

## 환경 스트레스에 의한 벼의 Peroxidase, Superoxide dismutase 및 Diterpene cyclase 활성비교

정형진\* · 신동현<sup>1</sup> · 박재호

안동대학교 생명자원과학부  
<sup>1</sup>경북대학교 농학과

### Comparision of Peroxidase, Superoxide dismutase and Diterpene cyclase Activity under Environmental Stress Conditions in Rice

Hyung Jin Jeong\*, Dong Hyun Shin<sup>1</sup> and Jae Ho Park

School of Bioresource science, Andong National University, Andong 760-749, Korea  
<sup>1</sup>Department of Agronomy, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

#### Abstract

This study carried out to investigate activities of the superoxide dismutase(SOD), peroxidase (POD) and diterpene cyclase of rice plant treated by environmental stress conditions.

The rice leaves of Ilpum was shown to have the most highest specific activity of POD and SOD. POD activity in the susceptible cv. Ilpum and Hwasung during the disease progress show a increase, while for a decreasing activity in the resistant cv. Dasan. SOD activity of rice plants treated by chitosan were increased as the treatment concentration increased. At the chitosan application, the SOD activity in the susceptible cv. Hwasung at the rice leaves 14days after treatment was higher in treatment than chitosan-untreated control. The activity of POD in the susceptible cv. Ilpum decreased as long as UV-B irradiation, while that in the resistant cv. Dasan increased. Futhermore, activity of that in Dasan were similar to as time on UV irradiation, Hwasung showed two times higher than untreated control at 40 minutes after UV-B exposure. The activity of diterpene cyclase in rice plants inoculated with *Pyricularia oryzae* has much higher tendency than UV-B irradiation. The activity of diterpene cyclase in the rice leaves gradually increased until 5 days after inoculation with *Pyricularia oryzae*.

**Key words** – Peroxidase, Superoxide dismutase, Diterpene cyclase, UV-B irradiation, Rice blast

#### 서 론

환경스트레스는 식물내에 존재하는 산소를 활성산소종

(O<sub>2</sub>, OH·, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)으로 전환시켜 생체내 대사과정에 장애를 유발함으로써 생산성에 감소를 초래한다[1,13]. 이때 식물은 활성 산소종으로부터 자신을 보호하기 위하여 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) 등의 역할이 필요한 것으로 알려지고 있다[2]. Rao 등[11]은 ultraviolet-B (UV-B)와 ozone (O<sub>3</sub>) 등에 노출된 식물에서 SOD 활성이 증

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : (0571) 850-5464, Fax : (0571) 841-1627  
E-mail: JHJ@andong.ac.kr

가하는 것으로 보고하였다.

Phytoalexin은 stress compound로써 병원균의 침입뿐만 아니라 중금속, 호흡저해, 세정제 그리고 상처와 같은 abiotic elicitors에 의해 생성될수 있으므로 현재는 phytoalexin을 물리적, 화학적 또는 생물학적 stress에 의하여 새롭게 생성되어지는 저분자의 2차 대사산물이라고 한다[4].

Osamu 등[10]과 Vivin등[15]은 감염되지 않은 벼 잎으로부터 몇 종류의 불포화 지방산의 epoxides와 hydroxides의 antifungal 물질을 분리하였으며, 이러한 물질의 antifungal 활성은 감수성 품종보다 저항성 품종에서 높게 나타났다고 보고하였으며, 벼에 있어서 phytoalexin은 도열병과 잎집무늬 마름병의 elicitor에 의해 유도되어지는 diterpen계통으로 화합물로 Momilactone A, B, Oryzalexin A~F, S와 sakurauetin 등이 있다고 보고하였다[7,12]. 특히 이들 화합물은 형질전환기법을 이용하여 경제적으로 중요한 식물체에 유용한 유전자를 도입시킴으로써 stress에 대한 식물에 방어 기작을 생리학적, 분자생물학적 측면에서 구명하는데 이용하고 있다[3,14]. 그러나 국내 재배 품종 벼에 대한 방어 기작과 항산화효소에 관한 연구는 주로 조직배양을 통한 기내 스트레스에 대한 연구가 주로 되어 있을 뿐 환경 스트레스에 따른 식물체내의 변화에 관한 것은 미미하다. 따라서 본 연구에서는 환경스트레스의 일종인 UV와 도열병을 유발하는 균에 의하여 벼 식물체내의 항산화효소 및 Phytoalexin 생성 관여 효소의 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 이용된 공시재료는 경북 안동 종자보급소에서 분양 받은 벼 품종 다산, 일품, 화성 (도열병 저항정도: 강, 중, 약)을 일반 육묘 방법에 의해 온실 내 ( $29 \pm 1^\circ\text{C}$ )에서 6엽까지 재배하여 각 처리별로 처리하여 시료로 사용하였다.

