

토마토 유식물의 Polyphenol Oxidase에 미치는 상해 및 Jasmonic Acid의 영향

진 선 영 · 홍 정 희
부산대학교 자연과학대학 생물학과
(1999년 11월 10일 접수)

Effects of Wounding and Jasmonic Acid on Polyphenol Oxidase in Tomato Seedlings

Sun-Young Jin and Jung-Hee Hong
Dept. of Biology, Pusan National University, Pusan 609-735 Korea
(Manuscript received 10 November, 1999)

The effects of wounding and jasmonic acid(JA) on polyphenol oxidase(PPO) in tomato(*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings were investigated. PPO was strongly induced by wounding or JA, and the response was also shown to be systemically induced by wounding. Mechanical wounding in cotyledon or leaf produced a signal that caused the concentration of PPO to increase in the unwounded cotyledon, in the first leaves but not in the second leaves. Severity of wounding and light intensity also affected wound induced change in PPO activity, JA showed a stimulatory effect on the loss of chlorophyll and the rapid increase in PPO activity. The PPO was clearly more active in the wounded leaves than in controls. The potency and specificity of the JA indicate a close relationship between JA and wound-induced changes in PPO in tomato species. JA and abscisic acid(ABA) acted similarly on both unwounded and wounded leaves, but the amount of PPO in the wounded leaves was always more than the respective controls. The highest increase in PPO activity occurred in wound- and JA-induced leaves of seedlings kept under bright lighting. Benzyladenine(BA) completely abolished JA- and ABA-induced PPO activity. The results suggest that JA-induced PPO activity is due to *de novo* PPO synthesis. Histochemical tests for PPO in stems of wound- and JA-treated tomato plants indicate that PPO was localized primarily in the outer cortex and xylem parenchyma. It is concluded that exogenously applied JA acts as stress agents and PPO may be a component of the inducible anti-herbivore defense response.

Key words : jasmonic acid, *Lycopersicon esculentum*, polyphenol oxidase, wounding, abscisic acid

1. 서 론

식물은 균류와 그 외의 미생물 병원균에 대하여 국부적 및 전 식물체의 반응을 유도하여 자신을 방어한다. 저항력이 있는 숙주식물과 상호작용을 하는 병원균은 부분적으로 고감도의 반응을 유발한다.¹⁾ 곤충의 침입에 반응하여 식물은 anti-herbivore phytochemicals과 단백질을 급속히 축적하는데 이러한 현상은 예측할 수 없는 환경에 적응하기 위한 식물의 방어전략의 하나이다.^{2,3)} Anti-insect 활성을 가진 inducible protein들은 proteinase, protease, anti-nutritive oxidative enzyme 및 2차 대사작용을 하는 효소들이다.⁴⁾ Jasmonates와 같은 신호분자는 식물반응을 유도하거나 조절하는 작용과 관련이 있다.

식물에서 상해는 여러 화합물의 증식을 일으키는데,

그 중 어떤 물질은 상처의 회복과 관련이 있으며, 또 다른 물질은 미생물 또는 초식동물에 대한 저항성을 증가시킨다.⁵⁾ 많은 과에서 잎의 상해는 proteinase inhibitor protein의 합성을 유도하며 wound-inducible proteinase inhibitor 유전자의 발현을 조절할 수 있는 몇 종의 화학 물질이 동정되었는데 jasmonates도 포함된다.⁶⁾ Jasmonic acid(JA)와 그 유도체(jasmonates)는 고등식물내에 널리 분포하고 있는 새로운 종류의 성장 조절물질로서 최근에 상당한 주목을 받고 있다.⁷⁻⁹⁾ Jasmonates는 다양한 식물 반응에 영향을 미치며 노화촉진과 생장억제 작용과 같은 생리학적 활성에 관한 많은 보고가 있는데, 유식물의 생장억제,¹⁰⁾ 세포신장과 증식억제,¹¹⁾ 잎노화의 촉진,¹²⁾ 발근 유도,¹³⁾ 근경형성 촉진,¹⁴⁾ 종자 및 화분발아 억제,⁷⁾ 기공 닫힘의 촉진,¹⁵⁾ 이층 형성 촉진⁹⁾ 등을 포함하고 있다. 이

과정에서 jasmonates는 특수한 유전자의 발현을 유도하는 능력을 가지고 있다.¹⁶⁾ 또한 jasmonates는 염도와 osmotic stress 등 여러 stress와 유사한 작용을 갖는 chemical stressor로 보고되고 있으며,^{17,18)} JA의 methyl ester인 methyl jasmonate(MeJA)는 토마토, 담배 및 알파파인에서 proteinase inhibitors의 potent inducer인 한편, 대두잎의 저장단백질 유도물질인데¹⁹⁾ 이 두 단백질은 상해에 의해 유도될 수 있다. 최근의 연구결과 MeJA가 식물방어 경로에서 phytoalexin을 유도한다고 보고하였는데,²⁰⁾ 이러한 증거는 jasmonates가 식물에서 중요한 stress-signalling molecules이라는 것을 암시한다.

