

대두에서 수분스트레스에 의한 항산화제와 항산화효소의 활성화 변화

김태성* · 강상재¹ · 박우철

경북대학교 농화학과, ¹상주대학교 원예학과

초 록 : 대두에서 수분스트레스시의 생화학적 변화를 확인하기 위하여 수분의 부족과 담수시의 항산화효소의 활성화 변화를 조사한 결과는 다음과 같다. Ascorbate peroxidase(APOX)의 활성화는 수분부족 처리시에 은하콩에서는 4일째까지는 완만한 증가를 보이다가 그 이후에는 급격히 감소하였고, 큰올콩에서는 완만한 감소를 보였다. 담수처리시 은하콩이 2일째까지 활성이 50%이상 증가하다가 점차 감소하는 경향이였다. 수분부족 처리시에 glutathione reductase 활성화는 은하콩과 큰올콩 모두 급격한 감소를 보였으며, 처리후 5일째에 90%이상 감소하였고, 담수처리시에는 초기 4일까지 지속적인 감소를 보이다가 그 이후에는 일정한 수준을 유지하였다. Dehydroascorbate reductase 활성화는 두품종 공히 4일 이후에 급격하게 감소하는 경향이였으나 담수처리시 은하콩에서 2일째에 70%이상 증가하다가 그 이후에는 거의 일정한 수준을 유지하였다. Monodehydroascorbate reductase 활성화는 은하콩의 경우는 4일째와 2일째에 각각 급격한 감소를 보이다가 그 이후에는 거의 일정하게 유지되었으며, 큰올콩은 수분부족 처리시에 완만한 감소를 보이나 담수처리시에는 활성화변화가 거의 없었다. 아스코브산과 환원형 글루타치온의 함량은 수분부족 처리시 대조구에 비해 두 품종 모두 감소하였고, 담수 처리시는 4일째까지는 담수처리가 수분부족 처리보다 더 크게 감소하다가 그 이후에는 회복되었다. (1999년 6월 3일 접수, 1999년 7월 14일 수리)

서 론

식물은 가뭄, 담수, 저온, 고온, 병충해, 양분결핍 등과 환경악화로 발생하는 산성비, 중금속, 오존 등의 다양한 스트레스에 노출되어 있다. 생명체는 각종 환경 스트레스에 노출되면 생체내에서 superoxide radical(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxy radical(OH·) 등과 같은 반응성이 높은 독성 활성산소종 농도가 증가하게 된다.^{1,2)} 활성산소종은 강한 산화력이 있어 세포막 분해, 단백질 분해, 지질 산화, DNA합성 억제, 광합성 억제, 엽록체 파괴 등 생체내에서 심각한 생리적인 장애를 유발한다. 환경 스트레스는 식물의 생장과 생산성에 영향을 미치는 중요한 인자로서 스트레스에 의해 발생하는 피해의 상당부분은 세포수준에서의 산화적 손상과 밀접한 관련이 있다.^{3,4)} 생체내에서 활성산소 제거시스템에는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), ascorbate peroxidase(APOX), dehydroascorbate reductase(DHAR), monodehydroascorbate reductase(MDHAR), glutathione reductase(GR) 등의 항산화효소와 ascorbic acid, tocopherol, glutathione, carotenoids 등의 항산화제들이 알려져 있다.⁵⁾

천연 항산화제와 항산화 효소는 유용물질로서 부가가치가 높을 뿐 만아니라 환경스트레스에 대한 방어기구를 이해하는데 중요한 역할을 한다. 식물체는 일련의 항산화 시스템을 구축하는 진화과정을 거치면서 현재까지 환경에 적응하여 왔기 때문에 병해충, 온도변화, 가뭄, 침수, 오존, 산성비 등의 스트레스를 받을 경우 다른 생물종과는 달리 스트레스에 대한 적응능