### 가. UV-B 조사

벼의 지상부를 채취하여 UV-B (260 nm)를 0분, 40분, 60분, 120분 조사시킨 후,  $30^\circ\text{C}$  광 상태에서 12시간 incubation 시킨 후  $30^\circ\text{C}$  암 상태에서 48시간 incubation 하여 측정용 시료로 사용하였다.

### 나. 도열병원균 접종

Rice bran Medium에서 15일간 배양된 *Pyricularia oryzae*

의 포자를 채취하여 포자 500 ml당 전착제인 Tween20 1ml를 혼합하여 공시재료에 엽면 살포한 뒤 접종 경과 일수에 따라 0일, 3일, 5일, 7일, 14일째 각 각 시료를 채취하여 측정용 시료로 사용하였다.

### 다. 키토산과 도열병원균 접종

시판되고 있는 키토산을 0%, 0.2%, 0.5%로 희석 후, 도열병원균 접종 3일전에 벼 육묘상에 처리하였다. 시료채취는 처리 후 0일, 7일, 14일째 각 각 채취하여 측정용 시료로 사용하였다.

## 효소측정

### 가. POD 활성

식물체 0.1 g을 1 ml의 0.05 M 인산완충액 (pH 7.8)과 함께 마쇄한 후,  $4^\circ\text{C}$ 에서 14,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 얻어진 상등액을 조효소액으로 사용하였다. POD활성은 pyrogallol(Sigma, U.S.A)을 기질로 사용하고, 100  $\mu\text{l}$ 의 조효소액에 2.9 ml의 assay buffer를 첨가하여 420 nm에서 20초간 상온에서 흡광도 변화를 측정하였다.

### 나. SOD활성

SOD 활성은 McCord와 Fridovich[9]의 방법에 따라 xanthine/xanthine oxidase system을 superoxide radicals ( $\text{O}_2 \cdot$ )의 공급원으로 이용하여 superoxide radicals에 의한 cytochrome c의 환원속도를 550 nm에서 측정하였다. SOD 활성 1unit는  $25^\circ\text{C}$ 에서 반응을 시작하여 150초간 550 nm에서 흡광도 변화를 조사하여 xanthine oxidase 활성이 50% 억제되는 것으로 정의하였다.

### 다. Diterpene cyclase 활성

Diterpene cyclase의 활성은 H가 radio label된 geranyl geranyl pyrophosphate (GGPP)를 기질로 사용하였다. 50  $\mu\text{l}$  조효소액과 500  $\mu\text{l}$  assay buffer를 첨가 후  $35^\circ\text{C}$ 에서 45분 반응시킨 뒤 250  $\mu\text{l}$  EtOH-Pet. Ether (1 : 3)을 첨가하여 유기층을 분취하였다. 분취액을 silicic acid 0.4 g과 250  $\mu\text{l}$  hexane을 가한 뒤 상층액 125  $\mu\text{l}$ 를 cocktail 4 ml과 혼합하여 LSS (liquid scintillation spectrometry)로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

