로 추론하였다(1995년 3월 10일 접수, 1995년 4월 13일 수리).

### 서 론

지난 10여년 동안 작물 내한성 연구의 2가지 주요목표중 그 첫째는 동결·융해의 반복과정(freeze/thaw cycle)중에 야기되는 세포장해 및 세포사인 기작을 구명하고자 하는 것이었으나<sup>1-3)</sup> 작물의 저온장해 기작은 매우 복잡하다는 것이 Olien<sup>2)</sup>에 의해 판명된 바 있다. 그럼에도 불구하고 치명적인 장해의 주요 원인으로 밝혀진 세포내 동결과정에 관여하는 필수적인 인자들을 규명하는데는 많은 성과가 있었다.<sup>4-5)</sup> 둘째, 저온순화중에 일어나는 생리 생화학적 변화를 종합적으로 이해하고자 하는 것으로, 동결·융해과정에 의한 식물체의 내성화 과정을 연구함으로써 내한성 기작을 해명하는데 많은 도움을 주고 있다.<sup>6)</sup>

일찌기 Siminovitch 등<sup>7)</sup>은 세포내 단백질의 축적이 내한성 유도와 밀접한 관계가 있다고 보고하였고, 저온순화중 수용성 단백질의 축적은 일반적인 현상으로 알려져 왔다.<sup>8)</sup> 저온순화처리시 단백질의 질적·양적 변화에 대한 전기영동적 연구에서도 많은 새로운 단백질이 합성된다고 하였으며<sup>9-10)</sup> 이들의 대부분이 고분자의 당단백질이라고 하였다.<sup>11)</sup> 특히 Krasnuk 등<sup>12-13)</sup>은 알팔파에서 월동기간중 대부분의 호흡관련 dehydrogenase들의 활성도가 증가하며, 아울러 ATPase, esterase, acid phosphatase, leucine aminopeptidase, peroxidase 및 일부 dehydrogenase 동위효소의 변화를 보고하였으나, 내한성 증대가 새로 변화된 동위효소의 특성 때문인지 아니면

조직내에 존재하는 다른 어떤 요인들 때문인지는 분명치 않다고 하였다.

Sarhan 등<sup>14)</sup>은 저온순화처리에 따른 RNA 염기조성의 변화를 보고하였고, 내한성이 약한 토마토와 내한성이 강한 알팔파에서 저온처리시 축적되는 mRNA에 대한 cDNA 단편도 분리된 바 있다.<sup>15-16)</sup> 그러나 아직까지 얼마나 많은 유전자들이 내한성 유도와 관련되어 있는지는 명확히 밝혀진 바 없으나 작물의 내한성은 상가적 유전자 작용(additive gene action)에 의해 조절되는 양적형질이며,<sup>17)</sup> Liesenfeld 등<sup>18)</sup>도 완두의 내한성은 양적형질에 의해 발현되며 최소한 3개 이상의 상가 유전자 또는 연관 그룹에 의해 조절될 것이라고 보고한 바 있다.

이상과 같이 작물 내한성에 관한 연구보문은 많으나, 아직까지 구체적인 내한성 기작은 밝혀져 있지 않고 또한 확실히 이용할 수 있는 내한성 조기검정법 조차 제대로 개발되어 있지 않는 실정이다. 따라서 본 연구에서도 전보<sup>19)</sup>와 동일한 가설 하에 내한성 정도가 크게 다른 Brassica속 작물 유묘를 이용하여 장기저온순화처리에 따른 peroxidase 및 superoxide dismutase 활성도 변화 및 동위효소 형태특성변화를 등전점 전기영동법으로 분석하여 앞에서 보고한 결과<sup>19-20)</sup>들을 종합적으로 고찰함으로써 작물 내한성 기작을 생화학적으로 추론하고, 내한성 관련 genetic marker 탐색을 위한 기초자료를 획득함과 동시에 이를 토대로 이상적인 작물 내한성 조기검정법을 개발하고자 하였다.