력이 다른 생명체보다 높을 것으로 생각되어 연구에 적합한 소재일 것으로 판단된다. 최근 환경 스트레스에 내성을 지닌 식물체 개발을 위해 유전자 조작을 통해 각종 항산화효소의 생산을 증폭시킨 형질전환 식물체 개발에 관한 연구가 활발히 진행 중에 있다.⁶⁻¹³⁾

본 연구에서는 대두에서 수분 스트레스에 대한 식물체의 방어기구를 이해하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 수분부족(drought)과 담수(flooding) 등의 수분 스트레스 처리시 항산화효소 활성화변화와 항산화제의 함량 변화를 연구하여 보고 한다.

재료 및 방법

식물생장 조건 및 수분 스트레스 처리

실험에 사용한 식물체의 생장조건 및 수분스트레스 처리는 전보¹⁴⁾와 같이 수분부족 처리는 5일까지 하였으며, 담수처리는 10일간 각각 3반복 처리하였다.

시료의 채취는 일정한 시간에 실시하였으며 각각 처리된 공시작물의 잎을 채취하여 분석 목적(효소활성도 측정용, 항산화제 측정용, 단백질 분석용, 예비용)에 따라 칭량하여 액체질소로 급속동결 후 -70°C에 보관하면서 실험을 수행하였다.

항산화효소 활성화 측정

0.5 g의 시료를 50 mM의 인산완충액(pH 7.0) 10 ml로 추출하여 12,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상정액을 효소활성도 측정을 위한 조효소액으로 하였다. 각 효소의 활성화 측정은 다음과 같은 방법으로 수행하여 대조구에 대한 상대적 활성으로 표시하였다.

찾는말 : 항산화효소, 항산화제, 아스코브산, 환원형 글루타치온
*연락처

Table 1. Relative content of ascorbate and reduced glutathione subjected to water stress in soybean leaves

Cultivar	DAT*	Relative ascorbate content (%)			Relative reduced glutathione content(%)		
		control	drought	flooding	control	drought	flooding
keonol kong	0	100	100	100	100	100	100
	2	100	95.6	91.2	100	91.0	65.0
	4	100	82.2	60.0	100	66.7	49.6
	5	100	43.0	61.3	100	25.2	50.4
	10	100	-	82.0	100	-	53.6
eunha kong	0	100	100	100	100	100	100
	2	100	94.6	87.8	100	70.0	60.0
	4	100	77.9	79.2	100	55.5	45.5
	5	100	38.0	85.9	100	26.7	50.8
	10	100	-	87.0	100	-	66.9

* Days after treatment.

Glutathione reductase(EC 1.6.4.2)는 50 mM 인산완충액(pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 0.5 mM 산화형 glutathione, 0.2 mM NADPH가 들어 있는 반응용액에 일정량의 효소추출액을 넣어 340 nm에서 NADPH의 감소율을 측정하여 나타내었다.¹⁵⁾

Dehydroascorbate Reductase(EC 1.8.5.1)는 50 mM 인산완충액(pH 6.5), 5 mM 환원형 glutathione, 0.5 mM dehydroascorbic acid가 들어 있는 반응용액에 일정량의 효소 추출액을 넣어 290 nm에서 ascorbate의 함량변화를 측정하여 표시하였다.¹⁶⁾ MDHA reductase(EC 1.6.5.4)는 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.6), 0.1 mM NADH, 2.5 mM ascorbic acid, 0.14 unit ascorbate oxidase가 들어 있는 반응용액에 일정량의 효소 추출액을 넣어 340 nm에서 NADH의 감소율을 측정하여 표시하였다.¹⁷⁾ Ascorbate peroxidase(EC 1.11.1.11)는 50 mM 인산완충액(pH 7.0), 0.5 mM ascorbic acid, 1 mM H₂O₂가 들어 있는 반응용액에 일정량의 효소추출액을 넣어 290 nm에서 산화된 ascorbate의 함량감소를 측정하여 표시하였다.¹⁸⁾

항산화제 함량 측정

0.3 g의 시료를 인산용액(5%) 10 ml로 추출한 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리한 뒤 아스코브산(ascorbate), 환원형 글루타치온(reduced glutathione)의 함량을 Law등의 방법¹⁹⁾으로 측정하였다. 각 물질의 정량은 각각의 검량선에 의하여 계산하였으며 대조구에 대한 상대적인 함량으로 나타내었다.