벼 품종별 엽중 POD, SOD 활성을 조사 해 본 결과, 일

Table 1. Peroxidase and superoxide dismutase activity in different rice cultivars

Cultivars	POD (unit/mg protein)	SOD (unit/mg protein)
Dasan	1.3	85.8
Ilpum	3.2	118.3
Hwasung	1.7	73.0

품이 POD, SOD 활성이 각 각 3.2와 118.3 (unit/mg protein)로 다른 품종에 비해 높게 나타났다(Table 1). 품종별로는 POD의 경우 일품, 화성, 다산 순으로, SOD의 경우 일품, 다산, 화성 순으로 높게 나타났다. 이는 도열병에 대한 저항성 및 감수성 품종과 POD, SOD 활성간에는 일정한 경향은 나타내지 않았다. 이러한 경향은 고구마에서 형질 전환된 식물체에 비하여 전환되지 않은 식물체가 POD 활성이 5배 정도 낮다는 연구보고[6]를 미루어 보면, 품종간의 항산화 효소활성의 차이는 각 품종별 유전물질의 조성의 차이에 의하여 기인되며, 특히 품종별 효소의 활성 정도는 생육 환경스트레스에 의하여 생성 정도가 지배되어 질 것으로 사료된다.

도열병 발병 시까지 경과 일 수별 품종별 벼 엽 중의 POD와 SOD 활성 변화를 조사 해 본 결과, 품종별 POD활성은 일품과 화성은 포자 살포 후 도열병 발병 시까지 활성이 계속 증가하였으나, 다산은 포자 살포 후 5일까지는 증가하다가 그 후에는 활성이 감소하였다(Fig. 1, 2). 다산의 엽중 POD활성은 외관상 도열병 발병 징후가 없는 포자 살포 3

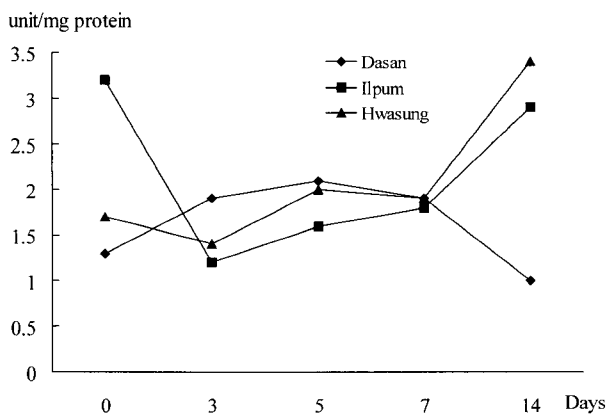


Fig. 1. Change of POD activity in rice leaves after rice blast strain "KI101" inoculation.

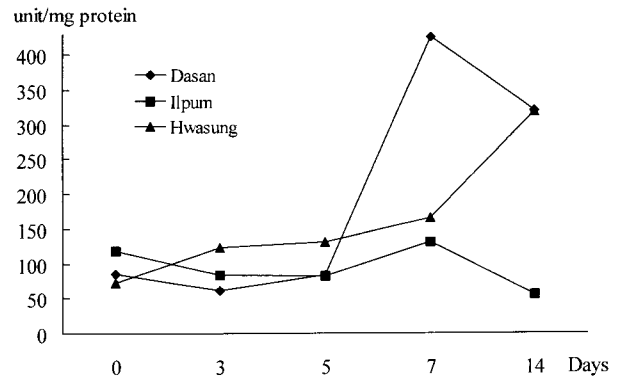


Fig. 2. Change of SOD activity in rice leaves after rice blast strain "KI101" inoculation.