Jasmonates의 많은 생리학적 반응은 abscisic acid (ABA)에 의해 유도된 효과와 유사한데, ABA는 환경스트레스와 관련된 조직내에서 그 양이 증가하며 새로운 polypeptides의 형성이 유도된다.²¹⁾ JA는 ABA와 화학적 생리학적으로 유사하다. ABA와 유사하게 JA는 환경스트레스에 대한 신호 기능으로서 유도성 방어유전자를 조절하는 신호 변환의 필수적인 부분의 하나로 추측되며, 여러가지 생물학적 스트레스에 반응하여 생성되는 방어 관련 대사산물의 변화를 증가하는 secondary messenger로 인식되고 있다.^{22,23)} 많은 식물군에서 상해와 octadecanoid pathway에 의해 유도되는 주요한 anti-nutritive protein은 polyphenol oxidase(PPO)이다.¹⁹⁾ 이 효소는 phenolic compounds를 quinones으로 산화시키는데, 이 물질은 많은 생물학적 분자들과 상호작용을 할 수 있는 반응력이 큰 분자이다. 식물이 엽식곤충에 의해 먹히는 동안 PPO는 페놀성 기질과 혼합되고 그 결과 quinones은 단백질의 필수아미노산을 알킬화하여 곤충에게 영양학적으로 유용하지 않은 성분으로 만든다.⁴⁾ 방어기능으로서의 PPO의 효능성은 많은 실험에서 증명되었는데, 정제한 PPO와 첨가된 기질은 토마토 해충의 생장을 억제한다.²⁴⁾ PPO는 많은 식물종에서 연구되었는데, 최근의 조사는 고등식물의 잎속에 PPO가 필수적으로 존재하고 있음을 보고하였다.²⁵⁾ PPO는 엽록체의 틸라코이드막에 위치해 있으며, 다양한 형태로 관찰된다. PPO의 특성은 불활성 또는 잠재성 PPO가 산성 또는 염기성 충격, 요소, SDS와 protease와 같은 anionic detergents 등에 의해 활성화된다는 점이다.²⁶⁾

본 실험에서는 외부적으로 첨가한 JA와 상해가 토마토 유식물의 PPO활성에 미치는 영향을 조사하였으며, 아울러 JA처리 및 상해가 PPO의 histochemical localization에 미치는 효과도 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 식물재료 및 성장조건

토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.) 종자를 1% sodium hypochlorite 용액으로 15분간 표면소독한 후 멸균 증류수로 수회 세척한 다음 vermiculite가 함유된 pot에 파종하였다. 이들을 14 h light(26°C)/10 h dark(18°C) cycle로 조절된 growth chamber에서 배양하였으며 Hoagland 용액을 2일마다 공급하였다. 2주된 유식물은 20ml의 JA

용액(10^{-4} M)을 함유한 glass pot에 넣고서 14 h/10 h cycle하에 96시간 incubation시킨 후 첫번째 잎을 채취하였다. 잎 절편은 철저히 수세, 건조 및 생체량 측정을 행한 후 homogenization 때까지 deep freezer 내에 보관하였다.

2.2. 상해방법

2주된 식물의 각 자엽 또는 잎에 평균 24회 바늘로 상해를 주었으며 3시간 간격으로 2회 반복하였고 24시간마다 채취하여 PPO분석을 행하였다. 전신상해를 유도하기 위해 아래쪽 잎에 상해를 준 다음에 상해잎은 잎과 그 위의 미상해잎 모두를 24시간 또는 48시간 후 채취하였다.

2.3. Polyphenol oxidase의 추출 및 분석

잎을 1 ml 완충액 당 200 mg 조직의 비율로 0.1% SDS를 함유한 0.1 M Na phosphate 완충액(pH 7.2)에 넣고 homogenizer에서 마쇄하였다. 추출물은 12,000 xg에서 2분간 원심분리에 의해 투명화되었으며 상등액을 490 nm에서 spectrophotometer로 PPO 활성을 측정하였다.

3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)은 quinone 중합체로 전환되었고 분석용액은 0.1 M Na phosphate(pH 7.2)내에 1 ml의 5 mg ml⁻¹ DOPA로 구성되었으며 분석 전 5분간 통기시켰다.

Peroxidase에 의한 기질의 산화방지와 H₂O₂를 제거하기 위해 280 units의 catalase(Sigma)를 0.1 ml H₂O 속에 첨가하였다. 0.05 ml의 효소 추출물의 첨가에 의해 분석이 행해졌는데, Sherman 등²⁷⁾의 방법에 따라 측정하였다. 모든 데이터는 3번 반복실험의 평균값을 나타낸 것이다.

2.4. 엽록소 함량 측정

엽록소의 추출은 미리 평방한 잎을 80%(v/v) acetone에서 마쇄한 후 10,000 xg에서 10분간 0-4°C에서 원심분리하였다. 상등액을 1 ml체적으로 만든 다음 acetone 추출물을 Arnon²⁸⁾의 방법에 따라 663 nm, 645 nm에서 흡광도를 측정하였다. 엽록소 함량은 g 생체중량 당 mg 엽록소로 나타내었다.

2.5. Polyphenol oxidase의 histochemical localization 조사

대조구 및 실험구식물로부터 동일한 직경을 가진 경엽부를 채취하여 즉시 neutral phosphate buffer 용액속에 담긴 다음 deionized water에 부유시키고서 수세를 행하였다. PPO localization을 위해 기질로서는 0.04M의 액상 catechol을 사용하였으며 Schadel 과 Walter²⁹⁾의 방법에 따라 PPO의 조직화학적 검사를 실시하였다. Sections은 현미경 관찰을 위해 glycerine 또는 glycerine jelly로 봉입하였으며, 모든 세포화학적 테스트를 위해 대조구 실험을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. JA농도별 및 상해종류별 PPO 활성 변화

2주된 토마토 유식물에서 24, 48, 72, 96시간 동안 JA

의 각 농도별 처리에 의해 나타난 PPO 활성을 조사한 결과 10^{-6} M로부터 10^{-4} M로 JA농도를 증가시키면 PPO 활성도 점차적으로 증가되었다. 따라서 PPO 활성은 농도의존적이었다. 대조구에서는 거의 변화가 없었으나 JA 처리구에서는 효소활성이 점차 증가하여 72시간에서 최고값을 보여 주었다(Table 1). 고농도(10^{-4} M)의 JA에서는 72시간 처리구에서 PPO 활성이 대조구에 비해 약 5배 증가하였다(Fig. 1).