아스코브산 함량은 추출액에 0.03%(w/v)의 2,6-dichlorophenolindophenol(DCP)를 분홍빛이 날 때까지 넣고, 2%(w/v) thiourea meta-인산용액 0.5 ml, 2%(w/v) 2,4-dinitrophenylhydrazine(DNP) 0.25 ml를 넣은 후 37°C에서 3시간 반응시킨 후 냉각하여 반응을 정지시켰다. 여기에 85%(v/v) 황산용액 1.25 ml와 2% DNP 0.25 ml를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켜 520 nm에서 측정하였다. 환원형 글루타치온 함량은 0.1 M phosphoric acid buffer(pH 7.5), 4 mM EDTA, 0.6mM 5,5'-dithio-2-nitrobenzoic acid(DTNB), 0.25 mM NADPH, 1 unit glutathione reductase가 들어 있는 반응용액에 추출액을 넣고 412 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

항산화제 함량변화

대표적인 항산화제로 알려진 아스코브산과 환원형 글루타치온의 함량변화는 표 1과 같이 수분부족 처리시 시간이 경과함에 따라 계속 감소하는 경향을 나타내었지만, 담수 처리시는 4일 경과 후에는 회복되는 경향을 보였다. 아스코브산이나 환원형 글루타치온 함량의 감소가 적은 이유는 이것을 재생시키는 MDHAR 및, DHAR, GR등 일련의 효소활성 때문으로 판단되며 현재는 항산화효소의 작용에 초점을 맞추어 활발한 연구가 진행되고 있다.⁹⁻¹¹⁾ 아스코브산의 경우 함량감소 정도는 수분부족 처리시 큰울콩에서는 대조구에 비해 2일, 4일, 5일째에 각각 4.4%, 17.8%와 57.0%가 감소하였으며, 은하콩은 5.4%, 22.1%와 62.0% 감소하였다. 담수 처리시 큰울콩의 경우는 대조구에 비해 2일, 4일, 5일, 10일째에 각각 8.8%, 40.0%, 38.7%와 28.0% 감소하였으며 은하콩의 경우는 12.2%, 20.8%, 14.1%와 13.0% 감소하였다. 환원형 글루타치온의 함량은 수분부족 처리시 큰울콩은 대조구에 비해 2일, 4일, 5일째에 각각 9.0% 33.3%와 74.8% 감소하였으며 은하콩은 30.0%, 44.5%와 73.3% 감소하였다. 담수 처리시 큰울콩은 대조구에 비해 2일째와 4일, 5일, 10일째에 각각 35.0%, 50.4%, 49.6%와 46.4% 감소하였으며 은하콩은 40.0%, 54.5%, 49.2%와 33.1% 감소하였다. 글루타치온은 생체내에서 대부분(93% ~ 95%) 환원형으로 존재하며, 직접 활성산소를 제거하기도 하고 DHA를 아스코브산으로 환원시키는데도 이용되는데 산화된 글루타치온은 GR에 의해 다시 환원된다. 아스코브산과 글루타치온은 직접 활성산소를 제거하거나, 또는 APOX나 DHAR과 같은 항산화효소의 기질로 이용되기도 한다.