일까지는 도열병병원균 무처리 식물체보다 높은 활성을 나타내었으나, 외관상 발병 징후가 나타난 처리 후 14일에는 낮은 활성을 나타내었다. 일품의 POD활성은 포자 살포 3일 후는 63%정도 급격히 감소하였으며, 그 이후부터 발병까지 증가하는 양상을 나타내었다. 화성은 포자살포 3일 후까지 감소하였으나 그 이후는 무처리 보다 2 배정도 높은 활성을 나타내었다. 따라서 도열병병원균 접종처리 경과 일 수별 POD 활성은 저항성 품종인 다산은 접종 5일 후까지는 서서히 증가하나 7일 이후에는 급격 한 감소를 나타내는 반면, 도열병에 감수성 품종인 일품과 화성은 병원균 접종 3일까지는 서서히 증가하다가, 7일 후부터 급격히 증가하였다. 이 결과는 감수성 품종과 저항성 품종간의 도열병 발병 진전 시기에 따른 Phytoalexin 물질의 생성 정도와 항산화 효소활성이고 밀접한 관련이 있는 것을 나타내며, 바이러스, 곰팡이, 세균 등의 침입에 의한 생물학적 stress를 받았을 때 식물체의 POD활성이 증가한다는 보고[5]와 일치하고 있다.

엽중 SOD 활성 변화는 품종간에는 다산의 경우 포자 살포 후 7일까지는 무처리에 비해 80%까지 증가한 후 감소하였으나, 일품은 10%정도 증가한 후 감소하여 무처리와 차이가 없었다. 화성은 포자 살포 후 발병까지 활성이 증가하여 도열병이 발병 전 식물체에서 무처리에 비해 약 77%까지 증가하였다.

POD활성은 도열병 감수성 품종인 화성에서 크게 증가하였고, SOD는 저항성 품종인 다산이 포자살포 후 7일된 식물체에서 가장 높게 나타났다. 감수성 품종과 저항성 품종간의 활성 차이와 양상변화는 품종간의 유전적 조성 차

이 때문인 것으로 사료된다. 식물은 활성 산소종으로 부터 자신을 보호하기 위하여 SOD 등의 역할이 필요하다는 연구보고[2]로 미루어 보아 도열병 발병 진전에 따른 품종간 SOD활성의 변화는 도열병병원균 접종에 의한 외부적 stress 인자에 의하여 발병시기 및 정도의 차이에 따라 활성정도가 차이가 있을 것으로 생각된다.

도열병을 억제하는 효과를 지닌 키토산 0.2%, 0.5%액을 식물체에 처리한 후 포자를 살포하여 14일이 경과된 식물체로 부터 POD, SOD활성을 조사한 결과, 키토산 0.2%를 처리한 다산의 POD 활성은 처리되지 않은 식물체에 비해 8.5 배 높았다(Fig. 3, 4). 키토산 0.5% 처리시는 0.2% 처리된 식물체보다는 활성이 낮게 나타났고, 일품에서는 키토산 처리에 의한 활성의 변화가 없었다. 키토산 0.2%가 처리된 화성의 엽중 POD활성은 무처리에 비하여 차이가 없었다. 따라서 키토산 처리 농도가 높을수록 엽중 POD활성은 감수성 품종에서 증가하고 저항성 품종에서는 감소하는 경향이였다.

키토산 처리시 SOD활성은 다산과 일품의 경우 POD와는 달리 키토산 농도가 높을수록 활성이 증가하였으나 처리 농도간에는 차이가 없었다.

벼 식물체에 UV-B를 시간별로 조사 한 후 POD 및 SOD활성을 조사 해 본 결과, POD는 일품은 UV 조사시간이 길수록 감소하였고, 다산과 화성은 증가하였다(Fig. 5, 6).