Table 1. Effect of JA at various concentrations on the PPO activity in attached leaves

Treatment	PPO activity($\Delta A_{490} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fr. wt}$)				
	0	24	48	72	96
control	32.8	45.2	48	54.4	46.2
10^{-4} M JA		81.3	85.8	275.8	136.6
10^{-5} M JA		62.7	64.5	92.6	67.4
10^{-6} M JA		52.2	57.3	72.5	59.3

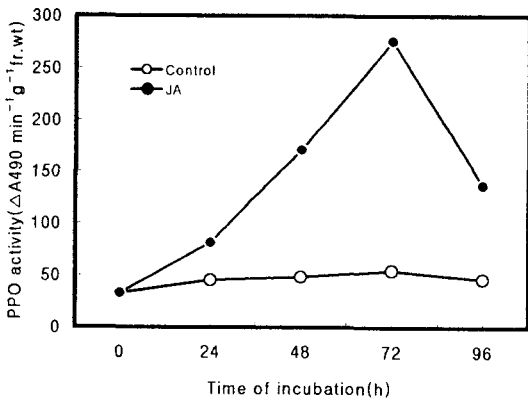


Fig. 1. Time course of PPO activity treated with JA in attached leaves.

유식물의 잎을 바늘로써 상해를 주고서 72시간의 유도기 후 잎의 PPO 활성을 측정 한 결과 비교적 작은 범위의 증가가 감지되었으며 JA처리구가 상해구에 비해 효소활성을 더 효과적으로 유도함을 알 수 있었다(Table 2). 한편, 유식물의 잎속에서 상당한 PPO 증가가 JA처리 4시간에서 감지되었다. 상해와 JA의 동시처리는 급격한 PPO 활성의 증가를 유도함으로써 매우 효과적인 복합처리임을 알 수 있었다(Fig. 2).

Table 2. Induction of the PPO activity by wounding and JA in attached leaves during 72 h

Treatment	PPO activity($\Delta A_{490} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fr. wt}$)
Control	53.8
Wounded	69.2
10^{-4} M JA	271.5

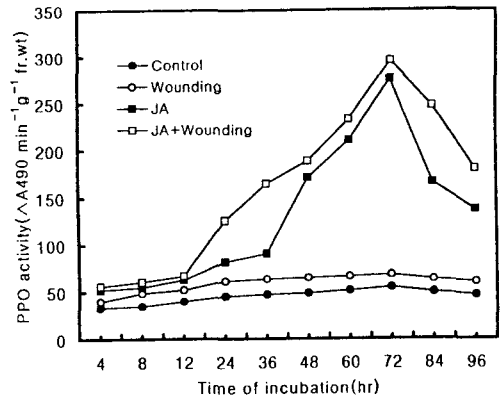


Fig. 2. Changes in the PPO activity with time after wounding and JA treatment in attached leaves.

상해방법에 따른 PPO 활성변화를 보면 잎의 정단부를 끊어 상해를 받은 segments는 기부를 끊어 상해를 받은 쪽보다 더 높은 PPO 농도를 나타내었으며 4형의 상해 방법 중 가장 효과적이었다(Table 3). 또한 PPO 농도증가는 바늘점의 수 증가와 관련이 있음을 알 수 있었다.

Table 3. Effect of wounding methods on the PPO activity in attached leaves

Type of wounding	PPO activity ($\Delta A_{490} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fr. wt}$)
Method a(whole segment scraped)	158.6
b(apical half scraped)	161.3
c(basal half scraped)	97.6
d(50 punctures with needle)	146.4

상해는 조직, 그 생리학적 연령 및 종에 따라 PPO에 대한 영향이 다르게 나타난다고 알려져 있다. 토마토잎에서 초식성 곤충의 침입에 의해 발생하는 상해는 잎으로부터 말단부 조직으로 전달되는 신호를 방출하여 proteinase inhibitor의 합성을 활성화하며, 장거리 신호 전달물질은 systemin이다.³⁰⁾ MeJA와 JA가 proteinase inhibitor합성의 강력한 유도물질이라는 최근의 관찰은 JA가 상해 또는 systemin의 작용을 통해 proteinase inhibitor 유전자 발현의 유도에서 세포간 신호의 중간 전달물질이라는 가능성을 더욱 증가시켜 준다.

PPO는 토마토에서 식물체 전체에 영향을 주는 상해에 의해 유도된다고 Constabel과 Ryan³⁰⁾이 보고하였는데, 상해 및 JA에 의한 잎의 PPO 활성의 유도는 식물계에서 흔히 발생되며 PPO 활성의 수준은 광범하게 변화된다고 알려져 있다.²⁷⁾ 이러한 사실은 PPO의 기질 선택성에 부분적으로 기인되는 것 같이 보인다. 식물의 PPO는 광범한 기질특이성을 가지며 di-ortho-phenolic compounds를 산화시키지만 PPO의 반응속도는 기질에 따라 달라진다. 따라서 다른 종간의 PPO 활성의 비교는 어렵다. 상해와 JA에 대해 PPO 활성이 증가되는 반응은 종에 따라 다

큰데, 토마토, 담배, 잠종포플라에서 분명하고 강력한 유도가 관찰되었다. PPO는 이들 식물에서 방어창고의 한 구성성분임을 암시하고 있으며 방어적 anti-nutritive protein으로 작용하는 것 같이 보인다. 고등식물에서 PPO의 거의 모든 분포는 이 효소가 갖는 많은 역할 중 초식성 곤충에 대한 방어기능을 채택하였음을 나타내는 것으로 추측된다. 흥미롭게도 PPO의 상해 유도는 MeJA의 유도와 관련이 있다는 사실이 여러 학자들에 의해 보고되어 있다.^{23,27)} Jasmonates는 세포내부로 상해신호를 전사시키는 octadecanoid pathway의 구성성분이다.⁶⁾ 다른 종에서 MeJA의 방어 활성화의 특성은 전신 상해반응을 조절하는 octadecanoid signal의 한 indicator인 것으로 알려져 있다. 이들 식물에서 PPO는 signalling pathway의 분석과정에서 볼 수 있는 매우 유용한 방어반응 maker 일 것이다.