Ascorbate peroxidase(APOX) 활성

APOX는 전자공여체로 아스코브산을 이용하여 H₂O₂를 분해시키는 효소로서 산화된 아스코브산의 함량변화로 표시하였으며 그 활성도 변화는 그림 1과 같다. 큰울콩의 경우에는 수분부족 처리와 담수처리 두 품종 모두에서 초기 2일, 4일째까지 APOX의 활성이 증가하였다. 은하콩의 경우에는 수분부족 처리시 2일, 4일째 효소활성이 약간 증가하는 경향을 나타내었으며 담수 처리시 큰 증가를 보였다. APOX 효소활성의 감소는 수분부족 처리시 큰울콩의 효소활성은 대조구에 비해 2일,

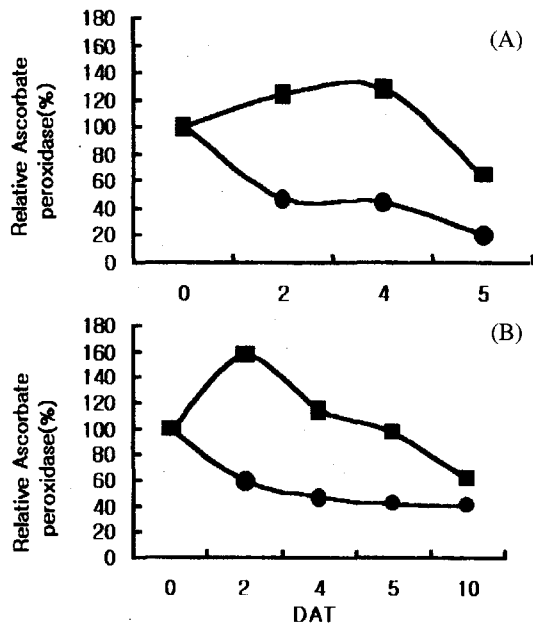


Fig. 1. Relative activity of ascorbate peroxidase subjected to water stress of drought(A) and flooding(B). ●—● : keonolkong ; ■—■ : eunhakong. Ascorbate peroxidase activities were determined by the oxidation of ascorbate($\mu\text{mol oxidized ascorbate/mg protein/min}$).

4일, 5일째에 각각 52.6%, 55.6%와 79.2% 감소하였고, 은하콩의 경우는 2일, 4일째에 각각 24.1%와 28.6% 증가하였다가 5일째는 36.4% 감소하였다. 담수 처리시 큰올콩의 효소활성은 대조구에 비해 2일, 4일, 5일과 10일째 각각 39.5%, 52.8%, 58.3%와 59.6% 감소하였고, 은하콩의 경우는 2일, 4일째에 각각 57.4%와 14.3% 증가하다가 5일째와 10일째에 각각 3.6%와 38.9% 감소하였다. 수분부족 처리시 SOD나 GR의 활성은 증가하는 것으로 알려져 있지만 APOX의 활성변화에 대한 결과는 거의 없는 실정이다.²⁰⁻²²⁾ 고등식물에서 엽록체와 세포질에 존재하는 APOX는 과산화수소의 제거에 중요한 역할을 하지만 산화적 스트레스에 반응하는 분자적 기작에 관하여는 아직 잘 알려져 있지 않으므로 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.²³⁾

Glutathione reductase(GR) 활성

GR은 광합성작용의 명반응에서 생성된 NADPH의 존재하에서 글루타치온을 환원형 글루타치온으로 환원시키는 효소이다.¹⁸⁾ 그림 2와 같이 큰올콩과 은하콩 모두 2일째에 대조구에 비해 효소활성이 크게 감소하는 경향이였다. 수분부족 처리 시에는 효소활성이 계속 감소하는 경향이였으며 큰올콩의 효소활성은 대조구에 비해 2일, 4일째와, 5일째 각각 53.8%, 76.7%와 91.7% 감소하였으며, 은하콩의 경우 54.5%, 76.9%와 91.0% 감소하였다. 담수처리 시에는 큰올콩의 효소활성은 대조구에 비해 2일, 4일, 5일째와 10일째 각각 61.5%, 66.7%, 75%와 72.3% 감소하였으며, 은하콩의 경우 18.2%, 38.2%, 30.0%와 36.4% 감소하였다. 담수 처리시에는 4일째 이후에 효소활성이 일정하게 유지되었는데 이 결과는 식물이 담수에 저항성을 획득하여 다시 광합성작용이 증가되어 NADPH의 공급