찾는말 : Brassica, cold acclimation, cold tolerance mechanism, peroxidase, superoxide dismutase

\*연락처자

\*\*본 논문은 "작물 내한성 기작규명을 위한 생화학적 연구"의 제3보임

Table 1. The influence of long-term cold acclimation on peroxidase activity of *Brassica* seedlings

Species	Treatment	POD activity (U/mg of protein)		
		Root	Hypocotyl	Cotyledon
<i>B. napus</i> ( <i>Naehanyuchae</i> )	Control <sup>a)</sup>	8.56 (100)	1.02 (100)	0.54 (100)
	Cold acclimation <sup>b)</sup>	21.97 (257)	3.07 (301)	0.68 (126)
<i>B. campestris</i> ( <i>Cunwisandongchae</i> )	Control	19.33 (100)	2.86 (100)	1.00 (100)
	Cold acclimation	29.03 (150)	10.11 (353)	1.54 (154)

<sup>a)</sup>6 days old seedling grown under the normal growth condition <sup>b)</sup>24 hr recovered after cold shock of the seedlings acclimated for 44 days

\* ( ): percentage against control

## 재료 및 방법

공시재료 및 생육방법, 효소의 추출 및 peroxidase 활성도 측정, 단백질 정량 등은 전보<sup>19)</sup>에서 설명한 바와 동일하다. 장기저온순화처리는 Perras 등<sup>21)</sup>의 방법에 준하여 내한유채 및 근위산동채 3일 유묘를 낮에는 6±1°C, 10시간의 광조건(8,000 lx), 밤에는 2±1°C, 14시간의 암상태로 조절된 발아기(Conviron사)에서 44일간 저온순화시킨 후 전보<sup>20)</sup>와 동일한 방법으로 유묘를 저온처리하였다. 등전점 전기영동과 동위효소 염색법 역시 앞의 보고<sup>19)</sup>와 같은 방법으로 실시하였으며, 단지 esterase는  $\alpha$ -naphthyl acetate 30 mg과 Fast blue RR salt 50 mg을 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 100 ml에 녹인 염색용액에 전기영동시킨 gel을 침지시켜 37°C에서 약 30분간 반응시켰다.<sup>22)</sup> Peroxidase 동위효소의 등전점은 amyloglucosidase(pI 3.6), trypsin inhibitor(pI 4.6), carbonic anhydrase I, II(pI 6.6, 5.9), myoglobin(pI 6.8), L-lactic dehydrogenase(pI 8.3) 및 trypsinogen(pI 6.3)의 등전점 marker를 이용하여 표준곡선을 작성하여 구하였다.

## 결과 및 고찰

### Peroxidase 활성도 및 단백질 함량 변화

정상생육조건(낮:24°C, 15 hrs, 밤:20°C, 9 hrs)하에서 생육시킨 6일묘(대조)와 거의 유사한 생육단계가 되도록 내한유채(*B. napus*) 및 근위산동채(*B. campestris*) 3일유묘를 44일간 저온순화(낮:6°C, 10 hrs, 밤:2°C, 14 hrs)시킨 다음 다시 1±1°C의 냉장고에서 15시간 저온처리한 후 정상생육조건하에서 24시간 회복시켰을 경우의 peroxidase 활성도 및 단백질 함량변화는 각각 Table 1 및 Table 2와 같다.