도열병 저항성품종인 다산은 UV-B 조사시간에 따른

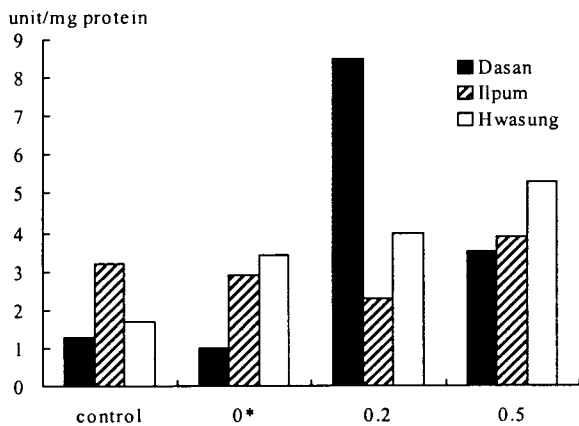


Fig. 3. Effect of chitosan concentration on POD activity in rice leaves at 14th day after rice blast strain "KI101" inoculation.  
\*Concentration of chitosan(%)

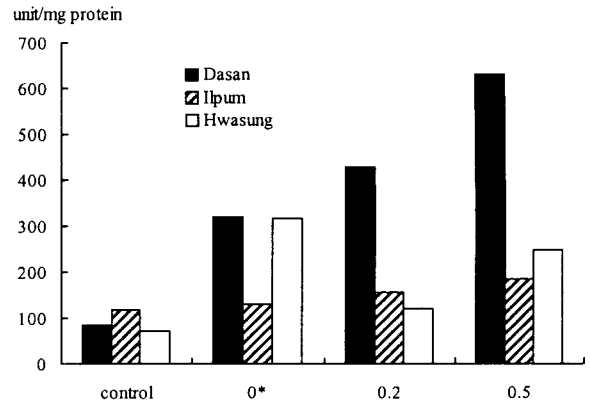


Fig. 4. Effect of chitosan concentration on SOD activity in rice leaves at 14th day after rice blast strain "KI101" inoculation.  
\*Concentration of chitosan(%)

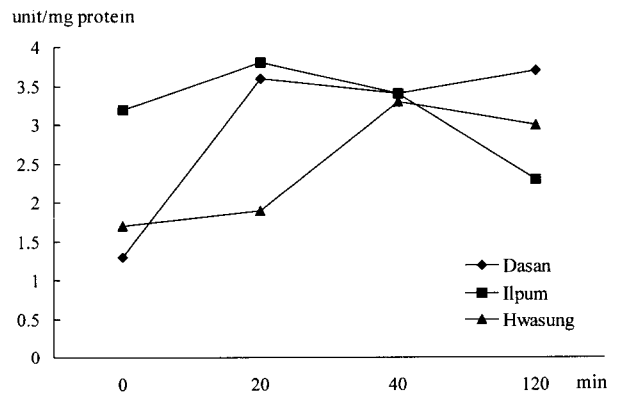


Fig. 5. Change of POD activity in rice leaves after UV-B irradiation.

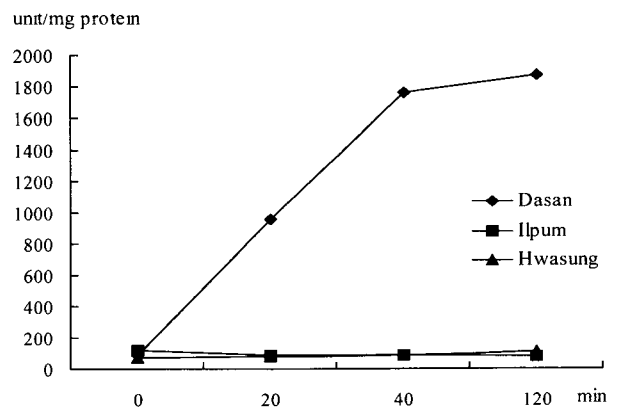


Fig. 6. Change of SOD activity in rice leaves after UV-B irradiation.