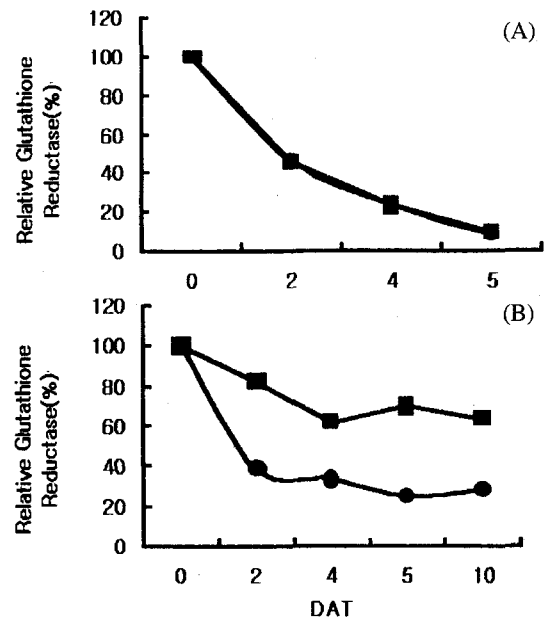


Fig. 2. Relative activity of glutathione reductase subjected to water stress of drought(A) and flooding(B). ●—● : keonolkong ; ■—■ : eunhakong. Glutathione reductase activities were determined by the oxidation of NADPH($\mu\text{mol NADPH/mg protein/min}$).

량이 증가되었기 때문이라고 생각할 수 있다. 수분스트레스 처리시 GR의 활성 감소는 NADPH의 공급과 큰 관련이 있는 것으로 판단되며 APOX가 H_2O_2 를 분해시키기 위해 아스코브산을 이용하면 산화된 dehydroascorbate나 monodehydroascorbate를 재환원하는 DHAR와 MDHAR가 연속적으로 작용한다는 것이 Yolanda등²⁴⁾ 과 Jose등²⁵⁾이외의 다수에 의해 제안되고 있다.

Dehydroascorbate reductase(DHAR) 활성

DHAR는 아스코브산 산화효소에 의해 산화된 dehydroascorbate를 아스코브산으로 환원시켜주는 효소¹⁸⁾로서 수분스트레스 처리시 그 활성도 변화는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보듯이 큰올콩의 효소활성은 대조구에 비해 수분부족 처리나 담수 처리시 모두 약간 증가하는 경향을 보였지만, 은하콩에 있어서는 2일째와 4일째에 큰 활성 증가를 보였다. 기간별 효소활성은 수분부족 처리시 큰올콩의 경우 대조구에 비해 2일째와 4일째에 각각 6.6%와 7.4% 증가하다가 5일째에 46.8% 감소되었다. 은하콩의 경우는 2일째와 4일째까지 각각 21%와 22.3% 증가하는 경향을 나타내다가 5일째 이후에는 56.3% 감소되었다. 담수 처리시 큰올콩의 경우는 대조구에 비해 2일, 4일, 5일째와 10일째에 각각 5.6%, 6.6%, 13.8%와 25.0% 증가하였으며, 은하콩의 경우는 각각 73.7%, 18.5%, 6.0%와 40.8% 증가하였다. 이 결과는 그림 1의 APOX의 활성변화와 관련해서 보면 큰올콩의 경우 APOX의 활성이 대조구에 비해 감소되었으며 DHAR활성이 약간 증가되는 경향이였다. 은하콩의 경우 APOX의 활성이 크게 증가하는 경향이므로 아스코브산의 산화량이 증가되고 이 결과로 DHAR의 활성이 증가되므로 이들 효소들이 일련의 연속과정으로 일어난다고 판단된다. 이 결과는 APOX와 DHAR 또는 MDHAR