뿌리부위에서의 peroxidase 활성도는 유채가 무처리 대비 약 157% 증가하는데 비해 산동채는 50% 증가에 그쳤다. 반면에, 배측부위에서는 유채가 무처리 대비 201% 증가되어 산동채의 무처리 보다 다소 높았으나 근위산동채는 250% 정도 증가되어 내한유채 무처리에 비해 거의 10배나 더 높은 효소활성도를 보였다(Table 1). 이러한 결과로 미루어 보아 장기 저온순화처리가 유채에서는 뿌리부위, 산동채에서는 배측부위의 peroxidase 활성증가에 효과적임을 알 수 있었고, 이는 전기

Table 2. Effect of long-term cold acclimation on protein content in *Brassica* seedlings

Species	Treatment	Protein content (mg/ml)		
		Root	Hypocotyl	Cotyledon
<i>B. napus</i> ( <i>Naehanyuchae</i> )	Control	0.91	0.70	7.59
	Cold acclimation	0.90	0.78	5.34
<i>B. campestris</i> ( <i>Cunwisandongchae</i> )	Control	0.96	0.83	8.14
	Cold acclimation	1.51	1.31	4.68

Control and cold acclimation were the same as described in Table 1.

Table 3. Summary of the increasing rate of peroxidase activity influenced by the different stresses to the seedlings of *B. napus* cv. *Naehanyuchae*

Stresses	Increasing rate (%)		B/A
	Root (A)	Hypocotyl(B)	
Uniconazole (0.3 ppm)	15.3	65.4	4.27
RAC <sup>a)</sup>	33.0	83.8	2.54
Uniconazole+RAC	69.6	97.6	1.40
Cold acclimation <sup>b)</sup>	156.7	201.0	1.28

<sup>a)</sup>24 hr recovered after cold shock of 6 days old seedling <sup>b)</sup>24 hr recovered after cold shock of the seedlings acclimated for 44 days

\*Increasing rate of POD activity (%): (treat.- control)/control×100

영동에 의해서도 확인되었다(Fig. 1a 참조).

또한 뿌리 및 배측부위에서의 단백질 함량 역시 장기 저온순화처리로 증가하는 경향이였으며, 특히 한해의 영향을 받기 쉬운 배측부위에서 유채의 단백질 함량은 11.4% 증가에 그친 반면, 유채에 비해 내한성이 월등히 강한 산동채에서는 57.8%나 증가하였다(Table 2).

Table 3은 뿌리와 배측부위에서 각종 stress에 따른 peroxidase 활성증가율을 이제까지 수행하여 얻어진 모든 결과<sup>19-20)</sup>들을 종합하여 비교 요약해 본 것으로, 모든 처리에서 배측부위의 효소활성증가율이 뿌리보다 훨씬 더 높았다.

이와 함께 유채와 산동채를 저온처리후 24시간 회복시켰을 경우 배측부위에서의 peroxidase 활성도 증가가 무처리에 비해 각각 84%, 206%에 달한 반면,<sup>20)</sup> 44일간 장기저온순화시킨 유묘를 저온처리후 1일간 회복시켰을 경우에는 각각 201%, 253% 정도에 달하는 것으로 보아