POD활성은 큰 변화가 없었으나, 감수성품종인 화성은 무처리에 비해 조사시간 40분 이상에서 2배정도 증가하였다. 다산 품종은 UV-B 조사시간의 증가에 따라 SOD 활성이 매우 증가하였으며, 특히 40분 조사시는 무처리 보다 95% 증가하였다. 다산품종에서의 UV-B 처리는 도열병병원균 접종 처리보다 SOD 활성 증가에 큰 영향을 미쳤으나 일품과 화성은 영향을 미치지 않았다. 저항성품종인 다산벼의 이 결과는 UV-B 조사 및 O<sub>3</sub>에 노출된 벼 식물은 SOD 활성이 증가한다는 보고[11]와 일치하는 경향이었으나, 일품벼에는 일치하지 않았다. 따라서 벼 품종에 따른 UV-B조사시 감응정도의 차이에 따라 SOD활성의 차이가 있는 것으로 생각된다.

도열병병원균 접종 후 경과 일수별 diterpene cyclase의 활성을 조사한 결과, 무처리에 비해 처리 후 5일까지는 세 품종 공히 효소 활성이 증가하였으나 그 이후는 감소하였다 (Fig. 7). 도열병 저항성 품종인 다산이 감수성 품종인 일품과 화성에 비해 활성이 높은 것으로 나타났다. West[16]에 의하면 geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)는 모든 polycyclic diterpene hydrocarbons의 전구물질이며, 벼는 GGPP에서 두가지 생합성 경로를 통해 Momilactone A와 Oryzalexin A를 생성시킨다고 하였다. 본 실험에서 *P.oryzae* 접종 후 품종 및 경과 일수별 diterpene cyclase의 활성의 차이를 보여주어서 공시 재료별 phytoalexin 생성도의 차이가 나타날 것으로 생각되며, 특히 품종내 경과일수별 diterpene cyclase의 활성이 점점 높아진 후 낮아지는 경향은 phytoalexin의 생성양상과 관련이 있을 것으로 생각된다.

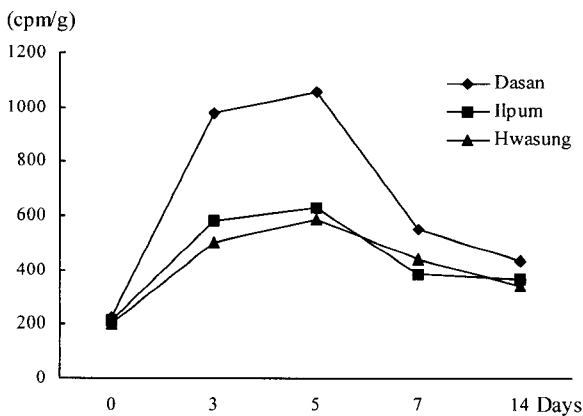


Fig. 7. Change of diterpene cyclase activity in rice leaves after inoculated with *Pyricularia oryzae*.

다. UV 조사시간별 diterpene cyclase의 활성을 조사한 결과, UV 무 조사에 비해 화성과 일품은 30분, 다산은 40분 조사까지는 효소 활성이 증가하였다가 그 이후는 감소하였다(Fig. 8). 도열병 감수성 품종인 화성이 저항성 품종인 다산에 비하여 효소활성이 높았다. 다산은 UV 40분, 일품과 화성은 20분 조사에서 각각 243 cpm/g, 276 cpm/g, 456 cpm/g으로 최고 활성을 나타내었다. 이 결과는 UV 무 조사에 비해 다산, 일품 및 화성이 각각 1.1배, 1.3배 및 2.1배 높았고, 특히 화성이 품종 내 효소활성 변화가 가장 크게 나타났다. 처리간의 diterpene cyclase 활성도는 UV 조사가 *P.oryzae* 접종처리에 비하여 품종에 관계없이 낮았다. Ren과 Charles[12]와 Karen과 Charles[8]은 무처리에 비해 UV 조사 시간이 경과 할 수록 diterpene cyclase 활성이 높아졌으며, UV 24분 조사 후 42시간 경과 시 활성이 가장 높았다고 보고하였다. 따라서 상기 결과로 미루어 볼 때 diterpene cyclase의 활성을 높일 수 있는 가장 적절한 UV 조사시간은 20분이었다. UV 조사시 diterpene cyclase 활성도는 도열병 감수성 품종인 화성이 저항성 품종인 다산에 비해 민감하였다.