3.2. 자엽 또는 잎에 상해처리 후 시간경과에 따른 PPO 활성변화

PPO 활성에서 상당한 증가가 유식물의 자엽 또는 잎에 바늘로 24회 상해를 준 후 24시간만에 감지되었으며 대조구에 비해 2-3배 증가하였다(Table 4A, C). 상해를 받은 자엽은 상해를 받지 않은 자엽보다 PPO 활성이 증가하였다. 그 후에는 유식물이 오래되면서 상해 및 대조구 모두에서 자엽내 PPO 농도가 감소하였다. PPO 활성의 상당한 증가가 유식물의 첫번째 잎에 상해를 준 48시간 후의 잎과 자엽이 7일전에 상해를 받은 유식물의 첫번째 잎에서 감지되었다(Table 4I, K). 따라서 PPO 활성에서의 큰 차이가 조직간에 나타났는데, 조직에 상해를 받은 시간이 오래 경과할수록 또한 자엽보다는 첫번째 잎에서 PPO 활성이 높게 나타났다.

자엽 또는 잎에 바늘로 상해를 줌으로써 유식물내에서 PPO 활성의 변화가 상당히 나타났는데, 유사한 관찰이 담배, 포플라종에서 보고된 바 있다.³⁰⁾ 배추 및 갯의 유식물에서는 바늘 및 곤충의 feeding에 의해서 잎속에 indole glucosinolates의 상당한 증가가 일어났다.⁵⁾ PPO의 농도는 상해에 매우 민감한데, Bodnaryk⁵⁾는 자엽이 작은 상해에 의해서도 PPO 농도를 증가시킴으로써 신속한 반응을 하며 확산성 화학신호가 상해 부위로부터 발생하여 식물을 통해 스스로 이동된다고 보고하였다. 생장중인 식물에서 한번의 자엽상해는 PPO 농도를 광범위하게 장기간 효과를 가지게 만들며 한 개 자엽에 대한 상해는 상해를 받지 않은 자매 자엽에 같은 양의 PPO 농도로 증가시킬 수 있다. 확산성 화학신호가 상해부위로부터 발생하여 상부 부위로까지 이동하며 부분적으로 발생한 상해신호가 말단조직에까지 전체적으로 이동한다는 생각이 더 선호되고 있다. 본 연구에서 상해를 받은 한 개 자엽이 상해 후 1-2시간내에, 즉 자엽내 PPO의 상당한 증가가 있기 전에 제거되었다면 미상해 자엽 내에는 증가된 PPO 농도가 여전히 발생할 것이다. 또한 상해를 받은 자엽을 제거하면 1-2시간내에 급속히 이동되는 상해신호가 발생할 것이다. 엽병의 절단이 남아있는 자엽내에 PPO 농도를 증가시킬 정도의 충분한 상해

를 만들지라도 그 효과는 상해를 받은 자엽에 함유된 것보다는 더 작은 것이므로 두 상해현상은 부분적으로 구분되어진다. 한편, 자엽의 상해는 첫번째 잎(상해후 7일)내 PPO 농도의 증가를 유도하였으나 2번째 잎에서는 유도하지 않았다. 이러한 사실은 자엽내에 발생한 상해신호가 비교적 장기간이며 생장중인 유식물이 발달함에 따라 첫번째 잎에 영향을 주었다는 것을 의미한다. 이상에서와 같이 식물체내에서 상해신호의 전달현상은 확인되지만 식물체간의 신호전달현상에 대한 증거는 아직 없는 실정이다.

Table 4. Effect of various treatments on the PPO activity in the cotyledons or leaves of tomato seedlings

Treatment	Wounds	PPO activity ($\Delta A_{400} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fr. wt}$)
A. Wound one cotyledon Analyse cotyledon after 24 hr	24	82.0
B. Wound one cotyledon Analyse sister cotyledon after 24 hr	0	31.2
C. Wound cotyledons Analyse cotyledon after 24 hr	24	61.1
D. Unwound cotyledons Analyse cotyledon after 24 hr	0	48.0
E. Wound first true leaf Analyse cotyledon after 24 hr	24	55.2
F. Wound first true leaf Analyse cotyledon after 48 hr	24	93.6
G. Unwound first true leaf Analyse cotyledon after 48 hr	0	86.8
H. Wound first true leaf Analyse first leaf after 24 hr	24	231.7
I. Wound first true leaf Analyse first leaf after 48 hr	24	367.4
J. Wound cotyledon Analyse after 7 day	24	131.2
K. Wound cotyledon Analyse first true leaf after 7 day	24	357.8
L. Wound first true leaf Analyse second leaf after 48 hr	24	177.9

3.3. 각종 화학물질이 PPO 활성에 미치는 영향

14일된 유식물의 잎에 JA와 상호작용하거나 상해 또는 스트레스 유도반응과 관련있는 여러 물질을 72시간 처리하였을 때 PPO 활성은 JA처리구에서 가장 높게 나타났다. Salicylhydroxamic acid(SHAM), NaCl 및 KCl의 첨가는 대조구에 비해 별다른 차이를 보여주지 않았다. 그러나 JA와의 복합처리구에서는 이들의 억제효과가 다소 완화되는 경향을 나타내었다(Fig. 3).