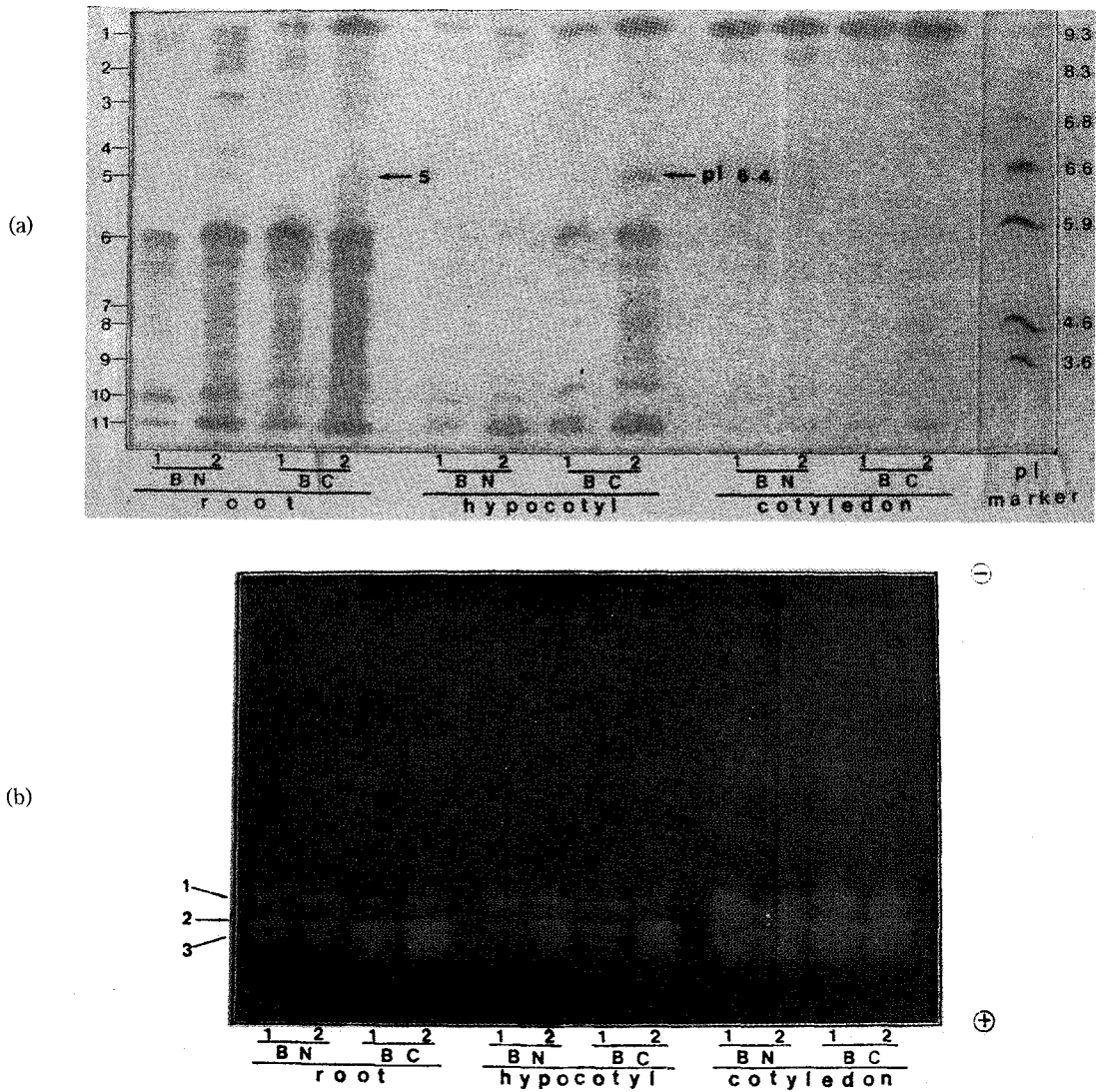


Fig. 1. Change of isozyme patterns in *Brassica* seedling fractions after long-term cold acclimation. \*1, control (6 DAG); 2, cold acclimation for 44 days. \*\*BC, *B. napus* cv. Naehanyuchae. BN, *B. campestris* cv. Gunwisandongchae (a) Peroxidase (pH 3.5~9.5:4.0~6.5=8:2) (b) Superoxide dismutase (pH 3.5~9.5:4.0~6.5=2:8)

장기저온순화처리가 내한성이 강한 산동채에서 보다 내한성이 상대적으로 약한 유채에서의 효소활성도 증가에 더욱 효과적임을 알 수 있었고, 이를 저온순화처리에 따른 내한성 유도<sup>23)</sup>와 비교검토해 보면 장기저온순화처리는 내한성이 강한 작물보다 약한 작물의 내한성 유도에 더욱 효과가 클 것으로 추측되었다. 그러나, 이와는 대조적으로 장기저온순화처리에 따른 배축부위에서의 단백질 함량은 유채가 11.4% 증가에 거친 반면 산동채는 57.8%나 증가하였는데, 이는 작물 내한성이 단백질 함량보다는 peroxidase 활성도와 더 밀접한 관련이 있기 때문이 아닌가 생각된다.