키토산 처리 후 도열병 병원균 접종시의 경과 일수별 diterpene cyclase의 활성을 조사한 결과, 세 품종 공히 키토산 처리구가 도열병병원균 단독 접종 처리에 비해 높았다(Fig. 9). 키토산처리 전 농도에서 처리 후 7일째가 14일째에 비해 높은 효소활성을 나타내었고, 처리 7일째의 효소활성은 도열병병원균의 단독 접종에 비해 키토산 처리시가 다산, 일

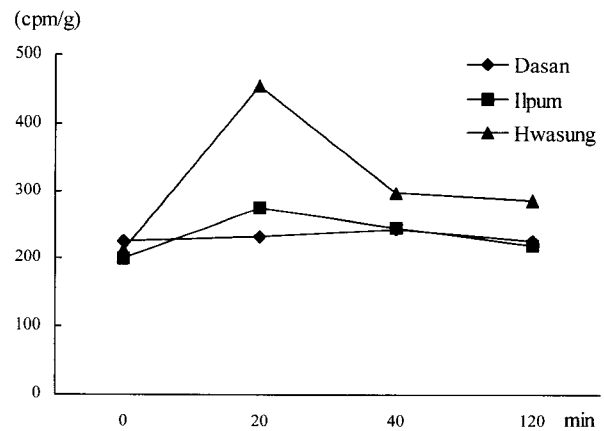


Fig. 8. Change of diterpene cyclase activity in rice leaves after UV-B irradiation.

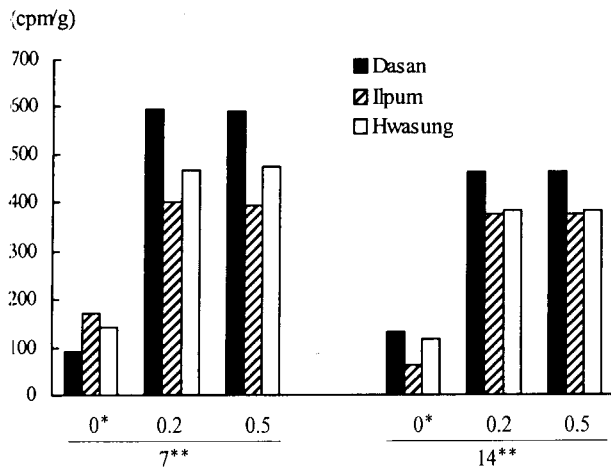


Fig. 9. Change of diterpene cyclase activity in rice leaves treated with chitosan and *P.oryzae*.

\*Concentration of chitosan (%)

\*\*Days after inoculation

품, 화성에서 각각 6.4배, 2.3배, 3.3배 높았고, 특히 저항성 품종인 다산이 가장 큰 폭으로 증가하였다. 도열병 병원균 단독접종 7일 후에 다산품종의 식물체는 일품과 화성에 비해 낮은 효소 활성을 나타내었고, 키토산 처리하는 농도에 관계없이 일품과 화성에 비해 높게 나타났다.

키토산 처리에 의한 diterpene cyclase의 활성증가는 Ren과 Charles[12]이 보고한 벼의 현탁배양세포에 키토산 처리는 oligogalacturonide의 처리시보다 높은 diterpene cyclase 활성을 나타내었다는 보고와 일치하였으나, 처리 농도가 증가할 수록 활성이 증가한다는 Ren과 Charles[12]의 보고와는 상이하였다. 이러한 결과는 벼의 키토산 처리는 무처리 에 비해 phytoalexin 물질의 유도에 효과적인 것으로 생각 된다.