JA생합성 억제제인 SHAM는 휴면종자로부터 분리한 배의 발아를 억제하였으며 또한 배양중인 사과 배에서 내생적 JA의 양을 감소시켰다.³¹⁾ 그러나 사과배의 발아는 JA첨가에 의해 촉진되었다. NaCl을 처리한 보리 유

식물에서 NaCl과 JA는 생리학적으로 유사한 작용을 나타내며 유사한 기작에 의해 Rubisco합성을 조절하는 것으로 추측되고 있다.³²⁾

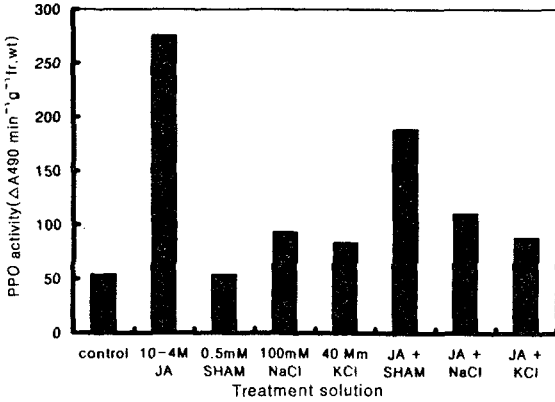


Fig. 3. Effect of JA, SHAM(salicylhydroxamic acid), NaCl and KCl on PPO activity in intact leaves.

한편, 식물생장물질이 상해받은 잎에서의 엽록소 함량과 PPO 활성에 미치는 영향을 조사하고자 ABA, BA 및 JA를 온전한 잎과 상해받은 잎에 각각 처리하였다. 유식물잎에서의 엽록소 형성과 PPO 활성은 BA첨가에 의해 가장 촉진된 반면, JA와 ABA첨가에 의해서 상당히 감소되었다(Fig. 4). 이러한 현상은 온전한 잎과 상해를 받은 잎 모두에서 동일한 효과를 나타내었다. 상해는 엽록소 형성을 증가시키는 것으로 알려져 왔으나 본 실험 결과에서는 상해를 받은 잎에서 엽록소 함량이 더 높지 않

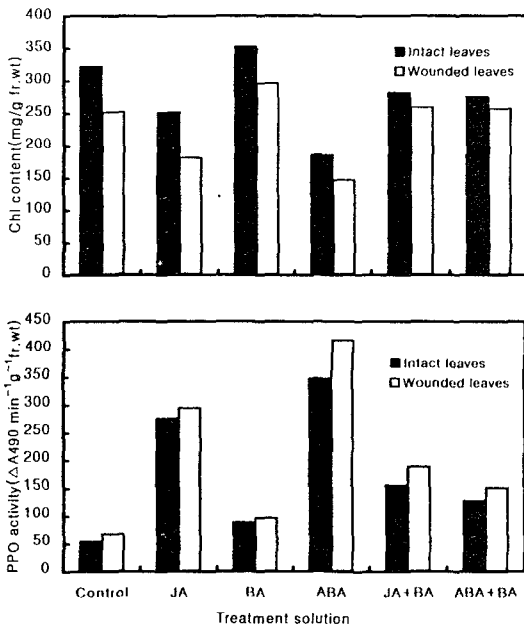


Fig. 4. Effect of JA, ABA and BA on chlorophyll content and PPO activity.

았음은 상해요인이 cytokinin과 억제제 양자를 생성함으로써 엽록소 형성을 억제하였기 때문인 것으로 추측된다. 이러한 사실은 Crane과 Ross³³⁾의 연구결과에서도 알 수 있다. 그러나 PPO 활성은 상해받은 잎에서 대체로 높게 나타났다. JA와 BA 또는 ABA와 BA의 복합처리는 JA 또는 ABA의 단독처리구에 비해 엽록소 함량과 PPO 활성을 증가시키는 현상을 보여주었다.

식물생장물질 중 BA처리는 엽록소 생성을 상당히 촉진하였으며 ABA의 억제효과를 역전시켰다. 특히 상해를 받은 잎에서 BA첨가가 엽록소 형성을 증가시켰음은 상해가 내생적 cytokinin 활성을 증가시켰음을 암시한다. 상해받은 잎과 온전한 잎 사이에는 뚜렷한 차이가 감지되지 않았다. 또한, JA가 유도한 PPO 활성은 BA처리에 의해 상당히 완화되었다. 이것은 JA가 유도한 PPO 활성이 *de novo* PPO 합성에 기인된다는 것을 암시한다. JA와 ABA는 생장억제제와 노화촉진을 포함한 유사한 여러 가지 생리학적 작용을 유도한다. 따라서 본 연구결과는 JA와 ABA가 PPO 활성을 증가시키는데 유사한 효과를 가지고 있음을 증명하고 있다.