**동위효소 pattern 변화**

내한유채(*B. napus*) 및 군위산동채(*B. campestris*) 3일 유묘를 장기저온순화시킨 다음 저온처리후 24시간 회복시켰을 경우의 peroxidase 동위효소 pattern 변화를

보면(Fig. 1a) 뿌리와 배축부위에서는 주로 11번과 1번 band의 효소활성도가 뚜렷하였는데, 특히 유채의 뿌리부위에서는 6번 band(pI 5.7)가 효소활성증가에 크게 기여하였다. 또한 저온순화처리시 유채에서는 뿌리부위, 산동채에서는 배축부위의 효소활성도가 현저하게 증가함을 관찰할 수 있었고, 아울러 유채의 뿌리부위에서는 2, 3, 4 및 5번 band가, 산동채의 배축부위에서는 2, 3, 5, 7, 8 및 9번 band가 새로 출현되었다. 특히 저온순화처리에 의해 새로 생합성되는 동위효소들중 pI 6.4의 5번 band(→)는 유채 및 산동채 뿌리부위에서 모두 출현될 뿐만 아니라 내한성이 강한 산동채의 배축부위에서도 강하게 출현되었으며, 아울러 peroxidase 동위효소들은 주로 등전점 5.7(6번 band) 이상에서 많은 변화를 보이는 것이 특징적이었다.

Uniconazole이나 저온처리에 의해서는 출현되지 않던 새로운 peroxidase 동위효소들이 장기저온순화처리로

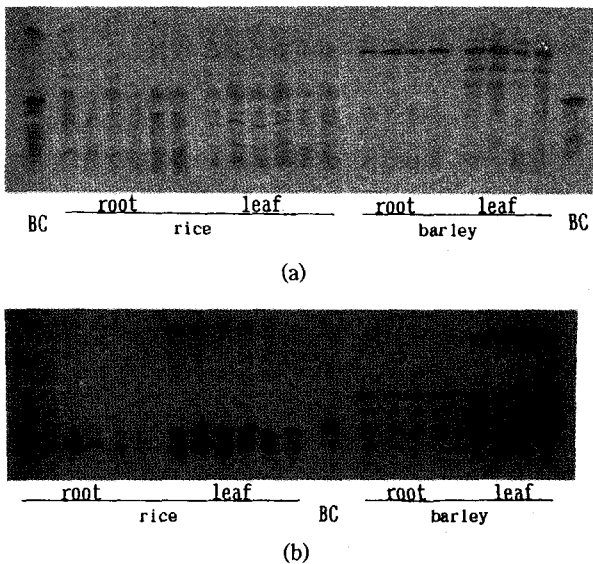


Fig. 2. Isozyme patterns of peroxidase (a) and esterase (b) among crops by isoelectric focusing (pH 3.5~9.5: 4.0~6.5=8: 2). \*BC: *B. campestris* cv. Gunwisandongchae

출현되었으며 특히 효소활성도가 높은 뿌리부위에서 가장 많은 수의 동위효소가 출현될 뿐만 아니라 그 변화 역시 현저한 것은 Shannon의 보고<sup>24)</sup>와 거의 일치하는 결과로서 많은 식물생장 호르몬이 분포하고 있는 뿌리부위에서 여러 동위효소의 존재 필요성을 시사해 주며, 아울러 저온순화처리에 의한 유전자의 변형으로 새로운 단백질이 합성된다는 Weiser<sup>25)</sup>의 가설과 저온순화시킨 시금치의 잎에서 새로운 mRNA가 유도된다는 Sarhan<sup>14)</sup> 및 Guy 등<sup>6,26)</sup>의 보고를 입증해 보이는 결과로 생각되었다. 특히 새로 출현되는 많은 peroxidase 동위효소들중 유채 및 산동채의 뿌리부위에서 모두 출현될 뿐만 아니라 내한성이 강한 산동채의 배측부위에서도 강하게 출현된 5번 band (pI 6.4)는 내한성 관련 생화학적 genetic marker로 이용될 수 있을 것으로 판단되었으나, 금후 *in vitro* mRNA translation 기법 등으로 다시 입증해 볼 필요성이 있다고 사료되었다.