## 요 약

UV-B와 도열병병원균 접종 등의 환경스트레스에 의한 벼의 POD, SOD 및 Diterpene cyclase등의 활성 변화를 조사하여 해 본 결과, 일품벼에서 POD와 SOD활성이 가장 높았고, 도열병진전에 따른 POD 활성은 감수성 품종인 일품과 화성은 증가하였으나 저항성 품종인 다산은 감소하였다. 키토산 처리에 의한 SOD의 활성 변화는 처리 농도가 높을 수록 증가하였다. 키토산 처리후 14일에서의 감수성 품종

인 화성의 SOD 활성은 무처리 식물체에 비하여 높았다. UV-B 조사 시간이 길수록 감수성품종인 일품의 POD 활성은 감소하였고, 저항성품종인 다산은 증가하였다. 특히 UV-B의 조사시간에 따른 다산의 POD활성은 차가 없었으나, 화성의 활성은 40분 조사 처리시 2배 높았다. UV-B 처리에 비해 *P. oryzae*를 접종하는 diterpene cyclase의 활성이 높아졌으며, 병원균 접종 후 5일까지 효소활성이 점진적으로 증가하였다.

## 감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부 학술진흥재단 과학기술중점 연구과제 연구비에 의하여 지원되었음.

## 참 고 문 헌

- Allen, R.D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol*, **107**, 1049-1054.
- Alscher, R.G. and J.L. Hess. 1993. Antioxidants in higher plants. *CRC Press, Boca Raton*, 1-17.
- Bowler, C., L. Slooten, S. Vandenbranden, R. De Rycke, J. Botterman, C. Sybesma, M. Van Montague and D. Inzé 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* **10**, 1723-1732.
- Daniel, M. and R. Purkayastha. 1995. *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*. pp.11-615, Marcel Dekker, Inc.
- Endress, A.G., S.J. Susrez and O.C. Taylor. 1980. Peroxidase activity in plant leaves exposed to gaseous HCl of ozone. *Environ. Pollut.* **22**, 47-58.
- Gyung, H.H., B.W. Yun, H.S. Lee, J.K. Jo and S.S. Kwak. 1998. Overproduction of sweet potato peroxidases in transgenic tobacco plants. *Phytochemistry*. **47(5)**, 695- 700.
- Kaliappan, K. and G.S.R. Subba Rao. 1996. An Expedient Route to the Preparation of Key Intermediates for the Total Synthesis of Aphidaclin, Stomodol and Oryzaalexin S<sup>1</sup>. *Tetrahedron Letters*, **37(46)**, 8429-8430.
- Karen, A. and A. Charles. 1992. Biosynthesis of Rice Phytoalexin: Identification of Putative Diterpene Hydrocarbon Precursors. *Archives of Biochem. and Bio-*

- physiol.*, **293(2)**, 320-332.
9. McCord, J. M. and I. Fridovich. 1996. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
  10. Osamu, K., S. Takashi, M. Junichi and A. Tadami. 1988. Ultraviolet-induced Accumulation of Phytoalexins in Rice Leaves. *Agric. Biol. Chem.* **52(10)**, 2469-2473.
  11. Rao, M.V., G. Paliyath and D.P. Ormrod. 1996. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **110**, 125-136.
  12. Ren, Y.Y. and A. Charles. 1992. Elicitation of Diterpene Biosynthesis in Rice (*Oryza sativa* L) by Chitin. *Plant Physiol.* **99**, 1169-1178.
  13. Runeckless, V.C. and S.V. Krupa. 1994. The impact of UV-B radiation and ozone on terrestrial vegetation. *Environ. Pollut.* **83**, 1991-213.
  14. Tepperman, J.M. and P. Dunsmuir. 1990. Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol. Biol.* **14**, 501-511.
  15. Vivian, M., O. Jonathan, J. Renee and B. Jeffrey. 1997. Difference in Phytoalexin Response among Rice Cultivars of Different Resistance to Blast. *Phytochem.* **44(4)**, 599-603.
  16. West, C. A. 1981. Biosynthesis of isoprenoid compounds, pp.376-411 In Porter, J. W. and S. L. Spurgeon (eds.), Vol 1, Wiley, New York.