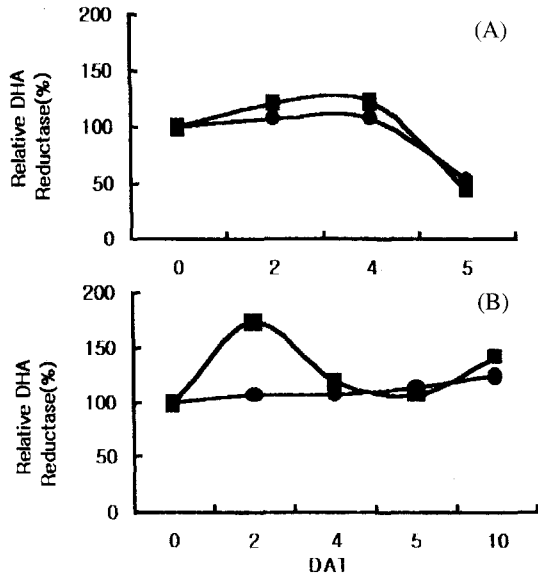


Fig. 3. Relative activity of dehydroascorbate reductase subjected to water stress of drought(A) and flooding(B). ●—● : keonolkong ; ■—■ : eunhakong. Dehydroascorbate reductase activities were determined by the formation of ascorbate($\mu\text{mol ascorbate/mg protein/min}$).

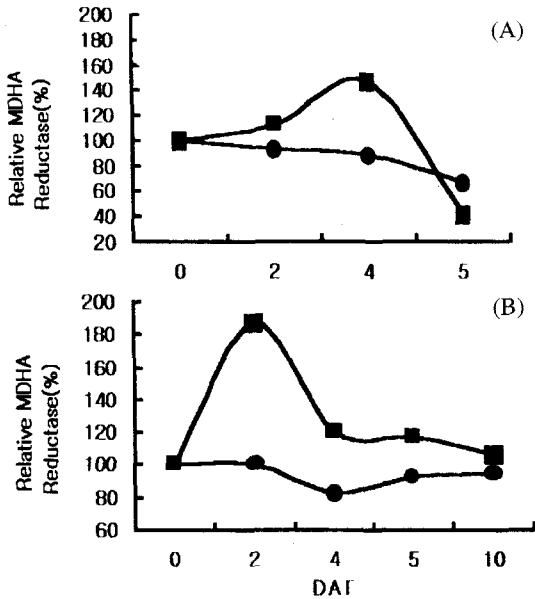


Fig. 4. Relative activity of monodehydroascorbate reductase subjected to water stress of drought(A) and flooding(B). ●—● : keonolkong ; ■—■ : eunhakong. Monodehydroascorbate reductase activities were determined by the oxidation of NADH($\mu\text{mol NADH/mg protein/min}$).

의 효소활성이 연속적으로 일어난다는 Yolanda의 보고²⁴와도 비슷한 결과이었다.

Monodehydroascorbate reductase(MDHAR) 활성

MDHAR는 아스코브산이 ascorbate peroxidase에 의해 산화형 monodehydroascorbate를 NADH 존재하에서 다시 아스코브산으로 환원하는 효소¹⁸로서 활성도 변화는 그림4와 같다. 그림 4에서 보듯이 큰올콩의 경우 수분부족이나 담수 처리시 모

두 대조구에 비해 큰 차이를 보이지 않았지만 은하콩의 경우 수분부족이나 담수 처리시 2일째와 4일째에 증가하였다. 특히 담수 처리시에는 대조구에 비해 높은 활성을 나타내었다. MDHAR의 기간별 효소활성은 수분부족 처리시 큰올콩의 경우 대조구에 비해 2일과 4일, 5일째에 각각 6.2%와 11.8%, 33.3% 감소하였고, 은하콩의 경우 2일째와 4일째에 12.3%와 46.7% 증가하다가 5일째에는 58.3% 감소하였다. 담수 처리시 큰올콩의 효소활성은 대조구에 비해 2일째와 4일, 5일째와 10일째에 각각 0.0%, 17.6%, 7.7%와 5.9% 감소하였고, 은하콩의 경우는 87.5%, 20.0%, 16.7%와 6.7% 증가하였다.