그리고, 저온순화처리에 의해 새로 출현된 peroxidase 동위효소들은 주로 pI 5.7(6번 band) 이상의 높은 등전점에서 변화를 보였는데, 이는 소맥에서 저온순화중 등전점이 5.55 이상인 많은 새로운 단백질들이 합성된다는 Perras 등<sup>21)</sup>의 보고와도 거의 유사한 결과라고 추정된다. 또한 Fig. 2에서 보는 바와 같이 하작물인 벼 수품종과 동작물인 보리 수품종에서의 peroxidase 및 esterase 동위효소 분포를 보아도 내한성이 월등히 높은 보리의 동위효소들이 산동채나 벼보다 훨씬 높은 등전점에서 분포하고 있음을 관찰할 수 있었는데, 이러한 결과는 장기저온순화처리시 Brassica속 작물에서 새로 출현되는 5번 band (pI 6.4)의 genetic marker 이용가능성을 한층 더 높여주는 것으로 판단되었다.

한편, 장기저온순화처리시 superoxide dismutase(SOD) 활성도는 뿌리 및 배측부위에서는 유채에 비해 산동채가

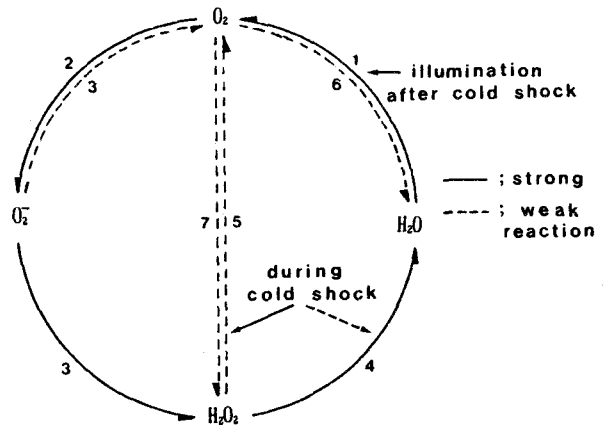


Fig. 3. A model of the biochemical interconversions of molecular oxygen species upon the recovery after cold shock. 1, photo-reduction by illuminated chloroplast; 2, various enzymic and nonenzymic oxidation; 3, superoxide dismutase; 4, peroxidase; 5, catalase; 6, metalloprotein oxidases; 7, flavoprotein oxidase and certain non-enzymatic oxidations.

더 높았으나 자엽부위에서는 그 반대였고, 뿌리 및 배측부위에서 유채는 1번 band가 강하게 출현되었지만 산동채는 2번 band가 강하게 나타나 중간 차이를 볼 수 있었다. 특히 장기 저온순화처리시 타부위에 비해 한해의 영향을 받기 쉬운 배측부위의 효소활성도가 현저하였는데, 유채에서는 2번과 1번이, 균위산동채는 2번과 3번 band가 효소활성도의 증가를 주로 좌우하였다. Superoxide dismutase(SOD)는 Mn을 cofactor로 함유하는 Mn-SOD와 Cu 및 Zn을 공유하는 Cu/Zn-SOD의 두 종류가 있고, 일부 식물세포에서는 Fe-SOD로 존재하는 것으로 알려져 있다. 이들중 Mn-SOD가 저온 stress에 대항하는 생체방어 시스템의 중요 구성성분일 것이라는 한 등<sup>27)</sup>의 보고와 3개의 동위효소중 특히 2번 band의 활성화가 현저하게 높아지는 것으로 보아, 2번 band는 아마 Mn-SOD일 가능성이 높을 것으로 추정되었으며 SOD도 peroxidase와 마찬가지로 작물 내한성과 관련이 있을 뿐만 아니라 각 동위효소의 역할 역시 서로 다르게 작용하는 것으로 생각되었다(Fig. 1b).