3.4. 광선의 강도가 PPO 활성에 미치는 영향

PPO 활성에 대한 상해, JA 및 광도의 상호관련성을 조사하기 위하여 72시간 동안 14일된 유식물을 광선, 암흑 또는 약광하에 두었다. PPO 농도는 대조군에서 광도에 관계없이 상당히 감소하였으며 약광하 또는 암하에 둔 상해를 입은 유식물에서도 매우 낮게 나타났다. 가장 높은 PPO 농도가 강광하에 둔 JA처리 유식물에서 관찰되었다(Table 5). MeJA는 암하뿐만 아니라 광선하에서도 귀리잎 절편의 노화를 촉진하는 강력한 물질이었으며 낮은 농도에서도 광선의 노화지연작용을 무효화시켰다.¹¹⁾

Table 5. Effect of light intensity on the PPO activity in detached leaves

Light intensity	PPO activity(ΔA ₄₉₀ min ⁻¹ g ⁻¹ fr. wt)		
	Intact leaves	JA-treated leaves	Wounded leaves
Darkness	117	331	123
Dim (25 μE · s ⁻¹ m ⁻²)	122	459	197
Bright (250 μE · s ⁻¹ m ⁻²)	141	603	260

3.5. JA 및 상해가 PPO의 histochemical localization에 미치는 영향

토마토 유식물의 줄기 횡단면에서 PPO의 조직화학적 분포를 조사한 결과 PPO 활성은 세포질, 피층, 목부 및 사부의 다양한 부위에서 다소 높게 나타났다(Table 6). 특히 외부피층과 목부유조직에서 강한 활성이 감지되었으며 상해를 받은 조직보다 JA처리를 한 조직에서 더 강한 염색성이 인지되었다(Fig. 5). 높은 레벨의 페놀화

합물과 PPO 간에 또는 낮은 레벨의 페놀화합물과 PPO 부재간에는 상호관계가 있다. 그러나 Kojima와 Com³⁴⁾은 이들 상호관계가 항상 있는 것은 아님을 보고하였다.

Table 6. Degree of localized intensity of PPO in the shoot of 14-day-old seedlings exposed to wounding and jasmonic acid

Zones of enzyme activity	PPO intensity		
	Control	Wounding	JA-treated
Epidermis	+	++	++
Cortex parenchyma	++	++++	++++
Phloem	+	+++	+++
Xylem	++	+++	++++
Pith parenchyma	±	+	++

Symbols : ±=feeble ; +=moderate ; ++=fairly rich ; +++=rich ;
++++=intense/dense ; +++++=strong

PPO에 의해 산화된 phenol은 고도로 반응성이 강하며 아미노산과 병원균 또는 초식동물의 단백질과 결합하여 이들을 생물학적으로 비활성이 되게 만든다.³⁵⁾ 토마토에서 다른 대사산물과 함께 phenol 화합물 및 PPO 활성의 증가는 병원균과 초식동물의 공격을 제한하는 역할을 하는 것으로 사료된다.

식물체에서 JA는 다양한 발생학적 생리학적 반응을 유도한다.³⁶⁾ JA가 PPO에 대해 잠재적 효과를 가지고 있음을 본 실험결과에서 알 수 있는데, 소량의 JA를 자엽 또는 잎에 국부적으로 처리하였을 때 PPO 농도가 상당히 증가되었다. 이러한 사실은 PPO에 대한 JA의 효과가 전 식물체에 영향을 미치며 JA는 낮은 휘발성을 가지고 있어 첫번째 잎에 부분적으로 처리하였을 때 그 효과가 2번째 잎까지는 구정적으로 또한 자엽까지는 구기적으로 이송됨을 시사해 주고 있으며,^{6,19)} 이러한 관찰은 JA의 사부이송과 일치하고 있다. JA 또는 JA에 의해 발생된 신호가 PPO 대사에 영향을 미치는 messenger를 만드는

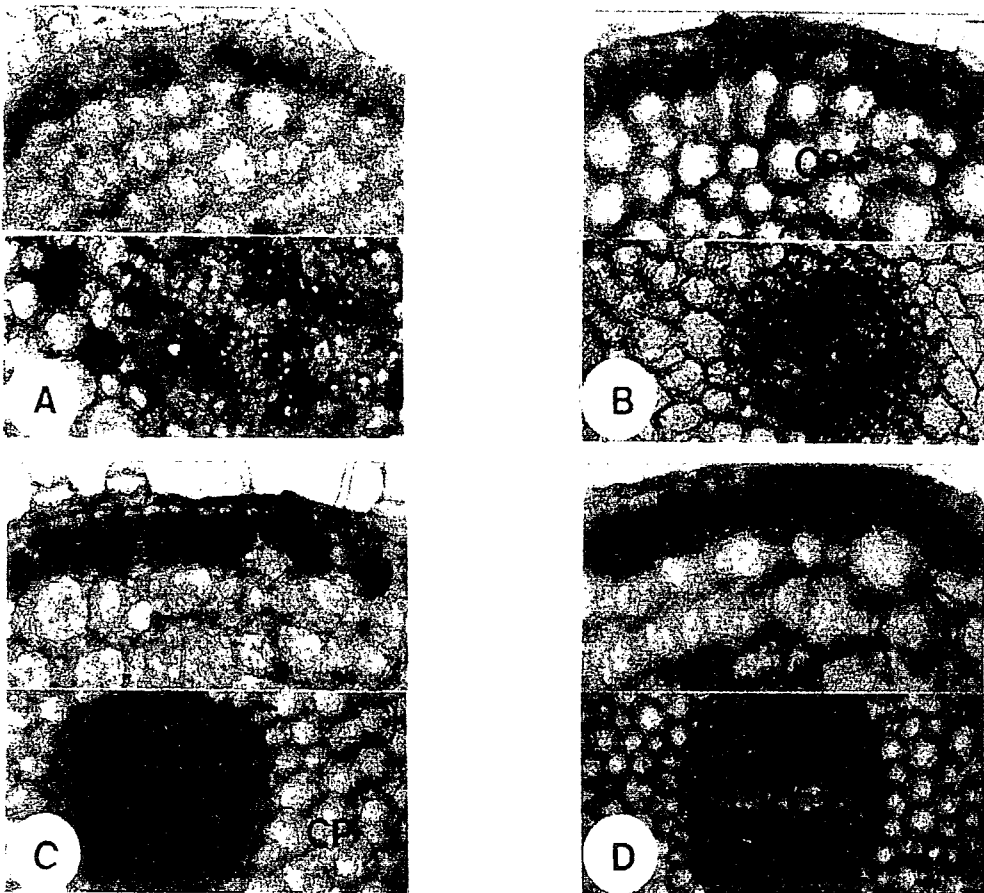


Fig. 5. A-D. Localization of polyphenol oxidase activity in the stem of two-week-old seedlings exposed to wounding and 10^{-4} M JA for 72 h. $\times 100$. A, control untreated catechol; B, control treated catechol; C, wounded seedling; D, JA treated seedling; E, epidermis; CP, cortical parenchyma; Ph, phloem; X, xylem; P, pith.