MDHAR도 DHAR와 마찬가지로 APOX의 활성과 상호관련성이 있다고 보고²⁴되고 있는데 큰올콩의 경우 대조구에 비해 스트레스 처리시 효소활성이 감소하였고 은하콩의 경우에는 효소 활성이 크게 증가되었다. 이결과는 앞에서 언급한 바와 같이 정상적인 상태에서는 APOX의 활성이 증가되면, 전자공여체로 아스코브산을 이용하기 때문에 아스코브산의 산화가 많이 일어나게 되고 이를 다시 환원시키기 위해서 MDHAR가 작용하여 그 활성이 증가될 것으로 생각된다. 수분스트레스 초기에는(2일째와 4일째) 큰올콩의 경우 APOX의 활성이 감소할 때 MDHAR의 활성은 큰 변화가 없었으나, 은하콩의 경우 APOX의 활성이 증가할 때 MDHAR의 활성도 증가한 것이 이와 같은 이유일 것으로 생각된다. 5일째 이후에는 APOX와 MDHAR 효소활성이 모두 감소하였다. MDHAR의 활성은 NADH를 필요로 하는데, 스트레스 하에서는 광합성작용, 엽록소의 함량의 감소 뿐 만 아니라 생체내의 대부분의 대사작용이 억제되기 때문에 NADH의 공급량도 감소된다.²⁵ 식물체내 대사작용은 MDHAR의 활성과 큰 관계가 있을 것으로 판단된다. Jose²⁵은 MDHAR가 활성 산소 제거시스템의 핵심적인 역할을 하며 DHAR는 MDHAR의 활성이 NADH의 공급이 감소되어 제한될 때만 작용한다고 보고하였다.

참고문헌

- Hewitt, N., Kok, G. and Fall, R. (1990) Hydroperoxide in plants exposed to ozone mediates air pollution damage to alkene emitters. *Nature* **344**, 56-58.
- Price, A. and Hendry, A. (1991) Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environ.* **14**, 477-484.
- Gardner, P. R. and Fridovich, I. (1991) Superoxide sensitivity of *Escherichia coli*. 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. Chem.* **266**, 1478-1483.
- Imlay, J. A. and Linn, S. (1986) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**, 1302-1309.
- Alscher, R. G. and Hess, J. L. (1993) Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca, Raton FL. pp. 136-174.
- Tepperman, J. M. and Dunsnur, P. (1990) Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol. Biol.* **14**, 501-511.
- Lagrimini, L. M., Bradford, S. and Rothstein, S. (1990) Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **2**,