이상의 결과와 전보<sup>19-20)</sup>를 종합하여 작물 내한성 기작을 생화학적으로 추론해 보면 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 즉 온도가 급격히 떨어지는 밤동안에 저온 shock를 받은 작물이 낮에 광조건하로 노출되면 물분자의 광환원으로 생성되는 산소분자의 효소적 또는 비효소적 산화작용 등에 의해 독성물질인 superoxide( $O_2^-$ )가 과다 축적되기 때문에 저온장해가 발현되며, 이에 대한 세포 보호기능을 갖고자 즉시 superoxide dismutase의 활성화가 일어나며 이때 생성되는 과산화수소로부터의 세포내 동적평형을 유지하고자 catalase의 peroxidatic 작용에 의한 peroxidase 활성화 증가가 거의 동시에 뒤따라  $H_2O_2$ 를 안전한 물분자로 분해하는 것으로 추정되었다.

따라서 작물 내한성은 산소분자로부터  $O_2^-$ 의 생성에 관여하는 효소들과 superoxide dismutase, peroxidase 및

catalase 등 복합유전자(multiple gene)의 작용에 의해 발현되는 양적형질이며, 이러한 관점에서 peroxidase가 작물 내한성과 관련이 있을 것으로 판단되어 발아초기 단계에서 내한성 조기검정법을 개발하고자 4년간에 걸쳐 조사된 유채 및 산동채 수품종의 평균 포장월동율과 발아후 6일 유묘에서의 peroxidase 활성도와와의 상관관계를 분석해 본 결과, 기보고<sup>28)</sup>한 바와 같이 뿌리( $r=0.776^{**}$ ,  $n=18$ )와 배축( $r=0.941^{**}$ ,  $n=8$ )부위에서 고도의 정의 유의상관을 보여 실내분석만으로도 내한성 조기검정이 가능할 것으로 판단되었다.