지에 대해서는 아직 알려져 있지 않다. 토마토와 감자에
서 JA는 상해에 의해 유도되는 proteinase inhibitor의 합
성을 활성화시킨다.²³⁾ 곤충 또는 병원균 침입에 의해 발
생하는 상해 신호에 반응하여 식물세포막의 지질로부터
linolenic acid가 세포질내로 방출되어 jasmonate로 전환
되며, proteinase inhibitor 유전자의 발현을 조절하는 하
나의 신호로 작용한다. 최근에는 MeJA가 식물에서 신호
를 변환하는 2차 messenger로 작용하며 여러가지 스트
레스에 반응하여 방어유전자의 발현을 촉진한다고 보고
되어 있다.^{6,20)}

본 연구결과는 토마토 잎에서 PPO 활성이 JA와 상해
에 의해 증가되었음을 분명히 보여주어 JA의 다
른 기능이 엽 스트레스, 수분결핍 및 삼투적 스트레스에
반응하여 관련이 있음을 뒷받침하고 있다. PPO 유전자가
잎속에서 상해 및 JA에 의해 조절되는가를 결정하는
것은 흥미로운 사실일 것이며 스트레스가 유도한 PPO
활성이 JA에 의해 증가되는지는 계속 연구되어야 할 과
제인 것으로 사료된다.

4. 결 론

토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.) 유식물에서
polyphenol oxidase(PPO)에 미치는 상해와 jasmonic
acid(JA)의 효과를 조사하였다. 상해 및 JA처리에 의해
높은 PPO 활성이 유도되었으며 그 반응은 식물 전체에
걸쳐 일어났다. 바늘로써 자엽에 기계적 상해를 주었을
때 신호가 발생하여 상해를 받지 않은 자엽과 첫번째 잎
속에 PPO 농도가 증가되는 현상을 볼 수 있었다. 상해
의 강도와 광선의 강도 또한 PPO 활성의 변화를 일으켰
다. JA는 엽록소 분해를 촉진하였고 PPO의 빠른 축적을
유도하였다. PPO는 대조구에 비해 상해를 받은 잎에서
그 활성이 더 높았다. JA의 잠재력 및 특이성은 JA와 상
해가 유도한 PPO의 변화사이의 밀접한 유언관계를 시사
해 준다. JA와 abscisic acid(ABA)는 상해를 받지 않은
잎과 상해를 받은 잎 모두에서 유사한 생리학적 작용을
나타내었으며, PPO의 농도는 대조구보다 상해를 받은
잎에서 더 높았다. 상해 및 JA 처리잎을 강한 광선하에
두었을 때 가장 높은 PPO 활성을 볼 수 있었다. Ben-
zyladenine(BA)은 JA 및 ABA가 유도한 PPO 활성을 무
효화시켰다. PPO 활성에 대한 조직화학적 관찰을 토마
토 줄기에서 행한 결과 상해를 받은 조직이나 JA를 처
리한 조직 모두에서 PPO 활성이 주로 외피층과 목부유
조직에 국한되어 있었다. 본 실험의 결과를 종합해 보면
외생적으로 첨가한 JA는 식물방어 경로에서 스트레스
유발물질로 작용하며, PPO는 초식성 동물에 대한 방어
반응을 유도할 수 있는 성분으로 작용할 수 있을 것으로
사료된다.

참 고 문 헌

1) Constabel, C. P., D. R. Bergery, and C. A. Ryan,
1995, Systemin activates synthesis of wound-
inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the
octadecanoid defense signaling pathway, Proc. Natl.