- 7-18.
8. Aono, M., Kubo, A., Saji, H., Natori, T., Tanaka, K. and Kondo, N. (1991) Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that express the gene for glutathione reductase from *E. coli*. *Plant Cell Physiol.* **32**, 691-697.
 9. Suzuki, M., Miyamoto, R., Hattori, T., Nakamura, K. and Asahi, T. (1995) Differential regulation of the expression in transgenic tobacco of the gene for beta glucuronidase under the control of the 5'-upstream regions of two catalase genes from castor bean. *Plant Cell Physiol.* **36**, 273-279.
 10. Suzuki, M., Miyamoto, R., Hattori, T., Nakamura, K. and Asahi, T. (1995) Differential sets of cis-elements contribute to the expression of a catalase gene from castor bean during seed formation and postembryonic development in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol.* **35**, 1067-1074.
 11. McKersie, B. D., Bowley, S. R., Harjanto, E. and Leprince, O. (1996) Water deficient tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* **111**, 1177-1181.
 12. Guan, L. and Scandalios, J. G. (1993) Characterization of the catalase antioxidants defense gene Cat 1 of maize and its developmentally regulated expression in transgenic tobacco. *Plant J.* **3**, 527-5361.
 13. Van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D. Reupold-Popp, P. Jr., Sandermann, H. and Lamgebartels, C. (1994) Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Biotechnol.* **12**, 165-168.
 14. Kim, T. S., Kang, S. J. and Park, W. C. (1998) Changes of antioxidant enzyme activities subjected to water stress in soybean leaves. *Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.* **16**, 24-30.
 15. Dalton, D. A., Ressel, S. A., Hanus, F. J., Pascoe, G. A. and Evans, H. J. (1986) Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3811-3815.
 16. Dalton, D. A., Lamgeberg, L. and Treneman, N. C. (1993) Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiol. Plant* **87**, 365-370.
 17. Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **22**, 867-880.
 18. Asada, K. (1984) Chloroplast : formation of active oxygen and its scavenging. *Methods in Enzymol.* **105**, 422-429.
 19. Law, M. Y., Charles, S. A. and Halliwell, B. (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach chloroplasts. *Biochem. J.* **210**, 899-903.
 20. Burke, J. J., Gamble, P. E., Hatfield, J. L. and Quisenberry, J. E. (1985) Plant morphological and biochemical responses to field water deficits. I. responses of glutathione reductase activity and paraquat sensitivity. *Plant Physiol.* **79**, 415-419.
 21. Pastori, G. M. and Trippi, V. S. (1992) Oxidative stresses high rate of glutathione reductase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* **17**, 745-760.
 22. Tanaka, K., Masuda, R., Sugimoto, T., Omasa, K. and Sasaki, T. (1990) Water deficiency induced changes in the contents of defensive substances against active oxygen in spinach leaves. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2629-2634.
 23. Mittler, R. and Zilinskas, B. A. (1992) Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J. Biol. Chem.* **267**, 21802-21807.
 24. Yolanda, G., Inaki, I. O., Pedro, R. E. and Manuel B. (1995) Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stresses. *Plant Physiol.* **103**, 753-759.
 25. Jose, F. M., Manuel, B. Iturbe-Ormaetxe, I., Silvia, F., Robert, K. and Aparicio-Tejo, P. (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* **194**, 346-352.

Changes in Antioxidant and Antioxidant Enzymes Activities of Soybean Leaves Subjected to Water Stress

Tae-Sung Kim*, Sang-Jae Kang¹ and Woo-Churl Park(*Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea; ¹Department of Horticulture, Sangju National University, Sangju, 742-711, Korea*)

Abstract : This experiment was carried out to elucidate and investigate the changes in the content of antioxidants and the activities of antioxidant enzymes in the leaves of soybean subjected to water stresses. The results obtained were as follows; Leaves of soybeans subjected to water stresses have showed the differences in the activities of the antioxidant enzymes. In eunhakong, the activity of APOX was increased within a few days, but that of GR was decreased, whereas the activities of APOX and GR were gradually decreased in eunhakong. The activity of MDHAR of the leaves of eunhakong subjected to drought stress was gradually increased within 4days, whereas that of flooding was increased within 2days. We are supposed that the activities of APOX and MDHAR are coupled to maintain ascorbate concentration. In eunhakong, the relative activity of DHAR subjected to flooding was higher than that of drought. These results imply that DHAR is the only enzyme participating in the regeneration of ascorbate when the activity of MDHAR was limited by the deficiency of NADPH. The contents of ascorbate and reduced glutathione subjected to drought stress decreased continually, whereas those subjected to flooding stress recovered after five days of treatment.

Key words : water stress, antioxidant enzymes, antioxidants, ascorbic acid, reduced glutathione

*Corresponding author