## 참 고 문 헌

- Burke, M. J., L. V. Gusta, H. A. Quamme, C. J. Weiser and P. H. Li (1976) Freezing and injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **27**, 507-528.
- Olien, C. R. (1967) Freezing stresses and survival. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **18**, 387-408.
- Steponkus, P. L. (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 543-584.
- Mazur, P. (1969) Freezing injury in plant. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **20**, 419-448.
- Mazur, P. (1963) Kinetics of water loss from cells at sub-zero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* **47**, 347-369.
- Guy, C. L. and D. Haskell (1987) Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol.* **84**, 872-878.
- Siminovitch, D. and D. R. Briggs (1953) Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. IV. Effects of ringing on translocation, protein synthesis, and the development of hardiness. *Plant Physiol.* **28**, 177-200.
- Chen, H. H. and P. H. Li (1980) Biochemical changes in tuberbearing *Solanum* species in relation to frost hardiness during cold acclimation. *Plant Physiol.* **66**, 414-421.
- Brown, G. N. and J. A. Bixby (1975) Soluble and insoluble protein patterns during induction of freezing tolerance in black locust seedlings. *Physiol. Plant.* **34**, 187-191.
- Rosas, A., M. Alberdi, M. Delseny and L. Meza-Basso (1986) A cryoprotective polypeptide isolated from *Nothofagus dombevi* seedlings. *Phytochemistry* **25**, 2497-2500.
- Yoshida, S. (1984) Chemical and biophysical changes in plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (*Morus bombycis* Koidz. cv Goroji). *Plant Physiol.* **76**, 257-265.
- Krasnuk, M., G. A. Jung and F. H. Witham (1975) Electrophoretic studies of the relationship of peroxidase, polyphenol oxidase, and indoleacetic acid oxidase to cold tolerance of alfalfa. *Cryobiology* **12**, 62-80.
- Krasnuk, M., G. A. Jung and F. H. Witham (1976) Electrophoretic studies of several dehydrogenases in relation to cold tolerance of alfalfa. *Cryobiology* **13**, 375-393.
- Sarhan, F. and M. J. D' Aoust (1975) RNA synthesis in spring and winter wheat during cold acclimation. *Physiol. Plant.* **35**, 62-65.
- Schaffer, M. A. and R. L. Fischer (1988) Analysis of mRNA that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiol.* **87**, 431-436.
- Mohapatra, S., L. Wolfrum, R. J. Poole and R. S. Dhindsa (1989) Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold acclimation-specific genes of alfalfa. *Plant Physiol.* **89**, 375-380.
- Limin, A. E. and D. B. Fowler (1988) Cold hardiness expression in interspecific hybrids and amphiploids of the Triticeae. *Genome* **30**, 361-365.
- Liesenfeld, D. R., D. L. Auld, G. A. Murray and J. B. Swensen (1986) Transmittance of winterhardiness in segregated populations of peas. *Crop Sci.* **26**, 49-54.
- 남민희, 박우철 (1995) Brassica속 작물 유묘에서 생장억제제 Uniconazole 처리에 따른 생화학적 변화. *한국농화학회지* **38**, 202-206.
- 남민희, 박우철, 박경배 (1995) Brassica속 작물 유묘에서 저온처리에 따른 생화학적 변화. *한국농화학회지* **38**, 207-211.
- Perras, M. and F. Sarhan (1989) Synthesis of freezing tolerance proteins in leaves, crown, and roots during cold acclimation of wheat. *Plant Physiol.* **89**, 577-585.
- Harris, H. and D. A. Hopkinson (1976) Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics, p.290, North-Holland publishing Co., Amsterdam, Netherlands
- Guy, C. L. (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 187-223.
- Shannon, L. M. (1968) Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **19**, 187-210.
- Weiser, C. J. (1970) Cold resistance and injury in woody plants. *Science.* **169**, 1269-1278.
- Guy, C. L., K. J. Niemi and R. Brambl (1985) Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 3673-3677.
- 한창균, 김종평, 정진 (1991) 식물의 냉해에 대한 생체 방어기구로서 항산화 효소의 유도: (II)  $Mn^{2+}$  이온에 의한 세포내 SOD의 활성화와 벼 유묘의 내냉성 향상. *한국농화학회지* **34**, 168-173.
- 남민희, 박우철 (1992) Brassica속 작물의 내한성 조기검정을 위한 생화학적 특성분석. *농시논문집 (생명공학편)* **34**, 15-20.

---

**Biochemical Changes in *Brassica* Seedlings Due to Cold Acclimation Treatment\*\***

Min-Hee Nam<sup>1\*</sup>, Woo-Churl Park<sup>2</sup> and Yun-Jin Oh<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:** This study was aimed for determining the biochemical mechanism of cold tolerance in crops and for searching the biochemical genetic marker related with cold tolerance by the analysis of isozyme pattern. We investigated various biochemical changes induced by the long-term cold acclimation in cold sensitive rape (*B. napus*) and in cold tolerant "Sandongchae" (*B. campestris*) seedlings. The cold shock after long-term cold acclimation to *B. napus* and *B. campestris* greatly increased the activities of peroxidase 157% and 50% in root fraction and, 201% and 205% in hypocotyl, respectively. Simultaneously, the activity of superoxide dismutase was largely increased in hypocotyl fraction, too. Protein contents of hypocotyl fractions in *B. napus* and *B. campestris* were also increased by 11.4% and 57.8%, respectively. The band of pI 6.4 among peroxidase isozymes newly biosynthesized during long-term cold acclimation was emerged in the hypocotyl fraction of cold tolerant *B. campestris* as well as in the root of both species. From above and previous results, we presented a model of interconversions of molecular oxygen species due to the cold injury and biochemically inferred the mechanism of cold tolerance in crops.

---

\*Corresponding author

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