Acad. Sci. U.S.A. 92, 407~411.
2) Baldwin, I. T., 1994, In Plant-Insect Interactions,
Vol.V., ed. E.A. Bernays, p.1 CRC Press, Boca
Raton.
3) Tallamy, D. W. and M. J. Raupp., eds, 1991,
Phytochemical Induction by Herbivores, Wiley, N.Y.
4) Duffey, S. S. and G. W. Felton, 1991, In Naturally
Occurring Pest Bioregulators, ed. P.A. Hedin, p. 167
ACS Washington DC.
5) Bodnaryk, R. P., 1992, Effects of wounding on
glucosinolates in the cotyledons of oilseed rape and
mustard, Phytochem. 31, 2671~2677.
6) Farmer, E. E., R. Johnson, and C. A. Ryan, 1992,
Regulation of expression of proteinase inhibitor
genes by methyl jasmonate and jasmonic acid,
Plant Physiol. 98, 995~1002.
7) Hamberg, M. and H. W. Gardner, 1992, Oxylinp
pathway to jasmonates : Biochemistry and biological
significance, Biochem. Biophys. Acta 1165, 13~18.
8) Mayer, A., O. Niersch, C. Buttner, W. Dathe, and
G. Sembdner, 1984, Occurrence of the plant growth
regulator jasmonic acid in plants, J. Plant
Growth Regul. 3, 1~8.
9) Sembdner, G. and B. Parthier, 1993, The bio-
chemistry and physiological and molecular actions
of jasmonates, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.
Bio. 44, 569~589.
10) Ueda, J., K. Miyamoto and M. Aoki, 1994,
Jasmonic acid inhibits the IAA-induced elongation
of oat coleoptile segments : A possible mechanism
involving the metabolism of cell wall poly-
saccharides, Plant Cell Physiol. 35, 1065~1070.
11) Ueda, J. and J. Kato, 1982, Inhibition of cytokinin-
induced plant growth by jasmonic acid and its
methyl ester, Physiol. Plant. 54, 249~252.
12) Chou, C. M. and C. H. Kao, 1992, Methyl
jasmonate, calcium, and leaf senescence in rice,
Plant Physiol. 99, 1693~1694.
13) Zimmerman, D. C., J. S. Bush and J. A. Kuc.,
1987, Stimulation of adventitious rooting in mung
bean seedlings by jasmonic acid and 12-oxo-
phytodienoid acid, Plant Physiol. 84, 520~525.
14) Koda, Y., Y. Kikuta, H. Tazaki, Y. Tsujino S.
Sakamura, and T. Yoshihara, 1991, Potato tuber-
inducing activities of jasmonic acid and related
compounds, Phytochem. 30, 1435~1438.
15) Herde, O., H. Pena-Cortes, L. Willmitzer, and J.
Fisahn, 1997, Stomatal responses to jasmonic acid,
linolenic acid and abscisic acid in wild-type
and ABA-deficient tomato plants, Plant, Cell and
Environment 20, 136~141.
16) Staswick, P., 1992, Jasmonate, genes and fragrant

- signals, *Plant Physiol.* 99, 804~807.
- 17) Chen, C. T., C. M. Chou, and C. H. Kao, 1992, Methyl jasmonate induces the accumulation of putrescine but not proline in detached rice leaves, *J. Plant Physiol.* 143, 119~121.
 - 18) Parthier, B., 1991, Jasmonates, new regulators of plant growth and development : Many facts and few hypotheses on their actions, *Bot. Acta* 104, 446~454.
 - 19) Farmer, E. E. and C. A. Ryan, 1990, Interplant communication : Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7713-7716.
 - 20) Gundlach, H., M. Müller, T. M. Kutchan, and M. H. Zenk, 1992, Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 2389~2393.
 - 21) Lehmann, J. R. Atzorn, C. Bruckner, S. Reinbothe, J. Leopold, C. Wasternack, and B. Parthier, 1995, Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments, *Planta* 197, 156~162.
 - 22) Bleichert, S., W. Brodschelm, S. Holder, L. Kammerer, T. M. Kutchan, M. J. Mueller, Z-Q. Xia, and M. H. Zenk., 1995, The octadecanoid pathway : Signal molecules for the regulation of secondary pathway, *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 92, 4099~4105.
 - 23) Farmer, E. E. and C. A. Ryan, 1992, Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound inducible proteinase inhibitors, *The Plant Cell*, 4, 129~134.
 - 24) Felton, G., K. Donato, R. Del Vecchio, and S. Duffey, 1989, Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality foliage for noctuid herbivores, *J. Chem. Ecol.* 15, 2667~2694.
 - 25) Sherman, T. D., K. C. Vaughn and S. O. Duke, 1991, A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase, *Phytochem.* 30, 2499~2506
 - 26) Moore, B. M. and W. H. Flurkey, 1990, Sodium dodecyl sulfate activation of plant polyphenol oxidase, *J. Biol. Chem.* 265, 4982~4988.
 - 27) Sherman, T. D., K. C. Vaughn, and S. O. Duke, 1991, A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase, *Phytochem.* 30, 2499~2506.
 - 28) Arnon, D., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplast : Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.* 24, 1~15.
 - 29) Schadel, W. E. and W. M. Walter, 1981, Localization of phenols and polyphenol oxidase in 'Jewel' sweet potatoes, *Can. J. Bot.* 59, 1961~1967.
 - 30) Constabel, C. P. and C. A. Ryan, 1997, A survey of wound- and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants, *Phytochem.* 47, 507~511.
 - 31) Ranjan, R., O. Miersch, G. Sembdner, and S. Lewak, 1994, Presence and role of jasmonate in apple embryo, *Physiol. Plant.* 90, 548~552.
 - 32) Maslenkova, L. T., T. S. Miteva, and L. P. Popova, 1992, Changes in the polypeptide patterns of barley seedlings exposed to jasmonic acid and salinity, *Plant Physiol.* 98, 700~707.
 - 33) Crane, K. E. and C. W. Ross, 1986, Effects of wounding on cytokinin activity in cucumber cotyledons, *Plant Physiol.* 82, 1151~1152.
 - 34) Kojima, M. and E. E. Com, 1982, Tissue distribution of chlorogenic acid and of enzymes involved in its metabolism in leaves of *Sorghum bicolor*, *Plant Physiol.* 70, 922-925.
 - 35) Jayabalan, M., J. J. Shah, K. Rajarathinam, and S. Veerasamy, 1995, Histochemical localization of oxidase in *Parthenium argentatum*, *Phytomorph.* 45, 9~14.
 - 36) Parthier, B., C. Bruckner, W. Dathe, B. Hause, G. Herrmann, H. D. Knofel, H. M. Kramell, R. Kramell, J. Lehmann, O. Miersch, S. Reinbothe, G. Sembdner, C. Wasternack, and U. Zur Nieden, 1992, Jasmonates: Metabolism, biological activities, and modes of action in senescence and stress responses, In *Progress in Plant Growth Regulation*, C. M. Karssen, L.C. van Loon and D. Vreugdenhil, eds. pp. 276-285, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.